

Doctorado en Ingenierías Química, Mecánica y de Fabricación

TESIS DOCTORAL

**VALORIZACIÓN DE RESIDUOS DEL CULTIVO DEL
PLÁTANO PARA LA PRODUCCIÓN DE PIENSOS DE
ACUICULTURA**

Autora:

Sara Ester Díaz Guzmán

Directores:

Antonio Nizardo Benítez Vega

Zaida Cristina Ortega Medina

Las Palmas de Gran Canaria

Septiembre de 2021

**D Mario Domingo Monzón Verona COORDINADOR/A DEL
PROGRAMA DE DOCTORADO Ingenierías Química, Mecánica y de
Fabricación DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN
CANARIA**

INFORMA,

De que la Comisión Académica del Programa de Doctorado, en su sesión de fecha tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "Valorización de residuos del cultivo del plátano para la producción de piensos de acuicultura" presentada por la doctorando/a D^a Sara Ester Díaz Guzmán y dirigida por el Doctor Antonio Nizado Benítez Vega y la Doctora Zaida Cristina Ortega Medina.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 11 del Reglamento de Estudios de Doctorado (BOULPGC 04/03/2019) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a...de.....de dos mil veintiuno.

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

ESCUELA DE DOCTORADO

Programa de doctorado Ingenierías Química, Mecánica y de
Fabricación

Título de la Tesis: Valorización de residuos del cultivo del plátano para
la producción de piensos de acuicultura

Tesis Doctoral presentada por D/D^a Sara Ester Díaz Guzmán

Dirigida por el Dr. D. Antonio Nizardo Benítez Vega

Codirigida por la Dra. D^a Zaida Cristina Ortega Medina

Las Palmas de Gran Canaria, a 23 de septiembre de 2021

El Director,

La Codirectora

La Doctoranda,

(firma)

(firma)

(firma)

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis. A Nizado, por el apoyo que me ha brindado siempre y por la confianza que ha depositado en mí desde que llegué al grupo. A Zaida, gracias por estar siempre ahí, tanto en lo profesional como en lo personal, y por ayudarme a permanecer en Tadasana.

A todos los miembros del grupo de investigación cuyo coordinador es Mario Monzón, quienes de diferente forma me han ayudado en el desarrollo de este trabajo pero que, sobre todo, me han hecho el camino más ameno con buenos momentos, desayunos y risas compartidos en el día a día.

Gracias a Lidia Robaina y a todos los compañeros del GIA por abrirme las puertas de su laboratorio y estar siempre dispuestos a enseñarme y ayudarme.

A Conceição, por acogerme en su familia y por darme la oportunidad de trabajar en el CEBAL. Gracias a Ivone y al resto de compañeros del grupo por toda su ayuda.

A Luis Duarte, por recibirme en el LNEG como parte del grupo y por todos los conocimientos que me ha transmitido. Gracias también a Diogo, Florbela, Patricia y todos los demás miembros del laboratorio.

I would like to thank Leonidas Matsakas for offering me the opportunity of working in his research group at the LTU and for his nice and kind help. Thanks also to all the members of the group who has helped me and to the Winter Swimmers.

Por último, a nivel personal, no puedo dejar de agradecer a todas las personas que han estado ahí todo este tiempo. Un trabajo de investigación es también fruto del apoyo que nos ofrecen las personas que nos quieren, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que esto requiere. En particular, quiero dar las gracias a mis padres, que me han enseñado la importancia del sacrificio, que me han apoyado en todas mis elecciones y que con su presencia y cariño me han ayudado a continuar.

También tengo que dar las gracias a todos los amigos que tengo la suerte de tener (la crema Team, mis compañeros de Touch, mis amigos del Luis Corti, La Escuelita DD...) que me han apoyado estos años y que, sin haber hecho una tesis muchos de ellos, saben lo que puede llegar a suponer después de haberme aguantado tantas quejas.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Referencia de la ayuda FPU15/03138).

RESUMEN

El cultivo del plátano genera una gran cantidad de residuos vegetales como consecuencia de que la planta solo da fruto una vez y, tras la cosecha, esta es cortada, produciéndose, por cada tonelada de fruta cultivada alrededor de cuatro toneladas de residuos. La creciente tendencia hacia una utilización más eficiente de los residuos agroindustriales y la cantidad de residuos generada en esta actividad, así como la problemática que supone su gestión, han despertado interés en los mismos por parte de la comunidad científica. En los últimos años han surgido numerosos estudios en los que se analiza la composición de las diferentes fracciones de subproductos generadas y la posibilidad de obtener, a partir de ellos, productos de valor añadido.

En el presente trabajo de tesis se estudió la posibilidad de obtener, a partir de residuos del cultivo del plátano, compuestos de interés para su uso en piensos de acuicultura, concretamente antioxidantes y oligosacáridos con potencial prebiótico. Como materias primas se han empleado la pulpa que se genera en el proceso de extracción mecánica de la fibra del pseudotallo de la planta, el raquis y el plátano que es descartado en los centros de empaquetado. A continuación, se presenta una breve descripción de los ensayos experimentales llevados a cabo y de los resultados que se han obtenido a partir de los mismos.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

En primer lugar, se realizó una caracterización química de los tres materiales en la que se determinaron sus principales componentes: análisis proximal (humedad, contenido en cenizas, proteínas, lípidos) y caracterización de la fracción de carbohidratos (contenido en almidón, celulosa, hemicelulosa, lignina). Los tres materiales se encuentran formados mayoritariamente por carbohidratos, aunque de diferente naturaleza en cada caso. El raquis y la pulpa, dada su naturaleza lignocelulósica, se componen de celulosa (26% la pulpa y 30% el raquis), hemicelulosa (19% para la pulpa y 15% para el raquis) y lignina, con bajos contenidos en lípidos (prácticamente nulo) y proteína (algo superior en el caso del raquis). La pulpa, además, presentó un contenido en almidón elevado (22%). El plátano, por otro lado, también presentó bajos contenidos en proteínas y lípidos siendo su componente mayoritario el almidón (57%). La caracterización química proporcionó un mayor entendimiento sobre la naturaleza de los tres subproductos, así como su comportamiento a la hora de procesarlos, lo cual fue importante para los posteriores tratamientos aplicados a los mismos.

OBTENCIÓN DE ANTIOXIDANTES NATURALES

Los alimentos para peces tienen un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que los hacen especialmente susceptibles a la oxidación, razón por la cual los piensos comerciales incluyen antioxidantes sintéticos, principalmente butil hidroxitolueno y etoxiquina. El empleo de estas sustancias influye además positivamente en la calidad del pescado. Sin embargo, los mencionados antioxidantes sintéticos han demostrado su participación en procesos cancerígenos, por lo que existe un creciente interés por encontrar antioxidantes naturales que, a diferencia de estos, no tengan efectos secundarios en el organismo. Dado que existían varios estudios resaltando el alto contenido en compuestos bioactivos de las distintas partes de la platanera, en la presente tesis se estudió la posibilidad de extraer dichos compuestos.

En primer lugar, se determinó el contenido máximo de polifenoles presentes en cada uno de ellos. El raquis es el que mayor contenido en polifenoles (TPC) presentó (1110.46 mg/100g de materia seca inicial), seguido por el plátano (823.42 mg/100 g de materia seca) y, en último lugar, la pulpa (408.61 mg/100g de materia seca). Tras esto, se llevó a cabo una optimización de las condiciones de operación empleando una tecnología de extracción simple y respetuosa con el medio ambiente, como es la extracción con etanol, disolvente además apto para alimentación. Para cada material se evaluó simultáneamente la influencia de la temperatura (24, 50 y 78 °C) y la concentración de etanol (20, 40 y 60%) sobre la extracción de los polifenoles. Como variables de respuesta se determinaron el contenido total de polifenoles (TPC), de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu, y la capacidad antioxidante, mediante el método de captura del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en los extractos. Los datos obtenidos se ajustaron a un polinomio, que se usó para determinar el punto óptimo. En general, temperaturas altas y concentraciones intermedias de etanol-agua dieron lugar a los mejores resultados para los tres materiales, siendo el porcentaje de etanol la variable que mayor impacto tuvo sobre la extracción de polifenoles. Una vez optimizadas la concentración y la temperatura de operación, se evaluó la influencia del tiempo (15-120 min), variable que tuvo menos influencia en las propiedades del extracto.

Finalmente, se realizó un experimento a mayor escala bajo las condiciones elegidas para cada material, se determinaron los rendimientos de extracción y caracterizaron los extractos mediante determinación de su contenido en polifenoles y actividad antioxidante. El mayor rendimiento de extracción, fue obtenido para el raquis (26.0%), seguido por la pulpa (16.2%) y el plátano (9.6%). Por otro lado, el extracto con mayor concentración de polifenoles fue el plátano (TPC de 27.26 mg/g extracto, correspondiente a 54.59 mg eq. Trolox/g extracto) seguido por el raquis (22.52 mg/g extracto, correspondiente a 42.5 mg eq. Trolox/g extracto) y finalmente la pulpa (10.17 mg/g extracto equivalentes a 15.16 mg eq. Trolox/g extracto).

OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS

A fin de resolver los problemas ocasionados por la intensificación de la actividad acuícola, como son la exposición al estrés y a enfermedades de los peces, se han desarrollado diversas estrategias como la aplicación de antibióticos y otros agentes profilácticos. Sin embargo, la tendencia cada vez más restrictiva por parte de las autoridades frente a la utilización de antibióticos, debido a los problemas que estos pueden acarrear y la presión hacia una acuicultura sostenible y rentable, ha impulsado la búsqueda de soluciones. Los prebióticos son uno de los suplementos dietéticos funcionales más estudiados. En este trabajo se estudió la hidrólisis de los carbohidratos presentes en la pulpa para así obtener oligosacáridos con potencial prebiótico.

En primer lugar, se evaluó la influencia de dos tipos de pretratamientos, previo a la hidrólisis enzimática para la producción de celo-oligosacáridos, cuyo objetivo era mejorar las propiedades del material y hacerlo más susceptible al ataque enzimático. Se exploró, por una parte, la autohidrólisis, pretratamiento que solo emplea agua como agente químico y que, además, permite la obtención de otro tipo de oligosacáridos de otras fracciones como la hemicelulosa o el almidón. Se operó bajo condiciones no isotérmicas, variándose la temperatura final del proceso (140 – 220 °C) y bajo condiciones isotérmicas a una temperatura fija de 140 °C y estudiándose, en ese caso, la influencia del tiempo de tratamiento (120 - 300 minutos). Además, se probó un pretratamiento de autohidrólisis no isotérmica realizado en dos etapas consecutivas de severidad incrementada. Por otro lado, se usó un pretratamiento químico con sosa, por ser de los más empleados dada su simplicidad y eficacia. En este caso, se empleó NaOH 1 N a temperatura ambiente y se evaluaron diferentes tiempos de tratamiento (4, 8 y 24 horas). Para ambos pretratamientos se analizó la composición de los sólidos obtenidos y se determinó su digestibilidad enzimática, como una

medida de la eficacia del tratamiento. Para el caso de los tratamientos de autohidrólisis, se analizó, además, la composición de los licores obtenidos.

Los dos pretratamientos permitieron alterar satisfactoriamente la estructura del material, dando lugar a mejoras en la digestibilidad. En el caso del tratamiento con sosa se logró alcanzar un valor de digestibilidad prácticamente del 100%. Para el caso de autohidrólisis, los valores de digestibilidad enzimática variaron entre 79% y 90% para las condiciones menos y más severas, respectivamente. Por otro lado, el pretratamiento de autohidrólisis permitió obtener un licor con un alto contenido en malto-oligosacáridos (24 g/100 g material prima) procedentes de la fracción de almidón, bajo unas condiciones de operación moderadas (factor de severidad de 2.3, correspondiente a una temperatura máxima de 150 °C). La autohidrólisis en dos etapas permitió obtener una mayor cantidad de oligosacáridos (30 g/100 g materia prima) y un sólido con mayor digestibilidad (97%).

A continuación, se evaluó la hidrólisis enzimática de la fracción de celulosa presente en la pulpa con el objetivo de obtener celo-oligosacáridos, compuestos que han mostrado tener capacidad prebiótica. En primer lugar, y dado el bajo contenido en lignina y el valor alto de digestibilidad obtenido para la pulpa sin tratar, se decidió probar la hidrólisis enzimática directa de este material. Se usó para ello un complejo enzimático celulasa (de *Trichoderma reesei*) disponible comercialmente. Se fijó el pH, la relación sólido-líquido, la temperatura y la velocidad de agitación y se evaluó la influencia de la carga de enzima (10, 30 y 45 FPU/g de materia prima seca) y el tiempo de tratamiento. Además, se estudió la influencia de suplementar el medio con pectinasa. Los rendimientos obtenidos para todas las condiciones probadas mostraron la necesidad de un pretratamiento.

Se estudió entonces la hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis, dadas las ventajas de este pretratamiento frente al alcalino (permite obtener valores de digestibilidad comparables a la vez que obtener oligosacáridos de otras fracciones de la biomasa, además del beneficio medioambiental). Se empleó el sólido pretratado mediante este tratamiento a dos temperaturas finales (150 y 170 °C). En este caso también se fijó el pH, la relación sólido-líquido, la temperatura y la velocidad de agitación y se evaluó la evolución del proceso a lo largo del tiempo empleando diferentes cargas del mismo complejo enzimático de celulasa (10 y 30 FPU/g de materia prima seca para el sólido pretratado a 170 °C (P170) y 10 y 1 FPU/g de materia prima seca para el sólido pretratado a 150 °C (P150)).

El uso de P150 presentó ventajas como son, por una parte, la posibilidad de obtener durante el pretratamiento una mayor cantidad de oligosacáridos en el licor (24.07 vs 16.05 g/100 g de materia prima para 150 y 170 °C, respectivamente) usando unas condiciones menos severas, con el consiguiente ahorro energético. En cuanto al rendimiento en celo-oligosacáridos obtenido durante la hidrólisis enzimática, se obtuvieron rendimientos similares (alrededor del 25%) con ambos materiales, con la ventaja de que la selectividad en oligosacáridos fue mayor para P150 (72% para P150 vs 58% para P170). Por otro lado, la hidrólisis de P150 empleando una carga de enzima baja (1 FPU/g ms), además del beneficio económico, permitió un mayor control del proceso, permitiendo un mayor control sobre la generación de glucosa. El máximo rendimiento en oligosacáridos obtenido fue del 28% con una selectividad del 72%, trabajando con P150, 1 FPU/g ms y un tiempo de reacción de 12 horas. Bajo estas mismas condiciones, pero con un tiempo de tratamiento muy inferior (1 h), se logró obtener una selectividad del 87%, aunque en ese caso el rendimiento en oligosacáridos fue bastante inferior (12.56%).

Una vez elegido el sólido P150 por las mencionadas ventajas, se intentó mejorar los rendimientos y selectividades obtenidos. Se evaluó, en primer lugar, el uso de una enzima pura,

la endo-1,4- β -D-glucanasa de *Aspergillus niger*, disponible comercialmente, con el objetivo de reducir la generación de monosacáridos, difícil de controlar al emplear el complejo enzimático. El uso de esta enzima pura permitió obtener una alta selectividad, pero rendimientos inferiores a los obtenidos empleando el complejo de celulasa. Por otro lado, se probaron 3 estrategias de hidrólisis en varias etapas, con intercambios del medio de reacción a intervalos regulares de tiempo, empleando para ello el sólido pretratado a 150 °C y carga de celulasa de 1 FPU/g de materia prima seca (condiciones elegidas del estudio de hidrólisis simple en una etapa). Sin embargo, el empleo de una estrategia formada por varias etapas no aportó mejoras ni en rendimientos ni en selectividad, al compararse con el empleo de una única etapa de 12 horas de duración.

Finalmente, se evaluó la capacidad de dos cepas bacterianas probióticas (*Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus plantarum*) de consumir el hidrolizado obtenido mediante hidrólisis enzimática como prueba preliminar de su potencial prebiótico. Ambas bacterias fueron capaces de consumir el hidrolizado.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que los subproductos del cultivo del plátano que han sido estudiados en la presente tesis presentan compuesto de interés para su uso en acuicultura. Por un lado, los tres materiales y, en especial el raquis, se sitúan como una fuente interesante de antioxidantes naturales que pueden ser extraídos mediante una tecnología de extracción simple y respetuosa con el medio ambiente y fácilmente escalable, como es la extracción con etanol, disolvente además apto para alimentación.

Por otro lado, la pulpa procedente del pseudotallo de la platanera, pretratada mediante autohidrólisis bajo condiciones moderadas, es una buena candidata para la producción de celooligosacáridos, con potencial prebiótico, mediante hidrólisis enzimática, empleando una dosis muy baja (1 FPU/g ms) de un complejo enzimático de celulasa disponible comercialmente y mediante una estrategia simple.

SUMMARY

Banana crops produce a great amount of wastes due to the fact that banana plants only bear fruit once in its lifecycle and that once they have been harvested, the plant is cut, producing around four tons of lignocellulosic wastes per ton of fruit harvested. The increasing trend emerging in recent years towards a more efficient utilization of agro-industrial residues, combined with the high amount of wastes available in this sector, as well as the problems associated to their management, have raised the interest of the scientific community. This is reflected in the numerous studies found in literature addressing the characterization of the different by-products generated in the agricultural sector and the possibility of obtaining high value added products from them.

In this research work, the possibility of obtaining compounds of interest to be applied in the aquaculture sector, from by-products generated in the banana crop was evaluated. The pulp generated during the mechanical fiber extraction of banana's pseudostem was the main subject of study. Rachis and discarded bananas were also considered. On the one hand, the possibility of extracting natural antioxidants from the three mentioned by-products was evaluated. In the case of the pulp, the possibility of producing oligosaccharides was also evaluated. A brief description of the experimental test conducted in this thesis as well as the main results obtained are included below.

CHEMICAL CHARACTERIZATION

Firstly, a chemical characterization of the three by-products was conducted in order to determine their main constituents: proximate analysis (moisture, ash protein and lipids contents) and characterization of the carbohydrate fraction (starch, cellulose, hemicellulose and lignin). The three materials were mainly composed of different types of carbohydrates. The pulp and the rachis, both lignocellulosic, were mainly composed of cellulose (26% for the pulp and 30% for the rachis), hemicellulose (19% the pulp and 15% the rachis) and lignin, with minor presence of lipids (close to zero) and protein (slightly upper for rachis). The pulp also presented a high content of starch (22%). The discarded bananas also showed low lipids and protein contents, being starch the main component (57%). The chemical characterization provided a better understanding of the nature of the three materials and their behavior when they were processed, which was important for the entire study.

NATURAL ANTIOXIDANTS' EXTRACTION

Fish food contains a high presence of long chain polyunsaturated fatty acids, which makes it particularly vulnerable to oxidation, reason why they incorporate synthetic antioxidants, commonly butylated hydroxytoluene and ethoxyquin. The use of these compounds also has a positive effect on the fish quality. However, in recent years great attention has been paid to using natural antioxidants, due to studies indicating possible adverse effects that may be related to the consumption of synthetic antioxidants. There are different studies that have shown that different fractions of banana by-products present compounds with significant antibacterial and antioxidant properties and thus, in this thesis the possibility of recovering this compounds was evaluated.

First, total polyphenols content was determined. Comparing the three materials, the rachis had the highest amount of polyphenols (1110.46 mg/100g raw material), followed by the

discarded bananas (823.42 mg/100 g raw material) and finally the BPP (408.61 mg/100g raw material). Then, the optimization of the antioxidant extraction using a simple and green technology, as ethanol extraction, solvent besides safe for feeding, was conducted. The influence of the temperature (24, 50 y 78 °C) and aqueous ethanol concentration (20, 40 y 60%) on extract properties (total phenols content (TPC) and antioxidant activity) was firstly analyzed. 78 °C and ethanol concentrations close to 50% yielded the best results for the three materials, being the ethanol concentration the most affecting variable. The equations obtained by the response surface methodology gave a satisfactory description of the experimental data, allowing optimizing the extraction conditions. Under optimized conditions, time influence (15-120 min) was then assessed, although this parameter seemed not significantly influence results. Among the three by-products, rachis extract (60% Et-OH, 78 °C and 30 min) presented the highest TPC (796 mg gallic acid/100 g of dried material) and antioxidant activity (6.51 mg Trolox equivalents/g of dried material), followed by discarded banana and pseudostem pulp.

Finally, under the optimal conditions, experiments were performed at a larger scale, allowing to determine the extraction yields (EY) and to characterize the extracts. The highest EY was obtained for the rachis (26%), followed by the pulp (16.2%) and the discarded bananas (9.6%). On the other hand, the banana extract was the one with the highest polyphenol content (TPC of 27.26 mg/g extract corresponding to 54.59 mg Trolox equivalents/g extract), followed by the rachis (22.52 mg/g extract corresponding to 42.5 mg Trolox equivalents/g extract) and the pulp (10.17 mg/g extract corresponding to 15.16 mg Trolox equivalents/g extract).

OLIGOSACCHARIDES PRODUCTION

The intensification of aquaculture practices and changes in dietary habits of the species has translated into an increase in stress level on the animal and illness and antibiotics have been used as feed supplements to treat them. However, pressures to find alternatives to medicinal disease treatments are rising, due to concerns over antibiotic use in aquaculture. Alternatives to antibiotics include dietary prebiotics, probiotics and symbiotics and among them, oligosaccharides have recently received much attention from researchers owing to their multiple biological activities. In this research work, the hydrolysis of carbohydrate fraction of the pulp was studied with the objective of obtaining oligosaccharides with prebiotic potential.

The study of the impact of two pretreatments, as a previous step to enzymatic hydrolysis for cello-oligosaccharides production, was evaluated. The objective of the pretreatment was to improve the characteristics of the material to make it more susceptible to enzymes' attack. On the one hand, the autohydrolysis treatment, which only uses water as chemical agent and that, besides, allows to obtain other kind of oligosaccharides coming from other fractions like hemicellulose or starch, was evaluated. Isothermal and non-isothermal autohydrolysis was tested. In the first one, the temperature was fixed at 140 °C and the effect of the time of treatment (120 - 300 minutes) was evaluated. In the second one, different final temperatures, and consequently times, were tested (140 – 220 °C). Two stage autohydrolysis, with increasing severity, was also studied. On the other hand an alkaline pretreatment was also tested, as it is one of the most used pretreatments given its simplicity and efficacy. 1N NaOH was used at room temperature and the influence of the treatment time (4, 8 and 24 h) was studied. For both pretreatments, the composition and enzymatic digestibility of the pretreated solids obtained was determined. In the case of autohydrolysis treatments, also the composition of the liquors were analyzed.

Both tested pretreatments satisfactory disrupted the morphological structure of the pulp and improved results were obtained during enzymatic digestibility assay. Enzymatic digestibility

values close to 100% were obtained with alkaline pretreated solids. For autohydrolysis pretreatment, the digestibility of the solid fractions varied between 79% and 90% for less and more severe conditions, respectively. On the other hand, the autohydrolysis pretreatment allowed to obtain a liquor rich in malto-oligosaccharides (24 g/100 g raw material) coming from starch fraction using mild operational conditions (severity factor of 2.3, corresponding to a maximum temperature of 150 °C). Two stage autohydrolysis, with increasing severity, allowed to obtain a higher amount of oligosaccharides (30 g/100 g raw material) and higher digestibility of the remaining solid (up to 97%).

The enzymatic hydrolysis of the cellulosic fraction of the pulp to obtain cello-oligosaccharides was then studied; these cello-oligosaccharides are compounds whose prebiotic potential has been proven on the literature. First, due to the low lignin content and high digestibility of the pulp, direct enzymatic hydrolysis of the untreated material was evaluated. A cellulose complex from *Trichoderma reesei* commercially available was used. pH, solid-liquid rate, temperature and agitation speed were fixed and the influence of the enzyme dosage was studied along the time (10, 30 y 45 FPU/g of dry material). Besides, pectinase supplementation influence was also tested. The low enzymatic yields obtained demonstrated that the pretreatment is a key factor for the efficient enzymatic hydrolysis of this material.

On the other hand, autohydrolysis pretreated pulp at two different final temperatures 150 °C (P150) and 170 °C (P170) were chosen for enzymatic hydrolysis. In this case also the pH, the solid-liquid rate, the temperature and the agitation speed were fixed and the influence of the enzyme dosage was studied along the time. For P170, 10 and 30 FPU/g DB were used. On the other hand, EH of P150 was carried out with 10 and 1 FPU/g DB of cellulase.

Autohydrolysis treatment at 150 °C presented some advantages as a pretreatment method in comparison to 170 °C. On the one hand, at 150 °C a higher amount of OS was produced in the liquor (24.07 vs 16.05 g/100 g of raw material for 150 and 170 °C, respectively) using less severe conditions, with the consequent energy savings. Considering oligosaccharides yield, similar yields (around 25%) were achieved with both materials, with the advantage that working with P150 a higher OS selectivity was obtained (72% for P150 vs 58% for P170). On the other hand the use of a very low dosage (1 FPU/g DB), besides the cost savings, enabled a better control of the process, with a greater stability of the cello-oligosaccharides and a very slow glucose production rate. The best yield in cello-oligosaccharides was 28%, with a selectivity of 72%, working with P150, 1 FPU/g DB and a reaction time of 12 h. Under these conditions, but using a treatment time of 1 h, a higher selectivity of 87% can be obtained, although accompanied by much lower yield in oligosaccharides (12.56%).

Due to the advantages of working with P150, the possibility of improving oligosaccharides yields and selectivity working with this material was explored. On the one hand, a purified endo-1,4- β -D-glucanase of *Aspergillus niger*, commercially available, was used in order to avoid the glucose generation. More difficult to control when an enzymatic complex is used. The use of an endo-glucanase produced high oligosaccharides selectivity but lower yield, compared with the use of the complex of cellulase. On the other hand 3 different multi-stage hydrolysis strategies with buffer exchange at regular intervals of time were tested. For this, P150 and 1 FPU/g DB were used. If the 12 h single stage strategy is compared with the multi-stage, both yield in OS production and the OS selectivity are very close, and so it seems that the single strategy constitutes a better treatment strategy for banana crops by-products.

Finally, valuation of the capacity of two probiotic bacteria of the *Lactobacillus* genus (*Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus plantarum*) to consume the hydrolysate obtained by

enzymatic hydrolysis of the pulp, was evaluated. Both bacteria were able to consume the cello-oligosaccharides.

CONCLUSIONS

The results obtained show that banana crops by-products under study in the present thesis contain different compounds in their composition that can be find application in aquaculture sector. On the one hand, the three materials, and specially the rachis, might constitute a good source of phenolic compounds that can be extracted using a simple, environmentally friendly and easily scalable to an industrial level technology as it is ethanol extraction, solvent that, besides, is Generally Recognized As Safe (GRAS).

On the other hand, banana's pseudostem pulp, pretreated under mild operational conditions, is a good candidate for cello-oligosaccharides production, with prebiotic potential, by enzymatic hydrolysis using a very low dosage (1 FPU/g DB) of a commercially available cellulase with a simple strategy.

Contenidos

Capítulo 1. Introducción.....	19
Capítulo 2. Marco teórico. Estado de la técnica.....	31
Capítulo 3. Caracterización de la materia prima.....	85
Capítulo 4. Extracción de antioxidantes.....	113
Capítulo 5. Obtención de oligosacáridos a partir de la pulpa: pretratamiento.....	141
Capítulo 6. Obtención de oligosacáridos a partir de la pulpa: hidrólisis enzimática.....	169
Capítulo 7. Conclusiones y líneas futuras.....	201
Anexos.....	215

Capítulo 1. Introducción

Contenido

1. Objetivos	23
2. Plan de trabajo.....	24
3. Estructura del documento.....	25
4. Objectives.....	26
5. Work plan.....	27
6. Structure of the document	28

En este capítulo se incluyen los objetivos planteados al inicio de la tesis y el plan de trabajo seguido para la consecución de dichos objetivos, así como un apartado en el que se presenta la estructura del documento, con una breve descripción de la información incluida en cada capítulo. Además, puesto que el trabajo pretende acogerse a la mención internacional, esta información se incluye también traducida al inglés.

1. Objetivos

En el presente trabajo de investigación se planteó como objetivo general la obtención, a partir de subproductos generados en el cultivo del plátano, de compuestos que pudieran ser incorporados en la elaboración de piensos para peces. Si bien como principal material de partida se eligió la pulpa que se genera en el proceso de extracción mecánica de la fibra del pseudotallo de la platanera, también se planteó la posibilidad de utilizar otros dos subproductos, el plátano de rechazo y el raquis.

Se valoró, por un lado, la posibilidad de extraer antioxidantes naturales a partir de los tres subproductos mencionados y, por otro lado, para el caso de la pulpa, se exploró además la posibilidad de tratar el material a fin de obtener oligosacáridos con potencial prebiótico. Ambos compuestos son de interés para el ámbito de la alimentación animal en general y de la acuicultura en particular.

Para lograr este objetivo global, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización química de los tres subproductos, pulpa procedente del pseudotallo, raquis y plátano de rechazo, a fin de determinar sus principales componentes.
- Determinación del contenido total en polifenoles de los tres materiales y optimización de las variables de extracción para cada uno de ellos, empleando una extracción simple con etanol.
- Determinación de los rendimientos de extracción bajo las condiciones optimizadas y caracterización del contenido en polifenoles y capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de los tres subproductos.
- Estudio de la influencia de dos pretratamientos, alcalino y de autohidrólisis, sobre la composición y digestibilidad enzimática de la pulpa.
- Hidrólisis enzimática de la pulpa (original y pretratada mediante autohidrólisis) con el objetivo de obtener celo-oligosacáridos.
- Evaluación de la capacidad de bacterias probióticas de consumir el hidrolizado obtenido mediante hidrólisis enzimática.

2. Plan de trabajo

Para alcanzar los objetivos propuestos se llevaron a cabo las siguientes tareas principales, que se resumen en la Figura 1.

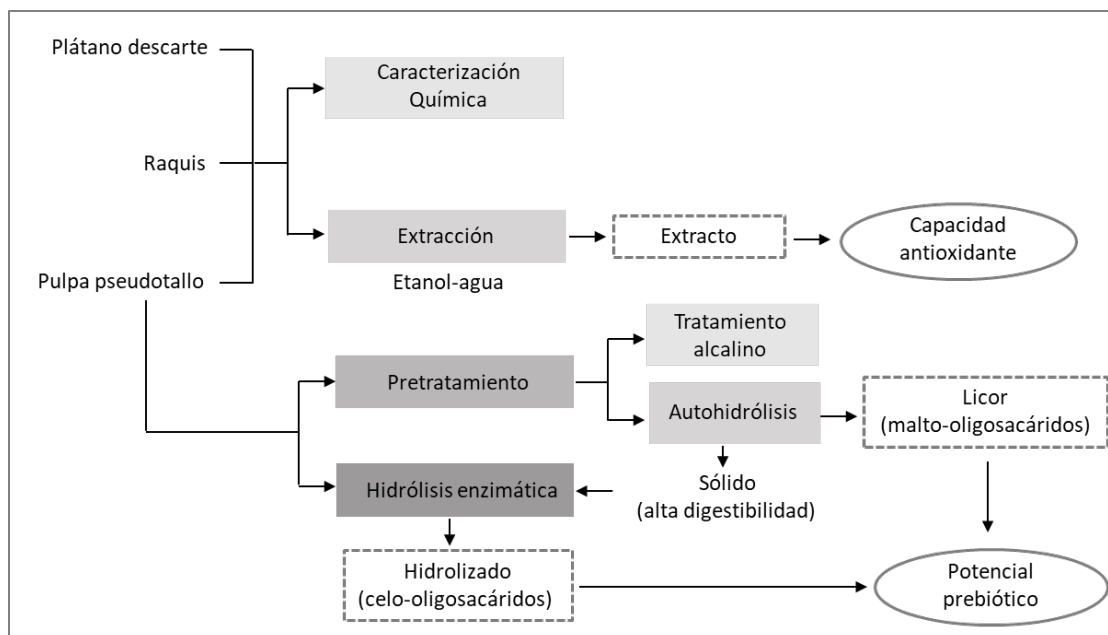


Figura 1. Plan de trabajo

1. Caracterización química de los tres subproductos, pulpa procedente del pseudotallo, raquis y plátano de rechazo.
 - Determinación de los principales componentes: análisis proximal (humedad, contenido en cenizas, proteínas, lípidos) y caracterización de la fracción de carbohidratos (contenido en almidón, celulosa, hemicelulosa, lignina).
2. Optimización de la extracción de antioxidantes de los tres subproductos.
 - Determinación del contenido total en polifenoles de los tres materiales.
 - Optimización de las variables de extracción. Estudio de la influencia de la temperatura, porcentaje de etanol y tiempo de extracción sobre la extracción de polifenoles y la capacidad antioxidante del extracto para cada subproducto.
 - Determinación de los rendimientos de extracción bajo las condiciones optimizadas. Para cada material se realizó una extracción a mayor escala, tras lo cual se llevó a cabo la concentración del extracto para la obtención del rendimiento de extracción y caracterización de dicho extracto mediante determinación de su contenido en polifenoles y actividad antioxidante.

3. Estudio del pretratamiento de la pulpa.

- Pretratamiento de autohidrólisis de la pulpa. Estudio de la influencia de la temperatura de tratamiento sobre la composición del licor obtenido y sobre la composición y digestibilidad enzimática del sólido pretratado resultante.
- Pretratamiento alcalino. Evaluación de la influencia del tiempo de tratamiento sobre la composición y la digestibilidad enzimática del sólido obtenido.

4. Evaluación de la hidrólisis enzimática de la fracción de celulosa de la pulpa.

- Hidrólisis enzimática de la pulpa sin pretratar. Evaluación de la influencia de la carga de enzima y el tiempo de reacción sobre el rendimiento total y el rendimiento en oligosacáridos.
- Hidrólisis enzimática del sólido pretratado mediante autohidrólisis a dos temperaturas finales de tratamiento. Para cada sólido, estudio de la influencia de la carga de enzima y el tiempo de reacción.
- Evaluación de una estrategia de hidrólisis enzimática en varias etapas bajo las condiciones optimizadas en las tareas anteriores.

5. Evaluación del potencial prebiótico del hidrolizado obtenido mediante hidrólisis enzimática.

- Evaluación de la capacidad de dos bacterias probióticas del género *Lactobacillus* de consumir el hidrolizado obtenido bajo las condiciones optimizadas.

3. Estructura del documento

El documento se estructura en siete capítulos en los que se incluye, en primer lugar, una introducción de algunos aspectos teóricos y estado del arte, seguido por cuatro capítulos en los que se incluyen los ensayos experimentales llevados a cabo, con su metodología y resultados obtenidos, un capítulo en el que se muestran las principales conclusiones extraídas del trabajo y líneas futuras y, finalmente, un apartado de anexos. Cada capítulo incluye su propio índice de tablas y figuras y referencias. Los capítulos se disponen de la siguiente forma:

- Capítulo 1: Introducción. Capítulo actual, en el que se incluyen los objetivos de la tesis, el plan de trabajo y la estructura del documento.
- Capítulo 2: Marco teórico. Estado de la técnica. Este capítulo contiene una introducción en la que se expone y justifica el problema que pretende abordar la tesis, incluyéndose algunos aspectos teóricos que se han tenido en cuenta para el desarrollo de la tesis, así como una revisión del estado del arte en cuanto al uso de subproductos del cultivo del plátano en general y en el ámbito de la acuicultura, sobre el uso de antioxidantes y oligosacáridos en piensos y sobre la obtención de estos compuestos a partir de materiales residuos vegetales.

- Capítulo 3: Caracterización de la materia prima. En este capítulo se describen los tres subproductos que han servido como materia prima para el estudio. Se incluye el protocolo de toma de muestras de los mismos, los procedimientos empleados en su caracterización y, finalmente, se exponen los resultados, realizándose una comparación entre los tres materiales.
- Capítulo 4: Extracción de antioxidantes. Se incluye el proceso de extracción seguido para la recuperación de los polifenoles de los tres subproductos, la descripción de los experimentos planteados y el tratamiento y análisis de los resultados obtenidos.
- Capítulo 5: Obtención de oligosacáridos a partir de la pulpa: pretratamiento. Se incluyen los procedimientos seguidos para llevar a cabo el pretratamiento de la pulpa, incluyéndose algunos aspectos teóricos y, a continuación, se exponen los resultados obtenidos, así como su análisis y comparación con trabajos previamente publicados.
- Capítulo 6: Obtención de oligosacáridos a partir de la pulpa: hidrólisis enzimática. En este capítulo se muestran todas las condiciones probadas en la hidrólisis enzimática de la pulpa, incluyéndose también en este caso, los protocolos seguidos para, a continuación, mostrar los resultados y su análisis. Se incluyen también los ensayos con bacterias realizados con el hidrolizado obtenido bajo las condiciones óptimas, como prueba preliminar de su potencial prebiótico.
- Capítulo 7: Conclusiones y líneas futuras. Este capítulo se divide en dos partes, una primera que contiene las principales conclusiones extraídas de la investigación y, a continuación, posibles líneas futuras de investigación en el campo.
- Anexos: este documento incluye parte de los resultados obtenidos en el desarrollo experimental de la tesis, que no fueron incluidos en los capítulos correspondientes para facilitar su lectura. Aunque no es necesario para el entendimiento del documento, este material se incluye de manera complementaria a fin de que pueda ser consultado en el caso de querer ampliar información. Además, se incluyen las publicaciones, tanto en congresos como en revistas con factor de impacto, derivadas de la investigación.

4. Objectives

The overall objective of this research work was the possibility of obtaining compounds of interest to be applied in the aquaculture sector, from by-products generated in the banana crop. The pulp generated during the mechanical fiber extraction of banana's pseudostem was the main subject of study. Rachis and discarded bananas were also considered.

On the one hand, the possibility of extracting natural antioxidants from the three mentioned by-products was evaluated. In the case of the pulp, the possibility of producing oligosaccharides was also evaluated. Both compound present interest to be applied in animal nutrition, in general, and in the aquaculture, particularly.

In order to reach such purpose, the following specific objectives were set:

- Chemical characterization of the three by-products, the banana's pseudostem pulp, the rachis and the discarded bananas, to determine their main constituents.
- Total polyphenols content determination for the three by-products and optimization of the variables of the extraction process for each material, using a simple extraction process with ethanol.
- Extraction yields determination under optimized conditions and characterization of the extracts obtained in terms of polyphenolic content and antioxidant activity.
- Study of the impact of two pretreatments, alkaline and autohydrolysis treatment, in the composition and enzymatic digestibility of the banana's pseudostem pulp.
- Enzymatic hydrolysis of the pulp (untreated and hydrothermally pretreated) with the objective of producing cello-oligosaccharides from its cellulosic fraction.
- Evaluation of the capacity of probiotic bacteria to consume the hydrolysate obtained by enzymatic hydrolysis of the pulp.

5. Work plan

In order to achieve the established objectives, the following tasks were carried out:

1. Chemical characterization of the three by-products, the banana's pseudostem pulp, the rachis and the discarded bananas.
 - Determination of the main constituents: proximate analysis (moisture, ash protein and lipids contents) and characterization of the carbohydrate fraction (starch, cellulose hemicellulose and lignin).
2. Optimization of antioxidants extraction process for the three by-products.
 - Total polyphenols content determination.
 - Optimization of the variables of the extraction process for each material. Study of the temperature, ethanol/water ratio and extraction time influence in polyphenols extraction and antioxidant capacity of the extracts.
 - Extraction yields determination under optimized conditions. For each material, the extraction was conducted on a larger scale, obtaining an extract that was lately concentrated and allowing the determination of the extraction yields and the characterization of the extracts through total phenolic content and antioxidant activity determinations.
3. Study of the pretreatment of the pulp.

Capítulo 1

- Autohydrolysis pretreatment. Evaluation of the temperature influence on the composition of the liquor and composition and enzymatic digestibility of the pretreated solid.
 - Alkaline pretreatment. Evaluation of the time of treatment on the composition and enzymatic digestibility of the pulp.
4. Evaluation of the enzymatic hydrolysis of the pulp.
- Enzymatic hydrolysis of untreated pulp. The influence of the enzyme dosage and reaction time on the total yield and cello-oligosaccharides yield.
 - Enzymatic hydrolysis of pretreated pulp by autohydrolysis at two different final temperatures. For both pretreated fractions, the influence of the enzyme dosage and reaction time was evaluated using two different enzymes.
 - Evaluation of a multi-stage strategy on the yields obtained in the enzymatic hydrolysis using previously optimized dosage on enzyme.
5. Prebiotic potential evaluation of the hydrolysate obtained under optimized conditions.
- Evaluation of the capacity of two probiotic bacteria of the *Lactobacillus* genus to consume the hydrolysate obtained by enzymatic hydrolysis of the pulp.

6. Structure of the document

The document is structured in seven chapters in which, first, an introduction about some theoretical aspects and a revision of the state of the art is included, followed by four chapters where experimental tests are exposed, including the protocols and the results obtained, a chapter in which the conclusions are summarized and the possible future research lines are stated and finally, annexes are included. In each chapter, its own list of illustrations and tables and bibliography are included. The chapters are distributed as follows:

- Chapter 1: Introduction. It includes the objectives proposed as well as the work plan and the explanation of the structure of the document.
- Chapter 2: Theoretical framework. State of the technique. This chapter contains an introduction explaining the problem that this research work aims to address, some theoretical aspects that are important to the understanding of the work as well as a revision of the state of the art, referred to the possible uses of the banana crops by-products in general and particularly in the aquaculture sector, antioxidants and oligosaccharides used in aquaculture and about the process to obtain these compounds from vegetal wastes.

- Chapter 3: Chemical characterization. In this chapter, the three raw materials under study are described. The sampling protocol, the characterization procedures and, finally, the results obtained are included.
- Chapter 4: Antioxidant's extraction. This chapter reflects the procedure followed for the polyphenols recovery from the three materials, the description of the list of experiments conducted and analysis of the results.
- Chapter 5: Oligosaccharides production from the pulp: pretreatment. This chapter contains a description of the autohydrolysis process and alkaline pretreatment, the procedures followed for the pretreatment of the pulp and the protocols to evaluate the effectiveness. The results obtained are exposed and compared with previously published work on this area.
- Chapter 6: Oligosaccharides production from the pulp: enzymatic hydrolysis. This chapter contains the conditions tested in the enzymatic hydrolysis of the untreated and pretreated pulp. The procedures are described, and the results obtained are exposed and interpreted. The protocol and results obtained in the prebiotic potential evaluation of the hydrolysate are shown.
- Chapter 7: Conclusions and future research lines. This chapter shows the main conclusions extracted from the different tests carried out, as well as an outline of future research lines in this field.
- Annexes: this document includes some of the results obtained in the thesis and that were not included in the memory in order to facilitate the reading of the document. Although this information is not necessary for the understanding of the document, it is included to be consulted in case of considered interesting. Moreover, the publications derived from the research are included.

Capítulo 2. Marco teórico. Estado de la técnica

Contenido

1. Introducción	35
2. El cultivo del plátano.....	39
2.1. Producción y consumo de plátano.....	39
2.2. Morfología de la planta	40
2.3. Subproductos generados en el cultivo del plátano	40
2.4. Posibilidades de aprovechamiento de los subproductos generados en el cultivo del plátano	42
3. El sector de la acuicultura	44
3.1. Importancia de la acuicultura	44
3.2. La alimentación en la acuicultura.....	45
3.3. Ingredientes alternativos en la elaboración de piensos de acuicultura	47
4. Antioxidantes naturales.....	49
4.1. Importancia de los antioxidantes.....	49
4.2. Fuentes de antioxidantes naturales.....	50
4.3. Antioxidantes naturales probados en acuicultura.....	52
4.4. Proceso de extracción de los antioxidantes naturales.....	54
5. Oligosacáridos como prebióticos	56
5.1. Propiedades prebióticas de los oligosacáridos	57
5.2. Prebióticos en acuicultura	58
5.3. Obtención de oligosacáridos a partir de materiales lignocelulósicos.....	59
5.3.1. Estructura materiales lignocelulósicos	59
5.3.2. Obtención de celo-oligosacáridos a partir de la biomasa lignocelulósica	61
6. Índice de tablas y figuras.....	66
6.1. Índice de tablas.....	66
6.2. Índice de figuras	66
7. Bibliografía	67

Este capítulo contiene algunos aspectos teóricos que se han tenido en cuenta para el desarrollo de la tesis, así como una revisión del estado del arte.

En primer lugar, se incluye una introducción en la que se comentan algunos aspectos sobre la situación actual de los dos sectores relacionados en la tesis, el del cultivo del plátano y el de la acuicultura, su importancia y el crecimiento experimentado en los últimos años, así como algunas de las limitaciones con las que se encuentran actualmente y de qué manera la presente tesis pretende, en parte, contribuir a su avance.

A continuación, se profundiza un poco más en ambos sectores. Por un lado, se incluye datos sobre la producción y consumo del plátano, se describe la planta y las características de su cultivo, que conlleva la generación de una gran cantidad de residuos. Tras esto, se hace una revisión del estado del arte, en la que se incluyen las posibilidades de aprovechamiento de estos subproductos, tanto las usadas tradicionalmente como las que se encuentran bajo estudio. Por otro lado, se muestran datos de la producción acuícola y consumo y sobre las necesidades en las mejoras en la alimentación de las especies, tanto en la búsqueda de fuentes alternativas que permitan abaratar costes, como en la posibilidad de incorporar aditivos a los piensos que mejoren el estado de salud de los peces. Con esto se pretende poner de manifiesto la importancia económica de estos sectores y, por tanto, el beneficio que traería su mejora, aspecto en el que pretende contribuir este estudio.

En el siguiente capítulo se incluyen algunos aspectos básicos sobre los antioxidantes y las fuentes de antioxidantes naturales, destacándose la presencia de este tipo de compuestos en las distintas partes de la platanera, formas de extraerlos y un estado del arte sobre el uso de antioxidantes naturales en el sector de la acuicultura.

Finalmente, en el último capítulo se describen las propiedades prebióticas de los oligosacáridos y se hace una revisión sobre los aplicados en acuicultura. A continuación, se describen los oligosacáridos que pueden ser obtenidos a partir de los residuos lignocelulósicos (como son los residuos obtenidos de la platanera), centrándose en los celo-oligosacáridos y en su proceso de obtención.

1. Introducción

El plátano es la segunda fruta, después de los cítricos, producida a nivel mundial [1]. Esta se cultiva en más de 130 países y cuenta con una producción mundial que cada año se encuentra en torno a los 117 millones de toneladas, con aproximadamente 5.5 millones de hectáreas cultivadas [2]. En concreto en las Islas Canarias, se producen anualmente 0.4 millones de toneladas, situándose como el mayor productor de la Unión Europea [3].

El cultivo del plátano va acompañado de una gran cantidad de residuos, de los cuales los restos vegetales representan la mayor parte[4]. Estos residuos se generan en la propia plantación (pseudotallo, hojas y flor), como consecuencia de que la planta solamente da fruto una vez y es necesario cortar el pseudotallo tras la recolecta para permitir un crecimiento óptimo del hijo, y de la clasificación y empaquetado (raquis y plátanos de descarte). Se estima que por cada hectárea cultivada se generan cerca de 220 toneladas de residuos vegetales [5], lo cual supone unos 1 210 millones de toneladas de residuos al año (alrededor de cuatro toneladas por cada tonelada de fruta cosechada [6]), en su mayoría actualmente inutilizados.

La creciente tendencia hacia una utilización más eficiente de los residuos agroindustriales y la cantidad de residuos generada anualmente en esta actividad, así como la problemática que supone su gestión, han despertado interés en los mismos por parte de la comunidad científica. Así lo reflejan los numerosos estudios encontrados en la literatura en los que se analiza la composición de las diferentes fracciones de subproductos generadas [7–10] y la posibilidad de obtener, a partir de ellos, productos de valor añadido. Las aplicaciones propuestas en los estudios encontrados son muy variadas. Algunos ejemplos incluyen la obtención de fibra, producción de biogás, almidón, ácido láctico, enzimas lignolíticas o fertilizantes orgánicos, entre otros [7]. En el apartado 2.4 “Posibilidades de aprovechamiento de los subproductos generados en el cultivo del plátano” se incluye una revisión más profunda de los estudios encontrados.

De especial interés para este estudio son los trabajos encontrados en relación a la cantidad de compuestos antioxidantes presentes en los distintos subproductos [11–17], que se detallan en el apartado 4.2 “Fuentes de antioxidantes naturales”. Existe también una gran cantidad de estudios que se centran en la obtención de bioetanol y que han servido de referencia para los ensayos llevados a cabo con el objetivo de obtener oligosacáridos con potencial prebiótico, pues los tratamientos aplicados son comunes [18–20].

Por otro lado, con el estancamiento de la actividad pesquera, el sector de la acuicultura se enfrenta en la actualidad al reto de tener que hacer frente a la demanda, cada vez más creciente, de pescado. El consumo mundial de pescado per cápita ha alcanzado un valor de 20.5 kg por año y se espera que para 2050 aumente en un 58% [21]. La producción mundial de pescado se estima en unos 179 millones de toneladas en 2018, siendo el 50% de este pescado producido por la acuicultura [21]. Aunque en los últimos 50 años el sector ha estado en constante crecimiento, existen una serie de retos que aún deben ser superados para que esta industria crezca tanto como se espera y pueda hacer frente a este consumo creciente, entre los que la alimentación de los animales es un elemento clave de su sostenibilidad. La alimentación representa alrededor del 50% del coste de producción [22] y, por tanto, su efecto sobre la rentabilidad es muy elevado. Además de investigaciones sobre fuentes alternativas a la harina y aceite de pescado (principales componentes empleados tradicionalmente en la fabricación de los piensos), resulta necesario también un mayor esfuerzo investigador en la posibilidad de incorporar diversos aditivos a los piensos (inmuno-estimulantes, antioxidantes, pro y pre- bióticos, etc.) que mejoren el estado de salud de los peces y los índices de crecimiento y aprovechamiento nutritivo [23].

Entre estos aditivos se encuentran, por ejemplo, los antioxidantes, cuyo uso en acuicultura puede tener beneficios en la salud de los peces [23]. La incorporación de estos en los piensos para peces es necesaria, además, para evitar su oxidación. Debido a que el alimento para peces tiene un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de cadena larga, este es especialmente susceptible a la oxidación. Con el objetivo de proteger las grasas, los piensos comerciales incluyen antioxidantes sintéticos, principalmente butil hidroxitolueno y etoxiquina [24]. El empleo de estas sustancias influye además positivamente en la calidad del pescado, por lo que el uso de sustancias antioxidantes como aditivo del pienso para mejorar la calidad del pescado ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, los mencionados antioxidantes sintéticos han demostrado su participación en procesos cancerígenos, por lo que existe un creciente interés por encontrar antioxidantes naturales que, a diferencia de estos, no tengan efectos secundarios en el organismo [25]. En general, los vegetales presentan un buen potencial de compuestos con actividad antioxidante [26]. Se han encontrado numerosas investigaciones sobre el impacto del uso de antioxidantes naturales en el sector de la acuicultura, tanto en la calidad y salud del pescado como en la conservación del pienso [27]. En el apartado 4.3 “Antioxidantes naturales probados en

acuicultura” se incluyen algunos de estos estudios. La cantidad de estudios encontrados muestran el verdadero interés existente en estos extractos en el sector de la acuicultura.

En el caso de los subproductos del cultivo del plátano existen solo algunos estudios, concretamente para la piel de plátano, en los que se evalúa su efecto sobre la salud de ciertas especies acuáticas [28–31]. En cuanto al resto de subproductos del cultivo del plátano, su uso en acuicultura no ha sido explorado, aunque la cantidad de compuestos detectados con capacidad antioxidante en estos materiales (ácido tánico, pirocatecol, catecol, ácido gentísico, catequina, ácido protocatechuico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico y ácido cinámico) [32] comunes a los detectados en los extractos que sí han sido empleados, hace esperar que podrían presentar un efecto positivo tanto en la conservación de los piensos como en la salud del pescado. Por otro lado, la sustitución de los antioxidantes sintéticos por naturales requiere además de procedimientos que permitan la extracción de estos compuestos de forma segura, eficiente y económica, a fin de garantizar su viabilidad comercial [33]. Excepto para la cáscara de plátano [31, 34–36] y la inflorescencia [37], no se han encontrado referencias en las que se optimice la extracción de compuestos antioxidantes de los subproductos del cultivo del plátano haciendo uso de un proceso seguro, eficiente y económico.

Por otro lado, los residuos de la platanera presentan un alto contenido en carbohidratos a partir de los cuales se podrían obtener oligosacáridos que podrían también encontrar aplicación en el campo de la acuicultura, como prebióticos. A fin de resolver los problemas ocasionados por la intensificación de la actividad acuícola, como son la exposición al estrés y a enfermedades de los peces, se han desarrollado diversas estrategias como la aplicación de antibióticos y otros agentes profilácticos. Sin embargo, la tendencia cada vez más restrictiva por parte de las autoridades frente a la utilización de antibióticos, debido a los problemas que estos pueden acarrear (desarrollo de resistencias, modificación de ecosistemas próximos, etc.) y la presión hacia una acuicultura sostenible y rentable, ha impulsado la búsqueda de soluciones que permitan optimizar la producción de una manera natural y respetuosa con el medio ambiente. En este contexto, los suplementos dietéticos funcionales, incluidos los pre, pro y simbióticos están recibiendo una atención cada vez mayor [38], siendo los prebióticos uno de los suplementos dietéticos funcionales más estudiados.

Durante los últimos años, la administración de prebióticos en dietas de diferentes especies de peces ha mostrado resultados prometedores en la respuesta inmune [39]. Los manano-oligosacáridos (MOS) y los fructo-oligosacáridos (FOS) son quizás los que han sido más estudiados [40], aunque existe también algo de información sobre el uso de galacto-oligosacáridos (GOS), xilo-oligosacáridos (XOS), arabinoxilo-oligosacáridos (AXOS) e isomalto-oligosacáridos en animales acuáticos [41, 42]. También la inulina, mezcla heterogénea de polisacáridos de fructosa, ha sido bien estudiada en peces [43, 44]. En el apartado 5.2 Prebióticos en acuicultura se incluyen varios estudios encontrados al respecto.

Los oligosacáridos pueden encontrarse originalmente en alimentos, ser sintetizados a partir de disacáridos u obtenerse mediante la hidrólisis de polisacáridos. [45]. El proceso de hidrólisis de polisacáridos, aunque aún necesita ser mejorado, es considerado la mejor opción para la producción de oligosacáridos a gran escala, debido a su reproducibilidad y menor coste [46]. La biomasa lignocelulósica, como por ejemplo los residuos agrícolas, contienen una multitud de carbohidratos complejos que la convierten en una fuente atractiva para la obtención de estos oligosacáridos. En los últimos años han surgido numerosos estudios sobre la obtención de XOS a partir de la fracción hemicelulósica de diferentes residuos lignocelulósicos como la paja de trigo,

cáscara de almendra [47], paja de maíz [48], madera de abedul [49], etc. (en el ámbito de la acuicultura, Abdelmalek et al. incorporaron XOS obtenidos de la piña de millo a dietas suministradas a alevines de lubina, consiguiendo mejoras en su crecimiento y sistema inmune [50]). También los oligosacáridos de arabinosilanos y pectinas, que pueden obtenerse también a partir de materiales lignocelulósicos, han despertado recientemente interés como posibles nuevos prebióticos [51]. Por otro lado, resulta extraño que, siendo la fracción de celulosa el componente mayoritario de la biomasa (entre el 30 y el 50 %) y teniendo en cuenta el interés que existe en la sacarificación de la celulosa para la obtención de glucosa [51], no se haya prestado tanto interés en la posibilidad de obtener celo-oligosacáridos.

Los celo-oligosacáridos se definen como sacáridos formados por entre 2 y 6 unidades de glucosa unidas unas a otras en la posición beta (1,4), siendo la celobiosa el principal oligosacárido presente [52]. En los últimos años han surgido diversos estudios que muestran que estos oligosacáridos presentan actividad prebiótica [53–59]. Por otro lado, las publicaciones encontradas sobre la obtención de celo-oligosacáridos y, más concretamente, sobre obtención de estos a partir de materiales lignocelulósicos son escasas. Los estudios encontrados lo hacen mediante hidrólisis enzimática de los siguientes materiales: bagazo de la caña de azúcar [60, 61], residuos de mazorca [52], residuos forestales de maderas blandas y duras (abeldul y abeto) [62–64] y paja de trigo y salvado de maíz [65]. En el caso de los subproductos del cultivo del plátano, se han encontrado estudios en los que se les aplica tratamientos similares a los empleados en la obtención de oligosacáridos, aunque centrados en la obtención de glucosa como por ejemplo los estudios [8, 18, 66–69]

Por tanto, existen dos sectores (los del cultivo del plátano y de la acuicultura) que, aunque en constante crecimiento, deben hacer frente a problemas derivados de la intensificación de estas actividades y de las tendencias actuales hacia un desarrollo más sostenible. Por un lado, el cultivo del plátano debe ser capaz de gestionar la cantidad de subproductos que se generan en el sector, lo cual, además del beneficio medioambiental, podría suponer un beneficio económico para el sector. Por su parte, la acuicultura se enfrenta a la necesidad de obtener productos de origen natural que permitan mejorar el estado de salud de los peces y prescindir de los usados actualmente y que pueden acarrear diferentes problemas. Los residuos del cultivo del plátano pueden ser una fuente de estos productos, que podrían ser recuperados mediante la aplicación del concepto de biorrefinería, en línea con las directrices europeas sobre aprovechamiento eficaz de los recursos. Uno de los principales objetivos de Europa es desbloquear el potencial económico de la Unión a fin de que pueda ser más productiva al tiempo que utilizar menos recursos y avanzar hacia una economía circular. En este sentido, la biorrefinería juega un papel relevante, al permitir una conversión sostenible de la biomasa en un gran abanico de productos de interés industrial, convirtiendo de esta forma el subproducto de una industria en la materia prima de otra.

2. El cultivo del plátano

2.1. Producción y consumo de plátano

El plátano representa el 17% de la producción total de fruta, siendo la segunda fruta producida a nivel mundial, y es cultivado en más de 130 países [1]. Resulta difícil obtener una cifra precisa de la producción mundial de plátanos debido a que muchos cultivos pertenecen a pequeños agricultores y son comercializados en el sector informal, que con frecuencia es indetectable. Los datos disponibles muestran que la producción global de plátanos registró una cifra de 116 millones de toneladas en 2019, frente a los 68.2 millones de toneladas en el año 2000 [70].

La mayor parte de la producción de plátanos se centra en Asia, Latinoamérica y África. El mayor productor es la India, el cual produce una media de 29 millones de toneladas por año. Le sigue China, con 11 millones de toneladas, Filipinas, con 9 millones de toneladas, y Ecuador y Brasil, ambas con 7 millones de toneladas [2]. Europa es el mayor consumidor e importador de plátanos del mundo, seguido por Estados Unidos. En 2016, se consumieron 6.1 millones de toneladas de plátanos en la Unión Europea, de los cuales 5.4 millones fueron importados (la mayor parte de Latinoamérica) y cerca de 0.7 producidos internamente.

España fue el primer país productor de plátanos a nivel europeo durante el año 2016 con un total de 417 176 toneladas, según datos de la Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural de la Unión Europea. Del total de la producción de plátano y banana comercializada en Europa de origen comunitario (11.3%), el Plátano de Canarias, gracias a sus peculiares condiciones climáticas, supone más de un 60%, seguida de la banana de Martinica y Guadalupe en Francia (36%) y la de Madeira de Portugal (3%).

La Asociación de Productores de Plátanos de Canarias (ASPROCAN) estima la producción de plátanos en torno a las 400 000 toneladas de plátano al año. Este se produce en las 9 100 hectáreas (18.5 % de la superficie agrícola de Canarias) de cultivo existentes en 6 de las islas del archipiélago [71]. Tenerife es la isla de mayor producción de plátanos de Canarias, con casi un 42%, seguido por La Palma, con el 35%, y Gran Canaria, con el 21%. La Gomera, El Hierro y Lanzarote representan aproximadamente un 2%. Durante 2017 el Plátano de Canarias obtuvo su récord histórico con una producción de 437 782 toneladas de plátano, de las cuales el 87% fueron exportadas a la Península y el resto comercializado en Canarias. La exportación fuera de la Península es prácticamente nula [72]. Este sector genera 15 237 empleos, de los cuales unos 12500 son agricultores y 2 162 empleos indirectos, a través del comercio de fertilizantes, productos fitosanitarios, material agrícola, etc., así como industrias locales vinculadas al empaquetado y transporte en contenedores [73]. Incluyendo cultivo y comercialización (empaquetado), contribuye económicamente de forma directa a Canarias con más de 390 millones de euros. Estos datos ponen de manifiesto el efecto dinamizador del sector platanero sobre la economía y la sociedad canaria.

La platanera de Canarias proporciona un fruto característico: un plátano pequeño, amarillo y con pintas [74]. A finales de 2013, Plátano de Canarias recibió el sello de Indicación Geográfica Protegida (IGP) convirtiéndose en el único plátano del mundo que cuenta con este reconocimiento. Esta distinción garantiza la singularidad y el origen de sus plátanos, reconociendo al plátano de Canarias como un producto único y de calidad.

2.2. Morfología de la planta

La platanera es una planta herbácea de la familia *Musacea*. Agrupa un gran número de plantas herbáceas del género *Musa*, tanto cultivares genéticamente puros de las especies *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* como híbridos obtenidos a partir de estas especies silvestres. Se reconocen más de 70 especies en el “World Checklist of Selected Plant Families”, pero solo unas pocas especies son comestibles [75]. La distribución actual de variedades en el archipiélago canario se estima en unas 4 500 ha de Pequeña Enana, unas 3 000 ha de Gran Enana y 2 000 ha de Gruesa Palmera, correspondiendo el resto a una mezcla de especies [74].

Es una hierba perenne de gran tamaño. Es perenne porque de la base de la planta surge un brote llamado hijo, que reemplaza a la planta madre. Posee un tallo parcial o totalmente subterráneo, denominado rizoma, a partir del cual se forman las hojas. La parte de la planta que se asemeja a un tronco es un falso tallo, denominado pseudotallo, y está formado por las vainas foliares dispuestas en espiral y fuertemente apretadas unas a otras. Sus hojas son grandes, simples, enteras, con vaina y normalmente con pecíolo. El tallo floral (vela) crece a través del pseudotallo y emerge en la parte alta de la planta. El pedúnculo es el tallo que soporta la inflorescencia y la fija a la vela. La inflorescencia es una estructura compleja que contiene las flores femeninas, que se desarrollarán en frutos. A medida que las flores femeninas se transforman en frutos, la porción distal de la inflorescencia se alarga y produce grupos de flores masculinas. El raquis es el tallo de la inflorescencia que va desde el primer fruto hasta las flores masculinas.

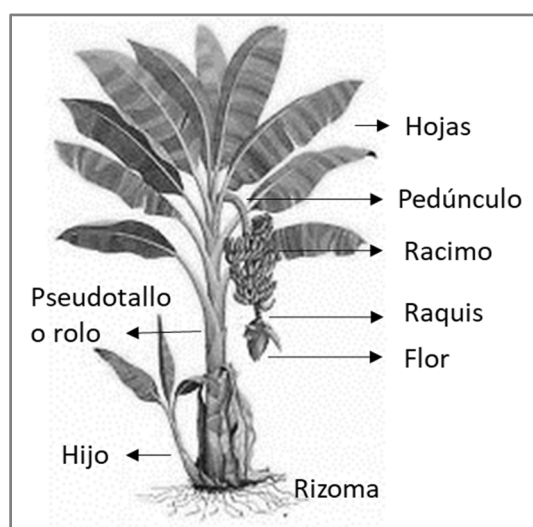


Figura 1. Partes de la platanera

2.3. Subproductos generados en el cultivo del plátano

El cultivo del plátano va acompañado de la generación de una gran cantidad de subproductos. Entre todos los residuos que genera este sector, la mayor parte está compuesta por restos vegetales [4]. Si bien anteriormente la agricultura y la ganadería se complementaban y no generaban residuos, desde hace varias décadas la intensificación de la actividad ha ido acompañada por una generación creciente de los mismos [4]. Estos consisten principalmente en los residuos de la

cosecha (rolo, hojas y flor), que se generan como consecuencia de la necesidad de cortar el pseudotallo de la planta tras la recolecta para permitir un crecimiento óptimo del hijo, y de la clasificación y empaquetado (raquis y plátanos de descarte) [76]. El peso y la proporción de los mismos dependen de la variedad de la platanera, las condiciones de cultivo y la clasificación.

Hojas	Según variedad platanera: 5-15 kg Canarias: 20-25 hojas (15 kg)
Rolo o pseudotallo	Según variedad: 25 - 50 kg Canarias: altura 1 - 2 m (35 kg)
Raquis	3-4 kg
Plátano de rechazo	2-3 kg

Tabla 1. Subproductos generados en el cultivo del plátano por cada planta [77]

Los subproductos de la platanera se caracterizan por un bajo contenido en materia seca, siendo particularmente bajo (5-10%) en el pseudotallo y raquis y algo más elevado en hojas y plátanos de rechazo, donde puede llegar hasta el 20% [78]. Algunas formas tradicionales de gestionar la materia orgánica incluyen el enterrado para abono verde, el acolchado vegetal para los cultivos, la alimentación para ganado y el compostaje. Los residuos generados en la cosecha (rolo y hojas) con frecuencia son, además, dejados en la propia plantación, sin tener un valor nutricional para el suelo (pues su descomposición es lenta) y produciendo un problema de acumulación de residuos en las siguientes cosechas. Además, puede incluso tener un impacto negativo en el medio, pues puede llegar a afectar al desarrollo de microorganismos [79, 80]. Por otro lado, existe una gran cantidad de residuos que se incineran o incluso se vierten en vertederos ilegales. En países como la India los agricultores arrojan los desechos de platanera en ríos, lagos y carreteras, causando serios problemas ambientales [5].

Teniendo en cuenta la cantidad de plátanos producida a nivel mundial y que por cada hectárea cultivada se generan cerca de 220 toneladas de residuos vegetales [5], resulta fundamental establecer herramientas que favorezcan el aprovechamiento de este recurso, no solo desde el punto de vista del beneficio medioambiental sino además por el aumento de su valor económico. En el caso de Canarias, la gestión de los residuos de platanera ha sido siempre una demanda y una preocupación del sector, pues además de suponer un problema medioambiental, supone un gasto económico. Entre las alternativas disponibles, la alimentación del ganado es una práctica que no puede ser generalizada a todas las Islas, pues en algunas la ganadería está menos extendida y no es capaz de absorber la cantidad de subproductos que se generan a nivel local. La reincorporación directa en las fincas es solo válida para pequeñas cantidades que sean susceptibles de biodegradación sin tratamiento. Por otro lado, el traslado a vertedero controlado presenta costes variables en función de la tipología y condiciones de cada isla y el compostaje mediante la mezcla con otros materiales disponibles a nivel local, práctica que no está generalizada, solo se lleva a cabo actualmente por gestores de residuos y puntualmente por alguna iniciativa privada [81].

2.4. Posibilidades de aprovechamiento de los subproductos generados en el cultivo del plátano

Los subproductos del cultivo del plátano han sido utilizados como envase de alimentos, utensilios para comer, para ropas, manualidades y para eventos ceremoniales en diferentes culturas [82]. Los brotes jóvenes, las hojas del pseudotallo y las inflorescencias son consumidas en ocasiones por indígenas en partes del sudeste de Asia y regiones de Indonesia [82]. También se han usado en alimentación animal, pero su alto contenido en agua, y por tanto su baja densidad nutritiva, hacen que sea necesario aplicar algún tratamiento previo [83]. Los plátanos de rechazo, dada su mayor degradabilidad, han sido utilizados tradicionalmente para alimentación animal y/o compostaje [68].

La creciente tendencia hacia una utilización más eficiente de los residuos agroindustriales y la cantidad de residuos generada anualmente en esta actividad, así como la problemática que supone su gestión, han despertado el interés en los mismos por parte de la comunidad científica. En los últimos años, han surgido numerosos trabajos que analizan las diferentes fracciones de subproductos generadas en el cultivo del plátano y la posibilidad de obtener, a partir de ellos, productos de valor añadido. Gabhane et al., Guerrero et al. y Oliveira et al. son algunos de los ejemplos de estudios en los que se realiza una caracterización química de las diferentes partes de la platanera [7–10]. En la Tabla 2 se incluye la composición determinada en algunos de estos estudios.

	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Cenizas (%)	Almidón (%)	Proteínas (%)
Pseudotallo	20 - 44	9.6 - 29	5 - 37	11 - 28	20 - 27	1.9 - 6.1
Raquis	23 - 40	7 - 28	9 - 18	21 - 30	3.1	3.3
Hojas	21 - 37	12 - 27	8.5 - 22	9 - 19	-	8 - 12
Plátano de rechazo	1.42	6.1	0.14	3.76	70	3.53
Cáscara de plátano	9.9	41.4	6.8 - 8.9	16 - 9	23	5.3 - 7.3

Tabla 2 Composición porcentual de los diferentes subproductos del cultivo del plátano, según varios autores [7–10, 84–89]

Aunque son numerosos los estudios sobre la composición de las diferentes partes de la platanera, el efecto de la localización geográfica, el clima y la madurez de la planta sobre la composición de las mismas no ha sido evaluado. Por ejemplo, se ha documentado que para una misma planta algunos compuestos bioactivos pueden variar significativamente debido a cambios estacionales, localización geográfica o grado de desarrollo de la planta [10].

Además de estudios sobre la composición, también han surgido numerosos estudios sobre posibles usos. Los residuos de la platanera se presentan como una excelente fuente de valiosas materias primas para su uso, por ejemplo, en materiales compuestos de fibra y textiles, energía renovable, alimentos alternativos y alimento para ganado [90, 91]. A continuación se referencian algunos de los estudios encontrados.

Un material interesante que puede extraerse fácilmente del pseudotallo de la platanera es su fibra. La fibra de platanera es comparable en resistencia y contenido en celulosa a otras fibras

naturales [92]. Esta ha sido incorporada como refuerzo en cemento [93, 94] y compuestos de base polimérica, tanto termoestables [95, 96] como termoplásticos [97, 98], consiguiéndose mejoras en las propiedades mecánicas. Por ejemplo, Pacheco et al. obtuvieron que al añadir un 20% de fibra de platanera a HDPE, el módulo elástico se incrementaba más del 500%, alcanzándose un valor de módulo elástico similar al de HDPE reforzado con un 10% de fibra de vidrio [99]. La fibra de la platanera también ha sido usada durante décadas como materia prima para tejidos en la producción de artesanía y ropas tradicionales [82]. John y Anandjiwala evaluaron diferentes métodos para la modificación superficial y mejora de esta fibra con fines textiles [100].

La producción de papel es una de las aplicaciones comerciales de los subproductos del cultivo del plátano. De acuerdo con Li et al. el alto contenido en holocelulosa y el bajo contenido en lignina del tallo de la platanera lo convierten en un material ideal para producción de pasta de papel y fabricación de papel [101]. Actualmente en Kerala (India) se fabrica un papel artesano resistente a partir del pseudotallo mezclado con cáscara de nuez de betel (*Areca catechu*), con rendimientos del 48-51% [102]. Ogunsile et al. [103] compararon la calidad y el rendimiento de la pulpa obtenida a partir de diferentes subproductos del cultivo del plátano y encontraron que a partir del pseudotallo se obtenían mejores rendimientos y calidad de pulpa para la producción de papel [104]. El papel obtenido de esta fuente tiene una capacidad de absorción de agua muy baja, lo que lo hace más resistente al agua y más resistente que el papel de pulpa de madera [105].

Debido a su alto contenido en almidón, el plátano ha sido usado casi directamente para la producción de etanol tras su hidrólisis enzimática [75, 106]. La cáscara del plátano ha sido también convertida en biogás mediante fermentación anaeróbica obteniéndose rendimientos relativamente altos [107, 108]. Sin embargo, las fracciones lignocelulósicas, debido a su compleja estructura, presentan más dificultades para su conversión en etanol [109]. Han surgido numerosos trabajos que evalúan el efecto de diferentes pretratamientos, sobre todo en el raquis y el pseudotallo, a fin de alterar su estructura y hacerla más susceptible a la hidrólisis enzimática, habiéndose conseguido buenos rendimientos. Por ejemplo Guerreiro et al. [19] consiguieron rendimientos de 87% y 74% del rendimiento máximo de etanol alcanzable usando el pseudotallo y el raquis pretratados con explosión por vapor, respectivamente.

Los residuos generados en el cultivo del plátano han sido identificados como un sustrato económico con potencial para su uso en la obtención de enzimas celulolíticas [110] y para el cultivo de hongos comestibles [111]. También han sido utilizados como material adsorbente para el tratamiento de aguas residuales [1].

Existen también estudios que muestran resultados prometedores sobre la posibilidad de transformar los subproductos del cultivo del plátano en alimento para ganado. Los residuos han sido utilizados directamente o ensilados. Algunos estudios llevados a cabo por el Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) mostraron que los plátanos de descarte ensilados presentaban una alta concentración energética y alta apetencia por parte del ganado. Además, los animales alimentados con este producto produjeron una mayor cantidad de leche con excelentes propiedades fisicoquímicas [4, 112, 113]. Por otra parte, Marie-Magdeleine et al. incorporaron las hojas y pseudotallo de la platanera tal cual como forraje en dietas para ovejas y no encontraron diferencias con respecto a las dietas control [114]. Sin embargo, debido a su moderado valor nutricional, se recomienda una inclusión limitada en las dietas de rumiantes y la posibilidad de su mejora, por ejemplo, a través de fermentación microbiana, es un paso importante para crear pienso de elevada calidad nutritiva [91].

Por otro lado, los subproductos del cultivo del plátano tienen un amplio rango de aplicaciones en la industria alimentaria. El plátano de rechazo, las cáscaras y el pseudotallo podrían ser una fuente barata de almidón, pectinas y celulosa, compuestos utilizados en esta industria como agente gelificante, agente de texturizado y estabilizadores. El plátano de descarte y la vela pueden ser transformados en almidón [80, 115, 116]. Emaga et al. aisló y caracterizó pectinas a partir de la cáscara del plátano [117]. Adinugraha et al. sintetizó carboximetilcelulosa utilizando el pseudotallo de la platanera, aunque se necesita estudiar su purificación para poder usarse en alimentación [118]. A partir de la fibra de platanera Elanthikkal et al. obtuvo celulosa microcristalina [119]. Por otro lado, la inflorescencia de la platanera puede ser una fuente de colorantes naturales y las hojas de biogeneradores de sabor para su uso también en la industria alimentaria [91].

Por otra parte, se han encontrado también compuestos con propiedades nutracéuticas que pueden tener aplicación en la industria farmacéutica o como conservantes en la industria alimentaria. [11, 12, 14–17, 91]. En el apartado 4.2 “Fuentes de antioxidantes naturales” se incluye más información acerca de estos estudios y de estos compuestos bioactivos encontrados en los subproductos del cultivo del plátano.

3. El sector de la acuicultura

3.1. Importancia de la acuicultura

El pescado y los productos pesqueros desempeñan hoy en día un papel importante en la seguridad alimentaria y la nutrición en todo el mundo. Su consumo ofrece beneficios nutricionales y para la salud únicos y se considera un elemento clave en una dieta saludable. El pescado es generalmente bajo en grasas saturadas, carbohidratos y colesterol y aporta no sólo proteínas de alto valor, sino también una amplia gama de micronutrientes esenciales, incluyendo diversas vitaminas (D, A y B), minerales (calcio, yodo, zinc, hierro y selenio) y ácidos grasos poliinsaturados omega 3.

Según el último informe de la FAO “El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020 (SOFIA 2020)”, el consumo de pescado per cápita aumentó de 9 kilogramos en 1961 a 20.5 kilogramos en 2018. Al mismo tiempo, desde 1961, el aumento anual promedio en el consumo mundial de pescado como alimento (3.1 %) ha superado el crecimiento de la población (1.6%) y superó la escalada del consumo de todos los demás alimentos de proteína animal (como carne de res, aves y leche), que aumentó en un 2.1% anual. Este informe destaca además que, en 2017, el consumo de pescado representó el 17% de la ingesta de proteínas animales de la población mundial y el 7% de todas las proteínas consumidas. Como tal, la FAO calcula que el pescado proporcionó a más de 3 300 millones de personas el 20% de su ingesta media per cápita de proteínas animales.

Si bien antiguamente la mayor parte de este pescado era aportado por la pesca, hoy día la acuicultura juega un papel esencial en abastecer esta demanda creciente de pescado. La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos (peces, moluscos, crustáceos y plantas) tanto en zonas costeras como del interior que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción. Aunque la acuicultura tiene una historia de 4 000 años, ha sido hace 50 cuando se

ha convertido en una actividad socioeconómica relevante. Y es precisamente desde el momento en que se estanca la actividad pesquera, cuando se produce el despegue definitivo de la acuicultura, representando ahora el 50 por ciento del pescado destinado a la alimentación a nivel mundial y dando empleo a más de 13 millones de personas en el mundo.

La producción mundial de pescado se estimó en unos 179 millones de toneladas en 2018, de los que la acuicultura representó el 46% de la producción total y el 52% del pescado para consumo humano [21]. China es, con diferencia, el principal productor de pescado comestible cultivado. La Unión Europea, considerada como una unidad, se situó como el 9º productor mundial con 1.35 millones de toneladas [120]. España fue en 2018 el estado miembro de la UE con una mayor cosecha de acuicultura (348 395 t) seguido por el Reino Unido y Francia. Los principales grupos de especies que se crían en España son moluscos y peces, mayoritariamente mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), seguido por lubina (*Dicentrarchus labrax*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y dorada (*Sparus aurata*) [120].

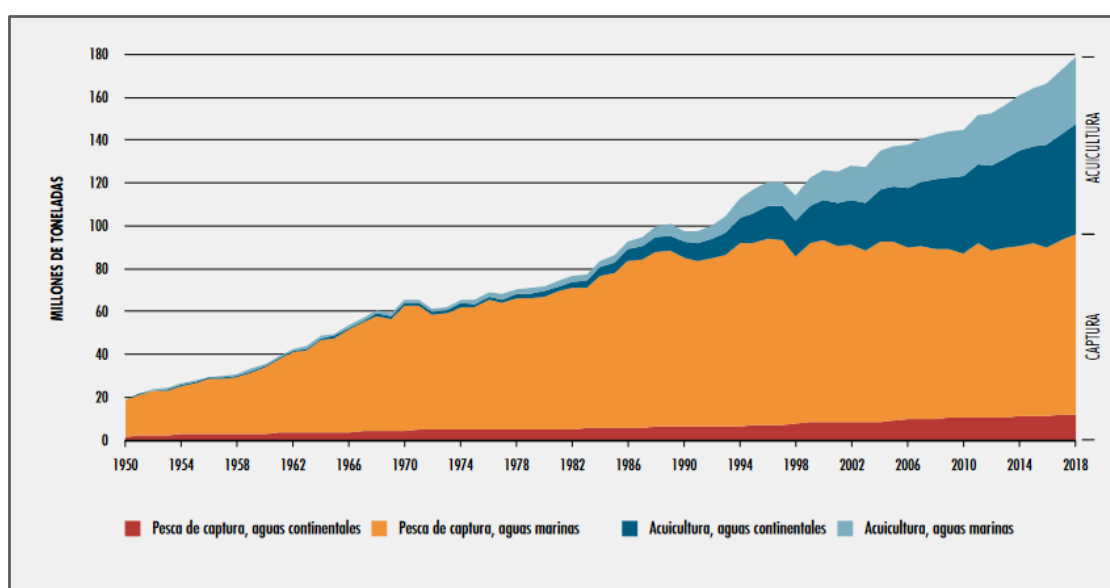


Figura 2. Evolución de la producción mundial de la pesca de captura y acuicultura [21]

Aunque los datos aportados reflejan el constante crecimiento del sector, existen una serie de retos que aún deben ser superados por la acuicultura para que esta industria crezca tanto como se espera y pueda hacer frente a la creciente demanda de pescado. Además del control de la sanidad de las especies cultivadas, mejoras en la gestión de las granjas, la domesticación de nuevas especies y la mejora genética de las actuales, la alimentación de los animales de acuicultura, en particular de peces, es un elemento clave de su sostenibilidad [120].

3.2. La alimentación en la acuicultura

El crecimiento experimentado por el sector de la acuicultura ha conllevado un aumento de la demanda de piensos para abastecer la producción acuícola. La alimentación representa alrededor del 50% del coste de producción [22] y, por tanto, su efecto sobre la rentabilidad es muy elevado. Las posibles medidas de mejora en la alimentación de los animales de acuicultura se pueden centrar en tres grandes aspectos: la optimización de los niveles de nutrientes (proteína y

aminoácidos, lípidos y ácidos grasos, vitaminas, etc.), la correcta elección de ingredientes (vegetales y animales), y la adecuada estrategia de alimentación [22]. Además, la correcta elección de los alimentos debe tener en cuenta otros aspectos como son el impacto ambiental, la calidad final del producto y la seguridad alimentaria.

A diferencia de los animales vertebrados terrestres, todos los peces marinos, sin excepción, requieren de forma natural una dieta rica en proteína animal, por lo menos en alguna etapa de su vida. Los componentes y rango de composiciones típicos empleados en la fabricación de alimentos balanceados para especies acuícolas incluyen: proteína (18-50%), lípidos (10-25%), carbohidratos (15-20%), cenizas (<8,5%), fósforo (<1,5%), agua (<10%) y trazas de vitaminas y minerales [121].

Los elevados requerimientos proteínicos en las dietas de peces y camarones se atribuyen a sus hábitos alimenticios carnívoros/omnívoros y al uso preferencial de la proteína dietética sobre los carbohidratos como fuente energética [122]. Las proteínas aportan al pez aminoácidos esenciales, por lo que se debe prestar especial atención a la calidad de la proteína (composición de aminoácidos que la caracterizan y disponibilidad biológica de los mismos), ya que cada especie de pez presenta unas determinadas necesidades cualitativas de aminoácidos esenciales.

Los lípidos son una fuente importante de energía metabólica; de hecho, de todos los nutrientes, los lípidos son los compuestos más energéticos. Por esta razón, suelen ser utilizados con objeto de disminuir la cantidad de proteína (más cara) que es utilizada con fines energéticos, destinándola exclusivamente para el crecimiento. En particular, los ácidos grasos libres, derivados de los triglicéridos (grasas y aceites) representan la principal fuente de combustible aeróbico para el metabolismo energético del músculo del pez [122]. En los peces carnívoros los lípidos juegan un papel calórico relevante debido a su limitada capacidad para usar carbohidratos de alto peso molecular. Para la mayor parte de peces marinos los ácidos grasos poli-insaturados omega-3 de cadena larga (EPA y DHA) son ácidos grasos esenciales, ya que no poseen la maquinaria bioquímica para sintetizarlos [123].

Los carbohidratos (almidones y azúcares) son las fuentes de energía menos caras para las dietas de peces. No son esenciales en las dietas pero se incluyen para abaratar costes y por su papel aglutinante durante la fabricación de los piensos. La habilidad para digerir de manera efectiva los carbohidratos depende de la especie; en general, se admite que, para peces omnívoros, estos niveles pueden ser del 30-40%, mientras que, para los carnívoros, únicamente del 10-20%.

Los minerales son elementos inorgánicos necesarios en la dieta para funciones normales del organismo. Basándose en la cantidad necesaria en las dietas y la cantidad presente en los peces, pueden dividirse en 2 grupos, macronutrientes y micronutrientes. Los peces pueden absorber muchos minerales directamente del agua y compensar de esta forma algunas deficiencias de minerales en la dieta. Además, gran parte de los minerales son incorporados con los diferentes ingredientes, por lo que un suplemento parcial de minerales suele ser suficiente. Los minerales más comúnmente incluidos en las dietas son Ca, P, Mg, K, Na, Cl, S, Fe, Zn, Co, Se, I. Los peces de agua salada solo necesitan fósforo, mientras que los de agua dulce requieren de todos los minerales.

Las vitaminas son componentes orgánicos necesarios, en pequeñas cantidades, para mantener el crecimiento normal y la salud del pez. La flora bacteriana intestinal en animales terrestres produce una gran variedad de ellas, lo que casi no ocurre en peces, y por tanto deben ser incorporados en las dietas. Las vitaminas pueden clasificarse en dos grandes grupos

dependiendo de su solubilidad, las hidrosolubles y las liposolubles. Las vitaminas hidrosolubles incluyen las vitaminas B, inositol, colina y vitamina C (ácido ascórbico). De estas, la vitamina C es probablemente la más importante dado su poder antioxidante y su mejora del sistema inmune. Las liposolubles incluyen vitaminas A, D, E y K. De estas, la E recibe la mayor atención dado su importante rol como antioxidante. Las vitaminas E y C además inhiben la oxidación de los lípidos de las dietas, aumentando su tiempo de vida útil. En general, todos los animales muestran distintos signos morfológicos y fisiológicos por deficiencia, cuando alguna vitamina está ausente en la dieta (el crecimiento limitado es el más común).

3.3. Ingredientes alternativos en la elaboración de piensos de acuicultura

Inicialmente, los piensos para peces eran fabricados exclusivamente a partir de harina (aporte proteico) y aceite (aporte de grasas) de pescado debido a su parecido en nutrientes a la dieta natural de los mismos. Frente a otras harinas de origen vegetal y animal, las harinas de pescado presentan la ventaja de poseer un óptimo perfil de aminoácidos esenciales y ácidos grasos esenciales. Su contenido de vitaminas, sobre todo del complejo B, es muy conveniente, además de ser la única que contiene cantidades importantes de vitamina D. Por otra parte, posee cantidades importantes de minerales como el selenio [124]. Estas razones, junto a su alta digestibilidad y exquisita palatabilidad convierten a este ingrediente tradicionalmente en la fuente proteica de los piensos para peces carnívoros [125].

Sin embargo, el agotamiento de estos recursos en los caladeros, unido al aumento de la demanda como consecuencia del incremento de la producción acuícola mundial, lo que ha dado lugar a un notable incremento en los precios de los mismos [22], están promoviendo la búsqueda de alternativas de ambos componentes en la formulación de los piensos. Esto permitiría reducir los costes de producción y ayudaría a mejorar la sostenibilidad de los caladeros [125]. Además, la sustitución de harinas y aceites de pescado puede resultar beneficiosa desde el punto de vista de seguridad alimentaria, dado que los productos de origen marino son fuentes potenciales de residuos químicos (dioxinas, policlorobifenilos, furanos) y metales pesados (metilmercurio, cadmio, arsénico) [123].

Durante los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones enfocadas a la búsqueda de ingredientes alternativos al aceite y harina de pescado. Los nuevos alimentos formulados deben estar basados en ingredientes de bajo coste que aporten los nutrientes necesarios que permitan a los peces crecer y mantenerse sanos. Estos nuevos ingredientes pueden provenir de diferentes fuentes: animal, vegetal y organismos unicelulares.

El empleo de fuentes proteicas animales terrestres no está permitido actualmente en la Unión Europea, con excepción de las harinas de sangre [22]. Actualmente, las materias primas más empleadas son las de vegetales, incluyendo granos (trigo, millo, etc.), semillas oleaginosas (soja, girasol, algodón, etc.) y legumbres (frijoles, guisantes, etc.) [126]. Entre estas, la alternativa más utilizada es la harina de soja (harina resultante de la eliminación del aceite de la soja), que presenta una amplia disponibilidad en el mercado y tiene precios más bajos y estables que las harinas de pescado [127]. Los productos derivados de la soja presentan, además, altos niveles de proteína bruta, la composición más equilibrada de aminoácidos de todos los alimentos de origen vegetal y buena palatabilidad para la mayoría de las especies de peces [126]. Otro ingrediente con un gran potencial para ser utilizado en la alimentación de peces como alternativa a la harina y aceite de

pescado son las algas. Estas presentan un contenido elevado de proteína, en particular las microalgas, acompañado por un buen perfil de ácidos grasos y adecuados niveles de vitaminas y minerales [128]. El empleo de microalgas ricas en ácidos grasos altamente insaturados como suplemento a los aceites vegetales en sustitución del aceite de pescado podría ser una alternativa de futuro, pero debido a que actualmente el coste de producción es muy elevado, solo se están utilizando en la alimentación larvaria [22].

Existen numerosas investigaciones en las que se estudian los efectos, en diferentes especies, de la sustitución de aceite y harina de pescado por estos ingredientes alternativos. Especialmente interesantes son las revisiones de Sales [126] para harina de pescado y Sales & Glencross (2011) [129] para aceite de pescado. Mientras que una sustitución completa ha dado lugar a efectos negativos en la salud y crecimiento de los peces, sustituciones parciales han mostrado resultados positivos [130].

Los problemas que se presentan a la hora de sustituir los ingredientes tradicionales por proteínas vegetales incluyen menor contenido de proteínas en comparación con las harinas de origen animal, desbalance en el contenido de aminoácidos (deficiencia en aminoácidos tales como la lisina, la metionina, la treonina y el triptófano, alta cantidad de carbohidratos, factores antinutricionales inherentes y baja palatabilidad especialmente para las especies carnívoras. En lo que respecta a los aceites vegetales en general estos carecen de ácidos grasos altamente insaturados, como el DHA y EPA, lo cual puede tener un impacto en la calidad nutricional del producto final destinado al consumo humano (reduciendo los niveles de ácidos grasos altamente insaturados n-3 y por tanto la calidad de los filetes) [123]. Es por eso que, aunque vienen siendo ampliamente usadas en la alimentación de ciertas especies acuícolas, principalmente herbívoras, el uso de los ingredientes de origen vegetal, sobre todo en especies carnívoras, ha estado limitado.

Todos los problemas mencionados hacen que la alta sustitución de harinas y aceites de pescado en piensos (sobre todo carnívoros) pueda provocar consecuencias negativas sobre el crecimiento, salud intestinal y sistema inmune de los peces [128]. A fin de solucionar estos problemas, ha surgido la necesidad de incorporar ciertos aditivos en las dietas. Estos aditivos son, en general, ingredientes que se añaden solos o en combinación, en pequeñas cantidades. Sus funciones son variadas: preservar el estado físico y químico del alimento, mejorar la salud y seguridad del animal, mejorar la calidad del producto final y mantener la calidad del ecosistema acuático. Se incluyen dentro de estos suplementos las vitaminas, minerales, antioxidantes, probióticos y prebióticos, etc. [131]. Algunos ejemplos de aditivos comercializados por Nutriad son ANACORE®, AQUAGEST®, APEX®, AQUABITE® [132].

Por tanto, además de las investigaciones sobre fuentes alternativas a la harina y aceite de pescado, resulta necesario también un mayor esfuerzo investigador en la posibilidad de incorporar diversos aditivos a los piensos (inmuno-estimulantes, antioxidantes, pro y pre- bióticos, etc.) que mejoren el estado de salud de los peces y los índices de crecimiento y aprovechamiento nutritivo [23]. En los siguientes apartados se incluye una revisión sobre la incorporación de antioxidantes naturales, como sustituto de los antioxidantes sintéticos usados tradicionalmente, en dietas de diferentes especies de peces (4.3 Antioxidantes naturales probados en acuicultura) y sobre la administración de prebióticos, como alternativa a la aplicación de antibióticos (5.2 Prebióticos en acuicultura).

4. Antioxidantes naturales

Debido a que el alimento para peces tiene un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de cadena larga, este es especialmente susceptible a la oxidación. Con el objetivo de proteger las grasas, los piensos comerciales incluyen antioxidantes sintéticos, principalmente Butil hidroxitolueno (en aceite de pescado) y etoxiquina (en harina de pescado) [24]. El empleo de estas sustancias influye además positivamente en la calidad del pescado, por lo que el uso de sustancias antioxidantes como aditivo del pienso para mejorar la calidad del pescado ha sido ampliamente estudiado. Debido a su composición química, el pescado es uno de los productos alimenticios más perecederos. Los fenómenos de autólisis tras la resolución del *rigor mortis* y la posterior degradación bacteriana, así como la peroxidación de los lípidos provocan la aparición de olores y sabores extraños, la alteración del color y en general una reducción de la calidad sensorial del alimento [133]. También se produce una disminución de su valor nutritivo y la generación de compuestos potencialmente nocivos para la salud que se han relacionado con el riesgo de padecer diversas patologías. El uso de antioxidantes permite minimizar o prevenir la oxidación de los alimentos, retrasando la formación de productos tóxicos de la oxidación, manteniendo la calidad nutricional y prolongando la vida útil del alimento [27].

Sin embargo, los mencionados antioxidantes sintéticos han demostrado su participación en procesos cancerígenos, por lo que existe un creciente interés por encontrar antioxidantes naturales, que a diferencia de estos, no tengan efectos secundarios en el organismo [25]. En general, los vegetales presentan un buen potencial de compuestos con actividad antioxidante [26].

4.1. Importancia de los antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que, presente en pequeñas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable (como lípidos, proteínas, ADN o carbohidratos), retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato [134]. Pueden ser productos muy diferentes entre sí en cuanto a origen, estructura química y modo de acción, pero tienen en común su capacidad de inhibir o frenar los mecanismos implicados en la oxidación [135].

Los antioxidantes se usan en una amplia variedad de aplicaciones. Son utilizados como estabilizantes en combustibles y lubricantes o incluidos como aditivos en polímeros tales como el caucho, plásticos y adhesivos para prevenir su degradación oxidativa, causante de pérdida en la resistencia y flexibilidad de estos materiales [136]. En la industria farmacéutica, por ejemplo, se usan para mejorar la estabilidad de agentes terapéuticos que son susceptibles a la degradación química por oxidación [137] y en cosmética no solo para la conservación de los productos, sino también como tratamiento o prevención del envejecimiento prematuro de la piel, como protector solar o como tratamiento de pieles sensibles al sol [138].

En la industria alimentaria, los antioxidantes se utilizan para inhibir la oxidación lipídica manteniendo así sus cualidades nutricionales y organolépticas. En alimentación animal, además, la inclusión de antioxidantes en dietas no solo permite conservar el alimento, sino que la ingesta de estos antioxidantes juega un papel clave en la posterior estabilidad y conservación de la carne.

Por otro lado, aunque no son necesarios desde un punto de vista nutricional, numerosos estudios han confirmado la importancia de la ingesta de antioxidantes en los sistemas biológicos

[139], donde junto con los antioxidantes endógenos (como las enzimas, proteínas y otros), ayudan a prevenir o retrasar el estrés oxidativo inducido por los radicales libres. De esta forma, los antioxidantes juegan un papel importante en la salud de seres vivos. Son efectivos en la prevención de enfermedades degenerativas, como distintos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurológicas, cataratas y disfunciones debidas al estrés oxidativo [136].

4.2. Fuentes de antioxidantes naturales

Los compuestos antioxidantes pueden clasificarse según diversos criterios. Atendiendo a su obtención puede distinguirse entre antioxidantes sintéticos (obtenidos mediante síntesis química) o naturales (a partir de fuentes naturales). Hoy en día, la mayor parte de comidas procesadas incorporan antioxidantes sintéticos [136]. Los más ampliamente usados y cuyo uso está permitido en alimentación son el Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Terbutilhidroquinona (TBHQ) y Galato de Propilo (PG) [33]. Sin embargo, en los últimos años, la demanda de antioxidantes de origen natural ha aumentado a causa de una mayor preocupación por los riesgos para la salud a largo plazo y una valoración negativa de los consumidores de los antioxidantes de origen sintético [139].

El incremento de la demanda de los consumidores por aditivos e ingredientes de origen natural ha incentivado la búsqueda de diferentes fuentes de compuestos bioactivos que permitan sustituir los compuestos sintéticos [33]. En general, los vegetales presentan un buen potencial de compuestos con actividad antioxidante [26]. Se han publicado multitud de estudios analizando el potencial antioxidante de una amplia variedad de vegetales, incluyendo plantas aromáticas y medicinales, cereales, frutas, semillas, residuos agrícolas e industriales y zumos de frutas [140]. Las vitaminas C, E y A, así como los carotenoides y los compuestos fenólicos son algunos de los antioxidantes de mayor interés [141, 142].

En concreto los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes a través de diferentes mecanismos de acción, lo que los convierte en buenos candidatos para su uso como protectores frente a la oxidación lipídica. Constituyen uno de los grupos de antioxidantes naturales más abundantes y ampliamente distribuidos del reino vegetal, con más de 8 000 estructuras conocidas. Son productos del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran en raíces, tallos, troncos, hojas y frutos, donde desarrollan funciones diversas que abarcan desde la protección frente a influencias externas (radiación UV, mordeduras de animales y ataques fúngicos y víricos) a los mecanismos de polinización, el olor, el color y la tolerancia al frío [143].

Estos compuestos poseen un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo y otros derivados funcionales como ésteres, metilésteres o glucósidos. La naturaleza de estos compuestos varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. En función de su estructura, los compuestos fenólicos se clasifican en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, taninos y lignanos [144]. Existen otros compuestos con capacidad antioxidante que no tienen naturaleza polifenólica, siendo los más relevantes el ácido ascórbico (conocido como vitamina C), tocoferol (vitamina E), ácido cítrico, carotenoides y péptidos proteicos [145].

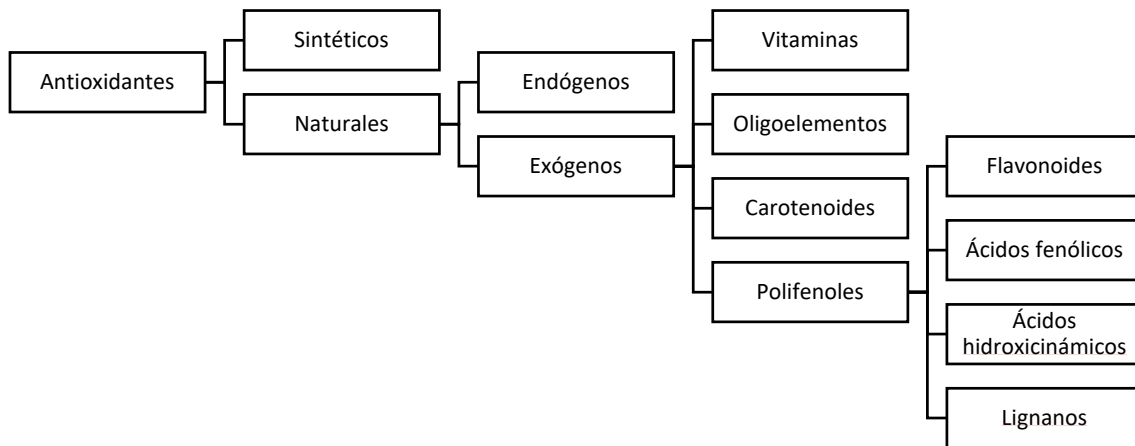


Figura 3. Esquema antioxidantes naturales

Se han encontrado compuestos fenólicos en muchos alimentos de origen vegetal tales como frutas, verduras, legumbres y cereales, también en bebidas, como el té verde y el vino tinto [146–150]. Dentro de la búsqueda de fuentes abundantes y biorrenovables de compuestos naturales, además de estas fuentes, merece especial atención aquellas de origen residual. Actualmente, los residuos agrícolas e industriales se muestran como una fuente atractiva para la obtención de antioxidantes naturales. Diferentes revisiones [26, 151, 152] muestran la posibilidad de empleo de residuos (piel de papa, orujo de oliva, alpechines, pepitas de uva, bagazo de manzana, bagazo de vino, pieles de uva, semillas y pieles de cítricos, residuos de pulpa de zanahoria, hojas viejas de té, subproductos del coco) como fuente de compuestos fenólicos bioactivos [140]. La valorización de estos residuos agroindustriales dependerá de la información existente acerca de sus componentes y de la posible implicación de los mismos en procesos que promuevan un beneficio saludable para el organismo [153–155]. Los nuevos compuestos antioxidantes hallados deberán también ser testados toxicológicamente antes de ser considerados aptos para el consumo, ya que el hecho de ser naturales no lleva implícita su seguridad [145].

En el caso de los subproductos generados en el cultivo del plátano, como ya se ha comentado, existe una larga lista de estudios en los que se demuestra que estos podrían ser una fuente natural de compuestos bioactivos. Se han detectado compuestos antioxidantes en la pulpa de la fruta [11], cáscara de plátano [12, 13, 156], rizoma [15], flor [16, 157], hojas [17], pseudotallo [14, 16, 157, 158], inflorescencia [37]. Algunos de los compuestos identificados incluyen ácido tánico, pirocatecol, catecol, ácido gentísico, catequina, ácido protocatechuico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico y ácido cinámico detectados en extractos obtenidos a partir del pseudotallo de la platanera [32]. Aboul-Enein et al. encontraron una alta cantidad de crisina, quercetina, catequina, cumarina y ácidos cinámico y cafeico en la cáscara de plátano [159]. En lo que respecta al plátano, su alto contenido en compuestos bioactivos y los beneficios para la salud asociados a los mismos ha sido extensamente estudiados. El plátano es una fruta rica

en muchos compuestos bioactivos, como carotenoides, flavonoides, aminos, vitamina C y otros compuestos fenólicos [158].

4.3. Antioxidantes naturales probados en acuicultura

Diversos estudios han demostrado los efectos positivos de la suplementación dietética con compuestos derivados de plantas en la estimulación de mecanismos antioxidantes en el ganado: aves, cerdos, vacas y ovejas [160]. En el caso de la acuicultura, también existen numerosas investigaciones sobre el impacto del uso de antioxidantes naturales, tanto en la calidad y salud del pescado como en la conservación del pienso. Por ejemplo, Hernández et al. [24] evaluaron el efecto del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) y dos aceites esenciales de tomillo (*Thymbra capitata*, quimiotipo carvacrol, y *Thymus zygis*, subespecie *gracilis*, quimiotipo thymol) en la conservación de dietas obtenidas por extrusión. El extracto de romero tuvo un efecto similar al del BHT (usado como referencia) tanto durante la extrusión del pienso, proceso que afecta a la oxidación de los lípidos, como durante el almacenamiento.

En cuanto a la conservación del pescado, el salmón es un pescado muy susceptible a la oxidación, por lo que el uso de antioxidantes es crucial para su conservación. Ortiz et al. [161] estudiaron el efecto del uso de antioxidantes naturales (una mezcla rica en isómeros de tocoferol y una mezcla de isómeros de tocoferol y extracto de romero) en la prevención de la rancidez oxidativa durante su almacenamiento en congelador y obtuvieron un comportamiento similar o incluso mejor que con antioxidantes sintéticos. Diversas investigaciones han llegado a la conclusión de que la vitamina E permite mantener la estabilidad lipídica en filetes de pescado mejor incluso que los antioxidantes sintéticos [25].

Por otro lado, la administración de antioxidantes puede reducir el estrés y mejorar el sistema inmune innato de los peces, aspectos que se ven afectados por las prácticas de cultivo intensivo [27]. Las plantas medicinales han sido utilizadas tradicionalmente en tratamiento de enfermedades en animales y humanos [162] debido a su amplio contenido en compuestos bioactivos, como antioxidantes. Algunas de estas plantas han sido utilizadas satisfactoriamente en dietas de peces, mostrando un fuerte potencial en una amplia gama de enfermedades virales, bacterianas o fúngicas, convirtiéndose en una alternativa segura al uso de antibióticos y medicamentos en acuicultura [163]. Algunas de las plantas utilizadas satisfactoriamente en el control del estrés de diferentes especies de peces incluyen el tomillo, salvia, menta [164], ginseng [165], malva [166], romero [167], ajo [168] y grano de café [169], entre otras.

Como ya se ha comentado, los polifenoles son uno de los antioxidantes presentes en las plantas más estudiados. Existen diversos estudios que analizan los efectos de polifenoles presentes en diferentes vegetales sobre la respuesta inmune y el estrés oxidativo de diferentes especies de peces, tanto carnívoras como omnívoras. El té verde es una de las plantas más utilizadas debido a su alto contenido polifenólico [27]. Por ejemplo, Nootash et al. [170] incluyeron hojas de té verde (0.1 g/kg) en la alimentación de la trucha arcoíris y Hwang et al. [171] estudiaron el efecto del extracto de té verde (50 g/kg) en pez de roca negro (*Sebastes melanops*). El efecto benéfico observado por ambos autores fue atribuido a la presencia de catequinas, que mostraron ser antioxidantes efectivos para combatir la peroxidación lipídica y reducir los niveles de colesterol en plasma *in vivo*. También Abdel-Tawwab et al. [172] y Zhou et al. [173] observaron un efecto antioxidante en Tilapia del Nilo y Carpa alimentadas con dietas

suplementadas con té verde. Por otro lado, Akrami et al. [174] incorporaron polvo de cebolla (10 g/kg) en la dieta de esturión beluga y observaron una disminución del colesterol asociada a la presencia de quercetina. Otro ejemplo es el estudio de Sicuro et al. [175], en el que la dorada alimentada con una dieta enriquecida con el subproducto del refinado de aceite de oliva (10 g/kg y 50 g/kg), mostró un ligero retraso en el proceso de oxidación lipídica de su filete almacenado a 4 °C. El aceite de oliva contiene polifenoles como el hidroxitirosol, tirosol, oleuropeína, ácidos hidroxicinámicos y ácido cafeico, los cuales poseen la capacidad de reducir los niveles de peroxidación lipídica, y mejorar el sistema de defensa antioxidante [176]. El extracto de maíz morado, el cual es una fuente importante de antocianinas, también aportó beneficios al ser incorporado (50 g/kg) en la dieta de trucha arcoíris [177]. Además de las propiedades antioxidantes previamente mencionadas, todos los extractos testados mostraron la capacidad de mejorar el sistema inmune.

Por otra parte, una de las características más interesante de los antioxidantes procedentes de plantas está relacionada con su capacidad de interactuar con otros antioxidantes, actuando sinérgicamente y ofreciendo más protección que individualmente [178]. Se ha visto que los antioxidantes derivados de plantas pueden incrementar la efectividad de vitaminas o compensar deficiencias de estas. Esto ha sido corroborado por autores como Antache et al. [179], quienes observaron que la administración de tomillo en combinación con vitamina E tenía un efecto sinérgico, aumentando el ritmo de crecimiento y reduciendo la peroxidación lipídica en Tilapia del Nilo.

Los estudios mencionados son solo un ejemplo de las numerosas investigaciones existentes en este ámbito, lo cual demuestra el verdadero interés existente en estos extractos en el sector de la acuicultura. Si bien los beneficios de estos han sido demostrados, es necesaria la evaluación de polifenoles purificados a partir de las fuentes vegetales con el propósito de demostrar cuáles son los componentes responsables de esta modulación de la respuesta inmune y antioxidante en las diferentes especies estudiadas [27]. Es importante, además, continuar con las investigaciones a fin de determinar las combinaciones óptimas y los niveles mínimos de antioxidantes naturales necesarios en la dieta para obtener la mayor estabilidad en el producto resultante, así como analizar el impacto de los antioxidantes ya estudiados y otros, si existe una bioacumulación de estos compuestos en el organismo, en tejidos como músculo, hígado y piel [25].

Como ya se ha comentado, una posible fuente natural de antioxidantes podrían ser los subproductos del cultivo del plátano. En el caso de los animales acuáticos existen solo algunos estudios en los que se investigan los efectos de la piel de plátano sobre la actividad antibacteriana, la respuesta inmune y la resistencia a las enfermedades de ciertas especies. Por ejemplo, Sankar et al. [28] investigaron los efectos sobre el crecimiento, estado antioxidante y función inmune de la especie *rohu* cuando se alimentaron con dietas suplementadas con cáscara de plátano. Obtuvieron que la administración de dietas suplementadas con un 5% de cáscara de plátano mejoraba su crecimiento y resistencia a enfermedades. Por otro lado, Rattanavichai et al [29, 30] evaluaron el efecto del extracto de la piel de plátano sobre la actividad antibacteriana, la respuesta inmune y la resistencia a las enfermedades del langostino gigante de agua dulce. Por otro lado, Anal et al. demostraron el potencial antioxidante del extracto de la piel del plátano en la conservación del aceite de pescado [31].

4.4. Proceso de extracción de los antioxidantes naturales

La sustitución de los antioxidantes sintéticos por naturales requiere de procedimientos que permitan la extracción de estos compuestos de forma segura, eficiente y económica, a fin de garantizar su viabilidad comercial [33]. La extracción de compuestos fenólicos a partir de materiales de origen vegetal se ha llevado a cabo habitualmente mediante el empleo de disolventes orgánicos, especialmente a nivel industrial. En los últimos años han surgido otros procedimientos como la extracción por presión [180], con fluidos supercríticos [181], la extracción asistida por microondas [182], la extracción asistida por ultrasonido [183] y más recientemente la extracción asistida por campos eléctricos pulsados [184]. Si bien estas nuevas tecnologías permiten reducir los requerimientos energéticos y de disolventes, todavía presentan algunas limitaciones para su implementación a nivel industrial, como es la necesidad de tecnologías más complejas que elevan los costes y el mantenimiento [185].

Método de extracción	Ventajas	Inconvenientes
Maceración	No se necesita energía adicional	Tiempos de extracción largos
Extracción con disolventes	Técnica conocida y fácilmente escalable a nivel industrial	Tiempos de extracción largos. Algunos disolventes no son aptos para alimentación
Extracción asistida por ultrasonido	Mayor eficiencia (menor tiempo de extracción y requerimientos de solvente) Extracción segura de compuestos sensibles al calor	Escalado caro
Extracción asistida por microondas	Calentamiento rápido. Tamaño de equipo reducido. No necesita la adición de disolventes	Riesgo de quemar la muestra y desnaturalizar los compuestos
Extracción por presión	Extracción rápida	Las altas temperaturas pueden degradar compuestos
Fluidos supercríticos	Extracción con fluidos supercríticos (CO ₂): disolvente no tóxico y barato, extracción en ausencia de aire y luz, extractos puros	Escalado caro
Extracción asistida por campos eléctricos pulsados	Adquirido por algunas industrias alimentarias para proceso de escalado	Necesidad de equipos muy especializados

Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de distintos métodos de extracción de antioxidantes de partir de materiales de origen vegetal [185]

La extracción convencional de polifenoles mediante el uso de disolventes, técnica empleada en la presente tesis, está influenciada por el tipo de disolvente empleado y por las condiciones de extracción (tiempo y temperatura de extracción, pH), siendo el disolvente uno de los factores que más afecta. Normalmente se utiliza agitación para favorecer la transferencia de materia, aunque

también la extracción en Soxhlet es ampliamente utilizada a escala de laboratorio puesto que es barata y no requiere de una separación posterior por filtración, aunque se debe tener en cuenta la posible degradación de polifenoles termolábiles por el exceso de calor [186].

Entre los disolventes más usados en la extracción de compuestos fenólicos de plantas se encuentran el metanol, etanol, agua, propanol, acetona, cloroformo, etil acetato, dimetil formaldehído, n-hexano y combinaciones de los mismos [31, 186]. Además, el disolvente puede acidularse para mejorar la extracción (normalmente al 1% usando HCl, ácido acético u otro ácido) [185]. Según la naturaleza de los compuestos a extraer estos serán más solubles en un disolvente u otro, pues la polaridad de cada uno es diferente. Aún hay dudas sobre qué disolvente es más adecuado para la extracción de polifenoles, pues los resultados obtenidos difieren entre estudios. Por ejemplo Liu et al. [187] comprobaron que la acetona era más eficiente que el agua, el metanol o el etanol en la extracción de polifenoles de flores de lichi. Sin embargo, Fernández-Agullo et al. [188] comprobaron que el agua era mejor disolvente en la extracción de polifenoles de las cáscaras de las nueces verdes. Iloki-Assanga et al. [189] encontraron que una disolución acuosa de metanol era la opción más adecuada para la extracción de polifenoles de roble (*Phoradendron californicum*). Por tanto, la literatura muestra que no existe ningún disolvente que sea el más adecuado para la extracción de polifenoles; no obstante, en general, se consideran como mejor opción los disolventes de alta polaridad, dada la alta solubilidad de los polifenoles en los mismos [189].

Por otro lado, uno de los inconvenientes de la extracción con disolventes es la toxicidad de algunos de ellos. El etanol ha mostrado ser un buen disolvente en la extracción de polifenoles [136] y, además, es más barato que otros disolventes como el metanol, es reconocido como GRAS (por sus siglas en inglés “*generally recognized as safe*”) y, por tanto, apto para su aplicación en alimentación. Además, el etanol presenta también seguridad medioambiental, y tiene la ventaja de poder ser recuperado mediante evaporación [190]. En general, las mezclas de alcohol-agua son más eficientes que los mono componentes [190]. Concentraciones comprendidas entre el 40% y el 70% han sido reportadas como óptimas [189]. Por un lado, la naturaleza hidrofílica de los grupos hidroxilos encontrados en algunos compuestos fenólicos así como la presencia de azúcares unidos a las moléculas de muchos compuestos fenólicos, aumenta su hidrofiliidad y, como consecuencia, la extracción de compuestos fenólicos a altas concentraciones de etanol disminuye [191]. Sin embargo, por otro lado, el uso de agua pura puede ser también desfavorable, pues puede solubilizar otro tipo de moléculas, como proteínas o polisacáridos, especialmente a altas temperaturas, dando lugar a un descenso en la selectividad de la extracción [191].

En cuanto a las condiciones de extracción, tienen influencia sobre la eficiencia de extracción el tiempo, la relación de disolvente por masa de muestra empleados y o la temperatura, principalmente [33]. El tiempo y la temperatura tienen un efecto dependiente: aumentando la temperatura se necesitan tiempos de extracción menores para obtener la misma cantidad de antioxidantes, mientras que aumentando el tiempo se necesitan temperaturas inferiores. En general se ha observado que la temperatura tiene un efecto positivo en la extracción de antioxidantes. Por ejemplo, Ivanovic et al. [192] obtuvieron que un incremento de la temperatura de 25 °C a 40 °C supuso un incremento en el rendimiento de extracción del 20%, bajo el mismo tiempo de extracción (15 minutos). Otro autor [193] encontró que usando una temperatura de 60 °C, el rendimiento en extracción de polifenoles se triplicaba con respecto a la extracción a 20 °C. Este efecto positivo de la temperatura sobre la extracción puede explicarse por la reducción de la viscosidad y tensión superficial del disolvente, aumentando su poder de solvatación a la vez

que aumenta la solubilidad de los polifenoles en el disolvente [185]. Sin embargo, hay que considerar que altas temperaturas pueden dar lugar a degradación de los compuestos.

Por otro lado, en cuanto a la relación sólido-solvente, cuando esta aumenta, menos disolvente es empleado y, por tanto, mayor concentración de antioxidantes es obtenida en el extracto. Sin embargo, una deficiencia de disolvente dificulta la transferencia de masa, por lo que debe haber un balance entre ambas especies.

Aunque, como puede extraerse de los resultados presentados, las condiciones de operación óptimas suelen encontrarse en un cierto rango, dado que cada material presenta unas propiedades únicas en cuanto a estructura y composición, es difícil predecir su comportamiento [194]. Para cada sustrato es necesario, por tanto, realizar un estudio que permita establecer las condiciones óptimas para la extracción de los compuestos polifenólicos [195]. Por ejemplo, Fernández-Argullo et al. obtuvieron que un 50% de etanol y una temperatura de 80 °C permitía obtener los extractos de nuez rallada con mayor actividad antioxidante [196]. Xavier et al., por su parte, encontraron como condiciones óptimas trabajando con subproductos forestales, 75 °C, 55 min y 30% de etanol [190].

Finalmente, una vez llevada a cabo la extracción, es necesaria la concentración y quizás purificación del extracto obtenido. Además de controlar los parámetros del proceso para intentar reducir la solubilización de otros compuestos, puede ser interesante una etapa posterior de purificación a fin de obtener un extracto lo más puro posible. La concentración de componentes bioactivos extraídos a partir de materias primas de origen natural se lleva a cabo tradicionalmente mediante procesos que implican altas temperaturas y alto consumo de energía. Frente a esto, la tecnología de membranas se presenta como una alternativa a procesos convencionales de separación y concentración de compuestos biológicamente activos a partir de medios líquidos, debido a ventajas tales como el empleo de bajas temperaturas, ausencia de transición de fase o bajo consumo energético [197].

5. Oligosacáridos como prebióticos

A fin de resolver los problemas ocasionados por la intensificación de la actividad acuícola, como son la exposición al estrés y a enfermedades de los peces, se han desarrollado diversas estrategias como la aplicación de antibióticos. Sin embargo, la tendencia cada vez más restrictiva por parte de las autoridades frente a la utilización de antibióticos y la presión hacia una acuicultura sostenible y rentable, ha impulsado la búsqueda de soluciones que permitan optimizar la producción de una manera natural y respetuosa con el medio ambiente. En este contexto, los suplementos dietéticos funcionales, incluidos los pre, pro y simbióticos están recibiendo una atención cada vez mayor [38]. Los prebióticos son uno de los suplementos dietéticos funcionales más estudiados. Durante los últimos años, la administración de prebióticos en dietas de diferentes especies de peces ha mostrado resultados prometedores en la respuesta inmune [39].

5.1. Propiedades prebióticas de los oligosacáridos

Diferentes organismos internacionales tales como la *Food and Agriculture Organization* (FAO) de Naciones Unidas y la *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) definen a los prebióticos como: “ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo”. Para que un ingrediente o alimento pueda considerarse como prebiótico debe cumplir una serie de requisitos tales como: i) no ser hidrolizado o absorbido en el tracto gastrointestinal superior (esófago, estómago y duodeno) y, por lo tanto, ser resistente a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas digestivas y no absorberse en el intestino delgado; ii) ser fermentado selectivamente por bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal y; iii) ser capaz de inducir efectos fisiológicos beneficiosos para la salud [198]. Muchos oligosacáridos han sido considerados como prebióticos.

Según su peso molecular o grado de polimerización, los carbohidratos se clasifican en monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Los oligosacáridos se definen como sacáridos compuestos por 2-10 unidades de azúcar, por lo que son considerados carbohidratos de bajo peso molecular [199, 200]. Además, los carbohidratos pueden clasificarse en digeribles y no digeribles. Los no-digeribles incluye algunos polisacáridos y oligosacáridos que alcanzan el intestino grueso intacto y que, en el colon, tienen la capacidad de ser fermentados selectivamente, estimulando la microbiota intestinal (principalmente de bifidobacterias y lactobacilos) y dando lugar a efectos beneficiosos sistémicos en el cuerpo. Debido a estas propiedades funcionales, estos carbohidratos son considerados prebióticos [201, 202].

Los oligosacáridos con propiedades prebióticas han atraído el interés de los investigadores y de la industria alimentaria debido a su potencial como ingredientes en la formulación de alimentos funcionales [46, 200]. Estos ayudan a minimizar riesgos relacionados con la salud, como diabetes, problemas cardiovasculares, cáncer, infección aguda, inflamación y obesidad. Entre los beneficios fisiológicos más citados de estos carbohidratos se encuentran la estimulación de la microbiota intestinal, producción de ácidos grasos de cadena corta, reducción del pH intestinal, inhibición del desarrollo de microorganismos patogénicos, reducción de las infecciones gastrointestinales, reducción de la reacción insulínica y absorción de la glucosa, mejora del perfil de lipoproteínas, reducción del riesgo a desarrollar cáncer y estimulación de la absorción de minerales, tales como calcio, magnesio y hierro [201, 203–206]. Estas propiedades fisiológicas varían según el tipo de monosacáridos que lo componen, el peso molecular, y los tipos de enlaces estructurales, características directamente relacionadas con la fuente natural de la cual son extraídos y del proceso aplicado en dicha extracción [47, 207].

Aunque la inulina, los fructo-oligosacáridos (FOS) y los galacto-oligosacáridos (GaOS) son los prebióticos más popularmente empleados en distintos alimentos, incluyendo alimentos para bebés [208] existen muchos otros oligosacáridos cuyo efecto prebiótico ha sido demostrado, como son los manano-oligosacáridos (MOS), xilo-oligosacáridos (XOS), arabinoxilo-oligosacáridos (AXOS) chitosan-oligosacáridos, malto-oligosacáridos (MO), isomalto-oligosacáridos (IMO), lactulosa, lactosacarosa, rafinosa, fructanos, almidón resistente, etc.

Los oligosacáridos pueden encontrarse originalmente en alimentos, ser sintetizados a partir de disacáridos u obtenerse mediante la hidrólisis de polisacáridos. Fuentes naturales de oligosacáridos son las plantas, algas, bacterias, hongos superiores [209], la miel y la leche [208]. Cuando estos están disponibles en la materia prima, solo es necesario un proceso de extracción,

lo cual puede lograrse por solubilización en agua, metanol u otro alcohol [45]. La rafinosa es un ejemplo de oligosacárido obtenido mediante extracción directa de la soja [200]. En cuanto a la obtención de oligosacáridos mediante el proceso de síntesis, este es más caro y difícil de reproducir a gran escala. El proceso de hidrólisis de polisacáridos, aunque aún necesita ser mejorado, es considerado como la mejor opción para la producción de oligosacáridos a gran escala, debido a su reproducibilidad y menor coste [46].

5.2. Prebióticos en acuicultura

En el caso de peces, los manano-oligosacáridos (MOS) y los fructo-oligosacáridos (FOS) son quizás los que han sido más estudiados [40], aunque existe también algo de información sobre el uso de galacto-oligosacáridos (GOS), xilo-oligosacáridos (XOS), arabinoxilo-oligosacáridos (AXOS) e isomalto-oligosacáridos en animales acuáticos [41, 42]. También la inulina, mezcla heterogénea de polisacáridos de fructosa, ha sido bien estudiada en peces [43, 44].

La mayoría de MOS probados en acuicultura provienen de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, donde se encuentran en forma de moléculas complejas ligadas a proteínas [210]. Dos productos importantes en esta categoría son los prebióticos Bio-Mos y Actigen, comercializados por la empresa Altech. La revisión realizada por Torrecillas et al. [210] sobre el uso de MOS como suplemento en dietas de acuicultura referencia una gran cantidad de estudios llevados a cabo en este ámbito. Algunos de los beneficios de la suplementación con MOS demostrados en estos estudios incluyen la mejora en el rendimiento y eficiencia de la alimentación de los peces [211, 212] y protección contra patógenos mediante la potenciación del sistema inmune y el refuerzo de la estructura y funcionalidad de la barrera epitelial [41, 213, 214]. En lo que respecta a los FOS, aunque los mecanismos no están claros, varios estudios han mostrado que también podrían mejorar la respuesta inmunitaria humoral de los peces [215–218].

Los galactooligosacáridos están formados por entre 2 y 20 moléculas de galactosa y glucosa y pueden ser obtenidos mediante tratamientos enzimáticos de lactosa [39]. Los GOS han sido ampliamente utilizados en animales endotérmicos, pero solo existen unos pocos estudios con peces [216, 219, 220]. Otros oligosacáridos de los que también existen algunas referencias sobre su potencial como prebióticos en acuicultura son los XOS [221, 222] y AXOS [223, 224]. Los primeros son oligómeros formados por unidades de xilosa, los cuales se encuentran en brotes de bambú, frutas, hortalizas, leche y miel [225]. Los AXOS son productos de la fragmentación de arabinoxilanos y son los principales polisacáridos, no amiláceos, encontrados en muchos granos de cereal [226]. Tanto los XOS como los AXOS también pueden ser obtenidos mediante despolimerización enzimática de materiales lignocelulósicos [227]. Abdelmalek et al. incorporaron XOS obtenidos de la piña de mijo a dietas suministradas a alevines de lubina, consiguiendo mejoras en su crecimiento y sistema inmune [50].

Aunque estos ingredientes han demostrado mejorar la respuesta inmune, la asimilación de nutrientes e incrementar la tasa de crecimiento y de conversión [228], los resultados obtenidos varían considerablemente entre estudios, lo cual puede ser debido, en parte, a las diferencias estructurales entre los OS usados, la dosis suministrada, tiempo de suministro, condiciones de cultivo, la especie de pez o la edad [210].

5.3. Obtención de oligosacáridos a partir de materiales lignocelulósicos

Como ya se ha comentado, los oligosacáridos pueden encontrarse originalmente en alimentos, ser sintetizados a partir de disacáridos u obtenerse mediante la hidrólisis de polisacáridos. Aunque aún necesita ser mejorada, la hidrólisis de polisacáridos es la mejor opción a gran escala, dada su alta reproducibilidad y menor coste [229]. Esta requiere normalmente de una extracción previa de los polisacáridos del material original, seguido por la despolimerización (enzimática, ácida o física) [229]. El proceso de hidrólisis da lugar a la simplificación de los carbohidratos en oligómeros y azúcares. Existen dos métodos principales de hidrólisis, la hidrólisis química, que emplea ácidos, y la enzimática. De acuerdo con Barreteau et al. [46], la despolimerización enzimática de carbohidratos es la mejor opción para una mayor producción de oligosacáridos, pues se evitan los bajos rendimientos en oligosacáridos y la formación de productos de degradación (como furfural y 5-hidroximetilfurfural) a partir de los monosacáridos que si tienen en la hidrólisis ácida [229].

La biomasa lignocelulósica, como por ejemplo los residuos agrícolas, contienen una multitud de carbohidratos complejos que la convierten en una fuente atractiva para la obtención de estos oligosacáridos. En los últimos años han surgido numerosos estudios sobre la obtención de oligosacáridos a partir de las distintas fracciones que la constituyen.

5.3.1. Estructura materiales lignocelulósicos

La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, cuya composición varía según la especie, la parte de la planta, la edad, la etapa de crecimiento e incluso las condiciones bajo las cuales crece la planta [230]. Aunque la proporción de cada uno de ellos varía, los tres principales componentes de los materiales lignocelulósicos son la celulosa, hemicelulosa y lignina, envueltos en una compleja estructura. La celulosa forma el esqueleto de la planta, el cual se encuentra rodeado de otra sustancia que funciona como matriz (hemicelulosa) y de materiales incrustantes (lignina) [231].

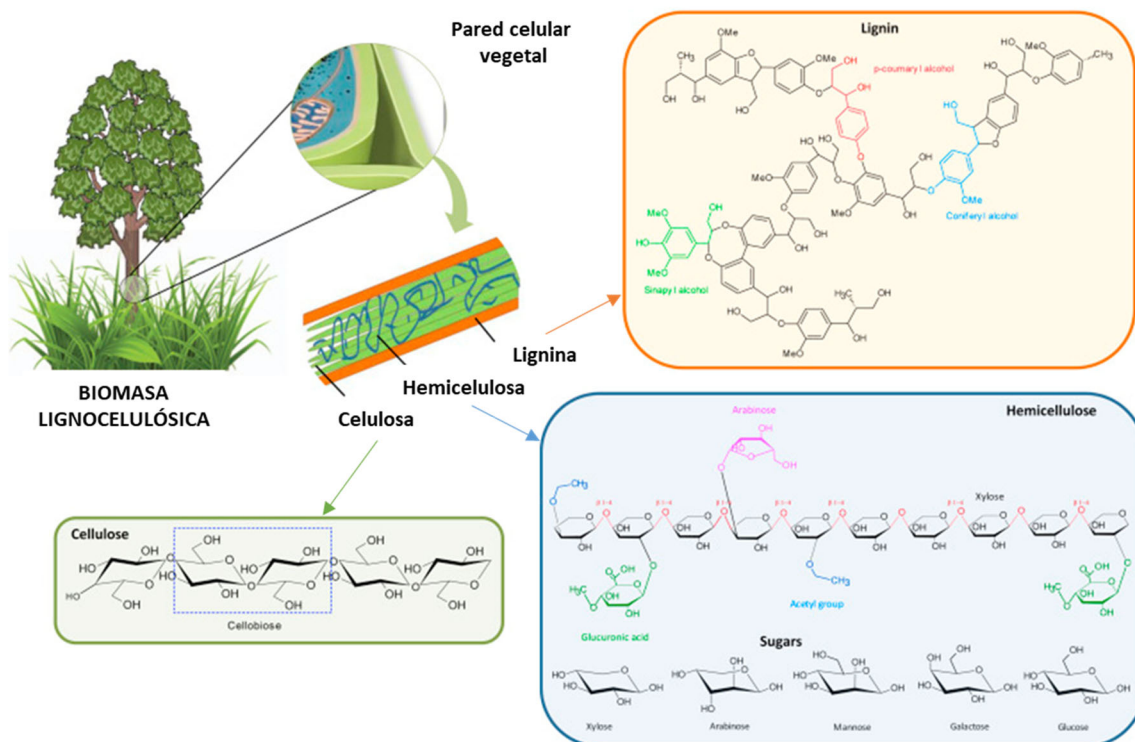


Figura 4. Principales componentes de los materiales lignocelulósicos [232]

En la Tabla 4 se muestra la composición de diversos materiales lignocelulósicos, donde se puede observar la variación en el contenido de las distintas fracciones. A pesar de las variaciones entre las distintas fracciones, la celulosa suele ser el componente estructural mayoritario. La celulosa es un homopolímero lineal constituido por unidades de D – glucosa unida por enlace glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática.

Biomasa lignocelulósica	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Trigo	43.68	28.24	8.25
Rastrojo de maíz	43.31	26.34	13.64
Paja de arroz	38	25	25
Bagazo de caña de azúcar	45.5	27	21.10
Hojas de caña de azúcar	45	25	18
Bambú	46.7	24.6	28.1
Tallo de soja	37.6	17.3	25.4
Cascarilla de trigo	22.0	33.0	20.0
Cascarilla de arroz	25.0	25.0	20.0
Cáscara de coco	39.31	16.15	28.48

Tabla 4. Composición de la pared celular de varios materiales lignocelulósicos [233]

Junto a la celulosa, la hemicelulosa forma parte de la fracción azucarada de la pared celular de las plantas. A diferencia de la celulosa, homopolímero lineal con estructura cristalina y cuya estructura es la misma en los diferentes materiales lignocelulósicos, la hemicelulosa constituye un heteropolímero con organización ramificada y su estructura muestra una gran variación entre especies. Al tratarse de un heteropolímero, los componentes monoméricos que forman la hemicelulosa son varios y pueden clasificarse en hexosas (glucosa, manosa, galactosa y ramnosa), pentosas (xilosa y arabinosa), ácidos urónicos y grupos acetilo [234]. La cantidad de cada uno de estos componentes varía dependiendo del material lignocelulósico y en función de la unidad mayoritaria se pueden establecer distintos tipos de hemicelulosas (xilanos, mananos, glucanos o galactanos, glucuronoxilanos, arabinoxilanos, glucomananos, etc.) [235]. La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y da toda la rigidez a la red de celulosa, hemicelulosa y lignina [236]. Las hemicelulosas tienen un grado de polimerización variable, su estabilidad térmica y química es generalmente inferior a la de la celulosa, siendo soluble en álcalis y fácilmente hidrolizada por ácidos [237].

La lignina es el tercer constituyente mayoritario de los materiales lignocelulósicos y su función principal es dar a la planta el soporte estructural, impermeabilidad, y la resistencia contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo [238]. Es insoluble en agua y se considera ópticamente inactiva, todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy difícil. La lignina es un polímero aromático. Las unidades a partir de las cuales se construye este polímero son el p-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S), que no tienen ningún grupo metoxilo, o bien, tienen uno o dos grupos metoxilo en las posiciones C3 y C5 de la unidad aromática [239]. Al igual que se mencionó para la hemicelulosa la extensión, así como la composición, en las distintas unidades de la lignina varían dependiendo de las especies.

Como compuestos adicionales a los ya mencionados, los materiales lignocelulósicos incluyen otros elementos en menores proporciones como son los componentes inorgánicos (sustancias minerales), proteínas y moléculas extraíbles tales como pectinas, hidratos de carbono simples, terpenos, alcaloides, saponinas, polifenoles, gomas, resinas, grasas y ácidos grasos [239]. Las pectinas tienen una función relacionada con la porosidad de la pared celular y son polisacáridos formados principalmente por unidades de ácido galacturónico y, en menores proporciones, ramnosa, arabinosa y galactosa [235]. Se caracterizan por su capacidad de constituir una fase gelatinosa muy hidratada en la que está embebida la red celulosa-hemicelulosa. Los extractivos son un grupo heterogéneo encargados del color, olor y/o la resistencia frente ataques microbianos e incluyen grasas, ceras, alcaloides, proteínas, mucílagos, gomas, resinas, etc. Los compuestos extraíbles solubles en agua o en disolventes orgánicos representan una pequeña fracción de la pared celular vegetal. Estos no influyen en la estructura morfológica de la pared celular, pero desempeñan funciones fisiológicas de vital importancia para la célula vegetal. Según su solubilidad se clasifican en compuestos extraíbles hidrofílicos y lipofílicos [240]. Por último, las cenizas representan el conjunto de compuestos inorgánicos, tales como las sales o los metales pesados [239].

5.3.2. Obtención de celo-oligosacáridos a partir de la biomasa lignocelulósica

En los últimos años han surgido numerosos estudios sobre la obtención de XOS a partir de la fracción hemicelulósica de diferentes residuos lignocelulósicos como la paja de trigo, cáscara de almendra [47], paja de maíz [48], madera de abedul [49], etc. En Japón se comercializan como

prebióticos XOS obtenidos a partir de piña de millo mediante hidrólisis enzimática [51]. También los oligosacáridos de arabinoxilanos y pectinas han despertado recientemente interés como posibles nuevos prebióticos [51]. Resulta extraño que no se haya prestado tanta atención a la posibilidad de emplear los celo-oligosacáridos como prebióticos, siendo la celulosa la fracción más abundante (entre el 30 y el 50 % según la biomasa) y teniendo en cuenta el interés que existe en la sacarificación de la celulosa para la obtención de glucosa [51].

Los celo-oligosacáridos se definen como sacáridos formados por entre 2 y 6 unidades de glucosa unidas unas a otras en la posición beta (1,4), siendo la celobiosa el principal oligosacárido presente [52]. Se han encontrado varios estudios en los que se demuestra que este tipo de oligosacáridos puede tener actividad prebiótica. Los celo-oligosacáridos han mostrado su capacidad para estimular el crecimiento de cultivos probióticos beneficiosos como bacterias del género *Bifidobacterium sp.* y *Lactobacillus sp.* [55]. Además, los celo-oligosacáridos pueden proporcionar diferentes mejoras en la salud de los animales, pues ayudan a conseguir una mejor arquitectura de la mucosa intestinal, mayor función de absorción, integridad de barrera y microflora de mayor calidad [241]. Su administración promueve efectos beneficiosos en la salud de cerdos [53] [54] [55], roedores, humanos [56], pollos [57] o terneros [58] [59].

Los celo-oligosacáridos pueden ser obtenidos a partir de la hidrólisis de la celulosa mediante métodos físico-químicos y enzimáticos. Los estudios existentes sobre la obtención de celo-oligosacáridos no son tantos como los de otro tipos de oligosacáridos y además la información sobre su obtención a gran escala es limitada [242]. Se han obtenido celo-oligosacáridos a partir de celulosa microcristalina empleando tratamiento con agua en condiciones supercríticas [243] [244] y mediante hidrólisis ácida [245], a partir de la hidrólisis de celulosa catalizada con carbón [246], o mediante catálisis homogénea [247].

Por otro lado, la hidrólisis enzimática es una opción más atractiva para la obtención de celo-oligosacáridos pues es considerada una opción más ecológica, emplea condiciones relativamente más suaves, no se generan productos de degradación como furfural o hidroximetilfurfural (HMF), y una gran cantidad de monosacáridos que son generados durante la hidrólisis ácida [248]. Aunque no hay un gran número de estudios al respecto, existen algunas publicaciones sobre obtención de celo-oligosacáridos mediante hidrólisis enzimática. Además, estos estudios emplean materiales lignocelulósicos como fuente de celulosa. Entre los estudios encontrados se incluyen el de Barbosa et al a partir de bagazo de la caña de azúcar [60, 61], residuos de mazorca [52], residuos forestales de maderas blandas y duras (abedul y abeto) [62–64] y paja de trigo y salvado de maíz [65]. En cuanto a residuos de platanera, como se ha comentado los estudios que hay aplicando tratamientos enzimáticos son con el objetivo de obtener glucosa, no se ha encontrado ningún trabajo que se centre en la obtención de oligosacáridos.

Sin embargo, el uso de la fracción de celulosa presente en los materiales lignocelulósicos se encuentra aún limitado debido a su compleja naturaleza y a las fuertes uniones al resto de componentes, hemicelulosa y lignina, que constituyen la matriz, lo cual dificulta la accesibilidad de las enzimas [242]. Por ello, la correcta elección de un pretratamiento que altere esta estructura y la haga más susceptible al ataque enzimático es crucial en la obtención de celo-oligosacáridos por esta vía.

El pretratamiento permite la disminución de las barreras físicas y químicas, tales como la cristalinidad de la celulosa, los grupos acetilos de la hemicelulosa y los enlaces entre la hemicelulosa y la lignina [249]. Además, permite aumentar el área superficial y eliminar o

disminuir la presencia de sustancias que interfieren o dificultan la hidrólisis. El pretratamiento permite que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten con respecto a los rendimientos teóricos a valores mayores al 90% [250].

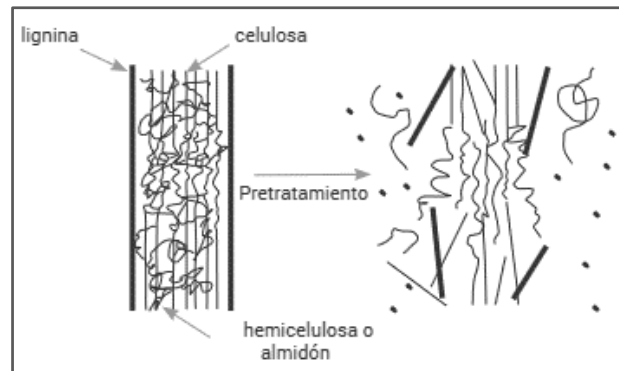


Figura 5. Efecto del pretratamiento sobre la estructura del material lignocelulósico [238]

En general, las técnicas de pretratamiento pueden clasificarse en físicas, químicas y biológicas y pueden ser utilizadas individualmente o combinadas [69]. Los pretratamientos físicos, como la molienda o la extrusión, se basan principalmente en el uso de fuerzas de impacto o cizalla para reducir el tamaño de partícula y desestructurar las fibras, aumentando el área superficial accesible. Los pretratamientos químicos, por otro lado, hacen uso de compuestos ácidos (diluidos o concentrados), bases, solventes orgánicos, compuestos oxidantes o líquidos iónicos. En lo que respecta a los procesos físico-químicos, el efecto ocasionado por la combinación de la acción física (cambio de temperaturas, presiones, etc.) y química (empleo de ácidos, solventes, etc.), permite la modificación estructural de la biomasa lignocelulósica, facilitando la extracción de sus componentes. Por último, los procesos biológicos implican el uso de microorganismos ligninolíticos o sus enzimas. Aunque son considerados seguros, respetuosos con el medio ambiente y consumen menos energía cuando se comparan con otros pretratamientos, la velocidad del proceso es muy baja y necesita mejoras para hacerlo una opción viable a nivel industrial [69].

En el caso de los residuos de la platanera, aunque no hay estudios en los que se obtengan oligosacáridos a partir de los mismos, sí hay estudios en los que se aplican diferentes pretratamientos con el fin de obtener un material en condiciones mejoradas para la hidrólisis enzimática y posterior fermentación de los azúcares obtenidos para la obtención de bioetanol. Los pretratamientos empleados en estas investigaciones incluyen pretratamiento con ácido sulfúrico diluido [5, 69, 251], con hidróxido de sodio [7, 67, 69, 251, 252], con hidróxido de calcio [253], pretratamiento alcalino asistido con microondas [254], pretratamiento con sosa o ácido sulfúrico asistido con microondas o ultrasonidos [7], explosión por vapor [5, 68], pretratamiento con agua líquida caliente [68] y pretratamiento biológico empleando hongos [69].

En la presente tesis se exploró, por una parte, el pretratamiento con sosa, por ser de los más empleados por su simplicidad y eficacia, y la autohidrólisis, pretratamiento que solo emplea agua como agente químico y que además permite la obtención de oligosacáridos [8]. Estos pretratamientos se explican más detalladamente en la memoria experimental en su capítulo correspondiente (Capítulo 5).

Una vez se ha realizado el pretratamiento, la biomasa se encuentra en unas condiciones mejoradas para la hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática de la celulosa consiste en la despolimerización de la misma, la cual se lleva a cabo mediante la adición de unas enzimas denominadas celulasas. El sistema de celulasas típico incluye 3 tipos de enzimas: 1) endoglucanasas o 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasas (EC.3.2.1.4); 2) exoglucanasas, que incluyen 1,4- β -D-glucano-glucanohidrolasas (celodextrinasas) (EC 3.2.1.74) y 1,4- β -D-glucano-celobiohidrolasas (celobiohidrolasas) (EC.3.2.1.91), y 3) β -glucosidasas o β -glucosidasa hidrolasas (EC.3.2.1.21):

- Las endoglucanasas (EG, endo-1,4- β -D-glucanasas) actúan de manera aleatoria en el interior de las regiones amorfas de la celulosa, rompiendo los enlaces β -1,4-glucosídicos y generando oligosacáridos de diferentes grados de polimerización. De esta forma, dan lugar a cadenas con extremos libres más accesibles para la actuación de las exoglucanasas.
- Las exoglucanasas incluyen las celobiohidrolasas y las glucanohidrolasas. Las celobiohidrolasas (CBH, 1,4- β -D-celobiohidrolasas) son aquellas que actúan sobre los extremos de las cadenas, liberando al medio celobiosas. Existen, a su vez, dos tipos: CBH I, atacan a los extremos reductores y CBH II que lo hacen sobre no reductores. Por otro lado, las glucanohidrolasas (1,4- β -D-glucanohidrolasa) son aquellas que actúan sobre los extremos no reductores, liberando unidades de glucosa.
- Las β -glucosidasas (BG, glucanohidrolasas) rompen el enlace β de las moléculas de celobiosa dando lugar a glucosa.

Si bien todas estas actividades son importantes para la obtención de glucosa, en el caso de la obtención de celo-oligosacáridos, no interesa la presencia de todas ellas, pues los oligosacáridos producidos son rápidamente hidrolizados por la acción de la β -glucosidasa. Las enzimas para la producción de oligosacáridos son producidas por microorganismos (bacterias y hongos). Entre los microorganismos productores de enzimas, la especie *Trichoderma reesei* es el microorganismo con aplicación en la industria lignocelulósica por excelencia. Este es rico en celobiohidrolasas y endogluconasas (además es conocido que presenta alta actividad exo- β -glucanasa en comparación con la endo- β -glucanasa [255]) y bajos niveles de actividad β -glucosidasa (BG) [256, 257].

Se están llevando a cabo numerosos esfuerzos económicos y científicos con el fin de mejorar dicha cepa tanto en sus niveles de producción de enzimas como en la obtención de mezclas equilibradas que incrementen la eficiencia de hidrólisis, aunque estos están centrados en la producción de glucosa.

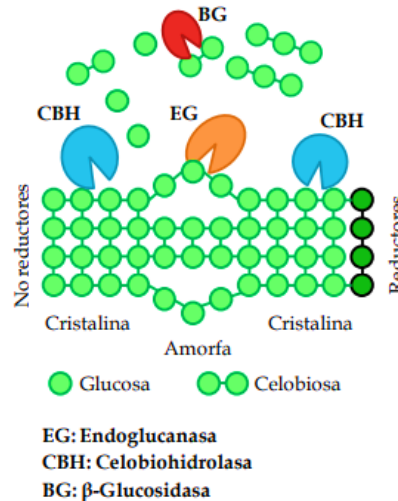


Figura 6. Esquema hidrólisis enzimática de la celulosa [258]

Además de una correcta mezcla de actividades enzimáticas, el proceso de hidrólisis enzimática está afectado por otros factores. Las variables implicadas en el proceso, como son el pH, la temperatura, el tiempo de reacción, la carga de enzima, la carga de sólido o la agitación, pueden ser adaptadas al material y al objetivo que se busca. Además de ajustar las variables implicados en la hidrólisis enzimática para favorecer la obtención de oligosacáridos, en las referencias mencionadas sobre la obtención de celo-oligosacáridos, en general, se proponen dos estrategias con este fin: el uso de enzimas “hechas a medida” (combinando enzimas puras de la actividad deseada) o la posibilidad de adaptar complejos enzimáticos disponibles comercialmente, que como ya se ha dicho normalmente son usados en la obtención de glucosa.

Dentro de la primera opción se incluyen los trabajos de Karnaouri y Barbosa [61, 62] en los que se lleva a cabo una optimización de la combinación de enzimas puras. Por otro lado, Barbosa [60], además de una combinación de endoglucanasas, empleó enzimas auxiliares, como las enzimas monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs) y celobiosa deshidrogenasa (CDH), con lactosa y cobre además como aditivos. Aunque la producción de mezclas de enzimas personalizadas para cada sustrato puede ofrecer ventajas (como la posibilidad de adaptar la composición del cóctel enzimático de acuerdo a las características específicas de cada biomasa), existen muchos factores que dificultan el poder realizar esto a mayor escala, como son los costes de producción y la laboriosidad de las técnicas, por lo que la posibilidad de adaptar complejos enzimáticos disponibles comercialmente se plantea como una opción más viable [64]. El problema que se encuentra al emplear complejos enzimáticos es que, como se ha dicho, estos presentan un conjunto de actividades que pueden no ser adecuadas para la obtención de oligosacáridos en lugar de glucosa, como se ha buscado tradicionalmente. En este sentido, por ejemplo Chu et al. [52], desarrollaron un proceso de adsorción-desorción para eliminar la β -glucosidasa presente en un complejo de celulasa. Otros autores [64], por su parte, modificaron el pH y la temperatura a fin de potenciar las actividad de interés para la obtención de oligosacáridos (celobiohidrolasas y endoglucanasas) y además añadieron un inhibidor de la β -glucosidasa (condurotol-B-epóxido).

Por otro lado, el conjunto de actividades presentes en un complejo enzimático actúa de forma sinérgica, por ello, al eliminar ciertas actividades del medio de reacción, pueden ocurrir problemas de inhibición de las otras enzimas. En este sentido Chu et al [52] y Karnaouri [64], además de las

adaptaciones realizadas a los complejos enzimáticos, emplearon una estrategia de hidrólisis en multi-etapa con reemplazos del medio de reacción a intervalos regulares de tiempo.

Finalmente, la pureza de los oligosacáridos obtenidos es también un aspecto que debe tenerse en cuenta, pues los hidrolizados obtenidos pueden presentar, además de monómeros y polisacáridos no hidrolizados, sales u otros compuestos. Aunque hay evidencias sobre efectos fisiológicos interesantes de mezclas de oligosacáridos, un producto final de alta pureza puede facilitar su inclusión en formulaciones de alimentos. La cromatografía en columna puede ser usada para obtener oligosacáridos individuales, sin embargo su aplicación se limita a pequeñas cantidades, no siendo aplicable a escala industrial [246]. Los celo-oligosacáridos también pueden ser separados mediante precipitación con ayuda de disolventes orgánicos como etanol o tetrahidrofurano, técnica que presenta la ventaja de ser escalable [247]. La precipitación elimina impurezas como sales y ácidos empleados durante la reacción. Además, este método puede usarse para separar los oligosacáridos por grupos de peso molecular ya que su solubilidad decrece al aumentar la longitud de la cadena. Soluciones acuosas de etanol o metanol permiten separar oligosacáridos de mayor tamaño (grado de polimerización 4-6) de aquellos con menor grado de polimerización [259]. Karnouri et al. [64] emplearon una separación por membranas (ultrafiltración para eliminar la enzima, combinada con nanofiltración para eliminar glucosa y otras moléculas de bajo peso molecular). La evaporación a vacío podría ser una opción para eliminar compuestos volátiles y concentrar los oligosacáridos [229].

6. Índice de tablas y figuras

6.1. Índice de tablas

Tabla 1. Subproductos generados en el cultivo del plátano por cada planta [75]	41
Tabla 2 Composición porcentual de los diferentes subproductos del cultivo del plátano, según varios autores [7–10, 82–87]	42
Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de distintos métodos de extracción de antioxidantes de partir de materiales de origen vegetal [183]	54
Tabla 4. Composición de la pared celular de varios materiales lignocelulósicos [231]	60

6.2. Índice de figuras

Figura 1. Partes de la platanera	40
Figura 2. Evolución de la producción mundial de la pesca de captura y acuicultura [21]	45
Figura 3. Esquema antioxidantes naturales	51
Figura 4. Principales componentes de los materiales lignocelulósicos [230]	60
Figura 5. Efecto del pretratamiento sobre la estructura del material lignocelulósico [236]	63

Figura 6. Esquema hidrólisis enzimática de la celulosa [256]	65
--	----

7. Bibliografía

1. Mohapatra D, Mishra S, Sutar N (2010) Banana and its by-product utilisation: an overview. *J Sci Ind Res* 69:323–329
2. FAO FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Banana facts and figures. <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/bananafacts/en/#.XnuyXoj7TIV>. Accessed 25 Mar 2020
3. ASPROCAN Asociación de Organizaciones de Productores de Plátanos de Canarias (ASPROCAN). Estadísticas de producción y comercialización de Plátano de Canarias. 2018. https://platanodecanarias.es/wp-content/uploads/2019/03/DossierPDC_2018.pdf. Accessed 25 Mar 2020
4. Dupuis I (2015) Evaluación de subproductos agroalimentarios para la alimentación animal en Canarias. <https://coagcanarias.com/wp-content/uploads/2016/04/EvaluacionSubproductosAgroalimentarios.pdf>. Accessed 14 Apr 2021
5. Ingale S, Joshi SJ, Gupte A (2014) Production of bioethanol using agricultural waste: Banana pseudo stem. *Brazilian J Microbiol* 45:885–892. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300018>
6. Souza EL, Liebl GF, Marangoni C, et al (2014) Bioethanol from fresh and dried banana plant pseudostem. *Chem Eng Trans* 38:271–276. <https://doi.org/10.3303/CET1438046>
7. Gabhane J, Prince William SPM, Gadhe A, et al (2014) Pretreatment of banana agricultural waste for bio-ethanol production: Individual and interactive effects of acid and alkali pretreatments with autoclaving, microwave heating and ultrasonication. *Waste Manag* 34:498–503. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.013>
8. Guerrero AB, Ballesteros I, Ballesteros M (2017) Optimal conditions of acid-catalysed steam explosion pretreatment of banana lignocellulosic biomass for fermentable sugar production. *J Chem Technol Biotechnol* 92:2351–2359. <https://doi.org/10.1002/jctb.5239>
9. Oliveira L, Cordeiro N, Evtuguin DV, et al (2007) Chemical composition of different morphological parts from ‘Dwarf Cavendish’ banana plant and their potential as a non-wood renewable source of natural products. *Ind Crops Prod* 26:163–172. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2007.03.002>
10. Guerrero AB, Aguado PL, Sánchez J, Curt MD (2016) GIS-Based Assessment of Banana Residual Biomass Potential for Ethanol Production and Power Generation: A Case Study. *Waste and Biomass Valorization* 7:405–415. <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9455-3>
11. Bennett RN, Shiga TM, Hassimotto NMA, et al (2010) Phenolics and antioxidant properties of fruit pulp and cell wall fractions of postharvest banana (*musa acuminata* juss.) Cultivars. *J Agric Food Chem* 58:7991–8003. <https://doi.org/10.1021/jf1008692>
12. Devatkal SK, Kumboj R, Paul D (2014) Comparative antioxidant effect of BHT and water extracts of banana and sapodilla peels in raw poultry meat. *J Food Sci Technol*

- 51:387–391. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0508-8>
13. Sundaram S, Anjum S, Dwivedi P, Rai GK (2011) Antioxidant activity and protective effect of banana peel against oxidative hemolysis of human erythrocyte at different stages of ripening. *Appl Biochem Biotechnol* 164:1192–1206. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9205-3>
14. Saravanan K, Aradhya SM (2011) Potential nutraceutical food beverage with antioxidant properties from banana plant bio-waste (pseudostem and rhizome). *Food Funct* 2:603–610. <https://doi.org/10.1039/c1fo10071h>
15. Kandasamy S, Baggu C, Javagal MR, et al (2014) Antioxidant Properties of Isolated Compounds from Banana Rhizome. *J Food Sci* 79:H988–H1001. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12414>
16. Bhaskar JJ, Mahadevamma S, Chilkunda ND, Salimath P V. (2012) Banana (*Musa* sp. var. elakki bale) flower and pseudostem: Dietary fiber and associated antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 60:427–432. <https://doi.org/10.1021/jf204539v>
17. Karuppiyah P, Mustaffa M (2013) Antibacterial and antioxidant activities of *Musa* sp. leaf extracts against multidrug resistant clinical pathogens causing nosocomial infection. *Asian Pac J Trop Biomed* 3:737–742. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60148-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60148-3)
18. Kamdem I, Jacquet N, Tiappi FM, et al (2015) Comparative biochemical analysis after steam pretreatment of lignocellulosic agricultural waste biomass from Williams Cavendish banana plant (Triploid *Musa* AAA group). *Waste Manag Res* 33:1022–1032
19. Guerrero AB, Ballesteros I, Ballesteros M (2018) The potential of agricultural banana waste for bioethanol production. *Fuel* 213:176–185. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.10.105>
20. El-Zawawy WK, Ibrahim MM, Abdel-Fattah YR, et al (2011) Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. *Carbohydr Polym* 84:865–871
21. FAO (2020) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma
22. Cerdá MJ (2012) Futuro de la alimentación de los peces en granjas marinas. *Aquat Rev electrónica Acuic* 78–89
23. Oliva-Teles A (2012) Nutrition and health of aquaculture fish. *J Fish Dis* 35:83–108
24. Hernández A, García García B, Jordán MJ, Hernández MD (2014) Natural antioxidants in extruded fish feed: Protection at different storage temperatures. *Anim Feed Sci Technol* 195:112–119. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2014.06.003>
25. Armenta López G, Sumaya Martínez M, Spanopoulos Hernández M, et al (2015) Inclusion of natural antioxidant compounds in fish feeds to counteract oxidative stress. *Rev Bio Ciencias* 3:68–78
26. Li A-N, Li S, Zhang Y-J, et al (2014) Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* 6:6020–6047. <https://doi.org/10.3390/nu6126020>
27. Lizárraga-Velázquez CE, Hernández C, González-Aguilar GA, Basilio-Heredia J (2018) Propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de polifenoles en peces carnívoros de cultivo. *CienciaUAT* 12:127. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v12i2.904>

28. Sankar Giri S, Woo Jun J, Sukumaran V, Chang Park S (2016) Dietary Administration of Banana (*Musa acuminata*) Peel Flour Affects the Growth, Antioxidant Status, Cytokine Responses, and Disease Susceptibility of Rohu, *Labeo rohita*. *J Immunol Res* 2016:. <https://doi.org/10.1155/2016/4086591>
29. Rattanavichai W, Cheng W (2014) Effects of hot-water extract of banana (*Musa acuminata*) fruit's peel on the antibacterial activity, and anti-hypothermal stress, immune responses and disease resistance of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* 39:326–335. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.031>
30. Rattanavichai W, Cheng W (2015) Dietary supplement of banana (*Musa acuminata*) peels hot-water extract to enhance the growth, anti-hypothermal stress, immunity and disease resistance of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* 43:415–426. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.011>
31. Anal AK, Jaisanti S, Noomhorm A (2014) Enhanced yield of phenolic extracts from banana peels (*Musa acuminata* Colla AAA) and cinnamon barks (*Cinnamomum varum*) and their antioxidative potentials in fish oil. *J Food Sci Technol* 51:2632–2639. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0793-x>
32. Saravanan K, Aradhya SM (2011) Polyphenols of pseudostem of different banana cultivars and their antioxidant activities. *J Agric Food Chem* 59:3613–3623. <https://doi.org/10.1021/jf103835z>
33. Kumar Y, Yadav DN, Ahmad T, Narsaiah K (2015) Recent Trends in the Use of Natural Antioxidants for Meat and Meat Products. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 14:796–812. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12156>
34. Awele Okolie J, Henry OE, Epelle EI (2016) Determination of the Antioxidant Potentials of Two Different Varieties of Banana Peels in Two Different Solvents. *Food Nutr Sci* 07:1253–1261. <https://doi.org/10.4236/fns.2016.713115>
35. Toh PY, Leong FS, Chang SK, et al (2016) Optimization of extraction parameters on the antioxidant properties of banana waste. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 15:65–78. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2016.1.7>
36. Šeremet D, Durgo K, Jokić S, et al (2020) Valorization of Banana and Red Beetroot Peels: Determination of Basic Macrocomponent Composition, Application of Novel Extraction Methodology and Assessment of Biological Activity In Vitro. *Sustainability* 12:1–21
37. Schmidt MM, Prestes RC, Kubota EH, et al (2015) Evaluation of antioxidant activity of extracts of banana inflorescences (*Musa cavendishii*). *CyTA - J Food* 1–8. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1007532>
38. Ringø E, Song SK (2016) Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. *Aquac Nutr* 22:4–24. <https://doi.org/10.1111/anu.12349>
39. Hoseinifar SH, Esteban MÁ, Cuesta A, Sun YZ (2015) Prebiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Rev Fish Sci Aquac* 23:315–328. <https://doi.org/10.1080/23308249.2015.1052365>
40. Jose Meseguer RC (2011) Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture: A Review. *J Aquac Res Dev* s1:1–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.S1-008>
41. Dimitroglou A, Merrifield DL, Carnevali O, et al (2011) Microbial manipulations to

- improve fish health and production – A Mediterranean perspective. *Fish Shellfish Immunol* 30:1–16. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2010.08.009>
42. Ringø E, Olsen RE, Gifstad TØ, et al (2010) Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquac Nutr* 16:117–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>
43. Ibrahim MD, Fathi M, Mesalhy S, Abd El-Aty AM (2010) Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol* 29:241–246. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.03.004>
44. Burr G, Hume M, Ricke S, et al (2010) In Vitro and In Vivo Evaluation of the Prebiotics GroBiotic®-A, Inulin, Mannanooligosaccharide, and Galactooligosaccharide on the Digestive Microbiota and Performance of Hybrid Striped Bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Microb Ecol* 59:187–198. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9597-6>
45. Wichienchot S, Jatupornpipat M, Rastall RA (2010) Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chem* 120:850–857. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.026>
46. Barreteau H, Delattre C, Michaud P (2006) Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technol Biotechnol* 44:323–333
47. Nabarlantz D, Ebringerová A, Montané D (2007) Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydr Polym* 69:20–28. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.020>
48. Moniz P, Pereira H, Quilhó T, Carneiro F (2013) Industrial crops and products. Elsevier Science
49. Borrega M, Nieminen K, Sixta H (2011) Degradation kinetics of the main carbohydrates in birch wood during hot water extraction in a batch reactor at elevated temperatures. *Bioresour Technol* 102:10724–10732. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.027>
50. Abdelmalek BE, Driss D, Kallel F, et al (2015) Effect of xylan oligosaccharides generated from corncobs on food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters of *Dicentrarchus labrax* fingerlings. *Fish Physiol Biochem* 41:1587–1596. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0110-5>
51. Rastall RA, Hotchkiss AT (2003) Potential for the Development of Prebiotic Oligosaccharides from Biomass. pp 44–53
52. Chu Q, Li X, Xu Y, et al (2014) Functional cello-oligosaccharides production from the corncob residues of xylo-oligosaccharides manufacture. *Process Biochem* 49:1217–1222. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2014.05.007>
53. Jiao LF, Ke YL, Xiao K, et al (2015) Effects of cello-oligosaccharide on intestinal microbiota and epithelial barrier function of weanling pigs. *J Anim Sci* 93:1157–1164
54. Otsuka M, Ishida A, Nakayama Y, et al (2004) Dietary supplementation with cellooligosaccharide improves growth performance in weanling pigs. *Anim Sci J* 75:225–229
55. Jiao LF, Song ZH, Ke YL, et al (2014) Cello-oligosaccharide influences intestinal microflora, mucosal architecture and nutrient transport in weaned pigs. *Anim Feed Sci Technol* 195:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.05.014>

56. Satouchi M, Watanabe T, Wakabayashi S, et al (1996) Digestibility, absorptivity and physiological effects of cellooligosaccharides in human and rat. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi (J Jpn Soc Nutr Sci)* 49:143–148. <https://doi.org/https://doi.org/10.4327/jsnfs.49.143>
57. Song J, Jiao LF, Xiao K, et al (2013) Cello-oligosaccharide ameliorates heat stress-induced impairment of intestinal microflora, morphology and barrier integrity in broilers. *Anim Feed Sci Technol* 185:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.08.001>
58. Hasunuma T, Kawashima K, Nakayama H, et al (2011) Effect of cellooligosaccharide or synbiotic feeding on growth performance, fecal condition and hormone concentrations in Holstein calves. *Anim Sci J* 82:543–548
59. K K, S T, M H, et al (2019) Provision of beta-glucan prebiotics (cellooligosaccharides and kraft pulp) to calves from pre- to post-weaning period on pasture. *Anim Sci J* 90:1537–1543. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13299>
60. Barbosa FC, Kendrick E, Brenelli LB, et al (2020) Optimization of cello-oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane straw using cellulolytic and oxidative enzymes. *Biomass and Bioenergy* 141:105697. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105697>
61. Barbosa FC, Martins M, Brenelli LB, et al (2020) Screening of potential endoglucanases, hydrolysis conditions and different sugarcane straws pretreatments for cello-oligosaccharides production. *Bioresour Technol* 316:123918. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123918>
62. Karnaouri A, Topakas E, Matsakas L, et al (2018) Fine-Tuned Enzymatic Hydrolysis of Organosolv Pretreated Forest Materials for the Efficient Production of Cellobiose. *Front Chem* 6:128. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00128>
63. Karnaouri A, Matsakas L, Krikigianni E, et al (2019) Valorization of waste forest biomass toward the production of cello-oligosaccharides with potential prebiotic activity by utilizing customized enzyme cocktails. *Biotechnol Biofuels* 12:. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1628-z>
64. Karnaouri A, Matsakas L, Bühler S, et al (2019) Tailoring celluclast® cocktail's performance towards the production of prebiotic cello-oligosaccharides from waste forest biomass. *Catalysts* 9:. <https://doi.org/10.3390/catal9110897>
65. Birhade S, Pednekar M, Sagwal S, et al (2017) Preparation of cellulase concoction using differential adsorption phenomenon. *Prep Biochem Biotechnol* 47:520–529. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/10826068.2016.1275009>
66. de Souza EL, Sellin N, Marangoni C, Souza O (2017) The Influence of Different Strategies for the Saccharification of the Banana Plant Pseudostem and the Detoxification of Concentrated Broth on Bioethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol* 183:943–965. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2475-7>
67. Low JC, Halis R, Shah UKM, et al (2015) Enhancing Enzymatic Digestibility of Alkaline Pretreated Banana Pseudostem for Sugar Production. *BioResources* 10:1213–1223
68. Santa-Maria M, Ruiz-Colorado AA, Cruz G, Jeoh T (2013) Assessing the Feasibility of Biofuel Production from Lignocellulosic Banana Waste in Rural Agricultural Communities in Peru and Colombia. *Bioenergy Res* 6:1000–1011. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9333-4>

69. Thakur S, Shrivastava B, Ingale S, et al (2013) Degradation and selective ligninolysis of wheat straw and banana stem for an efficient bioethanol production using fungal and chemical pretreatment. 3 Biotech 3:365–372. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0102-4>
70. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura EST: Banano. <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/banano/es/>. Accessed 8 Sep 2021
71. Robinson JC, Galán Saúco V (2012) Plátanos y bananas. Editorial Paraninfo
72. ASPROCAN (2020) Estadísticas 2020 de producción y comercialización de plátano de Canarias IGP. <https://platanodecanarias.es/asprocan/que-es-asprocan/>
73. (2014) Compost en Platanera. <http://www.volcandesanjuan.es/noticias/122-compost-en-platanera.html>. Accessed 16 Sep 2021
74. Ortega Medina Z (2012) Comportamiento de los composites plásticos reforzados con fibra de platanera obtenidos a partir de procesos de moldeo rotacional. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
75. Ma J (2015) Banana Pseudostem: properties nutritional composition and use as food. The UniveristyY of New South Wales
76. Álvarez S, Fresno M, Méndez P (2009) Utilización de los subproductos de la platanera en la alimentación del ganado caprino. Agropalca 4:
77. Álvarez Ríos S (2010) Aprovechamiento de subproductos de la platanera para alimentación animal. <https://www.icia.es/biomusa/es/jornadas-y-actividades/primeras-jornadas-de-transferencia-de-idi/19-de-octubre-de-2010-tercera-sesion/25-aprovechamiento-de-subproductos-sergio-alvarez/file>. Accessed 16 Sep 2021
78. Álvarez S, Médez P, Fresno M Ensilado de destrío de plátano para la alimentación caprina. https://www.icia.es/icia/GanAfrica/Ensilado_Platano.pdf
79. Hossain ABMS, Ahmed SA, M. A, et al (2011) Bioethanol fuel production from rotten banana as an environmental waste management and sustainable energy. African J Microbiol Res 5:586–598. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.231>
80. Abdul Aziz NA, Ho L-H, Azahari B, et al (2011) Chemical and functional properties of the native banana (*Musa acuminata*×*balbisiana* Colla cv. Awak) pseudo-stem and pseudo-stem tender core flours. Food Chem 128:748–753. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.100>
81. Compost en Platanera. <http://www.volcandesanjuan.es/noticias/122-compost-en-platanera.html>. Accessed 16 Sep 2021
82. Kennedy J (2009) Bananas and People in the Homeland of Genus Musa: Not just pretty fruit. Ethnobot Res Appl 7:179–197
83. Ulloa JB, Van Weerd JH, Huisman EA, Verreth JAJ (2004) Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: The Costa Rican situation. Waste Manag 24:87–97. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2003.09.003>
84. Abou-Arab AA, Abu-Salem FM (2018) Nutritional and Anti-Nutritional Composition of Banana Peels as Influenced by Microwave Drying Methods. Int J Nutr Food Eng 11:845–852. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1317334>
85. Pyar H, Peh KK (2018) Chemical Compositions of Banana Peels (*Musa sapientum*)

- Fruits cultivated in Malaysia using proximate analysis. *Res J Chem Environ* 22:108–111
86. Salazar D, Arancibia M, Calderón L, et al (2021) Underutilized Green Banana (*Musa acuminata* AAA) Flours to Develop Fiber Enriched Frankfurter-Type Sausages. *Foods* 2021, Vol 10, Page 1142 10:1142. <https://doi.org/10.3390/FOODS10051142>
 87. Kabenge I, Omulo G, Banadda N, et al (2018) Characterization of Banana Peels Wastes as Potential Slow Pyrolysis Feedstock. *J Sustain Dev* 11:14. <https://doi.org/10.5539/JSD.V11N2P14>
 88. Kayisu K, Hood L, Vansoest P (1981) Characterization of Starch and Fiber of Banana Fruit. *J Food Sci* 46:1885–1890. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1981.TB04511.X>
 89. Li Z, Guo K, Lin L, et al (2018) Comparison of physicochemical properties of starches from flesh and Peel of Green Banana Fruit. *Molecules* 23:. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23092312>
 90. Rosentrater K, Todey D, Persyn R", et al (2009) Quantifying Total and Sustainable Agricultural Biomass Resources in South Dakota-A Preliminary Assessment. *Agric Eng Int CIGR J Sci Res Dev* 1059–1058–1
 91. Padam BS, Tin HS, Chye FY, Abdullah MI (2014) Banana by-products: an under-utilized renewable food biomass with great potential. *J. Food Sci. Technol.* 51:3527–3545
 92. Uma S, Kalpana S, Sathiamoorthy K (2005) Evaluation of commercial cultivars of banana (*Musa*) for their suitability for the fiber industry. *Plant Genet Res Newsl* 142:29–35
 93. Savastano H, Warden PG, Coutts RSP (2005) Microstructure and mechanical properties of waste fibre-cement composites. In: *Cement and Concrete Composites*. Elsevier, pp 583–592
 94. Zhu WH, Tobias BC, Coutts RSP, Langfors G (1994) Air-cured banana-fibre-reinforced cement composites. *Cem Concr Compos* 16:3–8. [https://doi.org/10.1016/0958-9465\(94\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0958-9465(94)90024-8)
 95. Mishra S, Naik JB, Patil YP (2000) The compatibilising effect of maleic anhydride on swelling and mechanical properties of plant-fiber-reinforced novolac composites. *Compos Sci Technol* 60:1729–1735. [https://doi.org/10.1016/S0266-3538\(00\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(00)00056-7)
 96. Joseph S, Sreekala MS, Oommen Z, et al (2002) A comparison of the mechanical properties of phenol formaldehyde composites reinforced with banana fibres and glass fibres. *Compos Sci Technol* 62:1857–1868. [https://doi.org/10.1016/S0266-3538\(02\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(02)00098-2)
 97. Sapuan SM, Leenie A, Harimi M, Beng YK (2006) Mechanical properties of woven banana fibre reinforced epoxy composites. *Mater Des* 27:689–693. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2004.12.016>
 98. Zainudin ES, Sapuan SM, Abdan K, Mohamad MTM (2009) Thermal degradation of banana pseudo-stem filled unplasticized polyvinyl chloride (UPVC) composites. *Mater Des* 30:557–562. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2008.05.060>
 99. Saraiva AB, Pacheco E, Visconte LLY, Pereira E (2012) Potentials for utilization of post-fiber extraction waste from tropical fruit production in Brazil–The example of banana pseudo-stem. *Int J Environ Bioenergy* 4:101–119

100. John M, Anandjiwala R (2009) Surface modification and preparation techniques for textile materials. Woodhead Publishing Ltd
101. Li K, Fu S, Zhan H, et al (2010) Analysis of the chemical composition and morphological structure of banana pseudo-stem. *BioResources* 5:576–585. <https://doi.org/10.15376/biores.5.2.576-585>
102. Tock JY, Lai CL, Lee KT, et al (2010) Banana biomass as potential renewable energy resource: A Malaysian case study. *Renew Sustain Energy Rev* 14:798–805
103. Ogunsile BO, Omotoso MA, Onilude MA (2006) Comparative soda pulps from the mid-rib, pseudostem and stalk of *Musa paradisiaca*. *J Biol Sci* 6:1047–1052. <https://doi.org/10.3923/jbs.2006.1047.1052>
104. Mire M-A, Benjelloun-Mlayah B, Delmas M, Bravo R (2005) Formic Acid/Acetic Acid Pulping of Banana Stem (*Musa Cavendish*). *Appita J* 58:393–396
105. Jacob N, Prema P (2008) Novel process for the simultaneous extraction and degumming of banana fibers under solid-state cultivation. *Braz J Microbiol* 39:115–21. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080001000025>
106. Sharma N, Kalra KL, Oberoi HS, Bansal S (2007) Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. *Indian J Microbiol* 47:310–316. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0057-z>
107. Ilori MO, Adebuseye SA, Lawal A, Awotiwon OA (2007) Production of biogas from banana and plantain peels. *Adv Environ Biol* 1:33–38
108. Tumutegyeize P, Muranga FI, Kawongolo J, Nabugoomu F (2011) Optimization of biogas production from banana peels: Effect of particle size on methane yield. *African J Biotechnol* 10:18243–18251. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2442>
109. Velásquez-Arredondo HI, Ruiz-Colorado AA, De Oliveira S (2010) Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: Energy analysis. *Energy* 35:3081–3087. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2010.03.052>
110. Shafique S, Asgher M, Sheikh MA, Asad MJ (2004) Solid state fermentation of banana stalk for exoglucanase production. *Int J Agric Biol* 6:488–491
111. Bonatti M, Karnopp P, Soares HM, Furlan SA (2004) Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chem* 88:425–428. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.050>
112. Álvarez S, Méndez P, Martínez-Fernández A (2015) Fermentative and nutritive quality of banana by-product silage for goats. *J Appl Anim Res* 43:396–401. <https://doi.org/10.1080/09712119.2014.978782>
113. Álvarez S, Fresno M, Rodríguez AV, et al (2011) Utilización del ensilado de platanera en la alimentación de las cabras, efecto en la calidad físico – química y sensorial de los quesos elaborados con leche cruda de cabra. *Actas Iberoam Conserv Anim* 239–242
114. Marie-Magdeleine C, Liméa L, Etienne T, et al (2009) The effects of replacing *Dichantium* hay with banana (*Musa paradisiaca*) leaves and pseudo-stem on carcass traits of Ovin Martinik sheep. *Trop Anim Health Prod* 41:1531–1538. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9344-5>

115. Da Mota R V., Lajolo FM, Ciacco C, Cordenunsi BR (2000) Composition and Functional Properties of Banana Flour from Different Varieties. *Starch/Staerke* 52:63–68. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-379x\(200004\)52:2/3<63::aid-star63>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-379x(200004)52:2/3<63::aid-star63>3.0.co;2-v)
116. Zhang P, Whistler RL, Bemiller JN, Hamaker BR (2005) Banana starch: Production, physicochemical properties, and digestibility - A review. *Carbohydr Polym* 59:443–458. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.10.014>
117. Emaga TH, Robert C, Ronkart SN, et al (2008) Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. *Bioresour Technol* 99:4346–4354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.030>
118. Adinugraha MP, Marseno DW, Haryadi (2005) Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from cavendish banana pseudo stem (*Musa cavendishii* LAMBERT). *Carbohydr Polym* 62:164–169. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.07.019>
119. Elanthikkal S, Gopalakrishnapanicker U, Varghese S, Guthrie JT (2010) Cellulose microfibrils produced from banana plant wastes: Isolation and characterization. *Carbohydr Polym* 80:852–859. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.043>
120. APROMAR (2019) La acuicultura en España 2019. <http://www.apromar.es/>
121. Craig S, College V, Medicine V, Tech V (2017) Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding. Virginia Coop Extension Virginia State Univ
122. FAO NUTRICION Y ALIMENTACION DE PECES Y CAMARONES CULTIVADOS. MANUAL DE CAPACITACION. <http://www.fao.org/3/AB492S/AB492S02.htm>. Accessed 9 Sep 2021
123. Palos LB (2010) Sustitución de aceites de pescado en dietas de engorde de dorada (*Sparus aurata*) ricas en proteínas vegetales. Efecto sobre el crecimiento y los perfiles de ácidos grasos. Universitat Politècnica de València
124. Larrain FJZ (2002) Las harinas y aceites de pescado en la alimentación acuicola. *Av en Nutr Acuicola VI* 2:516–526. <https://doi.org/10.1038/srep03004>
125. García-Ortega A, Muy-Rangel D, Puello-Cruz A, et al (2010) Uso de ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteína y lípidos en alimentos balanceados para peces marinos carnívoros. *Av en Nutr Acuicola X Memorias del Décimo Simp Int Nutr Acuicola* 321–340
126. Sales J (2009) The effect of fish meal replacement by soyabean products on fish growth: a meta-analysis. *Br J Nutr* 102:1709–1722
127. Eleazar L, Fabián, Canseco, et al (2015) Desarrollo de alimentos formulados para especies acuícolas. *Rev Mex Agroecosistemas* 2:40–48
128. Vizcaíno Torres AJ (2017) Evaluación de la harina de algas como ingrediente en piensos de peces marinos. *Aquat Rev Científica Int Acuic en Español – Rev Of la Soc Española Acuic SEA* 48:
129. Sales J, Glencross B (2011) A meta-analysis of the effects of dietary marine oil replacement with vegetable oils on growth, feed conversion and muscle fatty acid composition of fish species. *Aquac Nutr* 17:e271–e287
130. Bandara T (2018) Alternative feed ingredients in aquaculture : Opportunities and challenges. *J Entomol Zool Stud* 6:3087–3094

131. Gasco L, Gai, Francesco Maricchiolo G, Genovese, Lucrezia Ragonese S, et al (2018) Chapter 4: Supplementation of Vitamins, Minerals, Enzymes and Antioxidants in Fish Feeds. In: Feeds for the Aquaculture Sector: Current Situation and Alternative. Springer
132. Soluciones des Acuicultura- Adisseo. <https://www.adisseo.com/es/especies/aqua/>. Accessed 9 Sep 2021
133. Jooyandeh H, Aberoumand A (2011) A Review on Natural Antioxidants in Fish: Stabilizing Effect on Sensitive Nutrients. *Middle-East J Sci Res* 7:170–174
134. Halliwell B, Gutteridge JMC (1985) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press
135. Niki E (2010) Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 49:503–515
136. Kebede M, Admassu S (2019) Application of Antioxidants in Food Processing Industry: Options to Improve the Extraction Yields and Market Value of Natural Products. *Adv Food Technol Nutr Sci – Open J* 5:38–49. <https://doi.org/10.17140/aftnsoj-5-155>
137. Jones D (2008) Pharmaceutical solutions for oral administration. In: *Pharm. Dos. Form Des.* https://www.pharmpress.com/files/docs/FT_pharm_dosage_sample.pdf
138. Cherubim DJ, Martins CV, Fariña L, Lucca RA (2020) Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *J Cosmet Dermatol* 19:33–37. <https://doi.org/10.1111/jocd.13093>
139. Díaz Reinoso B (2015) Recuperación de antioxidantes por tecnologías emergentes a partir de efluentes industriales y residuos forestales. Universidade de Vigo
140. Soto Álvarez ML (2015) Extracción y purificación de compuestos fenólicos a partir de subproductos de destilería de vino. Universidad de Vigo
141. Hraš AR, Hadolin M, Knez Ž, Bauman D (2000) Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem* 71:229–233
142. Avello M, Suwalsky M (2006) Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)* 161–172
143. Stevenson DE, Hurst RD (2007) Polyphenolic phytochemicals - Just antioxidants or much more? *Cell. Mol. Life Sci.* 64:2900–2916
144. Ignat I, Volf I, Popa VI (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 126:1821–1835
145. Peiró Sánchez S (2015) Actividad antioxidante del té blanco y de los residuos de limón: optimización de la extracción y aplicaciones en carne y en envases activos. Universitat de Barcelona
146. Bulfon C, Volpatti D, Galeotti M (2015) Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquac Res* 46:513–551. <https://doi.org/10.1111/are.12238>
147. Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, et al (2014) Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433:50–61
148. Vaseeharan B, Thaya R (2014) Medicinal plant derivatives as immunostimulants: An

- alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquac. Int.* 22:1079–1091
149. Afzal M, Safer AM, Menon M (2015) Green tea polyphenols and their potential role in health and disease. *Inflammopharmacology* 23:151–161
150. Shahidi F, Ambigaipalan P (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *J. Funct. Foods* 18:820–897
151. Moure A, Cruz JM, Franco D, et al (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 72:145–171. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5)
152. da Silva AC, Jorge N (2014) Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste. *Food Res Int* 66:493–500. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.025>
153. Saura-Calixto F (1998) Antioxidant Dietary Fiber Product: A New Concept and a Potential Food Ingredient. <https://doi.org/10.1021/JF9803841>
154. Shrikhande AJ (2000) Wine by-products with health benefits. *Food Res Int* 33:469–474. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00071-5)
155. Negro C, Tommasi L, Miceli A (2003) Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresour Technol* 87:41–4
156. Singh S, Prakash P (2015) Evaluation of Antioxidant Activity of Banana Peels (*Musa acuminata*) Extracts Using Different Extraction Methods. *Chem Sci Trans* 4:158–160. <https://doi.org/10.7598/cst2015.921>
157. Loganayaki N, Rajendrakumaran D, Manian S (2010) Antioxidant capacity and phenolic content of different solvent extracts from banana (*Musa paradisiaca*) and mustai (*Rivea hypocrateriformis*). *Food Sci Biotechnol* 19:1251–1258. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0179-7>
158. Sidhu JS, Zafar TA (2018) Bioactive compounds in banana fruits and their health benefits. *Food Qual. Saf.* 2:183–188
159. Aboul-Enein AM, Salama ZA, Gaafar AA, et al (2016) Identification of phenolic compounds from banana peel (*Musa paradisica* L.) as antioxidant and antimicrobial agents. *J Chem Pharm Res* 8:46–55
160. Jouany J-P, Morgavi DP (2007) Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* 1:1443–1466. <https://doi.org/10.1017/S1751731107000742>
161. Ortiz J, Larraín MA, Vivanco JP, Aubourg SP (2009) Rancidity development during the frozen storage of farmed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Effect of antioxidant composition supplied in the diet. *Food Chem* 115:143–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.076>
162. O’Hara M, Kiefer D, Farrell K, Kemper K A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch Fam Med* 7:523–36
163. Citarasu T (2010) Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquac Int* 18:403–414. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7>
164. Sönmez AY, Bilen S, Alak G, et al (2015) Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish Physiol Biochem* 41:165–175.

<https://doi.org/10.1007/s10695-014-0014-9>

165. Goda AMA-S (2008) Effect of Dietary Ginseng Herb (Ginsana[®] G115) Supplementation on Growth, Feed Utilization, and Hematological Indices of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), Fingerlings. *J World Aquac Soc* 39:205–214. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00153.x>
166. Soleimany V, Banaee M, Mohiseni M, et al (2016) Evaluation of pre-clinical safety and toxicology of *Althaea officinalis* extracts as naturopathic medicine for common carp (*Cyprinus carpio*). *Iran J Fish Sci* 15:613–629
167. Antache A, Cristea V, Iulia GR, et al (2013) The Influence of Rosemary, Sea Buckthorn and Ginger on Oxidative Stress at *Oreochromis Niloticus* Reared in a Recirculating Aquaculture System. *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Anim Sci Biotechnol* 70:110–116. <https://doi.org/10.15835/BUASVMCN-ASB:70:1:9292>
168. Metwally MAA (2009) Effect of Garlic (*Allium sativum*) on Some Heavy Metal (Copper and Zinc) Induced Alteration in Serum Lipid Profile of *Oreochromis niloticus*. *World J Fish Mar Sci* 1:1–6
169. Abdel-Tawwab M, Sharafeldin KM, Mosaad MNM, Ismaiel NEM (2015) Coffee bean in common carp, *Cyprinus carpio* L. diets: Effect on growth performance, biochemical status, and resistance to waterborne zinc toxicity. *Aquaculture* 448:207–213. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2015.06.010>
170. Nootash S, Sheikhzadeh N, Baradaran B, et al (2013) Green tea (*Camellia sinensis*) administration induces expression of immune relevant genes and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 35:1916–1923. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.030>
171. Hwang J-H, Lee S-W, Rha S-J, et al (2013) Dietary green tea extract improves growth performance, body composition, and stress recovery in the juvenile black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquac Int* 21:525–538. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9586-5>
172. Abdel-Tawwab M, Ahmad MH, Seden MEA, Sakr SFM (2010) Use of Green Tea, *Camellia sinensis* L., in Practical Diet for Growth and Protection of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), against *Aeromonas hydrophila* Infection. *J World Aquac Soc* 41:203–213. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00360.x>
173. Zhou J, Lin Y, Ji H, Yu H (1976) The Effect of Green Tea Waste on Growth and Health of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Cut Tool Eng* 28:679–689. <https://doi.org/10.4194/1303-2712-v16>
174. Akrami R, Gharaei A, Mansour MR, Galeshi A (2015) Effects of dietary onion (*Allium cepa*) powder on growth, innate immune response and hemato–biochemical parameters of beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1754) juvenile. *Fish Shellfish Immunol* 45:828–834. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.06.005>
175. Sicuro B, Daprà F, Gai F, et al (2010) Olive oil by-product as a natural antioxidant in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) nutrition. *Aquac Int* 18:511–522. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9262-6>
176. Rafehi H, Ververis K, Karagiannis TC (2012) Mechanisms of Action of Phenolic Compounds in Olive. *J Diet Suppl* 9:96–109. <https://doi.org/10.3109/19390211.2012.682644>
177. Villasante A, Patro B, Chew B, et al (2015) Dietary Intake of Purple Corn Extract Reduces Fat Body Content and Improves Antioxidant Capacity and n-3 Polyunsaturated

- Fatty Acid Profile in Plasma of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. J World Aquac Soc 46:381–394. <https://doi.org/10.1111/jwas.12206>
178. Mohiseni M (2017) Medicinal Herbs , Strong Source of Antioxidant in Aquaculture : A Mini Review. Mod Appl Pharm Pharmacol 1:1–5. <https://doi.org/10.31031/MAPP.2017.01.000504>
179. Antache A, Cristea V, Grecu I, Cretu M (2014) The synergistic influence of Thymus vulgaris and vitamin E on growth performance and oxidative stress at Oreochromis niloticus species. Ser Zooteh 62:85–90
180. Parniakov O, Lebovka NI, Van Hecke E, Vorobiev E (2014) Pulsed Electric Field Assisted Pressure Extraction and Solvent Extraction from Mushroom (Agaricus Bisporus). Food Bioprocess Technol 7:174–183. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1059-y>
181. Plaza M, Amigo-Benavent M, del Castillo MD, et al (2010) Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. Food Res Int 43:2341–2348. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.036>
182. Bittar S Al, Perino-Issartier S, Dangles O, Chemat F (2013) An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. Food Chem 141:3268–3272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.134>
183. Şahin S, Şamlı R (2013) Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. Ultrason Sonochem 20:595–602. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.029>
184. Zderic A, Zondervan E, Meuldijk J (2013) Breakage of cellular tissue by pulsed electric field: Extraction of polyphenols from fresh tea leaves. In: Chemical Engineering Transactions. Italian Association of Chemical Engineering - AIDIC, pp 1795–1800
185. Hidalgo G-I, Almajano MP (2017) Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review. Antioxidan 6:7. <https://doi.org/10.3390/antiox6010007>
186. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI (2021) Extraction of phenolic compounds: A review. Curr Res Food Sci 4:200–214. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2021.03.011>
187. Liu SC, Lin JT, Wang CK, et al (2009) Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (Litchi chinesis Sonn.) flowers. Food Chem 114:577–581. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.09.088>
188. Fernández-Agulló A, Pereira E, Freire MS, et al (2013) Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (Juglans regia L.) green husk extracts. Ind Crops Prod 42:126–132. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.05.021>
189. Iloki-Assanga SB, Lewis-Luján LM, Lara-Espinoza CL, et al (2015) Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of Bucida buceras L. and Phoradendron californicum. BMC Res Notes 2015 8:1–14. <https://doi.org/10.1186/S13104-015-1388-1>
190. Xavier L, Freire MS, González-Álvarez J (2019) Modeling and optimizing the solid–liquid extraction of phenolic compounds from lignocellulosic subproducts. Biomass Convers Biorefinery 9:737–747. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00401-9>
191. Jokic S, Velic D, Bilic M, et al (2010) Modelling of the process of solid-liquid extraction

- of total polyphenols from soybeans. *Czech J Food Sci* 28:206–212.
<https://doi.org/10.17221/200/2009-cjfs>
192. Ivanovic J, Tadic V, Dimitrijevic S, et al (2014) Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar “Čačanska Bestrna.” *Ind Crops Prod* 53:274–281. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2013.12.048>
193. Galvan D’Alessandro L, Kriaa K, Nikov I, Dimitrov K (2012) Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Sep Purif Technol* 93:42–47.
<https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2012.03.024>
194. Padam BS, Tin HS, Chye FY, Abdullah MI (2012) Antibacterial and antioxidative activities of the various solvent extracts of banana (*Musa paradisiaca* cv. Mysore) inflorescences. *J Biol Sci* 12:62–73. <https://doi.org/10.3923/jbs.2012.62.73>
195. Babbar N, Oberoi HS, Sandhu SK (2015) Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55:319–337. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653734>
196. Fernández-Agulló A, Freire MS, Ramírez-López C, et al (2020) Valorization of residual walnut biomass from forest management and wood processing for the production of bioactive compounds. *Biomass Convers Biorefinery* 1–10.
<https://doi.org/10.1007/s13399-019-00598-9>
197. Skowrya M (2014) Antioxidant properties of extracts from selected plant materials (*Caesalpinia spinosa*, *Perilla frutescens*, *Artemisia annua* and *Viola wittrockiana*) in vitro and in model food systems. Universitat Politècnica de Catalunya
198. Corzo N, Alonso JL, Azpiroz F, et al (2015) Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutr Hosp* 31:99–118.
<https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8715>
199. Sako T, Matsumoto K, Tanaka R (1999) Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int Dairy J* 9:69–80.
[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00046-1)
200. Mussatto SI, Mancilha IM (2007) Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* 68:587–597
201. Moure A, Gullón P, Domínguez H, Parajó JC (2006) Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochem.* 41:1913–1923
202. Gullón B, Gullón P, Sanz Y, et al (2011) Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides. *LWT - Food Sci Technol* 44:1687–1696.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.006>
203. Agheli N, Kabir M, Berni-Canani S, et al (1998) Plasma lipids and fatty acid synthase activity are regulated by short- chain fructo-oligosaccharides in sucrose-fed insulin-resistant rats. *J Nutr* 128:1283–1288. <https://doi.org/10.1093/jn/128.8.1283>
204. Qiang X, YongLie C, QianBing W (2009) Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 77:435–441
205. Gobinath D, Madhu AN, Prashant G, et al (2010) Beneficial effect of xylo-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Nutr* 104:40–47. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000243>

206. Li T, Li S, Du L, et al (2010) Effects of haw pectic oligosaccharide on lipid metabolism and oxidative stress in experimental hyperlipidemia mice induced by high-fat diet. *Food Chem* 121:1010–1013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.039>
207. Kang OL, Ghani M, Hassan O, et al (2014) Novel agaro-oligosaccharide production through enzymatic hydrolysis: Physicochemical properties and antioxidant activities. *Food Hydrocoll* 42:304–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.031>
208. Singh SP, Jadaun JS, Narnoliya LK, Pandey A (2017) Prebiotic Oligosaccharides: Special Focus on Fructooligosaccharides, Its Biosynthesis and Bioactivity. *Appl Biochem Biotechnol* 2017 1832 183:613–635. <https://doi.org/10.1007/S12010-017-2605-2>
209. Zhao C, Wu Y, Liu X, et al (2017) Functional properties, structural studies and chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Trends Food Sci Technol* 66:135–145. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.008>
210. Torrecillas S, Montero D, Izquierdo M (2014) Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. *Fish Shellfish Immunol* 36:525–544. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.029>
211. Staykov Y, Spring P, Denev S, Sweetman J (2007) Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Int* 15:153–161. <https://doi.org/10.1007/s10499-007-9096-z>
212. Andrews SR, Sahu NP, Pal AK, Kumar S (2009) Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. *Aquac Res* 41:61–69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02304.x>
213. Torrecillas S, Makol A, Caballero MJ, et al (2007) Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol* 23:969–981. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.007>
214. Torrecillas S, Makol A, Betancor MB, et al (2013) Enhanced intestinal epithelial barrier health status on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol* 34:1485–1495. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.351>
215. Buentello JA, Neill WH, Gatlin, III DM (2010) Effects of dietary prebiotics on the growth, feed efficiency and non-specific immunity of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* fed soybean-based diets. *Aquac Res* 41:411–418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02178.x>
216. Zhou Q-C, Buentello JA, Gatlin DM (2010) Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 309:253–257. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2010.09.003>
217. Soleimani N, Hoseinifar SH, Merrifield DL, et al (2012) Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish Shellfish Immunol* 32:316–321. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.11.023>
218. Akrami R, Iri Y, Khoshbavar Rostami H, Razeghi Mansour M (2013) Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hemato-immunological parameters of stellate

- sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. *Fish Shellfish Immunol* 35:1235–1239. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.039>
219. Grisdale-Helland B, Helland SJ, Gatlin DM (2008) The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 283:163–167. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.012>
220. Hoseinifar SH, Khalili M, Khoshbavar Rostami H, Esteban MÁ (2013) Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish Shellfish Immunol* 35:1416–1420. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.08.007>
221. Xu B, Wang Y, Li J, Lin Q (2009) Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiol Biochem* 35:351–357. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9248-8>
222. Morshedi V, Agh N, Noori F, et al (2018) Effects of dietary xylooligosaccharide on growth and feeding performance, body composition and physiological responses of sobaity seabream (*Sparidentex hasta*) juvenile. *Aquac Nutr* 24:1796–1803. <https://doi.org/10.1111/anu.12818>
223. Geraylou Z, Souffreau C, Rurangwa E, et al (2012) Effects of arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) on juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) performance, immune responses and gastrointestinal microbial community. *Fish Shellfish Immunol* 33:718–724. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2012.06.010>
224. Geraylou Z (2014) Fermentation of Arabinoxylan-Oligosaccharides, Oligofructose and their Monomeric Sugars by Hindgut Bacteria from Siberian Sturgeon and African Catfish in Batch Culture in vitro. *J Aquac Res Dev* 03: <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000230>
225. Brar SK, Dhillon GS, Soccol CR Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals. Springer Science & Business Media
226. Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, et al (2010) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302:1–18. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2010.02.007>
227. Aachary AA, Prapulla SG (2011) Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 10:2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x>
228. Egerton S, Culloty S, Whooley J, et al (2018) The Gut Microbiota of Marine Fish. *Front Microbiol* 9:873. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00873>
229. de Moura FA, Macagnan FT, da Silva LP (2015) Oligosaccharide production by hydrolysis of polysaccharides: a review. *Int J Food Sci Technol* 50:275–281. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12681>
230. Jeffries TW (1994) Biodegradation of lignin and hemicelluloses. *Biochem Microb Degrad* 233–277. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1687-9_8
231. Rogalinski T, Ingram T, Brunner G (2008) Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *J Supercrit Fluids* 47:54–63. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.05.003>

232. Mussatto SI, Dragone GM (2016) Biomass Pretreatment, Biorefineries, and Potential Products for a Bioeconomy Development. In: Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery. Elsevier Inc., pp 1–22
233. L B, A S, RK B, AK C (2019) Lignocellulose derived functional oligosaccharides: production, properties, and health benefits. *Prep Biochem Biotechnol* 49:744–758. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1608446>
234. Fengel D, Wegener G (2011) Wood: chemistry, ultrastructure and reactions, Walter de. Walter de Gruyter, Berlin-Nueva York
235. Brett C, Waldron K (1990) Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls, 2nd ed. Springer Netherlands, London: Chapman and Hall
236. Laureano-Perez L, Teymouri F, Alizadeh H, Dale BE (2005) Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: Characterization of pretreated corn stover. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*. Springer, pp 1081–1099
237. Wilder BM, Albersheim P (1973) The Structure of Plant Cell Walls: IV. A Structural Comparison of the Wall Hemicellulose of Cell Suspension Cultures of Sycamore (*Acer PseudoPlatanus*) and of Red Kidney Bean (*Phaseolus Vulgaris*) 1. *Plant Physiol* 51:889. <https://doi.org/10.1104/PP.51.5.889>
238. Cortes Ortiz WG (2014) Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos. *Rev Tecnol* 13:39–44
239. Moreno García AD (2013) Estudio de enzimas oxidorreductasas en la transformación de biomasa lignocelulósica en biocombustibles. Universidad Complutense de Madrid
240. Prinsen P (2013) Caracterización química y estructural de lignina y lípidos de materiales lignocelulósicos de interés industrial. Universidad de Sevilla
241. Pan L, Farouk MH, Qin G, et al (2018) The Influences of Soybean Agglutinin and Functional Oligosaccharides on the Intestinal Tract of Monogastric Animals. *Int J Mol Sci* 19:554
242. Ávila P, Silva M, Martins M, Goldbeck R (2021) Cello-oligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their emerging prebiotic applications. *World J Microbiol Biotechnol* 37:. <https://doi.org/10.1007/S11274-021-03041-2>
243. Tolonen LK, Juvonen M, Niemelä K, et al (2015) Supercritical water treatment for cello-oligosaccharide production from microcrystalline cellulose. *Carbohydr Res* 401:16–23. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2014.10.012>
244. Zhao Y, Lu WJ, Wang HT (2009) Supercritical hydrolysis of cellulose for oligosaccharide production in combined technology. *Chem Eng J* 150:411–417. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2009.01.026>
245. Zhang Y, Lynd L (2003) Cellodextrin preparation by mixed-acid hydrolysis and chromatographic separation. *Anal Biochem* 322:225–232. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2003.07.021>
246. Chen P, Shrotri A, Fukuoka A (2019) Soluble Cello-Oligosaccharides Produced by Carbon-Catalyzed Hydrolysis of Cellulose. *ChemSusChem* 12:2576–2580. <https://doi.org/10.1002/CSSC.201900800>
247. Liebert T, Seifert M, Heinze T (2008) Efficient method for the preparation of pure,

- water-soluble cellodextrines. *Macromol Symp* 262:140–149. <https://doi.org/10.1002/MASY.200850214>
248. Carvalho AFA, Neto P de O, da Silva DF, Pastore GM (2013) Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res Int* 51:75–85. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.11.021>
 249. Domínguez Domínguez MM, Alvarez Castillo A, Castrejón Rosales T, et al (2011) Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida de bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores. *Rev Iberoam Polímeros* 12:153–159
 250. Rabelo SC, Filho RM, Costa AC (2008) A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol* 144:87–100. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8086-y>
 251. Souza EL, Liebl GF, Marangoni C, et al (2014) Bioethanol from fresh and dried banana plant pseudostem. *Chem Eng Trans* 38:271–276
 252. Low JC, Halis R, Shah UKM, et al (2015) Enhancing Enzymatic Digestibility of Alkaline Pretreated Banana Pseudostem for Sugar Production. *BioResources* 10:1213–1223. <https://doi.org/10.15376/biores.10.1.1213-1223>
 253. Medina D, Paredes A, Nuñez M, et al (2010) Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano. *Rev Tecnológica - ESPOL* 23:81–88
 254. Chittibabu S, Saseetharan MK, Kalaivani MR, Rajesh MP (2014) Optimization of Microwave-assisted Alkali Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Banana Pseudostem. *Energy Sources, Part A Recover Util Environ Eff* 36:2691–2698
 255. Kuba Y, Kashiwagi Y, Okada G, Sasaki T (1990) Production of cello-oligosaccharides by enzymatic hydrolysis in the presence of activated carbon. *Enzyme Microb Technol* 12:72–75. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(90\)90183-Q](https://doi.org/10.1016/0141-0229(90)90183-Q)
 256. Rosales-Calderon O, Arantes V (2019) A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnol Biofuels* 12:240. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1529-1>
 257. Maitan-Alfenas GP, Visser EM, Guimarães VM (2015) Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Curr Opin Food Sci* 1:44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.10.001>
 258. Santos Meneses TM (2018) Autohidrólisis y deslignificación organosolv de madera de *Pinus radiata* para la recuperación de hemicelulosas y lignina con aprovechamiento de la fracción celulósica por vía enzimática. Universidad Complutense de Madrid
 259. Martin-Mingot A, Vigier KDO, Jérôme F, Thibaudeau S (2012) High efficiency of superacid HF–SbF₅ for the selective decrystallization–depolymerization of cellulose to glucose. *Org Biomol Chem* 10:2521–2524. <https://doi.org/10.1039/C2OB07143F>

Capítulo 3. Caracterización de la materia prima

Contenido

1. Materias primas	89
2. Métodos empleados en la caracterización de las materias primas	91
2.1. Acondicionamiento de la materia prima	92
2.2. Análisis proximal	92
2.2.1. Determinación de la humedad.....	92
2.2.2. Determinación del contenido en cenizas	93
2.2.3. Determinación de proteínas.....	93
2.2.4. Determinación de lípidos totales	95
2.3. Determinación del contenido en extraíbles	95
2.3.1. Extraíbles en agua	96
2.3.2. Extraíbles en etanol	96
2.4. Caracterización de la fracción de carbohidratos.....	97
2.4.1. Determinación del contenido en holocelulosa.....	97
2.4.2. Determinación del contenido en celulosa.....	97
2.4.3. Determinación del contenido en hemicelulosa.....	98
2.4.4. Determinación del contenido en almidón.....	98
2.4.5. Determinación del contenido en lignina.....	99
2.4.6. Hidrólisis ácida cuantitativa	99
3. Resultados obtenidos en la caracterización de las materias primas.....	101
3.1. Caracterización química de la pulpa	101
3.2. Caracterización química del raquis	104
3.3. Caracterización química del plátano	106
3.4. Comparación entre la composición química de los tres materiales.....	107
4. Índice de tablas y figuras.....	108
4.1. Índice de tablas.....	108
4.2. Índice de figuras	108
5. Bibliografía	108

En este capítulo se describen las tres materias primas objeto de estudio de la presente tesis: la pulpa procedente del pseudotallo de la platanera, el raquis y el plátano de rechazo. Se incluye, en primer lugar, el protocolo seguido para la toma de muestra de cada material. A continuación, se describen los métodos empleados para la determinación de sus principales componentes. Existen diversas estrategias que pueden ser usadas en la caracterización, basadas en diferentes principios. Según la aplicación que se le vaya a dar al material pueden resultar más útiles unas u otras técnicas. En la presente tesis se ha intentado emplear diferentes procedimientos, llevando a cabo una comparación entre los resultados obtenidos en cada caso. Para todos los subproductos, tal y como se comenta posteriormente, no fue posible llevar a cabo todas las determinaciones.

Una vez definidos los protocolos, se incluyen los resultados obtenidos, realizándose una comparación con trabajos previamente publicados. Finalmente, se comparan las características de los tres materiales. La caracterización química proporcionó un mayor entendimiento sobre la naturaleza de los tres subproductos, así como su comportamiento a la hora de procesarlos, lo cual fue importante para los posteriores tratamientos aplicados a los mismos.

1. Materias primas

La materia prima empleada en el presente trabajo fue la pulpa procedente del pseudotallo o rolo de la platanera, una vez se ha extraído su fibra mediante un proceso mecánico. Si bien la tesis se ha centrado en mayor medida en el residuo generado en el proceso de extracción de la fibra a partir del pseudotallo (residuo generado en la plantación), de manera complementaria también se han estudiado otros dos residuos, en este caso generados en la etapa de clasificación y empaquetado, como son el raquis y el plátano de rechazo. A continuación, se describen los protocolos de toma de muestra seguidos y el acondicionamiento del material para su posterior caracterización y tratamiento.

El pseudotallo está compuesto, en su mayoría, por agua (90%) con un 0.6% de fibra y un 9.4% de pulpa [1]. El proceso de extracción de fibra está formado por una serie de etapas en las que las hojas que forman el pseudotallo son separadas, prensadas y raspadas individualmente, consiguiéndose separar la fibra larga del resto (patente WO2014/174115). Mediante este proceso se consigue obtener el 68% de la fibra y el 76% de la pulpa seca disponibles en cada pseudotallo [2]. El raspado se lleva a cabo en dos etapas y en cada una de ellas se genera una fracción de residuo. Inicialmente, estas fracciones (pulpa procedente del módulo 1 y pulpa procedente del módulo 2) fueron analizadas independientemente a fin de evaluar si existían grandes diferencias en su composición proximal y si interesaba tratarlas de manera separada. Ambos materiales presentaban diferencias visuales. En el caso del módulo 1, la pulpa obtenida presenta un aspecto más fibroso y su molienda es más difícil que con la pulpa del módulo 2, que se encuentra mucho más triturada. Estas diferencias se deben a las características de las etapas de raspado y a que ambas fracciones provienen de diferentes partes de la hoja.

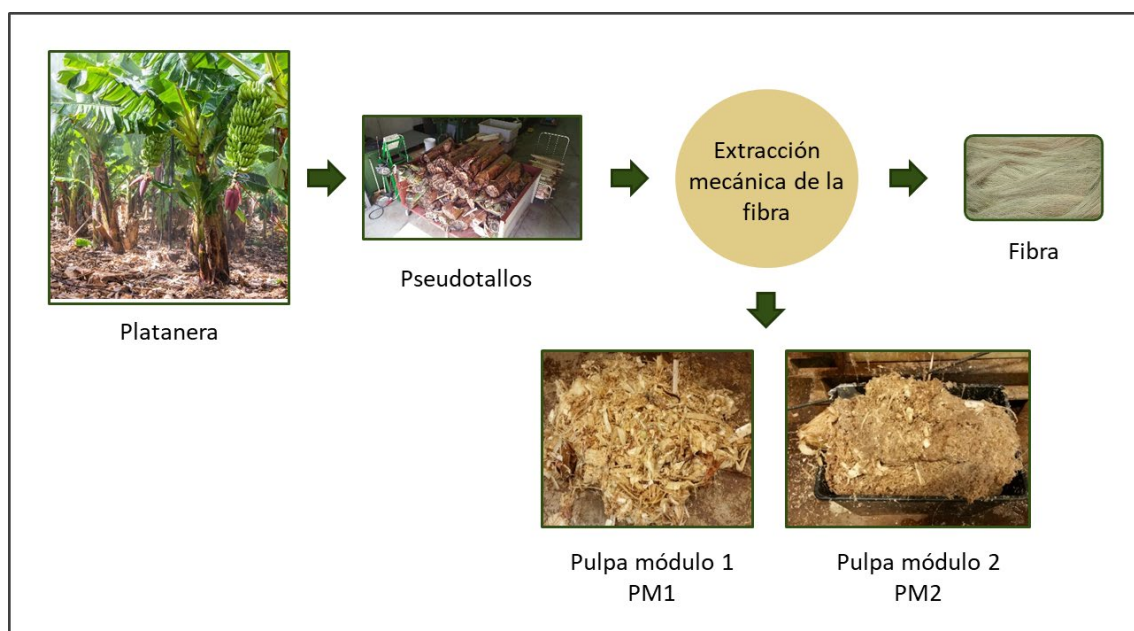


Figura 1. Esquema de extracción de la fibra del pseudotallo de la platanera

De cada uno de los 2 módulos que integran el equipo de extracción de fibra se tomó una muestra del 10% (en peso) del material generado una vez se habían procesado 10 rolos. El material fue homogeneizado, molido con una trituradora de mano y congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso. Esta toma de muestra se realizó 6 veces (lo cual supone un total de 12 muestras si se tienen en cuenta ambos módulos) y en cada caso se anotó la variedad de platanera (Gran Enana o Gruesa Palmera) de la que procedían los 10 rolos procesados, la finca de procedencia, la época del año y el tiempo transcurrido desde el corte de los rolos hasta su procesamiento (nunca superior a 3 días). De esta forma se quería evaluar no solo si había diferencias entre los residuos generados en ambos módulos sino también si la época del año o la variedad de platanera podían influir en la composición proximal del material.

El análisis proximal, como se explica posteriormente en el apartado “3. Resultados obtenidos en la caracterización de las materias primas”, realizado a los 6 lotes mencionados, reveló que no había diferencias significativas entre la composición proximal de los residuos generados en el módulo 1 y módulo 2 de la máquina de extracción de fibra. Tampoco se detectaron diferencias debidas a la época del año. Es por ello que, para el resto de caracterización y tratamientos, se decidió trabajar con la mezcla de ambos materiales. En ese caso, para la toma de muestras, una vez procesados los 10 rolos, ambos residuos se mezclaron, se homogeneizaron y se tomó una muestra de este conjunto, la cual fue igualmente triturada y congelada.

Además, como se comentará en el apartado de resultados, la composición de la pulpa de ambas variedades (Gruesa Palmera y Gran Enana) fue similar. Para el estudio de la extracción de compuestos bioactivos (antioxidantes y oligosacáridos) se decidió utilizar la pulpa procedente de la variedad Gran Enana, variedad elegida por el Grupo de Investigación durante el desarrollo del proyecto LIFEBAQUA por cuestiones relacionadas con rendimiento del proceso de extracción de la fibra. Para estos ensayos, rolos de la variedad *Musa acuminata* Dwarf Cavendish (Gran Enana cultivar) procedentes de una plantación situada en Arguineguín, en Gran Canaria (España), fueron procesados para la extracción de la fibra. La pulpa obtenida en ambos módulos fue mezclada, homogeneizada y congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

Para la toma de muestras del raquis y el plátano, el mismo agricultor que se encargaba de proporcionar los rolos para extracción de la fibra, proporcionó diferentes muestras de raquis de las dos variedades de platanera y de los plátanos de rechazo. Ambos materiales procedían de la Cooperativa Agrícola del Norte de Gran Canaria. El material se congeló a -20 °C hasta su posterior uso.



Figura 2. Muestras de raquis y plátano de rechazo

2. Métodos empleados en la caracterización de las materias primas

El uso de residuos agrícolas como ingredientes en alimentos para peces puede estar restringido por aspectos nutricionales, como por ejemplo altos niveles de fibra y bajos de proteínas, y presencia de elementos antinutricionales. Además, un problema que se puede encontrar con el uso de ciertos ingredientes y en particular con subproductos de plantas y animales y desperdicios de los mismos, es que su composición química puede variar considerablemente en períodos de tiempo relativamente cortos, así como de un lugar a otro. En este caso, aunque la estrategia de valorización planteada no contemplaba la inclusión directa del material en la dieta de peces, conocer su composición química lo mejor posible permitirá un mayor entendimiento de las características de cada fracción de material. Esto permitirá tener una idea de cómo podría comportarse el material y seleccionar la mejor estrategia para su tratamiento.

Por otro lado, aunque existen publicaciones sobre la composición de los distintos subproductos de la platanera, para una misma especie, la situación geográfica, el clima y la madurez de la planta tiene influencia sobre su composición [3]. Por ejemplo, se ha documentado que para una misma planta algunos compuestos bioactivos pueden variar significativamente debido a cambios estacionales, localización geográfica o grado de desarrollo de la planta [4]. Por tanto, cuando se trabaja con residuos vegetales es importante llevar a cabo su previa caracterización, y esa ha sido la primera tarea acometida en este trabajo.

Además el análisis de la composición de la biomasa lignocelulósica (como en el caso de la pulpa y el raquis) sigue siendo una tarea difícil y que conlleva tiempo, principalmente debido a la naturaleza recalcitrante de este tipo de materiales [5]. Existen diversas estrategias para su caracterización, basadas en diferentes principios. Según la aplicación que se le vaya a dar al material pueden resultar más útiles unas u otras técnicas. En la presente Tesis se ha intentado emplear diferentes procedimientos llevando a cabo una comparación entre los resultados obtenidos en cada caso.

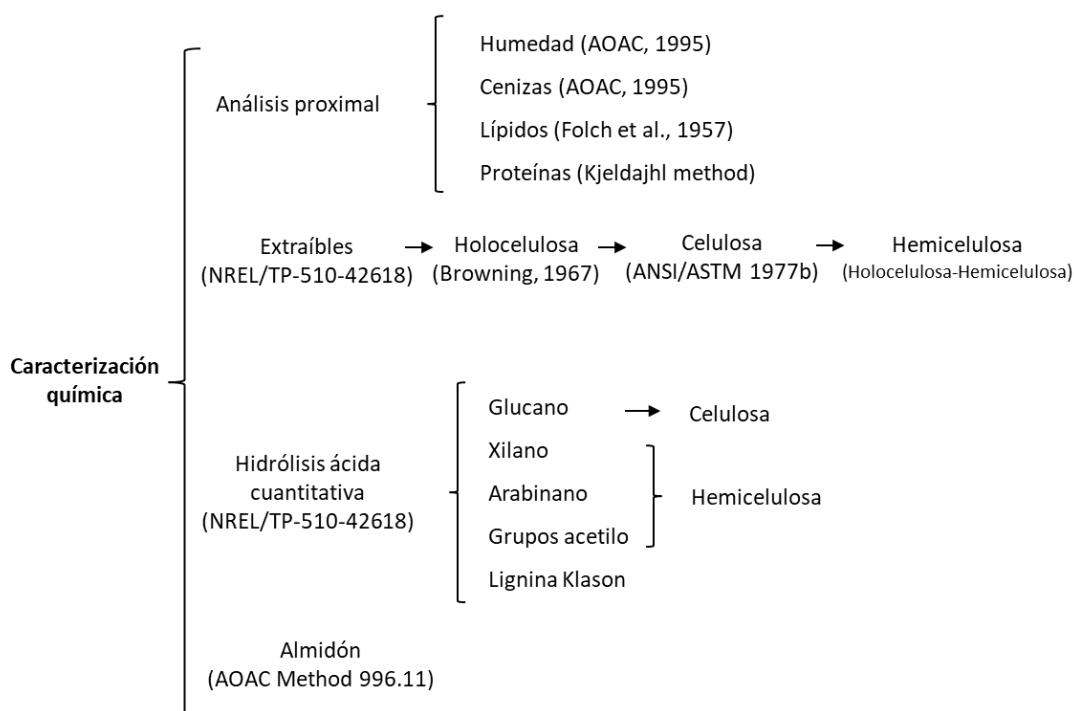


Figura 3. Esquema de los ensayos de caracterización química realizados

2.1. Acondicionamiento de la materia prima

Para llevar a cabo la caracterización del material, los diferentes subproductos fueron secados a -50 °C y 0.3 mbar en un liofilizador de la serie LyoQuest de Telstar y molidos a un tamaño de partícula inferior a 0.5 mm usando para ello el molino Ultra Centrifugal Mill ZM200 de Retsch. Una vez molido, el material fue almacenado en bolsas de plástico a 4 °C hasta su uso.

2.2. Análisis proximal

El análisis proximal o Weende se aplica a materiales que se usarán para formular una dieta y a los alimentos terminados, como un control para verificar que cumplen con las especificaciones o requerimientos establecidos durante la formulación. Comprende la determinación de los porcentajes de humedad, grasa, proteína y cenizas. Se sometieron a este análisis las dos fracciones de pulpa procedentes de los dos módulos que forman el proceso de extracción de la fibra (PM1 y PM2), el raquis de las dos variedades de platanera y el plátano de descarte. Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado.

2.2.1. Determinación de la humedad

La primera determinación que se realiza en el análisis proximal es el contenido en humedad. En el caso de formulación de dietas es fundamental conocer el contenido de agua en cada uno de los elementos que la compondrán y es necesario vigilar la humedad en el alimento preparado, ya que niveles superiores al 8% favorecen la presencia de insectos, y por encima del 14% existe el

riesgo de contaminación por hongos y bacterias [6]. En este caso, la determinación de la humedad es necesaria para expresar los porcentajes de cada material en base seca.

La humedad de las muestras se determinó por desecación en estufa a 110 °C hasta peso constante [7]. Para ello se pesaron entre 0.5 y 1 g de cada muestra en un recipiente previamente secado y pesado (peso A) y se anotó el peso del conjunto (peso B). Se colocaron las muestras en estufa a 110 °C durante 24 horas y, una vez seco, se dejaron enfriar durante media hora en el desecador y se pesaron una vez alcanzado peso constante (peso C). El contenido en humedad se obtuvo mediante la expresión:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(B-C)}{(B-A)} \cdot 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

2.2.2. Determinación del contenido en cenizas

El contenido en cenizas es una medida del total de minerales o material inorgánico en la muestra, elementos que cumplen funciones importantes en el organismo. Su determinación es una forma sencilla de determinar la calidad de ciertos alimentos, en los que un alto contenido en cenizas puede ser un inconveniente [8]. En el caso de alimentación de peces, los minerales son importantes pues son un constituyente esencial de las estructuras esqueléticas y son fundamentales para el mantenimiento de la presión osmótica y de la regulación del intercambio de agua y solutos; son también constituyentes de las estructuras de los tejidos blandos y son necesarios para la transmisión de los impulsos nerviosos y las contracciones musculares [9]. Sin embargo, estos elementos deben estar presentes en unas cantidades adecuadas, pues altos niveles de cenizas pueden tener un efecto negativo en la utilización de otros nutrientes [10]. El consumo de dietas con alto contenido en cenizas ha dado lugar a un aumento de la mortalidad, reducción del crecimiento y patologías tales como cataratas y anomalías del esqueleto [11]. Por tanto, la incorporación de un material en una dieta puede estar limitada por su contenido en cenizas, en el caso de ser muy elevado.

El contenido en ceniza se determinó por incineración de la muestra en un horno de mufla a una temperatura de 600 °C hasta peso constante [7]. Para ello se introdujeron los crisoles en el horno de mufla a 600 °C durante 1 hora, se dejaron enfriar 1 hora en un desecador y se pesaron (Peso A). A continuación, se colocaron en los crisoles entre 0.5 y 1 g de muestra (Peso B) y se introdujeron en la mufla a 600 °C durante 24 horas (obteniéndose unas cenizas de color blanco o gris uniforme). Se dejó enfriar la muestra durante 1 hora en el desecador y se pesó (peso C). El porcentaje en cenizas se calculó mediante la expresión:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(C-A)}{(B-A) \cdot (1 - \text{Humedad})} \cdot 100 \text{ (Ecuación 2)}$$

2.2.3. Determinación de proteínas

El método más usado en la actualidad para el análisis de proteínas es el método Kjeldahl [7] mediante la determinación del nitrógeno total de la muestra. El método consiste en la digestión de las muestras con ácido sulfúrico concentrado a 400 °C en presencia de un catalizador de cobre,

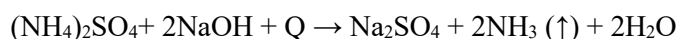
Capítulo 3

seguido de una destilación en la que se recoge el nitrógeno sobre ácido bórico y, finalmente, una valoración con ácido clorhídrico.

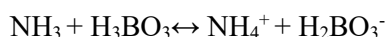
Para llevar a cabo esta determinación se pesaron entre 0.2 y 0.4 g de la muestra en un vidrio de reloj. Se anotó el peso y se pasó la muestra al tubo. A continuación, se añadió una pastilla catalizadora y 10 mL de H₂SO₄ a cada tubo y al blanco (testigo: 1 pastilla catalizadora y 10 ml de H₂SO₄). Se digirieron las muestras a 400 °C durante 1 hora y, una vez transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar durante 25 minutos. La digestión de la muestra con H₂SO₄ concentrado en presencia del catalizador de Cu-Se, convierte todo el N₂ presente en (NH₄)₂SO₄



Para llevar a cabo la destilación, se añadió a cada tubo 20 ml de agua destilada para diluir la muestra y se agitó. A continuación, se destiló el blanco y las muestras, añadiendo a cada tubo 50 mL de NaOH al 40% para neutralizar el exceso de H₂SO₄ resultante de la digestión (realizado automáticamente por el destilador Kjeldahl). La adición de NaOH en exceso da lugar a la liberación de NH₃ de la muestra digerida.



A continuación, se llevó a cabo la separación por arrastre con vapor del amoníaco (NH₃) y posterior solubilización de este amoníaco en ácido bórico al 1%. Los matraces donde se valoran las muestras se prepararon añadiendo alrededor de 10 gotas de indicador y 30 mL de ácido bórico saturado (el color del matraz queda de color fucsia).



El NH₃ liberado se determinó por valoración del ión borato con HCl 0.1 N. Se anotó la cantidad de HCl consumida por el blanco y por las muestras.



El valor del contenido en proteína bruta se obtuvo multiplicando el contenido en N₂ total por el factor empírico. Uno de los factores más empleados es 6.25, el cual proviene de la consideración de que la mayoría de las proteínas tienen una cantidad aproximada de 16% de nitrógeno. El porcentaje de proteínas puede calcularse mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ de proteína} = \frac{(\text{ml HCl}_{\text{muestra}} - \text{ml HCl}_{\text{blanco}}) \cdot 0.1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 14,007 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 6.25}{\text{m muestra (mg)} \cdot (1 - \text{Humedad})} \cdot 100 \text{ (Ecuación 3)}$$

Donde: 0.1= Normalidad del ácido clorhídrico

14.007= Peso atómico del nitrógeno

6.25= factor proteico

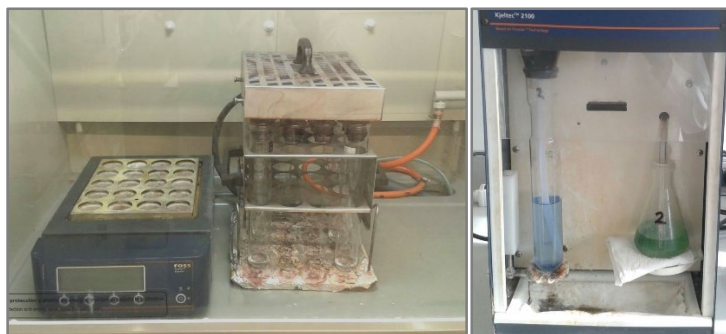


Figura 4. Digestor y destilador empleados en la determinación del contenido en proteínas

2.2.4. Determinación de lípidos totales

El método utilizado para la extracción de lípidos totales fue el descrito por Folch et al. [12] haciendo uso de una mezcla de cloroformo-metanol. Para ello se pesaron muestras de aproximadamente 200 mg en un tubo y se le añadieron 5 mL de cloroformo:metanol (2:1) con 0.01% de BHT. Se homogeneizó en ultra turrax durante 5 minutos y en hielo para evitar la oxidación de la muestra. A continuación se limpió con 5 mL más de la mezcla de cloroformo:metanol y se añadieron 2 mL de KCl 0.88%. Se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm obteniéndose dos fases: en la parte superior quedan la sal y el metanol y en la inferior los lípidos y el cloroformo. Se filtró la fase inferior en un tubo previamente pesado (en el papel de filtro se puso una pequeña cantidad de sodio sulfato anhidro y se empapó el filtro con triclorometano antes de pasar la muestra, evitando así que quedaran retenidos los lípidos) y se limpió el filtro con triclorometano. Una vez evaporado el solvente con una corriente de nitrógeno, los lípidos se pesaron y se determinó su contenido mediante la expresión:

$$\% \text{ de lípidos} = \frac{m_{\text{lípidos}}(\text{g})}{m_{\text{muestra}}(\text{g}) \cdot (1 - \text{Humedad})} \cdot 100 \text{ (Ecuación 4)}$$

2.3. Determinación del contenido en extraíbles

La fracción de extraíbles incluye compuestos no estructurales que podrían interferir en el resto de análisis. Fueron determinados según la norma NREL/TP-510-42618 [13], por duplicados. Este procedimiento emplea una extracción en dos etapas a fin de obtener las fracciones solubles en agua y etanol.

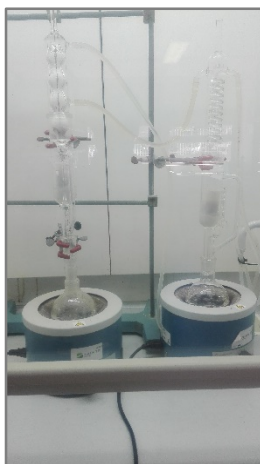


Figura 5. Montaje para determinación del contenido en extraíbles

2.3.1.Extraíbles en agua

Los extraíbles en agua incluyen material inorgánico, azúcares no estructurales y material nitrogenado, entre otros. La fracción inorgánica puede proceder tanto de la propia biomasa como de otros materiales presentes en la misma tales como suelo o fertilizantes. Para su determinación se pesaron entre 2 y 10 g del material molido (P1), del cual se conocía su humedad (H), en un dedal de extracción. La extracción se llevó a cabo en soxhlet con una cantidad conocida de agua durante 12 horas, ajustando el calentamiento para obtener 5 reflujos por hora. El material de vidrio empleado fue secado con anterioridad en estufa a 105 °C durante al menos 12 horas. La cantidad de extraíbles se obtuvo por diferencia de pesada del balón antes (P2) y después de la extracción (P3), una vez evaporada el agua en rotavapor y secado en estufa a 40 °C durante 24 horas.

$$\% \text{ extraíbles agua} = \frac{P3-P2}{P1 \cdot (100-\%H)} \cdot 100 \text{ (Ecuación 5)}$$

2.3.2.Extraíbles en etanol

El material soluble en etanol incluye clorofila, gomas y otros compuestos minoritarios. Para su determinación, el material libre de extraíbles en agua fue extraído de manera similar con etanol durante 12 horas, ajustando el calentamiento en este caso para obtener entre 6 y 10 reflujos por hora. La cantidad de extraíbles se obtuvo por diferencia de pesada del balón antes (P4) y después de la extracción (P5), al igual que la extracción con agua.

$$\% \text{ extraíbles etanol} = \frac{P5-P4}{P1 \cdot (100-\%H)} \cdot 100 \text{ (Ecuación 6)}$$

Los extraíbles totales se determinan sumando los extraíbles obtenidos en cada etapa.

2.4. Caracterización de la fracción de carbohidratos

Aunque de diferente naturaleza en cada subproducto, el principal componente de los tres materiales bajo estudio en la presente tesis es la fracción de carbohidratos. Puede haber dos tipos de carbohidratos disponibles en la biomasa: estructurales y no estructurales. Mientras que los carbohidratos no estructurales, entre los que se encuentran por ejemplo el almidón o los azúcares simples como la glucosa, la fructosa o la sacarosa, pueden ser extraídos con agua o etanol, los carbohidratos estructurales (la celulosa, hemicelulosa, pectina y gomas) se encuentran enlazados en la biomasa [14].

En esta tesis se llevó a cabo la determinación de la celulosa, hemicelulosa, lignina (polímero aromático), almidón y azúcares libres de la pulpa y el raquis. Además, para el caso de la celulosa y hemicelulosa se siguieron dos procedimientos diferentes. Puesto que, como se comentó, el análisis proximal realizado a la pulpa procedente del módulo 1 y módulo 2 reveló que no había diferencias significativas entre la composición proximal de los residuos generados en ambos módulos, estas determinaciones se realizaron a la mezcla de ambos. En el caso del plátano, debido a problemas en la filtración, no fue posible la determinación de la celulosa y hemicelulosa. Además, las determinaciones se realizaron al material tal cual y libre de extraíbles, pues, como se comentó anteriormente, la presencia de los mismos puede afectar a las determinaciones.

2.4.1. Determinación del contenido en holocelulosa

Se considera holocelulosa al producto obtenido después de la deslignificación de la muestra, formada por celulosa y hemicelulosa principalmente, y se determinó según la técnica descrita por Browning [15].

Para su determinación se pesaron 2 g de muestra (P1) en un erlenmeyer de 250 mL de capacidad y se añadieron 63 mL de agua desionizada. A la suspensión se le añadió 0.2 mL de ácido acético glacial y 0.6 g de NaClO₂, se cubrió con un vidrio de reloj y se colocó al baño maría (70-80 °C), agitando cada diez minutos. Cada hora se añadió otra dosis de clorito sódico y ácido acético (3 dosis para fibras madereras y 4 para fibras no madereras). Al finalizar las 5 horas se colocó el Erlenmeyer en un baño de agua con hielo hasta que la temperatura bajó a los 10 °C. Se filtró en placa filtrante previamente pesada (P2), se lavó con agua desionizada hasta la eliminación de la coloración amarilla, se secó a 60 °C y se pesó (P3). Al sólido obtenido se le determinaron los porcentajes de humedad (% Hholo) y materia orgánica (% Morg) mediante calcinación en mufla a 430 °C durante 24 horas. El contenido en holocelulosa se calculó de acuerdo con la expresión:

$$\% \text{ Holocelulosa} = \frac{(P3-P2) \cdot (100-\%H_{\text{holo}}) \cdot \%M_{\text{org}}}{P1 \cdot (100-\%H)} \quad (\text{Ecuación 7})$$

donde % H es la humedad de la muestra liofilizada y molida.

2.4.2. Determinación del contenido en celulosa

El contenido en celulosa se determinó según la norma ANSI/ASTM [16]. Para llevar a cabo esta determinación, se pesó 1 g de holocelulosa (P1), obtenida mediante el procedimiento descrito

en el apartado 2.4.1, en un Erlenmeyer de 100 mL. Se añadieron 5 mL de NaOH 17.5% (m/m) mezclando con una varilla de vidrio. Cada 5 minutos se vertieron 2.5 mL de NaOH 17.5% hasta consumir un total de 12.5 mL y se mantuvo 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se añadieron 16.5 mL de agua desionizada para pasar de NaOH al 17.5% a NaOH al 8.3%, se mezcló bien y se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se filtró en placa filtrante de peso conocido (P2) y se lavó con 50 mL de NaOH 8.3% y posteriormente con agua desionizada. Se repitió el lavado con ambas sustancias dos veces. Se cortó la succión y se añadieron 7.5 mL de CH₃COOH 10%, dejándolo en contacto 3 minutos, tras lo cual se volvió a conectar el vacío y se lavó con agua hasta la neutralidad del filtrado. Finalmente, la placa filtrante con la celulosa se secó a 105 °C en estufa durante 12 horas y se pesó (P3). En este caso también se calculó el contenido en materia orgánica del sólido obtenido (% M_{Org_{cel}}) mediante calcinación en mufla a 430 °C durante 24 horas. El contenido en celulosa (sobre el sólido inicial) se calculó de acuerdo con la expresión:

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{(P3-P2) \cdot (\% \text{ Holocelulosa}) \cdot \% \text{ M}_{\text{Org}_{\text{cel}}}}{P1 \cdot \% \text{ M}_{\text{Org}_{\text{holo}}} \cdot (100 - \% \text{ Hholo})} \text{ (Ecuación 8)}$$

2.4.3. Determinación del contenido en hemicelulosa

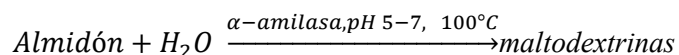
El contenido en hemicelulosa se calculó por diferencia entre el contenido de holocelulosa y el de celulosa:

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ Holocelulosa} - \% \text{ Celulosa} \text{ (Ecuación 9)}$$

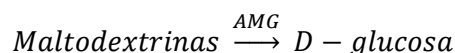
2.4.4. Determinación del contenido en almidón

La determinación del almidón total se realizó de acuerdo a AOAC Method 996.11 mediante el kit Total Starch Assay Kit (AA/AMG) de Megazyme. El procedimiento de determinación se basa en la ruptura selectiva de los enlaces α-(1 → 4) del almidón mediante el uso de enzimas α-amilasa y amiloglucosidasa.

La α-amilasa termoestable hidroliza el almidón en maltodextrinas solubles, ramificadas y no ramificadas



La amiloglucosidasa (AMG) hidroliza cuantitativamente las maltodextrinas a D-glucosa



A continuación, se determina la glucosa mediante su oxidación a D-gluconato con la liberación de cantidades equimolares de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que se mide cuantitativamente en una reacción colorimétrica.

Para llevar a cabo la determinación se pesaron 100 mg de muestra, por duplicado, en tubos de ensayo y se añadieron 0.2 mL de etanol acuoso (80% v/v) para humedecer la muestra y favorecer la dispersión, agitando posteriormente en un vórtex. A continuación, se añadió 3 mL de α-amilasa termoestable y se incubaron los tubos de ensayo en un baño de agua hirviendo durante 6 minutos (los tubos fueron agitados tras los 2, 4 y 6 minutos con ayuda de un vortex). Para el

caso de los blancos de muestra, en lugar de añadir la enzima, se añadieron 3 mL de agua y los tubos fueron igualmente incubados.

Transcurridos los 6 minutos, se colocaron los tubos de ensayo en un baño a 50 °C, añadiendo 0.1 mL de amiloglucosidasa (en el caso de los blancos de muestra se añadió 0.1 mL de agua). Se agitó con la ayuda del vórtex y se mantuvo en el baño durante 30 minutos. Transcurridos este tiempo, se transfirió todo el contenido del tubo de ensayo a un matraz de 100 mL y se enrasó el matraz con agua destilada.

Para la determinación de la glucosa, se filtró una pequeña cantidad del contenido del matraz y se tomaron 0.1 mL de muestra (por duplicados). A su vez, se prepararon los controles de D-Glucosa, que consistieron en 0.1 mL de la solución estándar de D-Glucosa (1 mg/mL) que se incluye con el Kit, y los blancos de reactivo, que consistieron en 0.1 mL de agua desionizada. Se añadió 3 mL de reactivo GOPOD (glucosa oxidasa más peroxidasa y 4-aminoantipirina) a cada tubo (incluyendo los controles de D-Glucosa y los blancos de reactivos), y se incubaron a 50 °C durante 20 minutos. Por último, se leyó la absorbancia de cada muestra a 510 nm frente al blanco de reactivos. Los datos obtenidos de absorbancia junto a las diluciones realizadas y la masa inicial de cada muestra se trataron en una hoja de cálculo facilitada por Megazyme.

2.4.5. Determinación del contenido en lignina

Se considera como lignina Klason el residuo insoluble que queda después de un ataque ácido y se determinó según la norma ANSI/ASTM [17].

Para su determinación se pesó 1 g de muestra (P1), a la cual se le añadieron 15 mL de H₂SO₄ al 72% (m/m) y se dejó reposar 24 horas. Transcurrido este tiempo, se trasvasó el contenido del vaso a un balón de 1000 mL y se añadieron 560 mL de agua desionizada para pasar a H₂SO₄ al 3%. El balón, al cual se le acopló un condensador para evitar pérdidas por evaporación, se colocó en una manta calefactora y se mantuvo la mezcla durante 4 horas en ebullición. Una vez transcurrido este tiempo, se dejó sedimentar el sólido y se filtró en una placa filtrante, previamente secada en estufa a 105 °C y pesada (P2). El sólido filtrado se lavó con abundante agua desionizada caliente hasta que el pH del agua de lavado no fue ácido. Finalmente, se secó en estufa a 105 °C durante 12 horas y se pesó (P3). Se tomaron unos 100 mg del sólido seco y se calcinó en mufla a 430 °C durante 24 horas, obteniéndose así el porcentaje en materia orgánica (%Morg). El contenido en lignina se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ lignina} = \frac{(P3-P2) \cdot \% \text{Morg}}{P1 \cdot (100 - \%H)} \cdot 100 \text{ (Ecuación 10)}$$

donde %H es la humedad de la muestra inicial

2.4.6. Hidrólisis ácida cuantitativa

Una forma de determinar de manera rápida el contenido en carbohidratos estructurales y lignina de un material lignocelulósico es mediante la hidrólisis ácida cuantitativa (NREL/TP-510-42618) [13]. Para su determinación, 300.0 ± 10.0 mg de las diferentes muestras molidas, de humedad conocida, se mezclaron con 3 mL de ácido sulfúrico al 72% (p/p) y se colocaron en un baño termostático a 30 °C durante 60 minutos. Cada cierto tiempo se removió la mezcla para

asegurar el contacto del ácido con la muestra y conseguir uniformidad en la hidrólisis. Transcurridos los 60 minutos, se diluyó cada muestra a una concentración de ácido del 4% mediante la adición de 84 g de agua desionizada y se introdujeron los recipientes cerrados en un autoclave a 121 °C durante 60 minutos (contados a partir del momento en que el autoclave alcanzaba dicha temperatura) enfriando rápidamente al finalizar. A fin de controlar posibles pérdidas durante el proceso, se pesaron los recipientes antes y después de la hidrólisis en autoclave. Se tomó una muestra del líquido y se filtró a través de un filtro Millipore® (Cork, Ireland) de membrana de acetato de celulosa y tamaño de poro 0.45 µm para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las concentraciones de monosacáridos (glucosa, xilosa y arabinosa) y grupos acetil, además de productos de degradación (HMF y furfural) de la fracción líquida obtenida tras la hidrólisis ácida cuantitativa se determinaron mediante el Sistema de HPLC Merck Hitachi LaChrome (Tokyo, Japan) equipado con detector de índice de refracción (L7490). Se empleó una columna de intercambio catiónico Aminex HPX-87H (7.8 × 300 mm) de Bio-Rad (USA) protegida con una precolumna con el mismo relleno (50 x 7.8 mm) de Bio-Rad (USA). La temperatura de operación se estableció en 50 °C usando H₂SO₄ 5 mM como fase móvil y un flujo de 0.4 mL·min⁻¹.

El resto de muestra fue filtrado a vacío a través de una placa filtrante de grado 3 previamente llevada a peso constante en mufla. El sólido fue lavado con agua desionizada caliente y secado en estufa a 105 °C para determinar, por pesada, la lignina ácido soluble (lignina Klason), después de corrección de cenizas.

Las concentraciones de glucosa, xilosa, arabinosa y ácido acético en los licores permiten determinar los porcentajes de glucano, xilano, arabinano y grupos acetilo, respectivamente. En la hidrólisis ácida cuantitativa una pequeña cantidad de los azúcares se degrada, por lo que en la expresión para su cálculo se introdujo un factor de corrección que se obtuvo mediante el uso de patrones de glucosa, xilosa y arabinosa que fueron introducidos en el autoclave y sometidos al mismo proceso que las muestras.

$$G_n = 1.04 \cdot \frac{100}{1005} \cdot \frac{162}{180} \cdot \frac{Glc \cdot P_{sol}}{A} \quad (\text{Ecuación 11})$$

$$X_n = 1.09 \cdot \frac{100}{1005} \cdot \frac{132}{150} \cdot \frac{Xil \cdot P_{sol}}{A} \quad (\text{Ecuación 12})$$

$$Ar_n = 1.09 \cdot \frac{100}{1005} \cdot \frac{132}{150} \cdot \frac{Ara \cdot P_{sol}}{A} \quad (\text{Ecuación 13})$$

$$GAc = \frac{100}{1005} \cdot \frac{60}{61} \cdot \frac{Ac \cdot P_{sol}}{A} \quad (\text{Ecuación 14})$$

$$LK = \frac{RIA - C}{A} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 15})$$

- G_n, X_n, Ar_n, GAc, LK son los porcentajes de glucano, xilano, arabinano, grupos acetilo y lignina Klason, respectivamente (g/100 g de sólido).
- P_{sol} y A son las masas de solución y de muestra seca utilizada en el ensayo, respectivamente (g).
- RIA y C son las masas de residuo no soluble en ácido y de ceniza de la muestra, respectivamente (g).

- Glc, Xil, Ara y Ac son las concentraciones de glucosa, xilosa, arabinosa y ácido acético en los licores (g/L).

El contenido en hemicelulosa se calculó como la suma de Xn, Arn y GAc. Para casos en los que la muestra no presenta un alto contenido en almidón el contenido en Gn se considera celulosa. Se realizó el procedimiento con el material tal cual y libre de extraíbles. Cada muestra se analizó por duplicado.

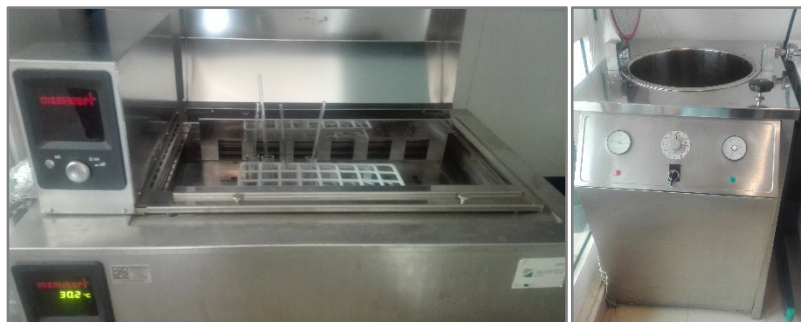


Figura 6. Baño termostático y autoclave empleados en la hidrólisis ácida cuantitativa

3. Resultados obtenidos en la caracterización de las materias primas

A continuación, se incluyen los resultados obtenidos en la caracterización de los tres materiales objeto de estudio. Los resultados se han comentado de manera independiente para cada material y al final se incluye un resumen comparativo entre los tres. Para evitar complicar la lectura y el análisis de los datos, algunos de los resultados obtenidos se han incorporado en el Anexo I, mostrándose aquí solo aquellos que tienen una mayor relevancia para el resto del estudio.

3.1. Caracterización química de la pulpa

Como ya se ha comentado, el proceso de extracción de fibra genera dos fracciones de residuo: pulpa Módulo 1 y pulpa Módulo 2. Ambos materiales se caracterizan por presentar un gran contenido en agua, como es característico de los subproductos de la platanera. En el caso del residuo del módulo 1, el porcentaje de humedad es del $92.96 \pm 0.18\%$ y en el caso del módulo 2 de $94.01 \pm 0.17\%$. Debido a las características de las etapas de raspado y a que ambos materiales proceden de diferentes partes de la hoja, estos presentan algunas diferencias en su aspecto físico (Figura 7). En el caso de la pulpa del módulo 1, que representa alrededor del 22% de la pulpa obtenida, esta presenta un aspecto más fibroso y su molienda es más difícil que con la pulpa del módulo 2, que se encuentra mucho más triturada.

A fin de evaluar si existían grandes diferencias nutricionales entre ambos materiales y si interesaba tratarlos separadamente, se realizó el análisis proximal a cada una de las fracciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1 del Anexo I. El análisis proximal mostró que no existían diferencias nutricionales entre los materiales obtenidos en ambos módulos. Las diferencias observadas pueden ser debidas a la heterogeneidad y complejidad características de este tipo de muestras, lo cual se ve reflejado en los valores de desviaciones típicas obtenidos.

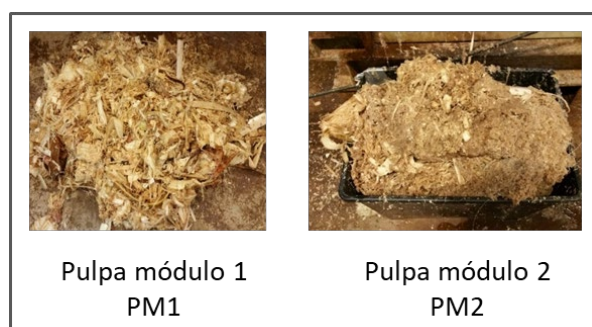


Figura 7. Pulpa obtenida del proceso de extracción de la fibra del pseudotallo

Por tanto, puesto que no se encontraron diferencias entre los materiales obtenidos en cada módulo, para el resto de análisis y tratamientos se decidió utilizar la mezcla de ambos, lo cual redujo la cantidad de ensayos. Además, por cuestiones relacionadas con rendimientos del proceso de extracción de fibra, el Grupo de Investigación prefería la variedad Gran Enana. Por ello, y dado que no se detectaron tampoco grandes diferencias entre ambas variedades, para el resto del estudio se trabajó con la mezcla del residuo obtenido en ambos módulos y únicamente con la variedad de Gran Enana. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en su caracterización.

Componente	Contenido (%)	Método de caracterización
Glucano	44.59 ± 1.70	NREL/TP-510-48087
Hemicelulosa	14.98 ± 0.29	
Xilano	7.65 ± 0.29	
Arabinano	6.61 ± 0.01	
Grupos acetilo	0.79 ± 0.01	
Lignina Klason	7.92 ± 0.27	
Cenizas (total)	15.44 ± 0.05	AOAC Method 996.11
Cenizas extraíbles	9.05 ± 0.10	
Extraíbles	21.11 ± 0.79	
Almidón (no-resistente)	22.17 ± 0.36	
Holocelulosa	57.48 ± 0.61	
Celulosa	26.29 ± 2.10	
Hemicelulosa	19.11 ± 2.31	Holocelulosa - Celulosa
Proteína	5.88 ± 1.82	Kjeldajhl method
Lípidos	1.09 ± 0.50	Folch et al., 1957

Tabla 1. Composición química de la pulpa obtenida en la extracción de fibra del pseudotallo de la platanera de la variedad Gran Enana (% peso/peso, base seca)

Se trata de un material lignocelulósico con un bajo contenido en proteínas y un contenido en lípidos prácticamente nulo. Como es característico de estos materiales, la mayor parte de la pulpa está formada por la fracción de carbohidratos (estructurales y no estructurales) y lignina. Aunque no existen datos publicados sobre la composición del material que queda tras la extracción de la fibra del pseudotallo, los resultados obtenidos pueden compararse con los publicados para el rolo entero. Aunque no siempre se especifica la especie concreta de platanera, otros autores han obtenidos contenidos en proteína en el pseudotallo de plantas del género *Musa* del 5.30% [18], 1.9% [19], 2.5% [20] o 6.1% para *Musa acuminata* [21]. En cuanto a contenido en lípidos, otros autores han obtenido valores del 1.7% [20] o 2.8% para *Musa acuminata* [21].

Especialmente interesante es su alto contenido en cenizas. Otros autores [4, 22, 23] también han destacado la alta cantidad de cenizas, poco usual en plantas anuales [24], encontrada en prácticamente todas las partes de la platanera. Algunos ejemplos de contenido en cenizas encontrado en el rolo de *Musa acuminata* por otros autores son: 18.5% [22], 14% [19] o 19% [25]. La presencia de estas cenizas ha sido relacionada con su función en el transporte de nutrientes a lo largo de la planta [25].

El material presenta un alto contenido en extraíbles, comparado con la madera y otras plantas anuales [24], que también ha sido destacado por otros autores. Oliveira et al. obtuvieron un 12.6% de extraíbles [25] y Guerrero et al. un 14.7% [22] ambos para *Musa acuminata*, Guerrero et al. un 24.1% [4] y Rahman et al. un 22.85% [26] para *Musa paradisiaca*. Una parte importante de estos extraíbles está compuesta por cenizas extraíbles (9.05%) y por azúcares libres (2.8% glucano), calculado como la diferencia de azúcares medidos en el ensayo de hidrólisis ácida cuantitativa en el material original y en el material libre de extraíbles. Oliveira et al. realizaron extracciones sucesivas en Soxhlet con diclorometano, etanol/tolueno y agua y analizaron el extracto acuoso, que en su mayoría resultó estar compuesto por cenizas y azúcares (principalmente glucosa) [25].

El contenido en lignina obtenido resultó ser bastante inferior al de otras biomásas como paja de arroz (14.4%) [27], rastrojo de millo (17.2%) [28] o paja de trigo (17.1%) [29]. El resultado obtenido está en el rango de los obtenidos por otros autores con todo el rolo, los cuales varían entre 4.70% [30] y 12% [31]. La lignina es el componente más recalcitrante de las paredes celulares de las plantas. Esta forma una matriz que envuelve a la celulosa y hemicelulosa y limita su hidrólisis enzimática, principalmente porque actúa como una barrera física que impide el acceso de las enzimas [28]. Por tanto, el bajo contenido en lignina podría ser una ventaja a la hora de procesar este material para su uso en alimentación animal. Otros autores también han señalado el bajo contenido en lignina en el pseudotallo de la platanera como una ventaja, aunque también han destacado su naturaleza más fibrosa (alto grado de cristalinidad y polimerización) [19], lo cual disminuye su digestibilidad.

Las determinaciones de holocelulosa y celulosa, llevadas a cabo según Browning (1967) y ANSI/ASTM respectivamente, reflejaron que la presencia de extraíbles puede interferir en el análisis y que, por tanto, se recomienda su extracción previa. Cuando existe una cantidad elevada de extraíbles, como es el caso de la pulpa, se recomienda llevar a cabo una extracción previa de los mismos para así evitar posibles interferencias en las determinaciones de lignina, celulosa y hemicelulosa. Los resultados obtenidos en la caracterización realizada al material tal cual y al material libre de extraíbles se incluyen en la Tabla 2 del Anexo I. Mientras que en la determinación de lignina no existen grandes diferencias entre usar el material libre de extraíbles o el original, en el caso de la hemicelulosa y celulosa sí hay diferencias considerables, siendo inferiores las concentraciones obtenidas con el material libre de extraíbles.

Los contenidos de celulosa y hemicelulosa fueron determinados mediante dos procedimientos diferentes (Tabla 1) y los resultados mostraron que el procedimiento utilizado para la caracterización puede llevar a valores diferentes debido a aproximaciones que pueden no ser adecuadas para todos los materiales o a la interferencia de otras sustancias presentes. En el caso de la hemicelulosa, se obtuvieron valores de entre 15% y 19%. El primer valor fue obtenido como la suma de xilanos, arabinanos y grupos acetilos determinados mediante la hidrólisis ácida cuantitativa. Aunque los xilanos son el principal componente de la hemicelulosa y, concretamente en plantas herbáceas los glucuronoxilanos son los componentes principales [32], el

heteropolímero de hemicelulosa también puede tener presente unidades de glucosa. Para el caso del rolo, [24] encontró una considerable presencia de glucosa en la fracción de hemicelulosa, por lo que su estimación mediante el procedimiento de NREL puede dar lugar a una subcuantificación de este componente, comparado con su estimación como la diferencia entre holocelulosa y celulosa.

El contenido en hemicelulosa también es relativamente bajo en comparación con el de otras biomásas herbáceas como paja de arroz (24.3%) [33]. El valor obtenido está en el rango de los reportados por otros autores para el conjunto del rolo, aunque en este caso hay que destacar que las concentraciones varían considerablemente entre estudios. Por ejemplo, Guerrero et al. obtuvieron un contenido en hemicelulosa del 9.6% para *Musa acuminata* 'Dwarf Cavendish' [22], Souza et al. un 29.4% (*Musa cavendishii*) [34], Shimizu et al. un 19.62% [35] o Cordeiro et al. un 24.84% para *M. acuminata* Colla [24]. El bajo contenido en hemicelulosa y grupos acetilo podría tener un efecto negativo en el proceso de autohidrólisis, resultando en un efecto más suave que para otras biomásas en las que el contenido en estos grupos puede llegar hasta el 6 % [22]. El alto contenido en cenizas, de naturaleza básica, podría también tener un efecto buffer en los grupos acetilo generados durante la autohidrólisis, lo que también es un factor a tener en cuenta.

El contenido en celulosa determinado como la diferencia entre los glucanos totales (hidrólisis ácida cuantitativa) y almidón fue 22.42% y según la norma ANSI/ASTM, 1977b fue 26.29%. Estos valores se alejan considerablemente de los valores publicados para el pseudotallo completo (alrededor del 40%) [25, 34, 36]. El valor que más se aproxima al obtenido en este estudio fue presentado por Guerrero et al. (20.1%) [22]. Estas diferencias pueden deberse a que no siempre se trata de la misma especie, pero también al uso de métodos de cuantificación diferentes, lo cual evidencia la necesidad de establecer procedimientos estandarizados que minimicen los errores derivados de las aproximaciones que se utilizan. También es importante señalar que en este estudio se trabajó con la parte del pseudotallo que queda tras la extracción de su fibra, que presenta un contenido en celulosa del 64% según Idicula [37].

El contenido en almidón fue muy elevado, aspecto destacado también por otros autores. Guerrero y colaboradores reportaron un contenido del 20.1% [22] mientras que Bhaskar et al. obtuvieron un 27.3% [20]. Oliveira et al, por su parte, dividieron el rolo en las hojas y la vela y obtuvieron valores de 8.4% y 26.3%, respectivamente [25]. Este último estudio muestra que la mayor parte del almidón presente en el pseudotallo se encuentra localizado en la vela (o tallo floral), que no está presente en el material utilizado en este trabajo, puesto que antes de la extracción de la fibra se separa la vela de las hojas, siendo estas últimas las que son procesadas para la extracción de la fibra. La determinación de almidón realizada al material tal cual y libre de extraíbles reveló que la mayor parte de este no se solubiliza durante las extracciones con agua y etanol.

3.2. Caracterización química del raquis

Al igual que la pulpa, el raquis presenta un gran contenido en agua. El porcentaje de humedad determinado para ambas variedades fue del $93.00 \pm 0.01\%$. En el análisis proximal del raquis se distinguió también entre las variedades de Gran Enana y Gruesa Palmera. Los resultados se incluyen en la Tabla 3 del Anexo I. En este caso tampoco se observaron grandes diferencias entre ambas variedades. El contenido en proteínas fue algo más elevado en el caso de Gran Enana y las

cenizas algo más elevadas en el caso de Gruesa Palmera. En ambos casos la suma del proximal fue cerca del 48%, correspondiendo el resto prácticamente a la fracción de carbohidratos y lignina.

Dado que el análisis proximal no reveló diferencias entre variedades, para el resto de análisis se decidió utilizar únicamente la variedad Gran Enana. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en su caracterización.

Componente	Contenido (%)	Método de caracterización
Glucano	26.88± 0.21	NREL/TP-510-48087
Hemicelulosa	15.13±3.22	
Xilano	11.54±0.60	
Arabinano	0.00±0.00	
Grupos acetilo	3.59±2.63	
Lignina Klason	9.71±0.21	
Cenizas (total)	30.47±0.75	
Cenizas extraíbles	24.84±0.03	AOAC Method 996.11
Extraíbles	31.84±1.21	
Almidón (no-resistente)	0.00±0.00	
Holocelulosa	45.51±1.43	
Celulosa	30.15±0.81	
Hemicelulosa	15.36±2.06	
Proteína	11.44±0.34	
Lípidos	1.82±0.10	

Tabla 2. Composición química del raquis de la variedad Gran Enana (% peso/peso, base seca)

Se realizaron también en esta ocasión las determinaciones al material tal cual y libre de extraíbles. A pesar de presentar una mayor cantidad de extraíbles que la pulpa, en este caso no se encontraron tantas diferencias al realizar las determinaciones con el material original o libre de extraíbles (ver Tabla 4 del Anexo I).

Al igual que la pulpa, se trata de un material lignocelulósico con un contenido prácticamente nulo en lípidos y un contenido en proteínas bajo, aunque más elevado que el de la pulpa. El contenido en proteínas determinado en este estudio fue bastante superior a valores publicados por otros autores: 3.30% [18], 2.0% [25].

Como se comentó, el raquis presentó también una alta cantidad de extraíbles, incluso superior al de la pulpa. Los valores obtenidos en este estudio difieren considerablemente con los publicados por otros autores: 18.2% [22], 17.6% [25] y 19.9% [4]. En cuanto al contenido en cenizas obtenido, este fue aún más elevado que el obtenido para la pulpa. Cuando se extrajeron las cenizas de la mufla, estas presentaban un color azulado. Los valores de contenido en cenizas obtenidos por otros autores son bastante similares al obtenido en este estudio. Por ejemplo Guerrero et al. reportaron un valor de 29.9% [22] y Oliveira et al. un 26.8% para *Musa acuminata* [25], Guerrero et al. un 26.6% [4] y Medina et al. un 23.10% [18]. La mayor parte de estas cenizas son de naturaleza extraíble, tal y como mostró la caracterización del material libre de extraíbles, que solo presentó un 5% de cenizas.

Los valores de contenido en lignina obtenidos fueron algo superiores a los de la pulpa, pero siguen siendo bajos en comparación con otras biomásas herbáceas, como se comentó

anteriormente. El valor obtenido es similar a los publicados por otros autores: 10.8% [22], 10.5% [25], 9.4 [4] o 9.85 [18].

En cuanto al porcentaje en hemicelulosa, se llegó a resultados similares mediante los dos procedimientos empleados y los valores obtenidos se encuentran en el rango de los valores publicados por otros autores: 11.2% [22], 7.5% [25], 10.2% [4] o 15.7% [18]. El contenido en hemicelulosa fue similar al encontrado para la pulpa, aunque en este caso el heteropolímero no presentó unidades de arabinano.

En lo que respecta al contenido en glucanos, el raquis presentó un contenido muy inferior al de la pulpa debido a que, a diferencia de esta, no tiene almidón en su composición. En este caso, puede asumirse que todos los glucanos determinados mediante la hidrólisis ácida cuantitativa forman parte de la fracción de celulosa. Los valores determinados en este estudio son próximos a los publicados en la bibliografía: 23.0% [22], 28.4% [25], 26.4% [4] o 30.6% [18]. Los contenidos en celulosa obtenidos tanto para el raquis como la pulpa son significativamente inferiores a los de otros residuos lignocelulósicos como cascarilla de trigo (42.1%) o bagazo de la caña de azúcar (49.9%). El contenido en celulosa presente en el tallo de las plantas vasculares suele ser más elevado que en las hojas [22] pero es importante señalar que en el caso de la platanera, tanto el raquis como el pseudotallo no son tallos reales.

3.3. Caracterización química del plátano de rechazo

El plátano de rechazo fue el tercer subproducto objeto de estudio en la presente tesis. En este caso, al tratarse del fruto y no de una parte de la planta de naturaleza lignocelulósica, su composición fue muy diferente a la de los otros dos subproductos. El elevado contenido en almidón del plátano, cercano al 60%, dio lugar a problemas durante la etapa de filtración en la determinación del contenido en holocelulosa y, como consecuencia, no pudo calcularse los contenidos en celulosa y hemicelulosa. En este caso, además, no se pudo realizar la hidrólisis ácida cuantitativa debido a que no se tuvo acceso al equipamiento necesario para ello (que no estaba en el centro de trabajo habitual).

Componente	Contenido (%)	Método de caracterización
Lípidos	1.53±0.54	Folch et al., 1957
Proteínas	4.57±0.251	Kjeldajhl method
Cenizas	7.47±0.35	NREL/TP-510-48087
Extraíbles	45.62±4.81	NREL/TP-510-48087
Almidón	56.64±1.61	AOAC Method 996.11
Lignina Klason	4.25±0.15	ANSI/ASTM 1977a

Tabla 3. Composición química del plátano de rechazo de la variedad Gran Enana (% peso/peso, base seca)

En la Tabla 3 se muestra los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización realizados al plátano. En esta ocasión únicamente se trabajó con la variedad de Gran Enana. El material presentó un elevado contenido en humedad (80.1±0.01%). Los porcentajes de lípidos y proteínas fueron muy bajos. En cuanto al contenido en extraíbles, este fue muy elevado, probablemente debido a la alta presencia de azúcares libres y una parte del almidón. El porcentaje de cenizas, por otro lado, fue bastante inferior a los altos valores determinados para los otros dos subproductos.

En lo que respecta a la lignina, se obtuvo un contenido del 4.25%, probablemente localizado en la cáscara. Abou-Arab y Abu-Salem obtuvieron un 6.82% de lignina en la piel de plátano [38].

Los valores obtenidos en este estudio pueden ser comparados con otros publicados previamente. En el presente estudio se trabajó con todo el fruto, incluyendo la piel (que representa aproximadamente el 40% del fruto [39]). En cambio, en las publicaciones encontradas en la bibliografía, suele realizarse un análisis de la cáscara y del fruto de manera separada. En muchos de estos estudios, además, se evalúa la influencia del grado de madurez de la fruta sobre su composición. En este caso se trabajó con el plátano verde, estado en el que se encuentra cuando se descarta en los centros de clasificado y empaquetado del plátano. Los valores de composición varían considerablemente entre estudios, lo cual puede deberse a que se emplean diferentes variedades de plátano, la metodología de análisis empleada, la zona geográfica, etc. Para la piel, por ejemplo, se han publicado valores de contenido en cenizas de 15.97%, proteína 7.31% o lípidos 5.38% [38]; Pyar y Peh, por su parte, publicaron valores de 5.3% de proteína, 1.6% de lípidos, 8.8% de cenizas y 19.2% de fibra [40].

En el trabajo de Mohapatra et al. se incluye una caracterización bastante detallada de la piel y del fruto [41]. También resulta interesante la comparación con los datos publicados por Salazar et al. [42], quienes analizaron el plátano verde de la misma variedad que el presente estudio (*Musa acuminata* AAA) e incluye, además de la composición del fruto (humedad 9.96%, grasas 0.15%, proteína 3.41%, cenizas 2.64%, fibra 1.28%) y de la piel (humedad 9.64%, grasas 3.51%, proteína 4.24%, cenizas 6.35%, fibra 10.26%) por separado, la del conjunto, piel más pulpa (humedad 11.32%, grasas 0.87%, proteína 3.53%, cenizas 3.76%, fibra 3.51%), valores próximos a los obtenidos en este estudio.

3.4. Comparación entre la composición química de los tres materiales

Si se comparan los tres subproductos, en los tres casos se caracterizan por presentar un elevado contenido en carbohidratos, aunque de diferente naturaleza. Para el caso de la pulpa y el raquis, al tratarse de materiales de naturaleza lignocelulósica y como es característico de estos materiales, se componen principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, con bajos contenidos en lípidos (prácticamente nulo) y proteína (algo superior en el caso del raquis). Los valores de celulosa y hemicelulosa, sin embargo, son algo inferiores que los esperados para plantas herbáceas, aunque hay que destacar que ni el rolo ni el raquis son los verdaderos tallos de la platanera [33]. También para el caso de la pulpa, es llamativo el alto contenido en almidón que presenta. En lo que respecta al plátano, el principal carbohidrato presente fue almidón, que durante su maduración va transformándose en azúcares sencillos como sacarosa, glucosa y fructosa. El plátano tampoco presentó un alto contenido en proteínas y lípidos aunque su contenido en estos componentes supera al de otras frutas, como por ejemplo la manzana (contenido en proteínas de 0.6% y en lípidos de 0.4%) o la naranja (contenido en proteínas de 0.7% y en lípidos de 0.5%) [43].

También resulta sorprendente el bajo contenido en lignina observado para las dos fracciones lignocelulósicas y los altos contenidos en cenizas, especialmente en el caso del raquis, no común en plantas anuales, como es el caso de la platanera. Comparado con estos dos subproductos, el plátano presentó un bajo contenido en cenizas aunque este se caracteriza por ser una buena fuente

de minerales como potasio. Por otro lado, es destacable el alto contenido en extraíbles obtenido para los tres materiales.

4. Índice de tablas y figuras

4.1. Índice de tablas

Tabla 1. Composición química de la pulpa obtenida en la extracción de fibra del pseudotallo de la platanera de la variedad Gran Enana (% peso/peso, base seca) 102

Tabla 2. Composición química del raquis de la variedad Gran Enana (% peso/peso, base seca) 105

Tabla 3. Composición química del plátano de rechazo de la variedad Gran Enana (% peso/peso, base seca) 106

4.2. Índice de figuras

Figura 1. Esquema de extracción de la fibra del pseudotallo de la platanera..... 90

Figura 2. Muestras de raquis y plátano de rechazo 91

Figura 3. Esquema de los ensayos de caracterización química realizados..... 92

Figura 4. Digestor y destilador empleados en la determinación del contenido en proteínas 95

Figura 5. Montaje para determinación del contenido en extraíbles..... 96

Figura 6. Baño termostático y autoclave empleados en la hidrólisis ácida cuantitativa 101

Figura 7. Pulpa obtenida del proceso de extracción de la fibra del pseudotallo..... 102

5. Bibliografía

1. Benítez AN, Monzón MD, Angulo I, et al (2013) Treatment of banana fiber for use in the reinforcement of polymeric matrices. *Meas J Int Meas Confed* 46:1065–1073
2. LIFEBAQUA El pseudotallo de la platanera: “un recurso con alto valor añadido medioambiental.” www.lifebaqua.eu. Accessed 30 Aug 2021
3. Santa-Maria M, Ruiz-Colorado AA, Cruz G, Jeoh T (2013) Assessing the Feasibility of Biofuel Production from Lignocellulosic Banana Waste in Rural Agricultural Communities in Peru and Colombia. *Bioenergy Res* 6:1000–1011. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9333-4>
4. Guerrero AB, Aguado PL, Sánchez J, Curt MD (2016) GIS-Based Assessment of Banana Residual Biomass Potential for Ethanol Production and Power Generation: A

- Case Study. Waste and Biomass Valorization 7:405–415.
<https://doi.org/10.1007/s12649-015-9455-3>
5. Krasznai DJ, Champagne P, Cunningham MF (2012) Quantitative characterization of lignocellulosic biomass using surrogate mixtures and multivariate techniques. *Bioresour Technol* 110:652–661. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.089>
6. Cockerell I, Francis B, Halliday D (1971) Changes in nutritive value of concentrate feedingstuffs during storage. Tropical Products Institute, London, U.K.
7. AOAC. (1995). Official methods of analysis 16th Ed. Association of official analytical chemists. Washington DC, USA. <http://www.sciencemuseum.org.uk/reference/141205>. Accessed 25 Mar 2021
8. Márquez B (2014) Refrigeración y congelación de alimentos: terminología, definiciones y explicaciones. Arequipa, Perú. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/4188> (Último acceso: 15/09/2021)
9. Barandica Cañón L (2010) Efectos de las dietas experimentales en la respuesta inmune de los peces. Universitat Autònoma de Barcelona
10. Mendoza-Rodriguez MG, Gatlin DM (2014) Effects of Various Levels of Silica Ash in the Diet of Juvenile Red Drum, *Sciaenops ocellatus*. *J World Aquac Soc* 45:199–205. <https://doi.org/10.1111/jwas.12101>
11. Shearer KD, Maage A, Opstvedt J, Mundheim H (1992) Effects of high-ash diets on growth, feed efficiency, and zinc status of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 106:345–355. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90266-N](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90266-N)
12. Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues - PubMed. *J Biol Chem* 226:497–509
13. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al (2008) Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011)
14. Karimi K, Taherzadeh MJ (2016) A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. *Bioresour. Technol.* 200:1008–1018
15. Browning B (1967) Methods of wood chemistry, Vol. 2. Interscience Publishers, New York
16. American National Standard Institute (1977) ANSI/ASTM., 1977b. Standard test methods for alpha-cellulose in wood D 1103-60
17. American National Standart Institute (1977) Method of Determination of Klason Lignin. Norma ANSI/ASTM
18. Medina D, Paredes A, Nuñez M, et al (2010) Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano. *Rev Tecnológica - ESPOL* 23:81–88
19. Gabhane J, Prince William SPM, Gadhe A, et al (2014) Pretreatment of banana agricultural waste for bio-ethanol production: Individual and interactive effects of acid and alkali pretreatments with autoclaving, microwave heating and ultrasonication. *Waste Manag* 34:498–503. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.013>
20. Bhaskar JJ, S M, Chilkunda ND, Salimath P V. (2012) Banana (*Musa sp.* var. *elakki*

- bale) Flower and Pseudostem: Dietary Fiber and Associated Antioxidant Capacity. *J Agric Food Chem* 60:427–432. <https://doi.org/10.1021/jf204539v>
21. Ma J (2015) Banana Pseudostem : properties nutritional composition and use as food. The University of New South Wales. Disponible en: <http://unsw.unsw.edu.au/fapi/datastream/unsw:37543/SOURCE02?view=true> (Último acceso:15/09/2021)
22. Guerrero AB, Ballesteros I, Ballesteros M (2017) Optimal conditions of acid-catalysed steam explosion pretreatment of banana lignocellulosic biomass for fermentable sugar production. *J Chem Technol Biotechnol* 92:2351–2359. <https://doi.org/10.1002/jctb.5239>
23. Li C, Liu G, Nges IA, et al (2016) Fresh banana pseudo-stems as a tropical lignocellulosic feedstock for methane production. *Energy Sustain Soc* 6:27. <https://doi.org/10.1186/s13705-016-0093-9>
24. Cordeiro N, Belgacem M., Torres I., Moura JCV. (2004) Chemical composition and pulping of banana pseudo-stems. *Ind Crops Prod* 19:147–154. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.09.001>
25. Oliveira L, Cordeiro N, Evtuguin DV, et al (2007) Chemical composition of different morphological parts from ‘Dwarf Cavendish’ banana plant and their potential as a non-wood renewable source of natural products. *Ind Crops Prod* 26:163–172. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.03.002>
26. Rahman MM, Islam T, Nayeem J, Jahan S (2014) Variation of chemical and morphological properties of different parts of banana plant (*Musa paradisica*) and their effects on pulping. *Int J Lignocellul Prod* 1:93–103. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20904-3_45
27. Patricia M, Lino J, Duarte LC, et al (2015) Fractionation of hemicelluloses and lignin from rice straw by combining autohydrolysis and optimised mild organosolv delignification. *BioResources* 10:2626–2641
28. Yoo CG, Wang C, Yu C, Kim TH (2013) Enhancement of enzymatic hydrolysis and klason lignin removal of corn stover using photocatalyst-assisted ammonia pretreatment. *Appl Biochem Biotechnol* 169:1648–1658
29. Montané D, Farriol X, Salvadó J, et al (1998) Fractionation of wheat straw by steam-explosion pretreatment and alkali delignification. Cellulose pulp and byproducts from hemicellulose and lignin. *J Wood Chem Technol* 18:171–191
30. Duque SH, Cardona CA, Moncada J (2015) Techno-economic and environmental analysis of ethanol production from 10 agroindustrial residues in Colombia. *Energy & Fuels* 29:775–783
31. Thakur S, Shrivastava B, Ingale S, et al (2013) Degradation and selective ligninolysis of wheat straw and banana stem for an efficient bioethanol production using fungal and chemical pretreatment. *3 Biotech* 3:365–372. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0102-4>
32. Thomas L V (2003) HEMICELLULOSES. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). pp 3060–3071
33. Moniz P, Pereira H, Duarte LC, Carvalheiro F (2014) Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw. *Ind Crops Prod* 62:460–465

34. de Souza EL, Sellin N, Marangoni C, Souza O (2017) The Influence of Different Strategies for the Saccharification of the Banana Plant Pseudostem and the Detoxification of Concentrated Broth on Bioethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol* 183:943–965. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2475-7>
35. Shimizu FL, Monteiro PQ, Ghiraldi PHC, et al (2018) Acid, alkali and peroxide pretreatments increase the cellulose accessibility and glucose yield of banana pseudostem. *Ind Crops Prod* 115:62–68
36. Abdullah N, Sulaiman F, Miskam MA, Taib RM (2014) Characterization of banana (*Musa spp.*) pseudo-stem and fruit-bunch-stem as a potential renewable energy resource. *Int J Energy Power Eng* 8:815–819
37. Idicula M, Boudenne A, Umadevi L, et al (2006) Thermophysical properties of natural fibre reinforced polyester composites. *Compos Sci Technol* 66:2719–2725. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2006.03.007>
38. Abou-Arab AA, Abu-Salem FM (2018) Nutritional and Anti-Nutritional Composition of Banana Peels as Influenced by Microwave Drying Methods. *Int J Nutr Food Eng* 11:845–852. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1317334>
39. Khawas P, Das AJ, Dash KK, Deka SC (2014) Thin-layer drying characteristics of Kachkal banana peel (*Musa ABB*) of Assam, India. *International Food Research Journal* 21(3): 1011-1018
40. Pyar H, Peh KK (2018) Chemical Compositions of Banana Peels (*Musa sapientum*) Fruits cultivated in Malaysia using proximate analysis. *Res J Chem Environ* 22:108–111
41. Mohapatra D, Mishra S, Sutar N (2010) Banana and its by-product utilization: an overview. *J Sci Ind Res* 69:323–329
42. Salazar D, Arancibia M, Calderón L, et al (2021) Underutilized Green Banana (*Musa acuminata* AAA) Flours to Develop Fiber Enriched Frankfurter-Type Sausages. *Foods* 2021, Vol 10, Page 1142 10:1142. <https://doi.org/10.3390/FOODS10051142>
43. Hoe VB (1999) The nutritional value of indigenous fruits and vegetables in Sarawak. *Asia Pac J Clin Nutr* 8:24–31. <https://doi.org/10.1046/J.1440-6047.1999.00046.X>

Capítulo 4. Extracción de antioxidantes

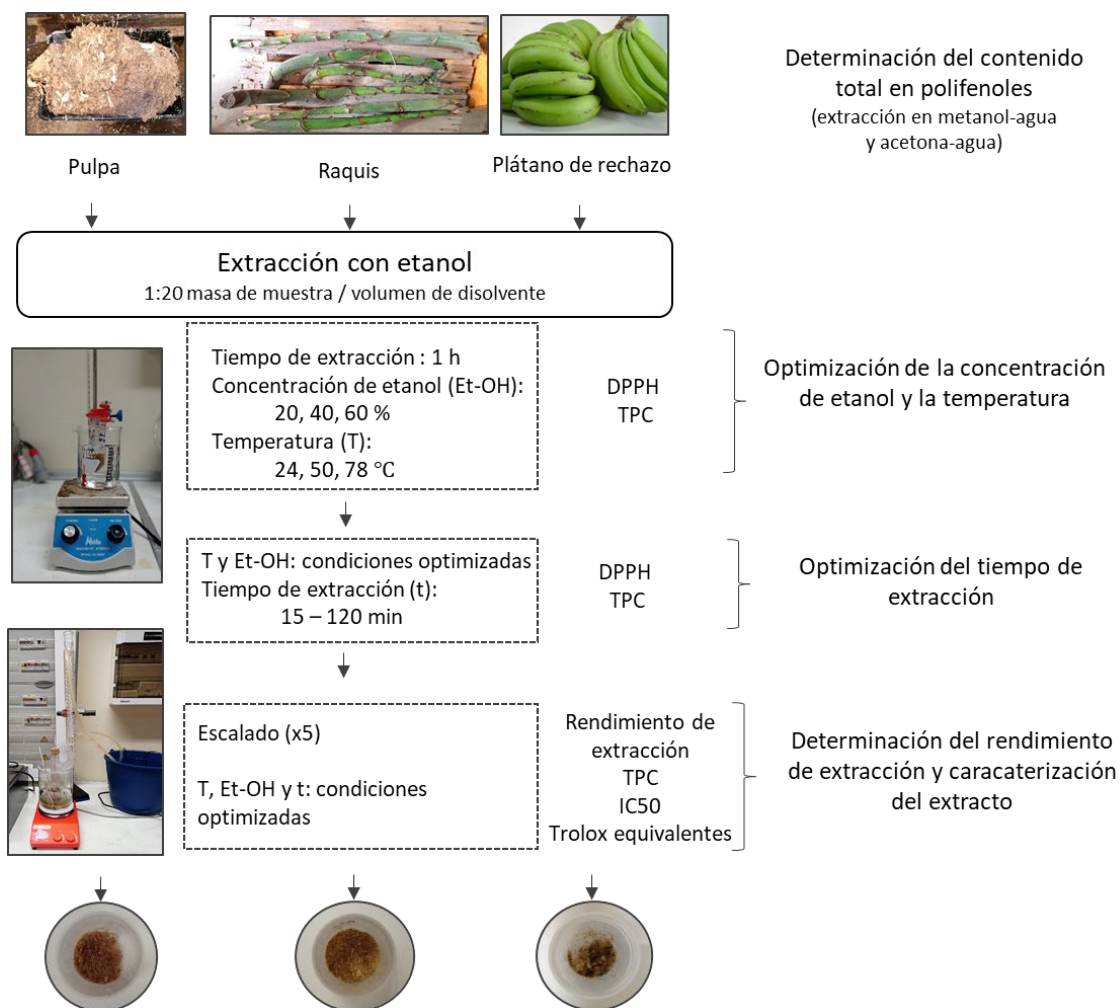
Contenido

1.	Procedimientos empleados en la extracción de antioxidantes.....	118
1.1.	Determinación del contenido total de antioxidantes extraíbles.....	118
1.2.	Optimización de la extracción de antioxidantes con etanol	118
1.2.1.	Influencia del porcentaje de etanol y de la temperatura	119
1.2.2.	Influencia del tiempo de extracción	121
1.3.	Determinación del rendimiento de extracción.....	121
1.4.	Caracterización de los extractos.....	122
1.4.1.	Determinación del contenido en polifenoles: método de Folin-Ciocalteu	122
1.4.2.	Determinación de la capacidad antioxidante: DPPH.....	123
2.	Resultados	124
2.1.	Optimización de la extracción de antioxidantes de la pulpa	124
2.2.	Optimización de la extracción de antioxidantes del raquis	128
2.3.	Optimización de la extracción de antioxidantes del plátano de rechazo	131
2.4.	Comparación entre los extractos obtenidos a partir de los distintos subproductos ...	133
3.	Índice de tablas y figuras.....	135
3.1.	Índice de tablas.....	135
3.2.	Índice de figuras.....	136
4.	Bibliografía	137

En este capítulo se estudia la extracción de compuestos antioxidantes a partir de los tres subproductos objeto de estudio. En primer lugar, se determinó el contenido máximo de polifenoles presentes en cada uno de ellos. Tras esto, se llevó a cabo una optimización de las condiciones de operación empleando una tecnología de extracción simple y respetuosa con el medio ambiente, como es la extracción con etanol, disolvente además apto para alimentación.

Para cada material se evaluó simultáneamente la influencia de la temperatura (24, 50 y 78 °C) y la concentración de etanol (20, 40 y 60%) sobre la extracción de los polifenoles. Como variables de respuesta se determinaron el contenido total de polifenoles (TPC), de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu, y la capacidad antioxidante, mediante el método de captura del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en los extractos. Los datos obtenidos se ajustaron a un polinomio, que se usó para determinar el punto óptimo. Una vez optimizadas la concentración y la temperatura de operación, se evaluó la influencia del tiempo (15-120 min). Finalmente, se llevó a cabo un experimento a mayor escala bajo las condiciones elegidas para cada material y se determinaron los rendimientos de extracción.

Se describen en primer lugar los procedimientos seguidos, tras lo cual se exponen los resultados obtenidos y su análisis.



1. Procedimientos empleados en la extracción de antioxidantes

1.1. Determinación del contenido total de antioxidantes extraíbles

En primer lugar, y previo a la optimización de la extracción empleando etanol, se obtuvo la cantidad máxima de polifenoles que podía ser extraída de cada material. Para ello, se llevó a cabo una extracción formada por dos etapas sucesivas, siguiendo el procedimiento descrito por [2]. Dado que no existe ningún disolvente que permita la extracción de todos los antioxidantes presentes en un material, una extracción eficiente de los mismos requiere del uso de, al menos, dos ciclos de extracción con disolventes de diferente polaridad [3]. Pérez-Jiménez et al. han demostrado que una extracción con una mezcla etanol-agua acidificada seguida por una segunda extracción con acetona-agua es eficiente en la extracción de los polifenoles presentes en diferentes materias primas [4].

Para la determinación de los polifenoles extraíbles se pesó medio gramo de la muestra liofilizada a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.3 mbar, usando un tamaño de partícula inferior a 0.5 mm (obtenido mediante el molino Ultra Centrifugal Mill ZM200 de Retsch). La muestra se colocó en un tubo de centrífuga de 50 mL de fondo cónico con tapa. La primera extracción se llevó a cabo con 20 mL de una mezcla metanol-agua (50:50, v/v; pH 2) acidificada con HCl (2 N). El tubo se agitó inicialmente en un vortex durante 3 minutos y, a continuación, se mantuvo en agitación con ayuda de un agitador magnético durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se centrifugó la muestra a 3000 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. A continuación, se llevó a cabo una segunda extracción, en este caso con 20 mL de una mezcla acetona-agua (70:30, v/v), de igual forma durante una hora. Una vez realizada la segunda extracción, se volvió a centrifugar y ambos sobrenadantes fueron combinados y llevados a un volumen de 50 mL en matraz. El extracto filtrado fue usado para determinar el contenido total de polifenoles mediante el método de Folin Ciocalteu (descrito en el apartado 1.4.1). Para cada materia prima se llevaron a cabo las extracciones por duplicado. Los polifenoles extraídos mediante este procedimiento fueron considerados como la cantidad máxima que podía ser extraída.

1.2. Optimización de la extracción de antioxidantes con etanol

Como ya se ha comentado en el Capítulo 2, la sustitución de los antioxidantes sintéticos por naturales requiere de procedimientos que permitan la extracción de estos compuestos de forma segura, eficiente y económica, a fin de garantizar su viabilidad comercial [5]. La extracción mediante disolventes es una técnica bien conocida y extendida en la extracción de compuestos naturales, fácilmente escalable a nivel industrial, en comparación con otros nuevos métodos no convencionales (como extracción asistida por ultrasonidos, microondas o presión) que, aunque permiten reducir los requerimientos energéticos y de disolvente, presentan aún algunas dificultades para ser aplicadas a nivel industrial [6]. Por todo ello, en la presente tesis se decidió emplear la extracción convencional con disolvente.

Por otro lado, de entre los posibles disolventes, se escogió el etanol como agente extractor, dado que ha mostrado ser un buen disolvente en la extracción de polifenoles [7], está reconocido como GRAS (siglas en inglés para reconocido generalmente como seguro) y es apto para su uso en alimentación, es más barato que otros disolventes, como el metanol, y es respetuoso con el medio ambiente, además de ser recuperable por evaporación [8].

Aunque existen estudios sobre la extracción de antioxidantes con etanol de una amplia variedad de plantas, cada material tiene unas características únicas en cuanto a su estructura y composición, por lo que es difícil predecir cómo será el comportamiento y es necesario llevar a cabo un estudio para cada material [6]. Además del tipo de disolvente y su concentración, tienen influencia sobre la extracción el tiempo, la relación sólido-líquido o la temperatura, principalmente [5]. En este estudio se fijó la relación sólido-disolvente y se evaluó la influencia de la concentración de etanol, la temperatura y el tiempo de extracción.

Las extracciones se realizaron con el material previamente liofilizado y molido. Se usó 1 g de muestra en tubo de centrifuga de 50 mL, empleando una relación de 1:20 (peso de la muestra / volumen de disolvente). Esta relación sólido-disolvente permitía una buena agitación para los tres materiales. Las muestras se colocaron en un baño termostático y con agitación magnética. Durante el proceso se controló la temperatura del baño y el tiempo de extracción. Finalizada la extracción, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se filtró para su análisis (según los procedimientos descritos en el apartado 1.4). Todas las extracciones se llevaron a cabo por duplicado.



Figura 2. Montaje experimental (a pequeña escala) para la optimización de la extracción de antioxidantes

1.2.1. Influencia del porcentaje de etanol y de la temperatura

En primer lugar, se estudió la influencia de la concentración agua-etanol (%Et-OH) y la temperatura (T), consideradas como variables independientes, sobre la extracción. Para ello, el tiempo de extracción se fijó en 1 hora y se estudió la influencia de estos 2 factores a 3 niveles, siguiendo un diseño factorial 3^2 . Los diseños factoriales se caracterizan por plantear experimentos en todas las combinaciones de valores de los factores, por lo que, en este caso, se requirió de la realización de 9 pruebas experimentales (Tabla 1).

El rango de variación de cada variable independiente se estableció en base a la literatura y a algunas pruebas preliminares. Para el caso de la concentración de etanol, en general, las mezclas de etanol-agua son más eficientes en la extracción de polifenoles que los monocomponentes. Los niveles establecidos para la concentración de etanol fueron: 20, 40 y 60%. En cuanto a la temperatura, esta suele tener un efecto positivo sobre la extracción, aunque altas temperaturas

pueden dar lugar a la degradación de los compuestos. Para el caso de la temperatura se establecieron los siguientes niveles: temperatura ambiente ($\approx 24\text{ }^{\circ}\text{C}$), $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura de ebullición del etanol puro). En la Tabla 1 se muestran las combinaciones de las variables empleadas para cada experimento. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado, siguiendo el procedimiento descrito previamente, y de manera independiente para los tres subproductos objeto de estudio.

Experimento	T ($^{\circ}\text{C}$)	Et-OH (%)
1	24	20
2	24	40
3	24	60
4	50	20
5	50	40
6	50	60
7	78	20
8	78	40
9	78	60

Tabla 1. Combinación de variables obtenidas en el diseño factorial 3^2 para el estudio de la influencia de la temperatura y concentración de etanol sobre la extracción de polifenoles

Se determinaron el contenido total de polifenoles (TPC), de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu, y la capacidad antioxidante, mediante el método de captura del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), descritos en el apartado 1.4, de los extractos obtenidos, y estas determinaciones se tomaron como las variables de respuesta del diseño experimental. El efecto de las dos variables independientes (%Et-OH y T) sobre las variables de respuesta (TPC y capacidad antioxidante) se evaluó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías. Este análisis permitió ver si el efecto de cada factor, así como el efecto de las interacciones entre factores sobre la variable respuesta era significativo. Además, se aplicó el test de comparaciones múltiples de Tukey para evaluar las diferencias entre medias.

Por otro lado, para cada variable respuesta, los valores medios obtenidos para cada experimento se ajustaron a un polinomio de segundo grado:

$$f(T, \%Et-OH) = p_{00} + p_{10} \cdot T + p_{01} \cdot \%Et-OH + p_{20} \cdot T^2 + p_{11} \cdot T \cdot \%Et-OH + p_{02} \cdot (\%Et-OH)^2$$

(Ecuación 1)

El ajuste se realizó mediante la herramienta *Curve Fitting Tool* de Matlab que, además, permite generar la superficie de respuesta. Además de los parámetros de ajuste, se obtuvo el valor del coeficiente de determinación (R^2) como estimador de la bondad del ajuste.

Una vez determinados los coeficientes del polinomio de segundo grado para las dos variables respuesta y para cada subproducto, se buscaron, numéricamente, las condiciones de extracción óptimas. Se realizaron, además, algunos experimentos bajo condiciones próximas al punto óptimo determinado numéricamente.

1.2.2. Influencia del tiempo de extracción

Una vez establecidas las condiciones óptimas de temperatura y concentración de etanol para cada subproducto, el estudio se centró en el establecimiento del tiempo óptimo para llevar a cabo la extracción. En este caso, muestras independientes fueron sometidas a diferentes tiempos de extracción: 15, 30, 60 y 120 minutos. Al igual que en el caso anterior, los extractos fueron analizados para determinar su contenido en polifenoles y capacidad antioxidante. Los ensayos también se realizaron por duplicado siguiendo el procedimiento descrito previamente. Se buscaba, en este caso, encontrar el tiempo mínimo necesario para lograr la extracción.

1.3. Determinación del rendimiento de extracción

Establecidas las condiciones de temperatura, concentración de etanol y tiempo óptimas para cada subproducto, se llevó a cabo la extracción bajo estas condiciones a mayor escala (x5), a fin de obtener una cantidad suficiente de extracto para poder calcular el rendimiento de extracción y llevar a cabo su caracterización. En este caso, la extracción se hizo con 5 g de muestra y 100 mL de disolvente en Erlenmeyer de 250 mL. Para mantener la temperatura se utilizó un baño termostático con agitación magnética. En este caso se controló la temperatura tanto del baño como del medio de extracción. Para evitar la evaporación del disolvente se conectó al Erlenmeyer un condensador refrigerado con agua.

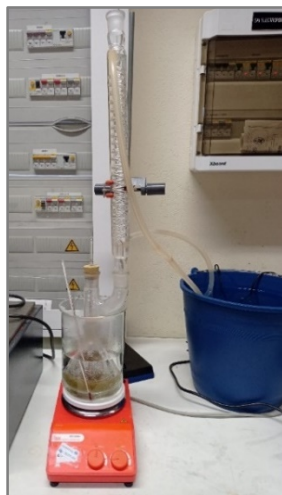


Figura 3. Montaje experimental para la determinación de los rendimientos de extracción bajo las condiciones óptimas de extracción establecidas, a menor escala, para cada subproducto

Finalizada la extracción, se recuperó el extracto mediante filtración a vacío y se tomó una pequeña muestra del mismo para la determinación del contenido total de polifenoles y su capacidad antioxidante. El resto del extracto se pesó y se concentró en rotavapor a baja temperatura para la eliminación del etanol, tras lo cual se congeló y liofilizó hasta sequedad para ser pesado. Se determinó el porcentaje de recuperación de extracto (LR) y el rendimiento de extracción (RE) según las expresiones:

$$\text{Recuperación de extracto (LR) (\%)} = m_{\text{extracto líquido recuperado}} / m_{\text{disolvente empleado}} \times 100 \text{ (Ecuación 2)}$$

$$\text{Rendimiento de extracción (RE) (\%)} = m_{\text{extracto liofilizado}} / m_{\text{material seco inicial}} \times 100 \text{ (Ecuación 3)}$$

Una muestra del extracto liofilizado se redisolvió para llevar a cabo su caracterización mediante la determinación del contenido total en polifenoles, el valor de IC₅₀, que corresponde a la concentración necesaria para disminuir en un 50% la absorbancia inicial del DPPH, y la concentración equivalente de Trolox. Estas determinaciones se llevaron a cabo de acuerdo a los procedimientos descritos en la sección 1.4.

1.4. Caracterización de los extractos

En este apartado se describen los procedimientos empleados en la caracterización de los extractos obtenidos. El creciente interés por los antioxidantes naturales ha hecho que se desarrollen una gran cantidad de métodos para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de extractos vegetales. FRAP (Capacidad antioxidante para Reducir el ion Férrico), ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno) son algunos de los métodos más comunes. Sin embargo, aunque todos estos métodos permiten obtener valores precisos y repetibles, ninguno de ellos refleja por sí solo la capacidad antioxidante total pudiendo ser los valores obtenidos con cada uno muy diferentes [4]. Por ello, un gran número de autores han planteado la necesidad de combinar más de un método de medida en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* [9]. En este estudio se han empleado dos métodos: el método DPPH y el método de Folin-Ciocalteu.

1.4.1. Determinación del contenido en polifenoles: método de Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu no es exactamente un método de medida de la capacidad antioxidante, sino del contenido en polifenoles. Sin embargo, la alta correlación de los resultados respecto a otros métodos, como el DPPH, ha hecho que este método se popularice como una herramienta simple y rápida para predecir la actividad antioxidante, principalmente en matrices complejas, donde la cantidad de compuestos fenólicos, más que la composición específica de estas sustancias, determinan la actividad antioxidante [10].

El método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en una muestra, por la acción del polianión molibdotungstosfórico, dando lugar a un producto coloreado con un máximo de absorción entre 730 y 760 nm. Los resultados se suelen expresar en equivalentes de ácido gálico, aunque en múltiples trabajos se han usado otros estándares, como catequina, ácido tánico, etc., Además, pese a lo extendido que se encuentra, muy pocos artículos siguen exactamente el protocolo original de este método. Todo ello dificulta la comparación entre estudios. Por otro lado, el hecho de que la medida se realice a 730 nm, que es una longitud de onda muy elevada, en la que pueden interferir muchos compuestos coloreados, además de que el método se basa en una reacción de reducción muy genérica, hace que una gran cantidad de sustancias puedan interferir en este ensayo (azúcares, ácido ascórbico, ácidos orgánicos...) [10]. Pese a esto, actualmente el método de Folin-Ciocalteu es ampliamente utilizado, acompañado con otros métodos, para la medición de la capacidad antioxidante. Puesto que ya se conoce el valor de equivalentes de ácido gálico para una amplia cantidad de frutas, vegetales y bebidas, es útil su determinación con el objetivo de establecer comparaciones entre muestras, siempre y cuando se sigan los procedimientos establecidos [9].

Para la determinación del contenido total en polifenoles (TPC) mediante el método de Folin-Ciocalteu se siguió el procedimiento descrito por Singleton et al. [11]. A 0.5 mL de la muestra se le añadieron 5 mL de agua destilada y 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se mantuvo 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y, tras esto, se añadieron 10 mL de una solución de carbonato de sodio (75 g/L) y 9 mL de agua destilada para llevar el volumen a 25 mL. La muestra se agitó y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se leyó la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro modelo Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies. Para la cuantificación de los polifenoles se usó como estándar el ácido gálico, expresándose los resultados en mg equivalente de ácido gálico (GAE) por 100 g de material seco. El procedimiento descrito fue aplicado a las muestras, el blanco y los estándares.

1.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante: DPPH

El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH[•]. Esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 515 nm. El mecanismo de reacción de este método no está aun totalmente claro [9]. Entre las ventajas de este método están su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental. Sin embargo, entre las desventajas se encuentran las posibles interferencias en la lectura de la absorbancia cuando se tienen otros compuestos cuyo espectro de absorción se solapa con el del radical. Además, se debe señalar que el DPPH[•] es un radical orgánico nitrogenado y estable, que no tiene nada que ver con los radicales peroxilo altamente reactivos implicados en reacciones in vivo.

Para la determinación de la capacidad antioxidante se siguió el método descrito por Carciochi et al. [12] con pequeñas modificaciones. A 50 µL de muestra se le añadieron 1950 µL de la disolución de DPPH (0.06 mM en metanol). La mezcla se agitó y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia a 515 nm en el espectrofotómetro modelo Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies. El procedimiento descrito fue aplicado a las muestras, el blanco y el estándar (Trolox). La capacidad antioxidante o porcentaje de inhibición se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\text{DPPH inhibición (\%)} = (A_C - A_S) / A_C \times 100 \text{ (Ecuación 4)}$$

donde A_C es la absorbancia del blanco (50 µL de agua en lugar de la muestra) y A_S es la absorbancia leída para la muestra.

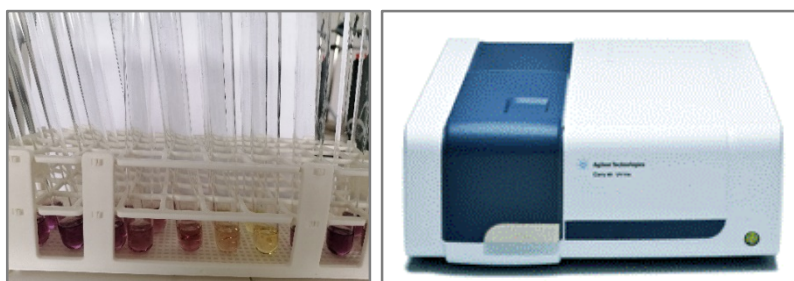


Figura 4. Tubos de ensayo curva de calibrado de Trolox y espectrofotómetro empleado en la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH

Por otro parte, para calcular la capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (TEAC) se usó una curva de calibración de esta sustancia. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de Trolox por gramo de material seco (mg eq. Trolox/gms).

Finalmente, para determinar la concentración de muestra necesaria para disminuir en un 50% la absorbancia inicial del DPPH (IC50), se realizaron diluciones del extracto liofilizado a diferentes concentraciones y se obtuvo una recta de calibrado DPPH inhibición (%) frente a la concentración del extracto. Esta recta permitió obtener el valor de concentración correspondiente a un 50% de inhibición.

2. Resultados

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en la optimización de la extracción de antioxidantes para cada material. Dado que para los tres materiales en muchas ocasiones se repite el comportamiento, la interpretación de los resultados solo se realiza de manera más detallada la primera vez que se explica. Finalmente se incluye una comparación entre los tres materiales.

2.1. Optimización de la extracción de antioxidantes de la pulpa

La pulpa fue, de los tres materiales, la que presentó el menor contenido en polifenoles, con un valor de 408.61 ± 8.61 mg/100g de materia seca inicial. Este valor fue determinado en el extracto obtenido mediante el procedimiento descrito en la sección 1.1 Determinación del contenido total de antioxidantes extraíbles, en el que se llevaron a cabo dos extracciones sucesivas con disolventes de diferente polaridad. En el caso de las extracciones llevadas a cabo con etanol, los valores fueron más bajos, lo cual es lógico puesto que habrá compuestos de naturaleza diferente que pudieron ser extraídos en la mezcla metanol-agua o acetona-agua pero que no se extraigan en etanol. Según la naturaleza del disolvente, se extraerán un tipo de compuestos u otros. Por ejemplo, el metanol ha mostrado ser más eficiente en la extracción de polifenoles de bajo peso molecular, mientras que la acetona actúa bien como agente extractor de flavonoides de mayor peso molecular [13].

En la Tabla 2 se muestran los valores medios y desviaciones típicas de contenido en polifenoles y actividad antioxidante obtenidos para las diferentes condiciones de extracción probadas con la pulpa. El mayor valor obtenido (353.65 mg/100g) corresponde a una extracción del 86.5% de los polifenoles totales determinados para la pulpa, valor bastante elevado teniendo en cuenta que se usa un único agente extractor en este caso

Los p valores obtenidos del análisis de la varianza reflejan que la temperatura tiene una gran influencia sobre el contenido de polifenoles (p valor de 0.0003) y sobre la capacidad antioxidante (p valor de $3.756E-12$) de los extractos. El porcentaje de etanol empleado también tiene un efecto significativo sobre ambas variables (p valor de 0.0014 para el TPC y de $7.934 \cdot 10^{-12}$ para DPPH inhibición). En cuanto al efecto de la interacción entre ambas variables, este fue significativo sobre la variable respuesta DPPH inhibición, pero no sobre el TPC.

Condiciones de extracción		Variables respuesta	
T (°C)	Et-OH (%)	TPC (mg/100g)	DPPH inhibición (%)
24	0	96.37 ^a ±17.55	7.98 ^{ab} ±1.35
	20	124.50 ^{ac} ±14.08	12.88 ^{bc} ±0.39
	40	171.57 ^{ad} ±6.11	20.90 ^a ±0.49
	60	227.77 ^{bcd} ±30.55	19.08 ^{de} ±0.17
	100	116.58 ^{ab} ±8.29	3.90 ^a ±0.11
50	20	160.61 ^{ad} ±30.62	12.00 ^{bc} ±0.33
	40	220.21 ^{cd} ±37.11	18.61 ^{de} ±1.23
	60	245.07 ^{df} ±34.70	22.23 ^e ±0.52
78	0	115.22 ^{ab} ±30.72	9.42 ^b ±0.36
	20	247.10 ^{cd} ±18.73	19.33 ^{de} ±0.00
	40	277.57 ^{df} ±23.33	30.34 ^f ±0.69
	50	318.77 ^{ef} ±39.82	35.46 ^{fg} ±0.15
	60	353.65 ^f ±55.68	36.19 ^g ±2.49
	70	347.55 ^f ±55.56	32.74 ^{fg} ±0.79
	100	191.12 ^{ad} ±16.77	15.20 ^{cd} ±4.67

Tabla 2. Contenido total en polifenoles (TPC) y capacidad antioxidante (DPPH inhibición) de los extractos obtenidos bajos las diferentes condiciones de extracción (relación sólido líquido 1:20, 60 minutos de extracción y temperatura y % de etanol variables) probadas con la pulpa. Los valores corresponden a la media de los duplicados ± desviación típica. Los valores con diferente superíndice son significativamente diferentes (p<0.05)

Los datos experimentales mostraron un buen ajuste a un polinomio de segundo grado, como reflejan los valores de R^2 obtenidos para ambas variables de respuesta (Tabla 3). En dicha tabla se pueden ver los coeficientes de dicho polinomio. Dado que el porcentaje de etanol y la temperatura son del mismo orden (ambas variables varían entre 0 y 100), los coeficientes de ambos parámetros pueden compararse. El término lineal que multiplica al porcentaje de etanol (p_01) es mayor que el que multiplica a la temperatura, mostrando que la primera variable tiene un mayor efecto sobre la extracción de polifenoles. En cuanto a los coeficientes cuadráticos, para el caso del porcentaje de etanol, este tiene signo negativo, por lo que existe un máximo. Esto también puede observarse en la representación de la superficie de respuesta que se muestra en la Figura 5. Para el caso de la temperatura, sin embargo, dicho coeficiente tiene un signo positivo. En esta figura puede verse que el comportamiento obtenido para las dos variables de respuesta fue similar. La determinación del óptimo empleando la ecuación obtenida para ambas variables da lugar al mismo resultado: $T=78\text{ °C}$ y $\approx 60\%$ Et-OH. Además, se realizó un análisis de regresión entre los valores de TPC y DPPH obteniéndose un R^2 de 0.9. Todo ello sugiere que los compuestos fenólicos son los responsables de la actividad antioxidante observada y que la determinación del TPC, a pesar de sus limitaciones [14], en este caso es un buen indicador de la capacidad antioxidante. Otros autores han encontrado resultados similares trabajando con otros materiales lignocelulósicos [8, 15].

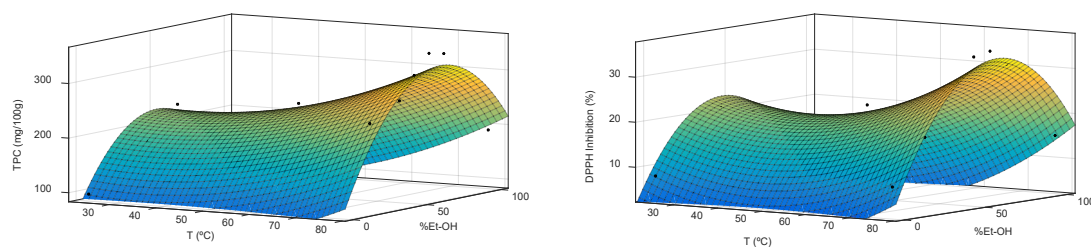


Figura 5. Superficie de respuesta en la que puede observarse el efecto de la temperatura y el porcentaje de etanol en el contenido total de polifenoles (izquierda) y la capacidad antioxidante (derecha) de los extractos obtenidos a partir de la pulpa

En este estudio se estableció como temperatura límite la temperatura de ebullición del etanol puro (78 °C) y el máximo se buscó en este rango, obteniéndose que este fue el valor óptimo. Una temperatura elevada reduce la viscosidad y tensión superficial del disolvente, aumentando el poder de solvatación y la solubilidad del soluto, por lo que una mayor cantidad de compuestos pueden disolverse [8]. Por ello, es posible que el uso de temperaturas superiores diera lugar a mejores resultados, aunque podría ser necesario el uso de una tecnología más compleja y se debería evaluar la estabilidad de los compuestos fenólicos, así como la pureza de los extractos obtenidos, pues a más temperatura más sustancias podrían ser extraídas.

Como ya se ha comentado, el porcentaje de etanol mostró un mayor impacto que la temperatura sobre la extracción de los polifenoles. En general, y como se observó en este estudio, las mezclas de alcohol-agua son más eficientes que los monocomponentes [8]. En este caso, concentraciones próximas al 50% dieron los mejores resultados. Por un lado, la naturaleza hidrofílica de los grupos hidroxilo presentes en algunos compuestos fenólicos o los azúcares unidos a las moléculas de los mismos, aumenta la hidrofiliidad de estos compuestos y, como consecuencia, su extracción a altas concentraciones de etanol disminuye [16]. Sin embargo, por otro lado, el uso de agua pura puede ser también desfavorable, pues puede solubilizar otro tipo de moléculas, como proteínas o polisacáridos, especialmente a altas temperaturas, dando lugar a un descenso en la selectividad de la extracción [16].

Fracción	Respuesta	p00	p10	p01	p20	p11	p02	R ²
Raquis	TPC	113.60	2.2950	16.55	-0.0130	0.0286	-0.1883	0.87
	DPPH	37.96	-0.6456	2.42	0.0045	0.0058	-0.0275	0.92
Plátano	TPC	196.10	-9.6820	11.85	0.1375	-0.0178	-0.1182	0.85
	DPPH	11.65	-0.9716	3.06	0.0138	-0.0009	-0.0292	0.91
Pulpa	TPC	97.51	-2.7650	5.83	0.0408	0.0089	-0.0556	0.92
	DPPH	18.53	-0.8084	0.68	0.0088	0.0022	-0.0075	0.94

Tabla 3. Coeficientes de determinación (R²) y coeficientes de regresión del polinomio de segundo orden $f(T, \%Et-OH) = p00 + p10*T + p01*\%Et-OH + p20*T^2 + p11*T*\%Et-OH + p02*\%Et-OH^2$ obtenidos a partir del ajuste de los valores experimentales de TPC y DPPH medidos en los extractos obtenidos de los tres subproductos bajo las diferentes condiciones de temperatura y porcentaje de etanol testadas

Determinado el punto óptimo a partir de las ecuaciones de ajuste, se realizaron algunos experimentos bajo condiciones próximas a dicho punto. Los valores predichos por el modelo y los observados experimentalmente fueron muy cercanos. El valor máximo predicho de contenido

en polifenoles fue de 321.6 mg/100g y de capacidad antioxidante 32.9%. Ambos valores difieren en menos del 10% de los valores obtenidos experimentalmente bajo las mismas condiciones (78 °C y 60% Et-OH). El mayor valor de TPC obtenido experimentalmente (353.65 mg/100g) correspondió a 3.00 mg eq. Trolox/gms.

Una vez fijadas las condiciones óptimas de temperatura y concentración de etanol, que en este caso fueron 78 °C y 60% Et-OH, se estudió la influencia del tiempo de extracción. En la Figura 6 se muestran los valores de contenido total en polifenoles obtenidos para los distintos tiempos estudiados (comprendidos entre 15 y 120 minutos), entre los que no se encontraron grandes diferencias. La curva obtenida coincide con el comportamiento típico observado en extracciones sólido-líquido, en las que existe una fase inicial rápida seguida, en pocos minutos, por una fase más lenta donde los rendimientos de extracción aumentan muy lentamente hasta alcanzar un valor constante [8]. Para 15 minutos, la concentración de polifenoles fue ligeramente inferior, pero tiempos largos no supusieron un incremento en el rendimiento de extracción de los polifenoles. Por otro lado, tiempos de extracción largos podrían suponer la descomposición de los compuestos bioactivos, disminuyendo las propiedades antioxidantes del extracto. Por ejemplo, Huang et al. encontraron que tiempos superiores a 70 minutos pueden ser perjudiciales para el extracto [17]. Sin embargo, no se observó una disminución con el tiempo ni en el contenido en TPC ni en la capacidad antioxidante medida en los extractos.

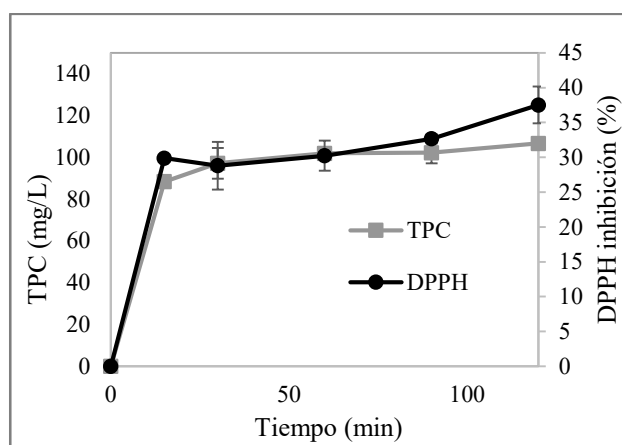


Figura 6. Influencia del tiempo de extracción sobre el contenido total en polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante (DPPH inhibición) obtenidos en el extracto obtenido a partir de la pulpa (78 °C y 60% Et-OH)

Para el estudio a mayor escala se decidió elegir como tiempo de extracción 30 minutos. Esta elección se realizó teniendo en cuenta que, aunque se podría quizás usar tiempos inferiores que supusieran un ahorro energético, a tiempos cortos las desviaciones observadas en los duplicados son mayores. Estas desviaciones pueden estar asociadas a la influencia del periodo de calentamiento hasta alcanzar la temperatura de operación, la cual tiene mayor relevancia para tiempos cortos. Además, en el caso de trabajar a mayor escala se podría esperar que esta etapa de calentamiento tuviera una influencia mayor.

Finalmente, bajo las condiciones óptimas elegidas (60% Et-OH, 78 °C y 30 min) se llevó a cabo el experimento a mayor escala (x5) con el objetivo de poder determinar el rendimiento de extracción y llevar a cabo una caracterización del extracto liofilizado obtenido. Los valores de TPC medidos directamente en el extracto fueron algo inferiores a los obtenidos bajo las mismas

condiciones a pequeña escala. Esto puede deberse a las diferencias entre los recipientes usados y, como consecuencia, a las diferencias en la agitación y la transferencia de masa, entre otros factores. En la Tabla 7 se muestran los resultados de porcentaje de recuperación de extracto (obtenido mediante la Ecuación 2), rendimiento de extracción (Ecuación 3), contenido total en polifenoles (TPC), IC50 (concentración de muestra necesaria para disminuir en un 50% la absorbancia inicial del DPPH) y TEAC (capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox) del extracto liofilizado obtenido.

El valor del rendimiento de extracción depende del porcentaje de líquido que es recuperado, como se refleja en la Ecuación 2. En el caso de haberse recuperado todo el líquido podría haberse alcanzado un valor del 22.1%, para lo cual habría sido necesario llevar a cabo alguna operación de lavado.

2.2. Optimización de la extracción de antioxidantes del raquis

El raquis fue el material que mayor contenido en polifenoles presentó. El extracto obtenido a partir de las dos extracciones consecutivas llevadas a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 1.1 permitió determinar un contenido en polifenoles de 1110.46 ± 8.59 mg/100g de materia seca inicial. Al igual que sucedió con la pulpa, los extractos obtenidos a partir de las extracciones con etanol presentaron un menor contenido en polifenoles. En este caso, el mayor valor observado experimentalmente fue 796.40 mg/100 g (Tabla 4), que corresponde a un 71.7% de los polifenoles extraíbles. En la Tabla 4 se muestran los valores medios y desviaciones típicas de contenido en polifenoles y actividad antioxidante obtenidos para las diferentes condiciones de extracción probadas con el raquis.

Condiciones de extracción		Variables respuesta	
T (°C)	Et-OH (%)	TPC (mg/100g)	DPPH inhibición (%)
24	0	297.26 ^{bc} ±1.22	32.99 ^{ac} ±2.18
	20	330.49 ^{bd} ±3.15	51.24 ^{bcd} ±0.12
	40	489.99 ^{fg} ±29.86	86.79 ^d ±0.12
	60	519.69 ^{gh} ±4.26	87.17 ^d ±0.27
	100	23.39 ^a ±1.72	0.90 ^a ±0.20
50	20	381.90 ^{cde} ±14.92	49.30 ^{bcd} ±0.28
	40	606.34 ^{hi} ±21.32	85.33 ^d ±0.15
	60	702.57 ^{ij} ±30.41	87.21 ^d ±0.28
78	0	248.99 ^b ±9.89	27.15 ^{ab} ±0.21
	20	406.47 ^{df} ±49.23	48.19 ^{bcd} ±2.82
	40	678.63 ⁱ ±52.65	85.61 ^d ±0.12
	50	699.24 ^{ij} ±22.09	86.49 ^d ±0.22
	60	796.40 ⁱ ±18.20	87.22 ^d ±0.27
	80	504.83 ^{efh} ±36.5	80.91 ^d ±0.31
	100	120.80 ^a ±3.37	20.43 ^{bcd} ±3.26

Tabla 4. Contenido total en polifenoles (TPC) y capacidad antioxidante (DPPH inhibición) de los extractos obtenidos bajo las diferentes condiciones de extracción (relación sólido líquido 1:20, 60 minutos de extracción y temperatura y % de etanol variables) probadas con el raquis. Los valores corresponden a la media de los duplicados ± desviación típica. Los valores con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Tanto la temperatura como el porcentaje de etanol presentaron un efecto significativo sobre las variables de respuesta ($p < 0.01$). En el caso de la capacidad antioxidante, para el efecto de la temperatura sobre esta variable se obtuvo un p valor algo superior a 0.05 (Tabla 5), aunque en este caso, los altos valores de capacidad antioxidante obtenidos en general con todos los extractos pudieron dar lugar a que estadísticamente no se detectaran las diferencias. En cuanto al efecto de la interacción entre ambas variables, este fue significativo sobre la variable respuesta TPC, pero no sobre DPPH inhibición.

p-valores (ANOVA)						
	Raquis		Plátano de rechazo		Pulpa	
	TPC	DPPH	TPC	DPPH	TPC	DPPH
T	0.0000	0.0739	1.74206E-9	8.1604E-8	0.0003	3.756E-12
%EtOH	0.0000	0.0000	2.83912E-6	2.4780E-9	0.0014	7.934E-12
Interacción	0.0133	0.2937	1.21194E-6	5.5540E-6	0.8355	2.7668E-7

Tabla 5. p-valores obtenidos mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías

Los datos de capacidad antioxidante y contenido total en polifenoles también se ajustaron, en este caso, a un polinomio de segundo grado (Tabla 3). Si se comparan los coeficientes de dichos polinomios se observa también que el porcentaje de etanol tiene un mayor efecto sobre la extracción de polifenoles que la temperatura. En la Figura 8 pueden verse las representaciones de la superficie de respuesta obtenidas para el contenido total en polifenoles y capacidad antioxidante, así como los puntos experimentales. Ambas gráficas presentan un comportamiento similar entre ellas aunque diferente al obtenido para la pulpa. El análisis de regresión entre los valores de TPC y DPPH, con un R^2 de 0.9, también mostró que, en este caso, los compuestos fenólicos pudieran ser los responsables de la actividad antioxidante observada.

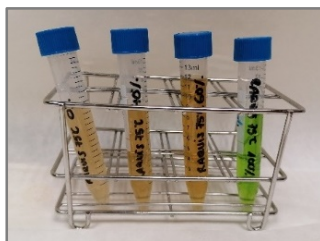


Figura 7. Extractos obtenidos en la extracción del raquis con diferentes concentraciones de etanol

Como sucedió con la pulpa, altas temperaturas y concentraciones intermedias de etanol dieron lugar a extractos con mayor capacidad antioxidante. Tanto con la ecuación de ajuste obtenida para el TPC como para el DPPH se obtuvo que el punto óptimo se encontraba bajo unas condiciones de 78 °C de temperatura y 50% de concentración de etanol. Sin embargo, el valor máximo observado experimentalmente correspondía a unas condiciones de 78 °C pero 60% de etanol. No obstante, si se tiene en cuenta la prueba de Tukey, no existen diferencias significativas entre usar un 50 o un 60% de etanol. El mayor valor de TPC obtenido experimentalmente (796.40 mg/100g) equivale a 6.51 mg eq. Trolox/gms.

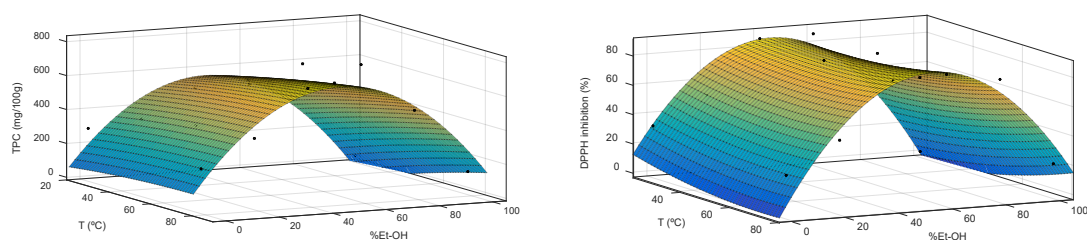


Figura 8. Superficie de respuesta en la que puede observarse el efecto de la temperatura y el porcentaje de etanol en el contenido total de polifenoles (izquierda) y la capacidad antioxidante (derecha) de los extractos obtenidos a partir del raquis

Elegidas las condiciones de temperatura y concentración de etanol óptimas (78 °C y 60% Et-OH) se evaluó la influencia del tiempo. En la Figura 9 se muestran los valores de contenido total en polifenoles y capacidad antioxidante obtenidos para los distintos tiempos estudiados (comprendidos entre 15 y 120 minutos). El comportamiento obtenido fue el mismo que el ya descrito para el caso de la pulpa. Para tiempos de 15 minutos, la concentración de polifenoles fue ligeramente inferior y tiempos largos no supusieron un incremento en el rendimiento de extracción de los polifenoles. En esta ocasión, a los 120 minutos ya se empieza a observar un ligero descenso en el contenido en antioxidantes, que puede estar asociado a su descomposición. En este caso también se eligió 30 minutos como tiempo de extracción para el estudio a una mayor escala.

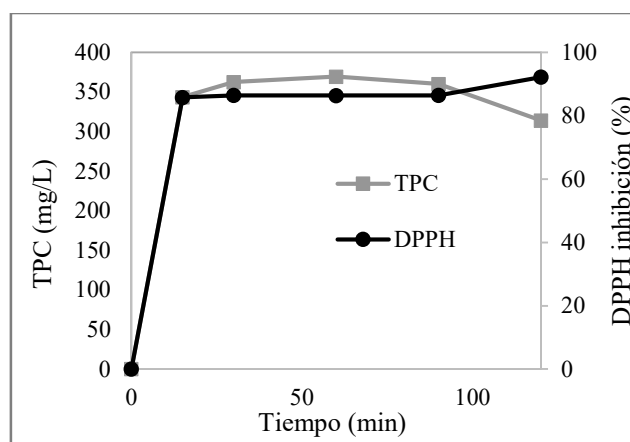


Figura 9. Influencia del tiempo de extracción sobre el contenido total en polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante (DPPH inhibición) obtenidos en el extracto obtenido a partir del raquis (78 °C y 60% Et-OH)

Bajo las condiciones óptimas elegidas (60% Et-OH, 78 °C y 30 min) se llevó a cabo el experimento a mayor escala, permitiendo obtener los valores de rendimiento de extracción y la caracterización del extracto obtenido, que pueden verse en la Tabla 7. Al igual que con la pulpa, el escalado afectó a los valores de TPC medidos directamente en el extracto (valor no mostrado), que fueron algo inferiores a los obtenidos bajo las mismas condiciones a pequeña escala. En este caso se recuperó una cantidad de extracto similar a la que se recuperó con la pulpa; una recuperación completa del extracto habría dado lugar a un rendimiento de extracción del 35.64% (frente al 26% logrado). Para evitar repetir información, la caracterización del extracto se comenta

más detalladamente en el apartado 2.4, en el que se comparan los tres extractos obtenidos a partir de las tres fracciones entre ellos y con otros materiales.

2.3. Optimización de la extracción de antioxidantes del plátano de rechazo

El plátano, por su parte, presentó un contenido total de polifenoles extraíbles de 823.42 ± 27.93 mg/100 g de materia seca. Tal y como sucedió con las otras dos fracciones de material, las extracciones realizadas con etanol-agua no permitieron extraer el total de los polifenoles. La cantidad máxima que fue extraída en este caso correspondió a un 68% de los polifenoles totales extraíbles. En la Tabla 6 se muestran los valores medios y desviaciones típicas de contenido en polifenoles y actividad antioxidante obtenidos para las diferentes condiciones de extracción probadas en el plátano.

Condiciones de extracción		Variables respuesta	
T (°C)	Et-OH (%)	TPC (mg/100g)	DPPH inhibición (%)
24	0	$112.99^{b} \pm 15.07$	$10.96^{ab} \pm 1.18$
	20	$154.19^{bc} \pm 1.00$	$26.26^{c} \pm 0.33$
	40	$206.05^{cd} \pm 3.43$	$62.79^{e} \pm 0.30$
	60	$415.99^{g} \pm 18.76$	$91.27^{h} \pm 1.22$
	100	$0.00^{a} \pm 0.00$	$4.32^{a} \pm 0.25$
50	20	$256.54^{df} \pm 2.24$	$39.65^{d} \pm 2.94$
	40	$277.80^{ef} \pm 0.65$	$73.96^{f} \pm 1.93$
	60	$285.61^{f} \pm 9.05$	$77.92^{fg} \pm 5.47$
78	0	$228.75^{de} \pm 18.72$	$17.74^{bc} \pm 4.10$
	20	$518.77^{hi} \pm 5.58$	$75.07^{f} \pm 4.34$
	40	$418.59^{g} \pm 32.89$	$90.87^{h} \pm 0.10$
	50	$558.45^{i} \pm 5.17$	$89.91^{h} \pm 0.16$
	60	$479.16^{h} \pm 19.68$	$91.31^{h} \pm 0.26$
	80	$396.80^{g} \pm 1.12$	$85.07^{gh} \pm 0.55$
	100	$104.73^{b} \pm 11.50$	$20.13^{bc} \pm 2.22$

Tabla 6. Contenido total en polifenoles (TPC) y capacidad antioxidante (DPPH inhibición) de los extractos obtenidos bajo las diferentes condiciones de extracción (relación sólido líquido 1:20, 60 minutos de extracción y temperatura y % de etanol variables) probadas con el plátano de rechazo. Los valores corresponden a la media de los duplicados $\pm$ desviación típica. Los valores con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

El análisis de la varianza de dos vías mostró que tanto la temperatura como el porcentaje de etanol tienen un efecto significativo sobre las 2 variables de respuesta ($p < 0.01$). También el efecto de la interacción entre la temperatura y el porcentaje de etanol fue significativo sobre las 2 variables, TPC y DPPH inhibición (Tabla 5).

Los valores de los coeficientes obtenidos para el polinomio de segundo grado mostraron que, también en este caso, es el porcentaje de etanol la variable que más afecta a la extracción. El comportamiento obtenido en este caso fue muy similar al obtenido para la pulpa, tal y como reflejan las representaciones de las superficies de respuesta (Figura 10). Al igual que en los otros

dos casos, el análisis de regresión entre los valores de TPC y DPPH también mostró que existe una relación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante observada.

Una vez más, altas temperaturas y concentraciones intermedias de etanol dieron lugar a los extractos con mayor capacidad antioxidante. La determinación de las condiciones óptimas usando las dos ecuaciones de ajuste llevaron al mismo resultado: 78 °C y 50% Et-OH. Bajo estas condiciones, los valores predichos fueron 509 mg/100g y 96.4% de capacidad antioxidante, valores muy próximos a los observados experimentalmente (Tabla 6). El mayor valor de TPC obtenido experimentalmente se obtuvo bajo las condiciones predichas y fue de 558.45 mg/100g, equivalentes a 6.30 mg eq. Trolox/gms.

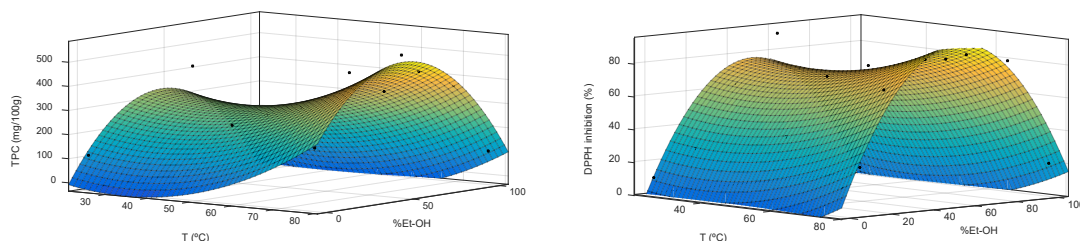


Figura 10. Superficie de respuesta en la que puede observarse el efecto de la temperatura y el porcentaje de etanol en el contenido total de polifenoles (izquierda) y la capacidad antioxidante (derecha) de los extractos obtenidos a partir del plátano de rechazo

También en este caso, bajo las condiciones de temperatura y concentración de etanol óptimas (78 °C y 50% Et-OH) se evaluó la influencia del tiempo. En la Figura 11 se muestran los valores de contenido total en polifenoles y capacidad antioxidante obtenidos para los distintos tiempos estudiados (comprendidos entre 15 y 120 minutos). No se observaron diferencias entre los tiempos evaluados. En el caso de los extractos obtenidos trabajando con el plátano se observaron mayores desviaciones entre duplicados tanto para 15 minutos como para 30 minutos. Por ello, para el estudio a mayor escala, se eligió 60 minutos de tiempo de extracción.

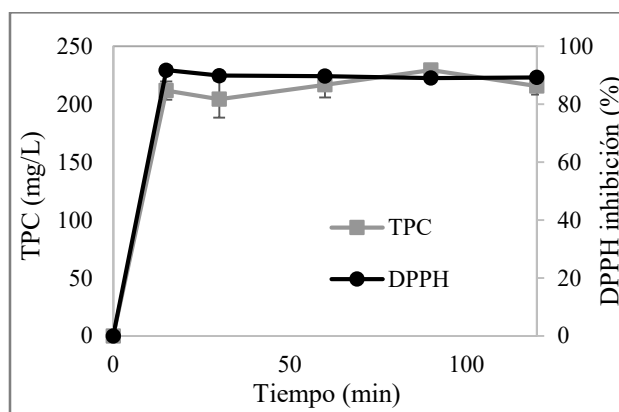


Figura 11. Influencia del tiempo de extracción sobre el contenido total en polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante (DPPH inhibición) obtenidos en el extracto obtenido a partir del plátano de rechazo (78 °C y 60% Et-OH)

El proceso de escalado, bajo las condiciones óptimas (50% Et-OH, 78 °C y 60 min), también afectó en este caso al contenido total de polifenoles extraídos en el medio, disminuyendo este valor con respecto a los ensayos a pequeña escala. El rendimiento de extracción así como la

caracterización del extracto obtenido se incluye en la Tabla 7. El extracto obtenido a partir del plátano presentaba una apariencia gelatinosa que dificultó el proceso de filtración y que hizo que el porcentaje de extracto que pudiera recuperarse (65.64%) fuera bastante inferior al de los otros dos materiales. El valor de rendimiento de extracción, de haberse recuperado todo el extracto, habría sido de 14.68%, frente al valor de 9.63% obtenido. La caracterización del extracto se comenta en el siguiente apartado (2.4).

2.4. Comparación entre los extractos obtenidos a partir de los distintos subproductos

Comparando los tres materiales, el raquis fue el que mayor contenido en polifenoles presentó, seguido por el plátano de rechazo y, en último lugar, la pulpa. Pérez-Jiménez et al. identificaron las 100 fuentes de la dieta más ricas en polifenoles y establecieron un rango que va desde los 10 mg/100ml, para el vino rosado, hasta los 15000 mg/100g, para los clavos [18]. Los tres materiales objeto de estudio en este trabajo presentan un contenido en polifenoles dentro de dicho rango, concretamente dentro de los 35 primeros puestos, posición ocupada por la ciruela con 411 mg/100g, valor determinado por el método de Folin, o 377 mg/100g, valor determinado por HPLC. Por tanto, los tres materiales se sitúan como una fuente interesante de antioxidantes naturales.

En lo que respecta a las extracciones llevadas a cabo con etanol, como ya se ha comentado, los tres materiales presentaron un comportamiento similar. Temperaturas altas y concentraciones intermedias de etanol-agua dieron lugar a los mejores resultados, con tiempos de extracción entre 30 y 60 min. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores trabajando con otros materiales lignocelulósicos, como es el caso de Fernández-Argullo et al., quienes obtuvieron que un 50% de etanol y una temperatura de 80 °C permitía obtener los extractos con mayor actividad antioxidante trabajando con virutas de madera de nogal [15]. Xavier et al., por su parte, encontraron como condiciones óptimas trabajando con subproductos forestales, 75 °C, 55 min y 30% de etanol [8].

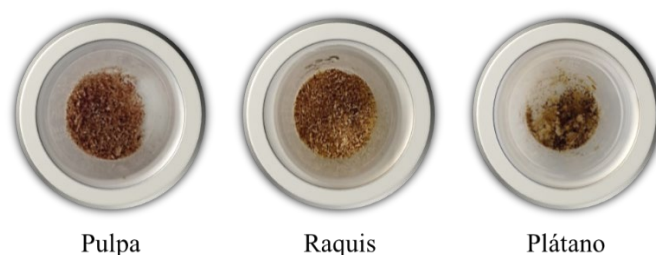


Figura 12. Extractos liofilizados obtenidos a partir de los tres subproductos mediante extracción con etanol bajo las condiciones optimizadas para cada uno de ellos

En la Tabla 7 se muestran las características de los extractos obtenidos a partir de cada subproducto bajo las condiciones óptimas. Puede verse que el extracto con mayor contenido en antioxidantes fue el plátano, seguido por el raquis y finalmente la pulpa. Mientras que la concentración de polifenoles medida directamente en el extracto líquido y calculada sobre los g de materia prima, era mayor para el caso del raquis (796.40 mg/100g para el raquis frente a 558.45 mg/100g para el plátano), el mayor rendimiento de extracción obtenido para este hizo que el

contenido en antioxidantes del extracto fuera inferior al del plátano. Si se tiene en cuenta la cantidad tan alta de extraíbles obtenida para el plátano (45%) cabía esperar que se hubiese obtenido una mayor cantidad de extracto para el plátano que para el raquis. En lo que respecta a la recuperación del extracto, como ya se comentó, para el raquis y la pulpa fue similar mientras que para el plátano la cantidad recuperada fue bastante inferior debido a su naturaleza más viscosa y que dificultó la filtración.

Fracción	Recuperación de extracto (%)	Rendimiento de extracción (%)	TPC (mg/g extracto)	IC50 (mg/mL)	TEAC (mg/g extracto)
Raquis	72.93±4.08	26.00±1.72	22.52±1.07	3.90±0.16	42.50±1.89
Plátano de rechazo	65.64±2.64	9.63±0.04	27.26±1.30	3.03±0.14	54.59±3.20
Pulpa	73.11±1.76	16.15±0.40	10.17±0.20	10.77±0.21	15.16±0.37

Tabla 7. Recuperación de extracto (%), rendimiento de extracción), contenido total en polifenoles (TPC), IC50 (concentración de muestra necesaria para disminuir en un 50% la absorbancia inicial del DPPH) y TEAC (capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox) de los extractos liofilizados obtenidos bajo las condiciones optimizadas para cada subproducto

En lo que respecta al cálculo de IC50, algunos estudios han mostrado que no siempre existe una relación lineal entre la concentración de antioxidante y la actividad antioxidante medida mediante el método DPPH, lo cual puede dificultar su determinación [19]. En este caso, sin embargo, para los tres materiales se encontró una relación lineal entre la concentración del extracto y la capacidad antioxidante (DPPH inhibición), lo que hizo la determinación del valor de IC50 sencilla. Los valores de IC50 obtenidos fueron coherentes con los valores de TPC: cuanto mayor es el TPC, menor concentración de extracto se necesita para conseguir una inhibición del 50%.

A continuación, se comparan los resultados obtenidos con los publicados en otros estudios con subproductos del cultivo del plátano y con otros residuos vegetales. Para un mismo residuo, el contenido total en polifenoles se puede ver afectado, entre otros, por la procedencia geográfica, la especie, la época de recolección, o el tiempo de almacenamiento o secado [20]. Además, es importante señalar que no solo el método empleado en la extracción de los polifenoles, sino el método elegido para su caracterización puede dar resultados muy diferentes. Además, para un mismo procedimiento, cuando se comparan valores de capacidad antioxidante *in vitro* publicados en distintos estudios debe hacerse con precaución, puesto que, aunque se haga uso del mismo método, se han hecho múltiples modificaciones de los mismos y no todos usan las mismas condiciones de ensayo, lo que puede llevar a resultados que no sean comparables [9].

Estudios previos en los que se lleva a cabo una extracción de antioxidantes a partir de residuos de platanera incluyen, por ejemplo, el estudio de Loganayaki et al. [21], que obtuvieron un rendimiento de extracción del 21.7% y un extracto con un contenido en polifenoles de 12 mg/g extracto realizando una extracción con metanol del pseudotallo de la platanera (*Musa paradisiaca*), material más parecido a la pulpa. Los valores obtenidos por estos autores son cercanos a los obtenidos en este estudio con la pulpa, a pesar de usarse un agente extractor diferente y que no se trate exactamente del mismo material. Si se comparan los valores de IC50, estos autores obtuvieron la mitad de concentración (4.9 mg/mL). González-Montelongo et al. [22]

por su parte, obtuvieron un TPC comprendido entre 12 y 19 mg /g extracto y valores de alrededor de 20 mg eq. Trolox/g extracto usando la cáscara del plátano y metanol como agente extractor. Con el plátano entero no se han encontrado estudios.

Los resultados obtenidos en este estudio son también comparables con los obtenidos por otros autores trabajando con diferentes materiales lignocelulósicos. Por ejemplo, Babbar et al. obtuvieron un extracto con un contenido en polifenoles de 37.4 mg/g y una capacidad antioxidante de 42.23 mg eq. Trolox/g extracto usando pipas de uva [20]. Karabegović et al., por otro lado, obtuvieron extractos de la fruta de *Solanum retroflexum* con un contenido en polifenoles de 92.07 mg/g extracto usando como condiciones de extracción 75% Et-OH, 60 °C y 45 min [23].

Como se comentó en el apartado 1.4, un gran número de autores ha planteado la necesidad de combinar más de un método de medida en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*. El uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es también interesante puesto que, aunque no da una medida de la capacidad antioxidante y posibles sinergias entre los compuestos presentes, permite detectar qué compuestos concretos están presentes y pueden ser los responsables de la capacidad antioxidante. En la presente tesis no se ha tenido la posibilidad de usar esta técnica, aunque se pretende hacer uso de ella en estudios futuros. Se ha encontrado en bibliografía algunos artículos en los que se ha empleado esta técnica y se han identificado compuestos como ácido tánico, pirocatecol, catecol, ácido gentísico, catequina, ácido protocatechuico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido felúrico y ácido cinámico en extractos obtenidos a partir del pseudotallo de la platanera [24]. Aboul-Enein et al. encontraron una alta cantidad de crisina, quercetina, cumarina y ácidos cafeico y cinámico en la cáscara de plátano [25]. En lo que respecta al plátano, su alto contenido en compuestos bioactivos y los beneficios para la salud asociados a los mismos ha sido extensamente estudiados. Entre los compuestos presentes en la fruta se incluyen: carotenoides, flavonoides, fenólicos, aminas y vitamina C [26].

3. Índice de tablas y figuras

3.1. Índice de tablas

Tabla 1. Combinación de variables obtenidas en el diseño factorial 3² para el estudio de la influencia de la temperatura y concentración de etanol sobre la extracción de polifenoles..... 120

Tabla 2. Contenido total en polifenoles (TPC) y capacidad antioxidante (DPPH inhibición) de los extractos obtenidos bajo las diferentes condiciones de extracción (relación sólido líquido 1:20, 60 minutos de extracción y temperatura y % de etanol variables) probadas con la pulpa. Los valores corresponden a la media de los duplicados $\pm$ desviación típica. Los valores con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$)..... 125

Tabla 3. Coeficientes de determinación (R^2) y coeficientes de regresión del polinomio de segundo orden $f(T, \%Et-OH) = p_{00} + p_{10} \cdot T + p_{01} \cdot \%Et-OH + p_{20} \cdot T^2 + p_{11} \cdot T \cdot \%Et-OH + p_{02} \cdot \%Et-OH^2$ obtenidos a partir del ajuste de los valores experimentales de TPC y DPPH medidos en los extractos obtenidos de los tres subproductos bajo las diferentes condiciones de temperatura y porcentaje de etanol testadas..... 126

Tabla 4. Contenido total en polifenoles (TPC) y capacidad antioxidante (DPPH inhibición) de los extractos obtenidos bajos las diferentes condiciones de extracción (relación sólido líquido 1:20, 60 minutos de extracción y temperatura y % de etanol variables) probadas con el raquis. Los valores corresponden a la media de los duplicados $\pm$ desviación típica. Los valores con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$)..... 128

Tabla 5. p-valores obtenidos mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías 129

Tabla 6. Contenido total en polifenoles (TPC) y capacidad antioxidante (DPPH inhibición) de los extractos obtenidos bajos las diferentes condiciones de extracción (relación sólido líquido 1:20, 60 minutos de extracción y temperatura y % de etanol variables) probadas con el plátano de rechazo. Los valores corresponden a la media de los duplicados $\pm$ desviación típica. Los valores con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$)..... 131

Tabla 7. Recuperación de extracto (%), rendimiento de extracción), contenido total en polifenoles (TPC), IC50 (concentración de muestra necesaria para disminuir en un 50% la absorbancia inicial del DPPH) y TEAC (capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox) de los extractos liofilizados obtenidos bajo las condiciones optimizadas para cada subproducto..... 134

3.2. Índice de figuras

Figura 1. Procedimiento seguido en la optimización de la extracción de antioxidantes a partir de los tres subproductos del cultivo del plátano. TPC: contenido total en polifenoles, DPPH: capacidad antioxidante mediante el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), IC50: concentración de muestra necesaria para disminuir en un 50% la absorbancia inicial del DPPH [1]..... 117

Figura 2. Montaje experimental (a pequeña escala) para la optimización de la extracción de antioxidantes 119

Figura 3. Montaje experimental para la determinación de los rendimientos de extracción bajo las condiciones óptimas de extracción establecidas, a menor escala, para cada subproducto..... 121

Figura 4. Tubos de ensayo curva de calibrado de Trolox y espectrofotómetro empleado en la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH..... 123

Figura 5. Superficie de respuesta en la que puede observarse el efecto de la temperatura y el porcentaje de etanol en el contenido total de polifenoles (izquierda) y la capacidad antioxidante (derecha) de los extractos obtenidos a partir de la pulpa 126

Figura 6. Influencia del tiempo de extracción sobre el contenido total en polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante (DPPH inhibición) obtenidos en el extracto obtenido a partir de la pulpa (78 °C y 60% Et-OH)..... 127

Figura 7. Extractos obtenidos en la extracción del raquis con diferentes concentraciones de etanol 129

Figura 8. Superficie de respuesta en la que puede observarse el efecto de la temperatura y el porcentaje de etanol en el contenido total de polifenoles (izquierda) y la capacidad antioxidante (derecha) de los extractos obtenidos a partir del raquis 130

Figura 9. Influencia del tiempo de extracción sobre el contenido total en polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante (DPPH inhibición) obtenidos en el extracto obtenido a partir del raquis (78 °C y 60% Et-OH) 130

Figura 10. Superficie de respuesta en la que puede observarse el efecto de la temperatura y el porcentaje de etanol en el contenido total de polifenoles (izquierda) y la capacidad antioxidante (derecha) de los extractos obtenidos a partir del plátano de rechazo 132

Figura 11. Influencia del tiempo de extracción sobre el contenido total en polifenoles (TPC) y la actividad antioxidante (DPPH inhibición) obtenidos en el extracto obtenido a partir del plátano de rechazo (78 °C y 60% Et-OH) 132

Figura 12. Extractos liofilizados obtenidos a partir de los tres subproductos mediante extracción con etanol bajo las condiciones optimizadas para cada uno de ellos 133

4. Bibliografía

1. Díaz S, Benítez AN, Ramírez-Bolaños S, et al (2021) Optimization of banana crop by-products solvent extraction for the production of bioactive compounds. *Biomass Convers Biorefinery* 2021 1:1–12. <https://doi.org/10.1007/S13399-021-01703-7>
2. Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F (2018) Non-extractable polyphenols and carotenoids : importance in human nutrition and health
3. Bravo L, Abia R, Saura-Calixto F (1994) Polyphenols as Dietary Fiber Associated Compounds. Comparative Study on in Vivo and in Vitro Properties. *J Agric Food Chem* 42:1481–1487. <https://doi.org/10.1021/jf00043a017>
4. Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, et al (2008) Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int* 41:274–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>
5. Kumar Y, Yadav DN, Ahmad T, Narsaiah K (2015) Recent Trends in the Use of Natural Antioxidants for Meat and Meat Products. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 14:796–812. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12156>
6. Hidalgo G-I, Almajano MP (2017) Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review. *Antioxidan* 6:7. <https://doi.org/10.3390/antiox6010007>
7. Kebede M, Admassu S (2019) Application of Antioxidants in Food Processing Industry: Options to Improve the Extraction Yields and Market Value of Natural Products. *Adv Food Technol Nutr Sci – Open J* 5:38–49. <https://doi.org/10.17140/aftnsj-5-155>
8. Xavier L, Freire MS, González-Álvarez J (2019) Modeling and optimizing the solid–liquid extraction of phenolic compounds from lignocellulosic subproducts. *Biomass Convers Biorefinery* 9:737–747. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00401-9>

9. Pérez Jiménez J (2007) Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes: efectos de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. Universidad Autónoma de Madrid
10. Londoño Londoño J Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Disponible en: http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9_129-162.pdf (Último acceso:14/09/2021)
11. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
12. Carciochi RA, Sologubik CA, Fernández MB, et al (2018) Extraction of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grain: Optimization and kinetics modeling. *Antioxidants* 7:. <https://doi.org/10.3390/antiox7040045>
13. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, et al (2014) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J Food Drug Anal* 22:296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
14. Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53:4290–4302
15. Fernández-Agulló A, Freire MS, Ramírez-López C, et al (2020) Valorization of residual walnut biomass from forest management and wood processing for the production of bioactive compounds. *Biomass Convers Biorefinery* 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00598-9>
16. Jokic S, Velic D, Bilic M, et al (2010) Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech J Food Sci* 28:206–212. <https://doi.org/10.17221/200/2009-cjfs>
17. Huang W, Xue A, Niu H, et al (2009) Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. *Food Chem* 114:1147–1154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.079>
18. Pérez-Jiménez J, Neveu V, Vos F, Scalbert A (2010) Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *Eur J Clin Nutr* 64:112–120. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.221>
19. Carmona-Jiménez Y, García-Moreno MV, Igartuburu JM, García Barroso C (2014) Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chem* 165:198–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.106>
20. Babbar N, Oberoi HS, Sandhu SK (2015) Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55:319–337. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653734>
21. Loganayaki N, Rajendrakumaran D, Manian S (2010) Antioxidant capacity and phenolic content of different solvent extracts from banana (*Musa paradisiaca*) and mustai (*Rivea hypocrateriformis*). *Food Sci Biotechnol* 19:1251–1258. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0179-7>
22. González-Montelongo R, Gloria Lobo M, González M (2010) Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food*

Chem 119:1030–1039. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.012>

23. Karabegović I, Mančić D, Nikolić N, et al (2018) Total polyphenols from *Solanum retroflexum* Dun. fruit: extraction and optimization by response surface methodology. *J Food Meas Charact* 12:1772–1778. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9792-6>
24. Saravanan K, Aradhya SM (2011) Polyphenols of pseudostem of different banana cultivars and their antioxidant activities. *J Agric Food Chem* 59:3613–3623. <https://doi.org/10.1021/jf103835z>
25. Aboul-Enein AM, Salama ZA, Gaafar AA, et al (2016) Identification of phenolic compounds from banana peel (*Musa paradaisica* L.) as antioxidant and antimicrobial agents. *J Chem Pharm Res* 8:46–55
26. Sidhu JS, Zafar TA (2018) Bioactive compounds in banana fruits and their health benefits. *Food Qual. Saf.* 2:183–188

Capítulo 5. Obtención de oligosacáridos a partir de la pulpa: pretratamiento

Contenido

1.	Procedimientos empleados en el pretratamiento de la pulpa.....	146
1.1.	Hidrólisis hidrotérmica de la pulpa	146
1.1.1.	Acondicionamiento del material	148
1.1.2.	Autohidrólisis no isotérmica	148
1.1.3.	Autohidrólisis isotérmica	149
1.1.4.	Autohidrólisis no isotérmica en dos etapas	150
1.2.	Pretratamiento alcalino.....	151
1.2.1.	Acondicionamiento del material y procedimiento	151
1.3.	Eficacia de los pretratamientos	152
1.3.1.	Caracterización de las fracciones sólidas pretratadas.....	152
1.3.2.	Caracterización de los licores obtenidos en autohidrólisis.....	153
2.	Resultados	154
2.1.	Autohidrólisis no-isotérmica	154
2.1.1.	Composición de los licores	154
2.1.2.	Composición de las fracciones sólidas y digestibilidad	158
2.2.	Autohidrólisis isotérmica	160
2.3.	Autohidrólisis en dos etapas.....	161
2.4.	Tratamiento con NaOH	163
2.5.	Comparación entre pretratamientos.....	164
3.	Índice de tablas y figuras.....	164
3.1.	Índice de tablas.....	164
3.2.	Índice de figuras	164
4.	Bibliografía	165

En este capítulo se evalúa la influencia de dos tipos de pretratamiento sobre la pulpa obtenida a partir del pseudotallo de la platanera, como tratamiento previo a la hidrólisis enzimática para la producción de celo-oligosacáridos. El objetivo de este tratamiento era mejorar las propiedades del material y hacerlo más susceptible al ataque enzimático.

Se exploró, por una parte, la autohidrólisis, pretratamiento que solo emplea agua como agente químico y que, además, permite la obtención de otro tipo de oligosacáridos de otras fracciones como la hemicelulosa o el almidón. Se operó bajo condiciones no isotérmicas, variándose la temperatura final del proceso (140 – 220 °C) y bajo condiciones isotérmicas a una temperatura fija de 140 °C y estudiándose, en ese caso, la influencia del tiempo de tratamiento (120 - 300 minutos). Además, se probó un pretratamiento de autohidrólisis no isotérmica realizado en dos etapas consecutivas de severidad incrementada.

Por otro lado, se usó con fines comparativos un pretratamiento químico con sosa, por ser de los más empleados dada su simplicidad y eficacia. En este caso, se empleó NaOH 1 N a temperatura ambiente y se evaluaron diferentes tiempos de tratamiento (4, 8 y 24 horas).

Para ambos pretratamientos se analizó la composición de los sólidos obtenidos y se determinó su digestibilidad enzimática, como una medida de la eficacia del tratamiento. Para el caso de los tratamientos de autohidrólisis, se analizó, además, la composición de los licores obtenidos, que presentaban un gran contenido en oligosacáridos procedentes de la fracción de almidón de la pulpa y que podrían tener interés también como ingrediente funcional.

En primer lugar, se exponen los procedimientos seguidos, incluyéndose algunos aspectos teóricos y, a continuación, se exponen los resultados obtenidos, así como su análisis y comparación con trabajos previamente publicados.

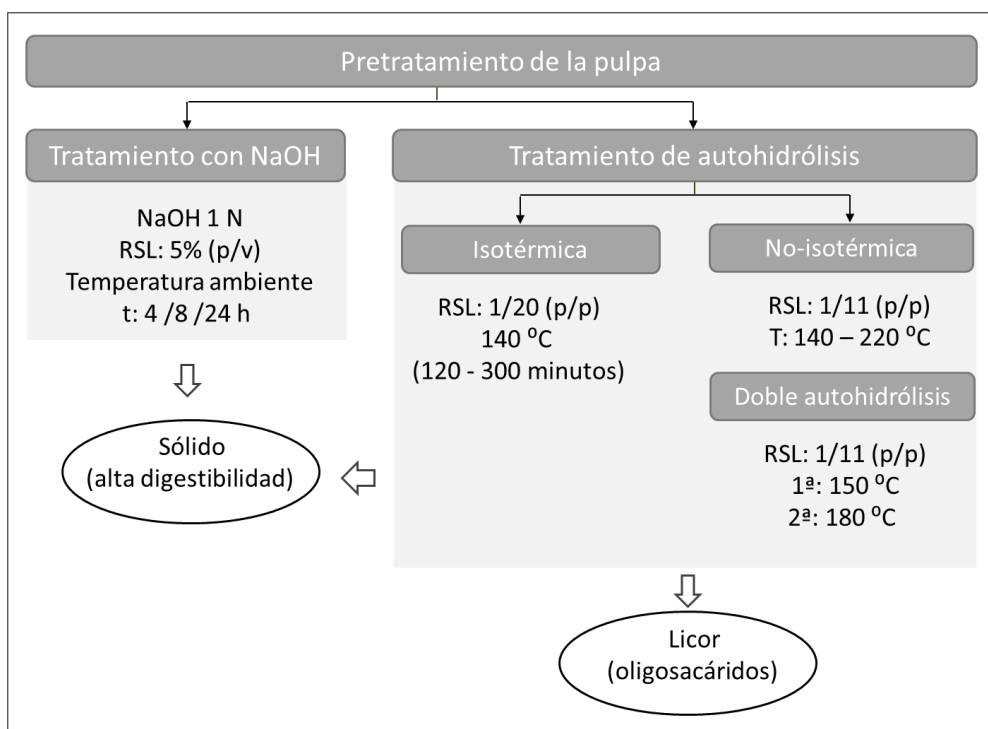


Figura 1. Esquema de los pretratamientos probados en la pulpa (RSL: relación sólido-líquido, g biomasa en base seca / g agua)

1. Procedimientos empleados en el pretratamiento de la pulpa

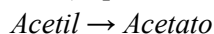
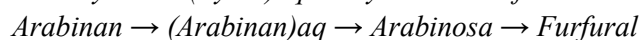
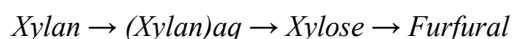
Como se comenta en Capítulo 2, debido a la complejidad de la estructura de la pared celular, la hidrólisis de los hidratos de carbono resulta difícil. Por ello, es necesario llevar a cabo un tratamiento previo. La lignina se considera el componente más recalcitrante de la pared celular y el más resistente a la degradación química o enzimática [1]. Los residuos de platanera tienen contenidos en lignina inferiores a otros materiales lignocelulósicos, lo que podría proporcionar buenos rendimientos utilizando hidrólisis enzimática sin necesidad de llevar a cabo un pretratamiento o bajo unas condiciones menos severas [2]. Sin embargo, aunque el contenido en lignina es inferior, los residuos de la platanera en general presentan una naturaleza más fibrosa y, dado su alto grado de cristalinidad y polimerización, puede ser igualmente necesario un pretratamiento que rompa la rigidez de la fibra y la haga vulnerable a la hidrólisis [3]. De entre las diversas opciones existentes, los pretratamientos químicos son los que han recibido mayor atención debido a que son efectivos y económicos, y en el caso concreto de los residuos de platanera, la mayor parte de los tratamientos probados incluyen tratamientos con ácidos y bases.

En la presente tesis se exploró, por una parte, la autohidrólisis, pretratamiento que solo emplea agua como agente químico y que, además, permite la obtención de otro tipo de oligosacáridos de otras fracciones como la hemicelulosa o el almidón. Además, se usó el pretratamiento con sosa, por ser de los más empleados por su simplicidad y eficacia. En el caso del tratamiento con sosa no se obtuvieron oligosacáridos durante el pretratamiento, pero se usó a fin de comparar los cambios en la digestibilidad del sólido.

1.1. Hidrólisis hidrotérmica de la pulpa

El tratamiento de autohidrólisis es un proceso hidrotérmico en el cual el material es sometido a alta presión y temperatura. En este tipo de pretratamiento únicamente se emplea agua, que actúa como disolvente y reactivo, con el consiguiente beneficio medioambiental [4]. La autohidrólisis, además de actuar como un pretratamiento que permite obtener un sólido cuya estructura ha sido alterada y que se encuentra, por tanto, en condiciones mejoradas para posteriores tratamientos, permite obtener una fracción líquida rica en oligosacáridos (con potencial prebiótico).

Los iones hidronio procedentes del agua y de compuestos generados durante el proceso, como ácido fórmico, acético, levulínico, urónico y ácidos fenólicos, catalizan la despolimerización de la hemicelulosa sin necesidad de añadir ácidos minerales para favorecer la cinética del proceso. De esta forma se reducen los problemas por corrosión y la necesidad de una etapa de neutralización posterior [4].



El tipo de oligosacáridos que puede ser obtenido dependerá del material de partida y de las condiciones de operación. Este proceso es considerado la opción más apropiada para la separación selectiva de la hemicelulosa [5], razón por la cual ha sido aplicado principalmente a materiales ricos en este componente. En este estudio, aunque la pulpa no sería el típico material al que se le aplicaría dicho tratamiento, pues su contenido en hemicelulosa es bajo, este presenta un alto contenido en almidón a partir del cual se podrían obtener malto-oligosacáridos, con potencial prebiótico [6–8]. Se han encontrado algunos estudios en la literatura en los que se aplica un tratamiento hidrotérmico a residuos procedentes del cultivo del plátano [9–12], aunque todos ellos se centran en el efecto que tiene este tratamiento sobre la digestibilidad del sólido y no en los compuestos obtenidos en el licor.

La autohidrólisis se puede llevar a cabo bajo dos modos de operación, isoterma (alcanzar la temperatura de tratamiento y mantenerla) o no isoterma (llegar a la temperatura de tratamiento y enfriar el reactor) [13]. En el presente trabajo se ha estudiado el proceso no isotérmico y, de manera complementaria, se han realizado ensayos en condiciones isotérmicas que han permitido obtener resultados complementarios y que podrían plantearse como una opción técnica y económicamente más viable. Además, se ha llevado a cabo un pretratamiento de autohidrólisis no isotérmica realizado en dos etapas consecutivas de severidad incrementada.

Las variables de operación en autohidrólisis son la temperatura, el tiempo, la velocidad de agitación, la relación sólido/líquido (RSL, g biomasa en base seca / g agua) y el tamaño de partícula. Entre estas, las más influyentes son la temperatura y el tiempo, siendo la primera función de la segunda, cuando se opera en condiciones no isotermas. Las temperaturas de operación normalmente varían entre 150 y 230 °C, aunque pueden usarse temperaturas superiores. Se emplean tiempos de reacción que van desde segundos hasta horas, dependiendo de la temperatura. Por otro lado, la razón sólido líquido puede variar entre 1/2 y 1/100, aunque los valores más comúnmente empleados se encuentran alrededor de 1/10, dependiendo de la capacidad de retención de agua del material. En general, la reducción del tamaño de partícula se traduce en un incremento del área superficial y, por tanto, en una mayor hidrólisis. Sin embargo, la reducción del tamaño de partícula puede suponer un alto consumo energético. Para bajas RSL, el tamaño de partícula no es tan importante, pero para RSL su incremento se traduce en una disminución de la solubilización de la biomasa, posiblemente debido a una deficiencia en la impregnación del material lignocelulósico [14].

Como se ha comentado, la relación entre la temperatura y el tiempo tienen un fuerte impacto en la composición de la fase líquida y sólida. Ambos factores pueden ser agrupados en un único parámetro, el factor de severidad ($\log R_0$). El factor severidad es un número adimensional que depende de la temperatura y el tiempo y que fue definido para poder comparar tratamientos de explosión por vapor y autohidrólisis realizados bajo condiciones diferentes y empleando distintos equipos [15]. Para procesos no isotérmicos se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T(t)-T_{ref}}{\omega}\right) \cdot dt \quad \text{Ecuación 1}$$

donde t es el tiempo expresado en minutos, $T(t)$ es la temperatura en °C en función del tiempo, T_{ref} es la temperatura hasta la cual el proceso de hidrólisis es poco significativo (normalmente 100 °C) y ω es un parámetro empírico relacionado con la energía de activación, normalmente 14.75 [14].

De entre las variables implicadas en el proceso, en este estudio, se ha fijado la RSL, el tamaño de partícula y la velocidad de agitación. Además, se ha estudiado la influencia de la temperatura final e, indirectamente, el tiempo (en el caso de autohidrólisis no isotérmica) y la influencia del tiempo (en el caso de isotérmica).

1.1.1. Acondicionamiento del material

El material, previamente secado en estufa a 40 °C, fue molido en un molino de cuchillas (Fritsh Industriestr, Germany) a un tamaño de partículas inferior a 6 mm. Se realizó una caracterización granulométrica del material obtenido usando una tamizadora con vibración (Endecotts) y tamices de tamaño de malla 60, 35, 18, 10 y 5. Se determinó el contenido en humedad y cenizas de cada fracción a fin de garantizar la homogeneidad del material.

1.1.2. Autohidrólisis no isotérmica

Los tratamientos bajo condiciones no isotérmicas se llevaron a cabo en un reactor discontinuo de mezcla completa de acero inoxidable y capacidad de 2 L, que permite operar en régimen no isoterma (Parr Instruments Company, USA). El reactor cuenta con una camisa calefactora eléctrica externa, un serpentín interno por el que circula agua, que permite la refrigeración del reactor, y un sistema interno de agitación de hélices. El equipo se controla mediante un módulo digital (Parr Instruments Company modelo 4842 controlador PID) que además permite monitorizar la temperatura, agitación y presión durante el tratamiento.



Figura 2. Reactor Parr Instruments Company, USA, empleado en los tratamientos de autohidrólisis no isotérmica

Para llevar a cabo los tratamientos, se empleó el material con un tamaño de partícula inferior a 6 mm y una relación sólido/líquido (g biomasa en base seca / g agua) de 1/11, no siendo posible usar cargas superiores debido a la baja densidad de la biomasa y su naturaleza higroscópica, que dificultaba la agitación y homogeneización de la mezcla y la posterior recuperación del licor. Para llevar a cabo las diferentes pruebas, la biomasa (104.6 g) fue mezclada con agua destilada (1094.4 g) en el reactor, la velocidad de agitación se fijó en 150 rpm y se operó bajo condiciones no isotermas, calentando hasta alcanzar la temperatura deseada (140, 150, 160, 170, 185, 200 y 220 °C) y rápidamente enfriando una vez alcanzada esta. La temperatura, presión y el consumo energético fueron registrados durante el proceso.

El material obtenido fue prensado con el fin de separar la fracción sólida de la líquida. El licor fue filtrado y el sólido se lavó con el doble de cantidad de agua utilizada en la autohidrólisis, prensándose nuevamente. Ambas fracciones fueron pesadas a fin de calcular el rendimiento en sólidos (Y_s) y recuperación de líquido (Y_L) según las expresiones:

$$Y_s (\%) = \text{masa sólido seco tras el pretratamiento} / \text{masa sólido seco inicial} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$Y_L (\%) = \text{masa licor recuperado} / \text{masa agua inicial} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Los licores obtenidos en los diferentes tratamientos fueron analizados directamente mediante HPLC (descrito en la sección 1.3.2). Una alícuota fue sometida a post-hidrólisis con H_2SO_4 al 4 % (peso/peso) a 121 °C durante 60 min permitiendo determinar la concentración de oligosacáridos (a partir del incremento en monómeros medido mediante HPLC). Se tomaron muestras de los sólidos pretratados y se secaron a 40 °C para su posterior caracterización mediante hidrólisis ácida cuantitativa y determinación de su digestibilidad (procedimientos explicados en la sección 1.3.1).

El factor de severidad ($\log R_0$) se calculó en base a los perfiles de temperatura obtenidos para cada pretratamiento mediante la Ecuación 1.

1.1.3. Autohidrólisis isotérmica

De manera complementaria, se realizaron pruebas bajo condiciones isotérmicas como una posible alternativa más viable a nivel industrial. El límite de temperatura para trabajar bajo condiciones económicamente viables a nivel industrial es 140 °C, motivo por el cual se escogió dicha temperatura para los tratamientos isotérmicos y se evaluó la influencia del tiempo. Se empleó para ello minirreactores de alta presión calentados en un baño termostático de aceite y con agitación magnética. En cada ensayo se usaron 0.5 g de material con un tamaño de partícula entre 1.0 y 2.0 mm, tamaño de partícula elegido de manera que garantizara la representatividad de la muestra (dada la pequeña cantidad de material usada en el ensayo), que permitiera, además, una agitación homogénea de la mezcla, pero que, por otro lado, no fuera demasiado pequeño como para que se produjera una rápida degradación del material durante el tratamiento. En esta ocasión, debido a la peor agitación proporcionada por el sistema, se empleó una relación sólido-líquido de 1/20. La temperatura de operación se fijó en 140 °C y se probaron diferentes tiempos de reacción (entre 120 y 300 minutos).

Tras el tratamiento, el sólido y el líquido fueron separados por filtración. Los licores fueron analizados directamente y tras post-hidrólisis mediante HPLC (tal y como se describe en la sección 1.3.2). La fracción sólida fue lavada y secada para determinar el rendimiento en sólidos y la fracción líquida pesada para determinar el porcentaje de licor recuperado. En este caso, dada la pequeña cantidad de material usada en los ensayos, no se pudo realizar la caracterización completa de la fracción sólida, como si se realizó en el caso de hidrólisis no-isotérmica (en la que se emplearon alrededor de 100 g en lugar de los 0.5 g empleados en este caso).



Figura 3. Minirreactores empleados en los tratamientos de autohidrólisis isotérmica

En este caso el factor de severidad se calculó asumiendo que, dado el pequeño volumen de trabajo, el calentamiento y enfriamiento del tubo de reacción es instantáneo.

1.1.4. Autohidrólisis no isotérmica en dos etapas

La autohidrólisis en dos etapas ha sido propuesta en la literatura con diferentes fines. Por ejemplo, esta puede ser empleada como una alternativa a una extracción previa con etanol para eliminar compuestos fácilmente extraíbles no deseados, como grasas, compuestos fenólicos de bajo peso molecular o compuestos inorgánicos solubles, facilitando, de esta forma, la purificación de los licores obtenidos en la segunda autohidrólisis [16]. Además, la eliminación de estos compuestos extraíbles puede ayudar a mejorar el rendimiento en oligosacáridos obtenidos tras el proceso [17]. Por otro lado, Lee y colaboradores [18] usaron una combinación de un tratamiento bajo condiciones suaves para extraer la hemicelulosa, seguido de un pretratamiento más severo para aumentar la digestibilidad enzimática del sólido. En este caso, en el que el material presenta un alto contenido en extraíbles y almidón, las dos autohidrólisis consecutivas se plantearon como opción interesante para extraer estos compuestos en una primera etapa de fraccionamiento, seguido por una segunda que permitiera recuperar otros productos interesantes, como oligosacáridos de la hemicelulosa, a la vez que mejorar la digestibilidad del sólido.

Para llevar a cabo los dos tratamientos en este caso, el sólido húmedo obtenido tras la primera autohidrólisis realizada mediante el procedimiento previamente descrito (temperatura final de 150 °C, condición que permitió obtener la mayor concentración de oligosacáridos en el líquido), fue mezclado con agua destilada en una relación sólido/líquido también de 1/11 (teniendo en cuenta la humedad con que quedaba el sólido tras el primer tratamiento). El segundo tratamiento fue llevado a cabo de manera similar a la descrita previamente, usando como temperatura final en este caso 180 °C. Tanto el licor como el sólido fueron caracterizados como en los casos anteriores.

En este caso, para calcular el factor de severidad se asumió que las dos etapas eran dependientes y que, por tanto, la efectividad del segundo pretratamiento dependía del primero [18]. Según Lee et al., para el proceso en dos etapas el factor de severidad se puede calcular a partir de los factores correspondientes a cada etapa, como $\log((R_{0,1} + R_{0,2}))$, siendo $R_{0,1}$ el factor de severidad para la primera etapa, y $R_{0,2}$, para la segunda [18].

1.2. Pretratamiento alcalino

La lignina se considera el componente más recalcitrante de la pared celular y el más resistente a la degradación química o enzimática [1]. Juega un papel muy importante al ejercer de barrera física y formar uniones inespecíficas con las enzimas hidrolíticas, por lo que muchos pretratamientos se basan en su eliminación o ruptura. De entre las diversas opciones existentes, los pretratamientos químicos son los que han recibido mayor atención debido a que son efectivos y económicos. Los pretratamientos químicos emplean diferentes especies químicas como ácidos y álcalis. De entre estos, uno de los más empleados es el pretratamiento con sosa dada su simplicidad y efectividad. Este pretratamiento es más efectivo en materiales con bajo contenido en lignina, como es el caso de los residuos procedentes del cultivo del plátano.

El tratamiento con NaOH diluido produce el hinchamiento de la biomasa, lo que conduce a un aumento del área superficial interna, un descenso de la cristalinidad, una separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos y una rotura de la estructura de la lignina. La eficiencia del proceso depende de algunos parámetros como nivel de alcalinidad, tiempo de reacción y temperatura, entre otros. Además, una ventaja de este pretratamiento es que los tiempos y temperaturas de reacción necesarios suelen ser inferiores a los de otros tratamientos pudiendo incluso llevarse a cabo a temperatura ambiente, aunque en ese caso se requiere tiempos de tratamiento más largos. Existen una gran cantidad de artículos en los que se estudia el pretratamiento con sosa del pseudotallo de la platanera [19–24]. En base a los resultados obtenidos por estos autores se eligieron las variables de operación que se usarían en la presente tesis y que a continuación se comentan.

1.2.1. Acondicionamiento del material y procedimiento

La pulpa obtenida en el proceso de extracción de fibra se secó en estufa a 40 °C y se molió a un tamaño de partícula inferior a 0.5 mm empleando el molino Retsch Ultra Centrifugal Mill ZM200. Dada la naturaleza higroscópica del material no se pudo emplear una relación sólido-líquido superior al 5% (p/v). Por otra parte, se empleó una concentración de hidróxido de sodio 1 N, concentración más comúnmente empleada en la bibliografía y que ha permitido obtener buenos rendimientos. Una vez mezclado el sólido con la sosa se dejó a temperatura ambiente (sin agitación) durante el tiempo correspondiente. Se probaron tiempos de reacción de 4, 8 y 24 horas.

Finalizado el tratamiento, se separó la fracción sólida del líquido. Debido al hinchamiento que experimenta la biomasa durante el pretratamiento y las microfibrillas presentes, la etapa de filtración resultó problemática, produciéndose rápidamente la saturación de los filtros. A fin de solventar este problema, se decidió llevar a cabo la separación mediante centrifugación.

Acondicionamiento	Pretratamiento	Sólido pretratado
Biomasa seca Molida < 0.5 mm	RSL: 5% p/v NaOH 1N T ambiente t de reacción: 4, 8 y 24 h	Centrifugación Neutralización (H ₂ SO ₄ 2M) Lavado x2

A continuación, se realizaron dos lavados con agua destilada (empleando en cada lavado un volumen de agua que fue el doble al volumen empleado en el tratamiento) y con agitación vigorosa. En el primer lavado se llevó a cabo la neutralización del medio, empleando para ello ácido sulfúrico 2 M, y se volvió a centrifugar. Se observó que, una vez realizada la neutralización, y durante la segunda etapa de lavado, el pH volvía a subir ligeramente probablemente debido a que queda parte de la sosa adherida al material, desprendiéndose durante el lavado. Es por ello que durante el segundo lavado se controló también el pH y se reajustó con una pequeña cantidad de sulfúrico para conseguir un pH neutro. El sólido obtenido se secó en estufa a 40 °C para su posterior análisis mediante hidrólisis ácida cuantitativa y ensayo de digestibilidad.

1.3.Eficacia de los pretratamientos

En este apartado se incluyen los procedimientos empleados para caracterizar los sólidos obtenidos tras los pretratamientos de autohidrólisis y con sosa. Esta caracterización permite valorar la eficiencia de los tratamientos empleados y compararlos entre ellos. Por otro lado, se incluye también los procedimientos empleados en la caracterización de los licores obtenidos en los tratamientos de autohidrólisis.

1.3.1.Caracterización de las fracciones sólidas pretratadas

1.3.1.1. Hidrólisis ácida cuantitativa

La caracterización de los sólidos pretratados obtenidos tras los tratamientos de autohidrólisis y pretratamientos básicos con sosa conllevó la determinación de su humedad, contenido en cenizas y, mediante hidrólisis ácida cuantitativa, de lignina Klason, xilanos, arabinanos, glucanos, y grupos acetilo. Dado que los procedimientos se encuentran descritos en el Capítulo 3 “Caracterización de la materia prima”, no se vuelven a describir aquí.

1.3.1.2. Digestibilidad enzimática

El principal objetivo del pretratamiento es aumentar la digestibilidad del sólido, por lo que su determinación es una forma de valorar la eficacia del mismo. La digestibilidad enzimática de los sólidos pretratados y del material original se determinó de acuerdo a la norma NREL/TP-510-42629 [25]. El material fue secado en estufa a 40 °C y molido a menos de 0.5 mm. 0.15 g de biomasa (en base seca) se mezclaron con 5 mL de solución tampón de citrato de sodio (0.1 M, pH 4.8), 100 µL de azida de sodio (2% p/v) como agente antimicrobiano y las cantidades de celulasa

(Celluclast 1.5L de Novozymes, 51 FPU/mL) y cellobiasa (Novozyme 188, 686 IU/mL) necesarias para obtener 60 FPU (Unidades de Papel Filtro) /g y 64 pNPGU (unidades de p-nitrofenil-glucosida) /g de biomasa seca respectivamente. Las actividades enzimáticas fueron determinadas según Ghose (1987) y estos procedimientos se incluyen en el Capítulo 6. Finalmente, el volumen se ajustó con agua destilada hasta completar 10 mL. Los ensayos se llevaron a cabo en una incubadora con agitación orbital (TEQ, Portugal) a 50 °C y 150 rpm durante 72 h. Tras esto, las muestras fueron hervidas durante 5 minutos para inactivar la enzima y rápidamente enfriadas en hielo. A continuación, se centrifugaron a $13000 \times g$, y se filtraron (usando filtros de membrana con tamaño de poro de 0.45 μm) para su análisis mediante HPLC. Se determinaron los contenidos de glucosa, xilosa y arabinosa en los hidrolizados empleando el equipo Agilent Technologies Liquid Chromatographer 1100 Series System (Santa Clara CA, USA) equipado con la columna de intercambio catiónico Aminex HPX-87H (7.8 $\times$ 300 mm), precedida por una precolumna de protección (50x7.8 mm) con el mismo relleno de Bio-Rad (USA) y con detector de índice de refracción. Las condiciones de operación de la columna se establecieron en 50 °C y como fase móvil se usó H₂SO₄ 5 mM con un caudal de 0.6 mL/min.

Cada muestra se analizó por duplicado. Además, se realizó un blanco de sustrato (sin enzima) para cada biomasa y un blanco de enzima (sin biomasa) a fin de corregir los resultados de los azúcares libres presentes en la biomasa y en la enzima. La digestibilidad enzimática se obtuvo mediante la ecuación:

$$\text{Digestibilidad (\%)} = (\text{glucosa obtenida} / \text{glucosa potencial en la biomasa}) \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

1.3.1.3. Microscopía electrónica de barrido

El pretratamiento permite romper la compleja estructura de la biomasa, dando lugar a alteraciones físicas en el material que pueden evaluarse visualmente mediante Microscopía Electrónica de Barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM). La pulpa original y pretratada (ambas secas) fueron analizadas usando el equipo Hitachi TM 3030 con un voltaje de aceleración de 15 kV y usando diferentes aumentos (x100, x600 and x1200). Las muestras no fueron metalizadas para su observación en SEM.

1.3.2. Caracterización de los licores obtenidos en autohidrólisis

Bajo condiciones moderadas de autohidrólisis, los oligosacáridos son, en general, el principal producto obtenido en el licor, pero esto dependerá de los parámetros empleados. Además de una mezcla de azúcares (oligómeros y monómeros) y ácido acético, en el licor pueden estar presentes los productos procedentes de la deshidratación de las hexosas y pentosas, como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), respectivamente. Estos productos, a su vez, pueden sufrir reacciones de degradación, generándose compuestos como ácido fórmico y levulínico. Además, debido a la solubilización parcial de la lignina, en el licor también puede haber presentes compuestos fenólicos.

Los licores obtenidos en los pretratamientos de autohidrólisis fueron analizados directamente en HPLC. Una muestra de los hidrolizados fue sometida a post hidrólisis con ácido sulfúrico al 4% (peso/peso) a 121 °C durante 60 minutos, y la cantidad de oligosacáridos fue obtenida a partir del incremento medido en los monómeros. Se empleó el cromatógrafo líquido Agilent

Technologies Liquid Chromatographer 1100 Series System (Santa Clara CA, USA) equipado con la columna de intercambio catiónico Aminex HPX-87H (Bio-Rad, USA) en combinación con una precolumna con el mismo relleno de Bio-Rad (USA), con detector de índice de refracción y un detector de matriz de diodo (*Diode Array Detector*, DAD). La temperatura de operación de la columna fue 50 °C y la fase móvil H₂SO₄ (5 mmol/L) con un caudal de 0.6 mL/min. La glucosa, xilosa, arabinosa y ácido acético fueron detectados con el detector de índice de refracción y el furfural e HMF mediante el detector UV a 280 nm.

Para la caracterización del grado de polimerización de los oligosacáridos presentes en los licores de autohidrólisis se empleó la columna Phenomenex Rezex RSO-Oligosaccharide Ag⁺ (200 x 10 mm), en combinación con una precolumna (60x10 mm) con el mismo relleno. En este caso se empleó como fase móvil agua ultrapura con un caudal de 0.3 mL/min y la temperatura de la columna se fijó en 80 °C. Para la calibración de la columna se emplearon celo-oligosacáridos (celobiosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa y celohexaosa) de Megazyme. Además, se inyectó una muestra de sirope de maíz (formada por malto-oligosacáridos) de Phenomenex para establecer los tiempos de retención de estos.

2. Resultados

A continuación, se incluyen los resultados obtenidos en los distintos pretratamientos probados. Como se ha comentado, el objetivo del pretratamiento es alterar la estructura del material lignocelulósico de tal forma que facilite la accesibilidad de las enzimas a los carbohidratos contenidos en la biomasa, lo cual puede verse reflejado en el valor de digestibilidad del material. Para el pretratamiento con sosa se han incluido los valores de digestibilidad de los sólidos pretratados obtenidos así como su caracterización química. Para el tratamiento de autohidrólisis, además de esta información, se incluye la caracterización de los licores obtenidos, dado el interés ya comentado que presentan los oligosacáridos que están presentes en el licor.

2.1. Autohidrólisis no-isotérmica

2.1.1. Composición de los licores

La autohidrólisis, además de actuar como un pretratamiento que permite obtener un sólido cuya estructura ha sido alterada y que se encuentra, por tanto, en condiciones mejoradas para posteriores tratamientos, permite obtener una fracción líquida rica en oligosacáridos (con potencial prebiótico). Los licores obtenidos presentaron la composición típica obtenida en los tratamientos de autohidrólisis, formados por una mezcla de compuestos oligoméricos (gluco-oligosacáridos (GlcOS), xilo-oligosacáridos (XOS), arabino-oligosacáridos (AOS) y grupos acetilos unidos a oligosacáridos (AcOS)), monosacáridos (glucosa, xilosa, arabinosa), ácido acético y productos resultantes de la descomposición de azúcares (furfural e hidroximetilfurfural (HMF)), además de otros compuestos que pueden ser solubilizados (lignina o compuestos resultantes de su descomposición y compuestos procedentes de la solubilización de pectinas, como galacto-oligosacáridos o ácido galacturónico). La concentración de cada uno de estos compuestos varió con el factor de severidad del tratamiento tal y como se muestra en la Figura 4.

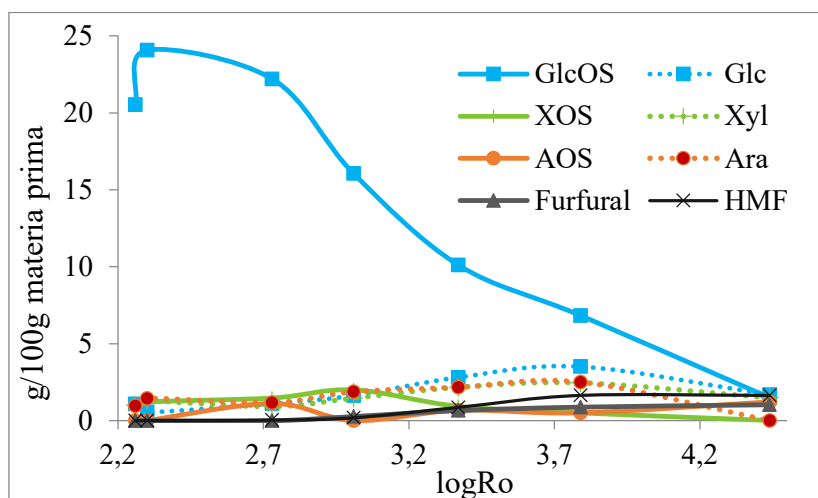


Figura 4. Variación en la composición química de los licores obtenidos en los pretratamientos de autohidrólisis no-isotérmica realizados a la pulpa bajo diferentes condiciones de severidad

La mayor parte de los oligosacáridos presentes en los licores fueron oligosacáridos de glucosa, así como glucosa para los monosacáridos. La concentración de GlcOS aumentó con el factor de severidad, exhibiendo su máximo valor de 24.07 g/100 g de materia prima para $\log R_0=2.3$ (150 °C). Para severidades superiores, la concentración de oligosacáridos empieza a disminuir progresivamente. Aunque durante la autohidrólisis la situación más común corresponde a una solubilización de la hemicelulosa [14], en este caso la cantidad de XOS y AOS obtenida fue muy baja, siendo los oligosacáridos en su mayoría de glucosa, como se ha dicho. Este comportamiento fue similar al obtenido por Guerrero et al. al someter al conjunto del pseudotallo a un tratamiento de explosión por vapor [12].

Los tiempos de retención obtenidos para los GlcOS en la columna Rezex RSO-Oligosaccharide mostraron que estos oligosacáridos correspondían a malto-oligosacáridos procedentes de la fracción de almidón y no a celo-oligosacáridos procedentes de la fracción de celulosa, pues los tiempos coincidían con los de una muestra de sirope de maíz y no con los de los patrones de celo-oligosacáridos inyectados. Los cromatogramas obtenidos en dicha columna para los distintos tratamientos se muestran en la Figura 5. En esta figura se observa que, dependiendo de la severidad del proceso, los oligosacáridos obtenidos presentan una distribución de pesos moleculares diferentes. Para factores de severidad bajos, el cromatograma muestra la presencia de oligosacáridos de mayor peso molecular, que se van rompiendo a moléculas de menor peso a medida que aumenta la severidad del tratamiento. Esto se observa en que los picos obtenidos a tiempos de retención bajos (correspondientes a oligosacáridos de mayor peso molecular) van disminuyendo o desapareciendo conforme aumenta la severidad del proceso, mientras que, al mismo tiempo, los picos a tiempos de retención mayores (correspondientes a oligosacáridos de menor peso molecular) comienzan a aparecer o aumentan.

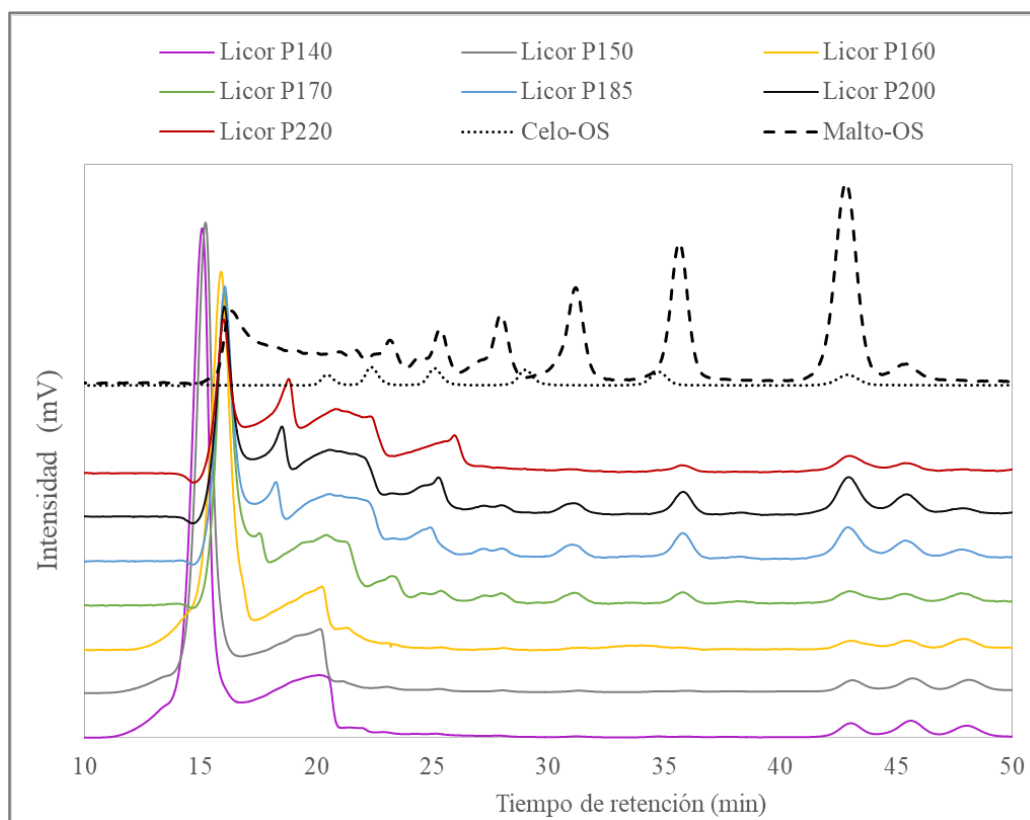


Figura 5. Distribución de pesos moleculares de los malto oligosacáridos obtenidos en los licores procedentes de la autohidrólisis no isotérmica de la pulpa

La caracterización de la pulpa mostró que esta tenía un alto contenido en cenizas y bajo contenido en hemicelulosa, aspectos que podría haberse esperado que tuvieran un efecto negativo durante el pretratamiento. Por un lado, el bajo contenido en hemicelulosa y, por tanto, bajo contenido en grupos acetilo podría llevar a un efecto más suave que trabajando con biomásas que presentan una mayor cantidad de grupos acetilos [2]. Por otro lado, la alta cantidad de cenizas, de naturaleza básica, podría haberse esperado que tuviera un efecto neutralizador sobre estos grupos acetilos generados, disminuyendo también la efectividad del pretratamiento. Sin embargo, las medidas de pH realizadas a los licores mostraron que no se produjo este efecto, pues los valores de pH variaron entre 4.6, para las condiciones más suaves y 3.2, para las condiciones más severas, valores típicos en autohidrólisis.

Resulta extraño el hecho de que la ruptura de los oligosacáridos no se viera acompañada por el correspondiente aumento de glucosa o productos de degradación (Figura 4). La baja formación de estos compuestos puede estar relacionada con una subcuantificación de los mismos debida a diferentes factores. Por una parte, la precipitación y/o condensación de estos productos con la lignina presente en la fase sólida ha sido previamente descrita [26]. El balance de masas realizado a la lignina muestra un aumento de la misma, siendo este más significativo para condiciones más severas, por lo que puede esperarse que haya ocurrido una recombinación de la glucosa con la lignina ácido-soluble. Además, dado el carácter volátil de algunos compuestos, estos pueden haberse perdido en la fase gaseosa [5], siendo esta pérdida mayor cuando la temperatura aumenta, tal y como reflejan los balances de materias publicados por otros autores [27]. La formación de compuestos volátiles se ve reflejada en los perfiles de presión y temperatura medidos durante los

ensayos, en los que se ve como existe un aumento de la presión del sistema si se compara con el ensayo realizado solo con agua bajo las mismas condiciones. Estos compuestos, entre los que se encuentran el ácido acético y productos de degradación de azúcares como el furfural e hidroximetilfurfural, son más volátiles que el agua y por tanto contribuyen a un aumento en la presión del sistema cuando se compara con el ensayo con agua [14]. Por otro lado, existen otros subproductos que se pueden generar durante la autohidrólisis como consecuencia de la degradación del furfural y el HMF [28]. Estos compuestos son el ácido fórmico y el levulínico y, aunque en este caso no fueron cuantificados, su presencia fue detectada en los cromatogramas obtenidos en HPLC para las condiciones más severas. Una combinación de todos estos factores puede justificar el hecho de que el balance de masas de glucosa no se cierre.

Como se comentó, las condiciones óptimas desde el punto de vista de la producción de oligosacáridos correspondieron a un factor de severidad ($\text{Log } R_0$) de 2.3, con un valor de temperatura máxima de 150 °C y una presión máxima de operación de 200 psi. Si se tiene en cuenta la viabilidad del proceso son condiciones de operación suaves. Bajo estas condiciones se obtuvo un rendimiento en sólidos, Y_S , del 52% y una recuperación de licor, Y_L , del 75%. Si se tiene en cuenta este porcentaje de recuperación del licor, el rendimiento en malto-oligosacáridos fue de 17.8 g/100 g materia prima. Existe una parte de los OS generados que queda en el licor que no logró recuperarse y otra que queda adherida a la fracción sólida. Esta parte de los OS podría recuperarse mediante lavado, aunque habría que evaluar la viabilidad de gestionar esa cantidad de agua. Otros autores han obtenido rendimientos similares con otras biomásas. Por ejemplo, Alves-Ferreira y colaboradores obtuvieron 15 g oligosacáridos/100 g materia prima ($\log R_0=3.07$) a partir de residuos de *Cistus ladanifer* (jara pringosa) provenientes de la destilación del material para la obtención de aceite esencial [17]. Carvalheiro et al. obtuvieron 10.5 g de XOS/100 g de cascarilla de trigo bajo una severidad de 3.96 [29]. Por su parte, Silva-Fernandes y colaboradores, obtuvieron rendimientos de alrededor de 17 g de oligosacáridos/100 g de materia prima usando diferentes materiales lignocelulósicos bajo factores de severidad de entre 3.62 y 3.75 [30]. En cuanto a los residuos de platanera, los estudios en los que se aplican tratamientos hidrotérmicos no se centran en la obtención de oligosacáridos sino en la generación de azúcares, como por ejemplo Guerrero et al., que obtuvieron 22 g de glucosa / 100 g mediante explosión por vapor (factor de severidad combinado de 2.3 [2]).

Aunque los oligosacáridos procedentes de los materiales lignocelulósicos que más han sido estudiados debido a sus propiedades funcionales y beneficios para la salud han sido los XOS y AOS [5], los malto-oligosacáridos también muestran interés por su posible actividad prebiótica [6–8].

Finalmente, es interesante el hecho de que para las condiciones óptimas (factor de severidad de 2.3) no se hayan detectado productos de degradación (furfural e HMF), cuya presencia podría tener un efecto negativo, actuando como inhibidor, en etapas posteriores con el sólido, como hidrólisis enzimática. En los casos en los que la presencia de estos subproductos es importante suele ser necesaria una etapa de purificación.

En lo que respecta al licor, aunque no presente productos de degradación, además de los oligosacáridos de interés también contiene otros compuestos como monosacáridos, ceras, compuestos procedentes de la fracción extraíble y de la lignina ácido soluble, compuestos inorgánicos solubles y productos derivados de las proteínas [31]. Por ello, y especialmente en este caso, en el que el material presenta un alto contenido en extraíbles, puede ser necesaria una etapa de purificación del licor rico en oligosacáridos obtenido. En la presente tesis no se ha llevado a

cabo esta etapa. Esta podría realizarse mediante diferentes tratamientos como precipitación, extracción, adsorción a materiales con superficie activa, técnicas de separación por cromatografía o separación por membranas, o una combinación de estos [14]. Por otro lado, algunos autores [31] han propuesto dos tratamientos consecutivos con agua de creciente severidad con el objetivo de eliminar los compuestos fácilmente extraíbles en el primer tratamiento y lograr una solubilización selectiva de otras fracciones durante la segunda etapa. Esto podría solventar, en parte, la necesidad de otras etapas de purificación. Este enfoque ha sido abordado en el presente trabajo, tratándose de la primera ocasión en que se ha realizado el proceso de autohidrólisis en dos etapas para los residuos del cultivo de platanera.

2.1.2. Composición de las fracciones sólidas y digestibilidad

En la Figura 6 se incluye la composición química de las fracciones sólidas obtenidas en los tratamientos de autohidrólisis, así como los valores de rendimiento en sólidos (Y_s) y de digestibilidad. En general, la recuperación de sólidos disminuye, como es lógico, al aumentar la severidad del proceso, pues existe una mayor cantidad del material de partida que se solubiliza. Es importante señalar que este valor también se vio afectado por las pérdidas de material durante la etapa de prensado, debido a la gran presencia de finos que se generaron durante la etapa de molienda del material.

Los resultados obtenidos en la composición química muestran que, debido a la solubilización de los extraíbles y gran parte de las cenizas durante los tratamientos, se obtiene un sólido enriquecido en hemicelulosa, glucanos y lignina. La solubilización de parte de los glucanos presentes, correspondientes a la fracción de almidón, se traduce en que el porcentaje del mismo se vea inalterado en el sólido resultante, aunque en ese caso la mayor parte de los glucanos cuantificados corresponderán a la fracción de celulosa, que no se solubiliza durante el tratamiento. El contenido en lignina, por su parte, aumentó con el factor de severidad, lo cual es indicativo de que no se solubiliza bajo las condiciones estudiadas.

Por otro lado, el contenido en hemicelulosa decreció ligeramente con el factor de severidad. Para condiciones suaves, los xilanos presentes en la biomasa no parecen solubilizarse. Su solubilización empieza a partir de $\log R_0=3.01$. En cuanto al contenido en arabinanos del sólido, en general, decreció con la severidad del proceso y para las condiciones más extremas fueron solubilizados al completo, no detectándose en el sólido. Este comportamiento ha sido previamente descrito [29]: los grupos acetilos son los primeros en solubilizarse, seguido de los arabinanos y, a continuación, los xilanos. En relación a los grupos acetilos, solo se detectó un 0.85% en el material de partida. Los altos valores determinados para los sólidos pretratados (a partir de $\log R_0=2.73$) pueden deberse a una sobreestimación, pues su determinación mediante hidrólisis con ácido sulfúrico se cree que da lugar a valores mayores de los reales debido a la formación de ácido acético por la degradación de azúcares [32]. Además, durante pretratamientos en condiciones severas, se puede generar un extra de ácido acético debido a la degradación de carbohidratos y oxidación de lignina y, como resultado, el contenido en grupos acetilo en la biomasa y/o licores obtenidos es sobreestimado [33].

Otros autores han reportado resultados similares tras el uso del pretratamiento mediante autohidrólisis de otras materias primas, es decir, se observa de manera general un aumento en el contenido de celulosa y lignina en el sólido resultante del tratamiento [34, 35].

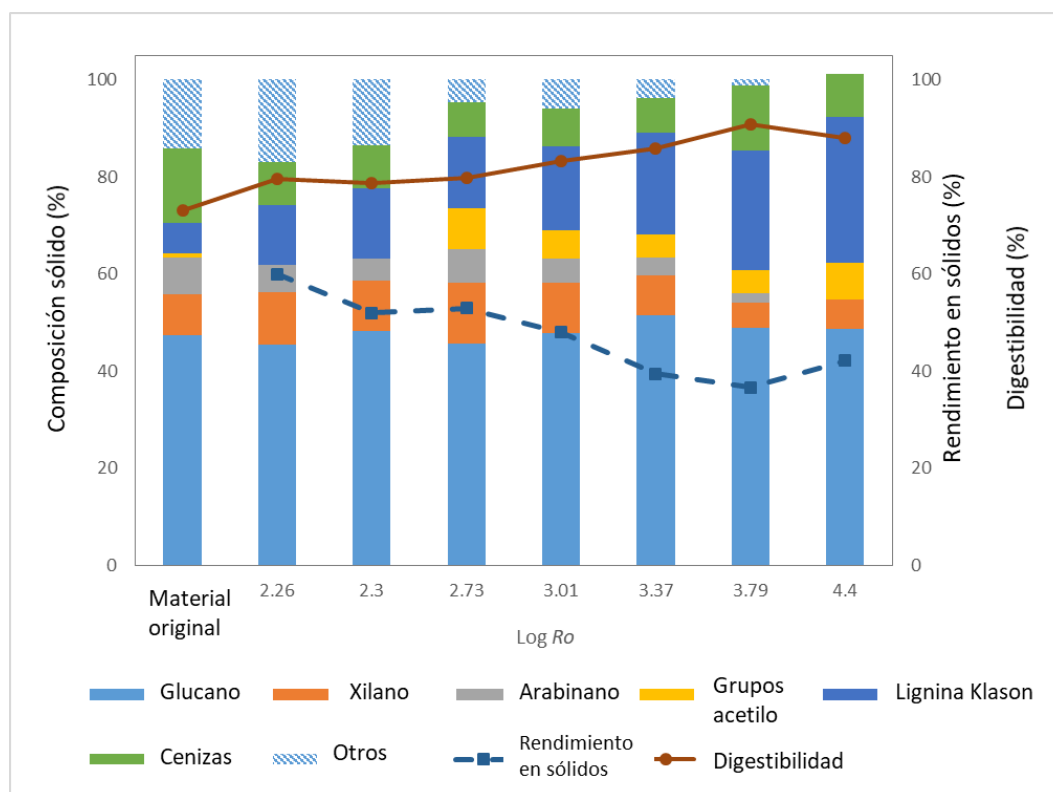


Figura 6. Efecto del factor de severidad sobre el rendimiento en sólidos, la composición y la digestibilidad de las fracciones sólidas obtenidas en la autohidrólisis de la pulpa bajo condiciones no-isotérmicas

Como ya se ha mencionado, el objetivo del pretratamiento es alterar la compleja estructura de la biomasa a fin de hacerla más susceptible a posteriores tratamientos como hidrólisis enzimática. Entre las alteraciones ocasionadas en la estructura morfológica de la biomasa se incluyen un aumento del área superficial disponible, el aumento del tamaño de los poros y la disminución de la cristalinidad de la celulosa [14]. Las imágenes obtenidas en SEM (Figura 7) permiten observar cambios en la estructura del material, siendo estas más evidentes cuanto más agresivo fue el pretratamiento.

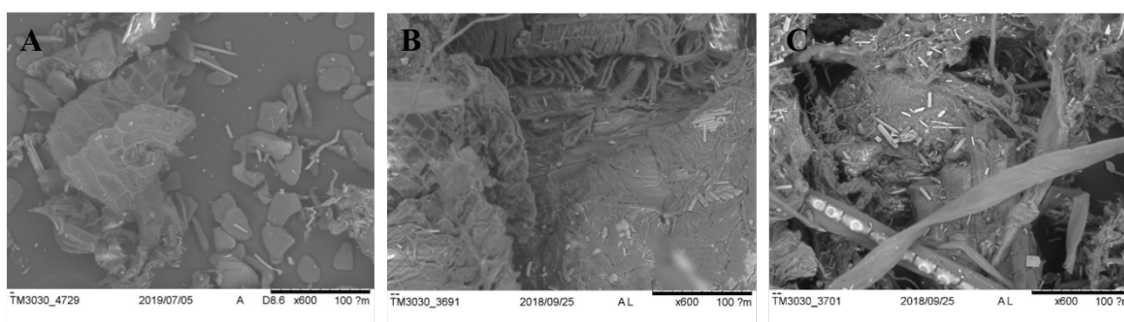


Figura 7. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, de la pulpa original (A) y la obtenida tras autohidrólisis a 160 °C (B, log R_0 = 2.73) y 200 °C (C, log R_0 = 3.79)

Estos cambios físicos ocasionados en el material lo hacen más susceptible a la acción de enzimas y consecuentemente mejoran los rendimientos que pueden lograrse en la hidrólisis enzimática. Esto puede verse reflejado en los valores de digestibilidad obtenidos, que se incluyen

en la Figura 6. Inicialmente la pulpa presentó una alta digestibilidad sin necesidad de haber sido pretratada, si se compara con otros materiales lignocelulósicos. Se obtuvo un 73.25% de digestibilidad empleando un tamaño de partícula menor a 0.5 mm (el mismo tamaño de partícula empleado en el análisis de los sólidos) y un 45.83% con un tamaño de partícula menor a 6 mm. Guerrero et al. obtuvieron un valor similar (42.7%) al segundo para el conjunto del rolo [2] usando una carga de enzima y un tamaño de partícula similar. En este mismo estudio se atribuye el alto valor de digestibilidad del material sin pretratar, comparado con el de otras biomásas como rastrojo de maíz (21.4%) [36] o paja de arroz (32.78%) [37], al alto contenido en almidón del tallo. En el ensayo de digestibilidad la celulasa se suplementa con Novozyme 188, que presenta una alta actividad amilasa [38] que puede atacar los enlaces alfa del almidón. Por lo que gran parte de la glucosa obtenida puede proceder de esta fracción.

Para el caso de la pulpa empleada en este trabajo también es importante destacar que ha sido obtenida mediante un proceso mecánico (desarrollado para la extracción de fibra, patente WO2014/174115), el cual puede haber actuado sobre el material como un pretratamiento físico, alterando su estructura y contribuyendo a mejorar su digestibilidad. Además, la separación de la fibra larga (principalmente formada por celulosa cristalina) puede también tener un efecto positivo en la digestibilidad del material.

Todos los pretratamientos condujeron a mejoras en la digestibilidad de la pulpa. En general, esta aumentó con el factor de severidad, obteniéndose el máximo rendimiento (90.73%) para un factor de severidad de 3.79. Otros autores han obtenido resultados similares al tratar otras biomásas con autohidrólisis. Por ejemplo, Moniz et al. lograron incrementar la digestibilidad de la paja de arroz de 32.8 a 88% [37] y la de la paja de maíz de 31.5 a 90% [34]. En cuanto a los residuos de la platanera solo se ha encontrado un estudio en el que se aplique autohidrólisis al pseudotallo y el valor obtenido en el presente trabajo fue superior al logrado en ese estudio (10 min, 180 °C y RSL 10% (p/v)) que fue de alrededor de un 50% de conversión de los glucanos [9]. Si se compara con los resultados obtenidos con otros pretratamientos los resultados fueron más similares. Santa-Maria et al. obtuvieron un rendimiento enzimático del 77 % al tratar el rolo mediante explosión por vapor (76.4 min a 200 °C) [9]; Shimizu et al. lograron rendimientos de sacarificación del 85% al tratar este mismo material con una disolución alcalina al 25% [39]; el mayor valor de digestibilidad (97.5%) fue logrado por Guerrero et al., 97.5% empleando explosión por vapor a 187.5 °C catalizada por ácido sulfúrico al 2.2% (v/v) [2].

2.2. Autohidrólisis isotérmica

De manera complementaria, y como una posible alternativa más viable a nivel industrial, se estudió el efecto de llevar a cabo la autohidrólisis en condiciones isotérmicas. Una temperatura de 140 °C se considera el límite para trabajar bajo condiciones económicamente viables, razón por la cual se escogió este valor como temperatura de operación y se evaluaron diferentes tiempos de tratamiento.

Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos bajo condiciones no-isotérmicas, siendo los principales productos obtenidos GlcOS y glucosa (Figura 8). En este caso tampoco la ruptura de los oligosacáridos se vio acompañada por una generación de glucosa o productos de degradación. Los rendimientos en oligosacáridos también fueron muy similares a los obtenidos bajo las condiciones no-isotermas. Bajo condiciones isotermas se obtuvo un máximo de 25.5 g

GlcOS/100g de materia prima para $\log R_0=3.43$, comparado con el valor de 24 g GlcOS/100g obtenido en el reactor no isotérmico ($\log R_0=2.3$).

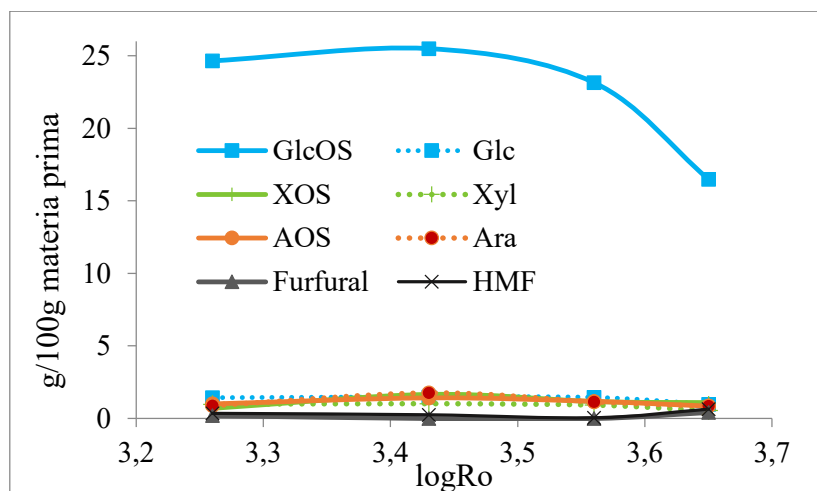


Figura 8. Variación en la composición química de los licores obtenidos en los pretratamientos de autohidrólisis isotérmica realizados a la pulpa bajo diferentes condiciones de severidad

2.3. Autohidrólisis en dos etapas

Dado el alto contenido en extraíbles y en almidón de la pulpa, la autohidrólisis en dos etapas se planteó como una opción interesante para extraer, en una primera fase, estos compuestos, seguido de una segunda fase que permitiera recuperar otros compuestos de interés y, al mismo tiempo, mejorara la digestibilidad del sólido obtenido.

En base al estudio realizado de hidrólisis simple, se decidió elegir como primera etapa el tratamiento óptimo desde el punto de vista de obtención de oligosacáridos: factor de severidad de 2.3 y temperatura final de 150 °C (condiciones suaves y, por tanto, económicas a nivel industrial). El material pretratado bajo estas condiciones fue entonces sometido a una segunda autohidrólisis a una temperatura final de 180 °C. La composición del licor y sólidos obtenidos en esta segunda etapa se muestra en la Tabla 1.

Fracción	Componente	P150-180
Licor (g/L)	Y _L	67.1%
	Gluco-oligosacáridos	14.48 ± 0.44
	Xilo-oligosacáridos	3.89 ± 0.13
	Arabino-oligosacáridos	1.06 ± 0.09
	Grupos acetilo unidos a oligosacáridos	0.52 ± 0.09
	Glucosa	0.974 ± 0.20
	Xilosa+Manosa+Galactosa	1.06 ± 0.01
	Arabinosa	1.62 ± 0.26
	Ácido acético	1.01 ± 0.21
	Furfural	0.80 ± 0.51
	Hidroximetilfurfural	0.21 ± 0.01
Sólido (% p/p en base seca)	Y _S	68.4%
	Glucano	55.97 ± 0.67
	Hemicelulosa	8.80 ± 0.80
	Xilano	7.62 ± 0.69
	Arabinano	1.18 ± 0.11
	Grupos acetilo	-
	Lignina Klason	18.00 ± 0.06
	Cenizas	9.02 ± 0.08

Tabla 1. Composición del licor y el sólido obtenidos tras la autohidrólisis de la pulpa en dos etapas, factor de severidad 3.36 calculado como $\log (R_{0,1} + R_{0,2})$. R rendimiento en sólidos (Y_S) y recuperación de líquido (Y_L)

El licor obtenido en este segundo tratamiento estaba formado por oligosacáridos, principalmente GlcOS, como sucedió en la primera etapa, y pequeñas cantidades de azúcares y productos de degradación. Aunque no se incluyó en la caracterización de las fracciones sólidas, se determinó el contenido en almidón de algunas de estas fracciones. Si se compara el contenido del sólido obtenido en las condiciones óptimas (temperatura final de 150 °C) y el obtenido bajo las condiciones más severas (220 °C), el primero presentó un 12.46 ± 1.17 % mientras que el segundo no presentó almidón. Esto significa que durante la autohidrólisis no-isotérmica, a partir de los 150 °C (máximo de oligosacáridos generados), aunque se consigue extraer más almidón, la degradación del ya extraído comienza y por eso la cantidad de oligosacáridos medida en los licores no solo no aumenta, sino que disminuye. Por ello, se ha planteado una estrategia en dos etapas para aumentar el rendimiento en OS: en la primera, el proceso se lleva a cabo bajo condiciones más suaves, maximizando así la cantidad de OS obtenida y evitando su degradación, y en la segunda, se puede emplear una temperatura superior, para recuperar más OS, sin riesgo de degradar los ya separados tras la primera etapa. En este caso, se produjo una solubilización parcial de la hemicelulosa, aunque no tanto como se esperaba, quedando una parte todavía en la fracción sólida (Tabla 1). Con respecto al sólido obtenido tras el primer pretratamiento, el contenido en glucanos y lignina aumentó y el de hemicelulosa disminuyó.

Teniendo en cuenta la cantidad de agua introducida, la cantidad de oligosacáridos generada fue de 14.78 g/100 g de sólido pretratado y si se tiene en cuenta el sólido inicial (no pretratado) 7.68 g/100 g pulpa original. De esta forma, el rendimiento global del proceso en dos etapas fue de 31.75 g/100 g biomasa inicial, en comparación con los 24 g/100 g obtenidos en la autohidrólisis simple. Además, el valor de digestibilidad enzimática también aumentó de $78.6 \pm 0.9 \%$ (pretratado a 150°C) a $96.57 \pm 1.71\%$. Este valor fue superior a todos los obtenidos en la hidrólisis simple, en las que el máximo valor obtenido fue del 90%.

2.4. Tratamiento con NaOH

Además del tratamiento hidrotérmico de autohidrólisis se usó como referencia un tratamiento químico. Estos pretratamientos emplean diferentes sustancias químicas, como ácidos o bases. En este caso, se escogió el tratamiento con sosa, por haberse probado en otros estudios su eficiencia trabajando con residuos de platanera [19–24]. El pretratamiento alcalino bajo condiciones suaves es capaz de eliminar la lignina y, por consiguiente, aumentar la susceptibilidad de la celulosa al ataque enzimático. Thakur et., por ejemplo, sometieron el pseudotallo de la platanera a un tratamiento con NaOH 1N durante 24 horas a temperatura ambiente y consiguieron eliminar sustancialmente la lignina (un 49% de la lignina, acompañado de pequeñas pérdidas de celulosa y hemicelulosa) a la vez que aumentar la digestibilidad enzimática [20]. También Low et al. lograron eliminar casi el 60% de la lignina del pseudotallo empleando sosa al 4% a temperatura ambiente durante 24 horas y lograron aumentar el rendimiento enzimático 1.75 veces [22]. Shimizu et al., aparte de eliminar la lignina observaron una solubilización de parte de la hemicelulosa del pseudotallo al someterlo a tratamiento alcalino [39].

Componente	% en base seca		
Pretratamiento	PNaOH 4h	PNaOH 8h	PNaOH 24h
Glucano	41.70±0.32	42.30±0.55	43.14±1.52
Hemicelulosa	17.51±1.86	23.22±1.51	21.74±2.86
Xilano	10.83±0.92	11.67±0.24	11.15±0.91
Arabinano	6.69±0.95	7.49±0.00	7.60±0.40
Grupos Acetilo	-	4.07±1.27	3.00±1.55
Lignina Klason	12.67±0.06	12.11±0.23	12.50±0.14
Cenizas	13.04±0.01	16.51±0.27	13.78±0.25
Digestibilidad	99.41±3.40	93.22±4.62	101.95±2.71

Tabla 2. Composición química y digestibilidad de los sólidos obtenidos tras pretratamiento básico con NaOH bajo diferentes tiempos de tratamiento

Los cambios obtenidos en la composición química de la pulpa tras los pretratamientos con sosa llevados a cabo en este estudio pueden verse en la Tabla 2. En las primeras 4 horas existe una solubilización inicial de compuestos que contienen glucosa, seguido, hasta las 8 horas, por una extracción proporcional de glucanos y lignina, obteniéndose un sólido ligeramente enriquecido en hemicelulosa. Entre las 8 y las 24 horas no se observaron cambios. A pesar de que los cambios ocasionados en la composición del material no sean tan claros como los obtenidos por otros autores, los tres tratamientos probados cumplieron con el objetivo buscado, alterando la estructura del material y dando lugar a un aumento de su digestibilidad. Para los tres tratamientos

se obtuvo una digestibilidad de prácticamente el 100%, empleando unas condiciones suaves como son una concentración de sosa 1 N y temperatura ambiente.

2.5. Comparación entre pretratamientos

En este capítulo se han evaluado dos tipos de pretratamientos: uno físico-químico, como es el tratamiento de autohidrólisis, y otro químico, como es el tratamiento alcalino con sosa. Ambos pretratamientos permitieron alterar satisfactoriamente la estructura del material, dando lugar a mejoras en la digestibilidad. En el caso del tratamiento con sosa se logró alcanzar un valor de digestibilidad del 100%. Para el caso de autohidrólisis se consiguió mejorar la digestibilidad hasta un 90% y hasta un 97%, realizando una doble autohidrólisis.

Para el estudio de hidrólisis enzimática se decidió elegir el material pretratado mediante autohidrólisis dadas las ventajas medioambientales de este tipo de pretratamiento, en el que no se requiere de la adición de agentes químicos, que deberían ser eliminados en su totalidad para no inhibir el posterior procesamiento enzimático o su posible utilización en la formulación de piensos (en caso de quedar residuos). Además, para el caso de la pulpa, el pretratamiento mediante autohidrólisis ha demostrado su efectividad bajo unas condiciones de operación suaves, lo que implica un consumo energético relativamente bajo. Esto está en línea con los principios sostenibles de las biorrefinerías: la utilización de tecnologías de procesamiento ecológicas, la utilización eficiente de la materia prima, la prevención de la generación de desechos y la limitación del consumo de energía y el impacto ambiental [14]. Además, en este pretratamiento no solo se obtiene un sólido en condiciones mejoradas para la hidrólisis enzimática sino que, además, se obtiene un licor rico en oligosacáridos con potencial prebiótico.

3. Índice de tablas y figuras

3.1. Índice de tablas

Tabla 1. Composición del licor y el sólido obtenidos tras la autohidrólisis de la pulpa en dos etapas, factor de severidad 3.36 calculado como $\log(R_{0,1} + R_{0,2})$. R rendimiento en sólidos (Y_s) y recuperación de líquido (Y_L)..... 162

Tabla 2. Composición química y digestibilidad de los sólidos obtenidos tras pretratamiento básico con NaOH bajo diferentes tiempos de tratamiento 163

3.2. Índice de figuras

Figura 1. Esquema de los pretratamientos probados en la pulpa (RSL: relación sólido-líquido, g biomasa en base seca / g agua)..... 145

Figura 2. Reactor Parr Instruments Company, USA, empleado en los tratamientos de autohidrólisis no isotérmica 148

Figura 3. Minirreactores empleados en los tratamientos de autohidrólisis isotérmica.....	150
Figura 4. Variación en la composición química de los licores obtenidos en los pretratamientos de autohidrólisis no-isotérmica realizados a la pulpa bajo diferentes condiciones de severidad	155
Figura 5. Distribución de pesos moleculares de los malto oligosacáridos obtenidos en los licores procedentes de la autohidrólisis no isotérmica de la pulpa	156
Figura 6. Efecto del factor de severidad sobre el rendimiento en sólidos, la composición y la digestibilidad de las fracciones sólidas obtenidas en la autohidrólisis de la pulpa bajo condiciones no-isotérmicas	159
Figura 7. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, de la pulpa original (A) y la obtenida tras autohidrólisis a 160 °C (B, log R _o = 2.73) y 200 °C (C, log R _o = 3.79)	159
Figura 8. Variación en la composición química de los licores obtenidos en los pretratamientos de autohidrólisis isotérmica realizados a la pulpa bajo diferentes condiciones de severidad ...	161

4. Bibliografía

1. Yoo CG, Wang C, Yu C, Kim TH (2013) Enhancement of Enzymatic Hydrolysis and Klason Lignin Removal of Corn Stover Using Photocatalyst-Assisted Ammonia Pretreatment. *Appl Biochem Biotechnol* 169:1648–1658. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0002-4>
2. Guerrero AB, Ballesteros I, Ballesteros M (2017) Optimal conditions of acid-catalysed steam explosion pretreatment of banana lignocellulosic biomass for fermentable sugar production. *J Chem Technol Biotechnol* 92:2351–2359. <https://doi.org/10.1002/jctb.5239>
3. Gabhane J, Prince William SPM, Gadhe A, et al (2014) Pretreatment of banana agricultural waste for bio-ethanol production: Individual and interactive effects of acid and alkali pretreatments with autoclaving, microwave heating and ultrasonication. *Waste Manag* 34:498–503. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.013>
4. Galia A, Schiavo B, Antonetti C, et al (2015) Autohydrolysis pretreatment of *Arundo donax*: A comparison between microwave-assisted batch and fast heating rate flow-through reaction systems. *Biotechnol Biofuels* 8:. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0398-5>
5. Moniz P, Pereira H, Duarte LC, Carvalheiro F (2014) Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw. *Ind Crops Prod* 62:460–465
6. Tamime AY, Thomas L V. (2017) *Probiotic Dairy Products: Second Edition*
7. O. Ibrahim O (2018) Functional Oligosaccharide: Chemicals Structure, Manufacturing, Health Benefits, Applications and Regulations. *J Food Chem Nanotechnol* 04:65–76. <https://doi.org/10.17756/jfcn.2018-060>

8. Panesar PS, Kumari S, Panesar R (2013) Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33:345–364
9. Santa-Maria M, Ruiz-Colorado AA, Cruz G, Jeoh T (2013) Assessing the Feasibility of Biofuel Production from Lignocellulosic Banana Waste in Rural Agricultural Communities in Peru and Colombia. *Bioenergy Res* 6:1000–1011. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9333-4>
10. Kamdem I, Jacquet N, Tiappi FM, et al (2015) Comparative biochemical analysis after steam pretreatment of lignocellulosic agricultural waste biomass from Williams Cavendish banana plant (Triploid Musa AAA group). *Waste Manag Res* 33:1022–1032. <https://doi.org/10.1177/0734242X15597998>
11. El-Zawawy WK, Ibrahim MM, Abdel-Fattah YR, et al (2011) Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. *Carbohydr Polym* 84:865–871. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.022>
12. Guerrero AB, Ballesteros I, Ballesteros M (2017) Optimal conditions of acid-catalysed steam explosion pretreatment of banana lignocellulosic biomass for fermentable sugar production. *J Chem Technol Biotechnol* 92:2351–2359. <https://doi.org/10.1002/jctb.5239>
13. María T, Meneses S, Olié M, et al (2018) Autohidrólisis y deslignificación organosolv de madera de *Pinus radiata* para la recuperación de hemicelulosas y lignina con aprovechamiento de la fracción celulósica por vía enzimática Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Ingeniería Química
14. Carvalheiro F, Duarte LC, Gírio F, Moniz P (2016) Hydrothermal/Liquid Hot Water Pretreatment (Autohydrolysis): A Multipurpose Process for Biomass Upgrading. In: *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. Elsevier, pp 315–347
15. Branco PC, Dionísio AM, Torrado I, et al (2015) Autohydrolysis of *Annona cherimola* Mill. seeds: Optimization, modeling and products characterization. *Biochem Eng J* 104:2–9. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.06.006>
16. Charalampopoulos D, Rastall R (2009) *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer
17. Alves-Ferreira J, Duarte LC, Lourenço A, et al (2019) Distillery Residues from *Cistus ladanifer* (Rockrose) as Feedstock for the Production of Added-Value Phenolic Compounds and Hemicellulosic Oligosaccharides. *Bioenergy Res* 12:347–358. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-09975-8>
18. Lee JM, Jameel H, Venditti RA (2010) One and two stage autohydrolysis pretreatments for enzyme hydrolysis of coastal Bermuda grass to produce fermentable sugars. *BioResources* 5:1496–1508
19. Souza EL, Liebl GF, Marangoni C, et al (2014) Bioethanol from fresh and dried banana plant pseudostem. *Chem Eng Trans* 38:271–276. <https://doi.org/10.3303/CET1438046>
20. Thakur S, Shrivastava B, Ingale S, et al (2013) Degradation and selective ligninolysis of wheat straw and banana stem for an efficient bioethanol production using fungal and chemical pretreatment. *3 Biotech* 3:365–372. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0102-4>
21. Ingale S, Joshi SJ, Gupte A (2014) Production of bioethanol using agricultural waste: banana pseudo stem. *Braz J Microbiol* 45:885–92
22. Low JC, Halis R, Shah UKM, et al (2015) Enhancing Enzymatic Digestibility of Alkaline

- Pretreated Banana Pseudostem for Sugar Production. *BioResources* 10:1213–1223. <https://doi.org/10.15376/biores.10.1.1213-1223>
23. Gonçalves Filho LC, Fischer GAA, Sellin N, et al (2013) Hydrolysis of banana tree pseudostem and second-generation ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Environ Sci Eng* 2:65
 24. Chittibabu S, Saseetharan MK, Kalaivani MR, Rajesh MP (2014) Optimization of Microwave-assisted Alkali Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Banana Pseudostem. *Energy Sources, Part A Recover Util Environ Eff* 36:2691–2698
 25. Selig M, Weiss N, Ji Y (2008) Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass NREL/TP-510-42629
 26. Xiang Q, Lee YY, Torget RW (2004) Kinetics of glucose decomposition during dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Appl Biochem Biotechnol* 113–116:1127–38. <https://doi.org/10.1385/abab:115:1-3:1127>
 27. Pu Y, Treasure T, Gonzalez R, et al (2013) Autohydrolysis Pretreatment of Mixed Softwood to Produce Value Prior to Combustion. *Bioenergy Res* 6:1094–1103. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9343-2>
 28. Ho AL, Carvalheiro F, Duarte LC, et al (2014) Production and purification of xylooligosaccharides from oil palm empty fruit bunch fibre by a non-isothermal process. *Bioresour Technol* 152:526–529. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.114>
 29. Carvalheiro F, Silva-Fernandes T, Duarte LC, Gírio FM (2009) Wheat straw autohydrolysis: Process optimization and products characterization. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Humana Press Inc, pp 84–93
 30. Silva-Fernandes T, Duarte LC, Carvalheiro F, et al (2015) Hydrothermal pretreatment of several lignocellulosic mixtures containing wheat straw and two hardwood residues available in Southern Europe. *Bioresour Technol* 183:213–220. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.059>
 31. Moure A, Gullón P, Domínguez H, Parajó JC (2006) Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochem*. 41:1913–1923
 32. Leschinsky M, Sixta H, Patt R (2009) Detailed mass balances of the autohydrolysis of *Eucalyptus globulus* at 170 C. *BioResources*, 4(2), 687-703.
 33. Hu HC, Zhang S, Zeng T, et al (2018) Determination of the Acetyl Group in Biomass and Its Products by Headspace Gas Chromatography. *Energy and Fuels* 32:450–454. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b02863>
 34. Moniz P, Pereira H, Quilhó T, Carvalheiro F (2013) Characterisation and hydrothermal processing of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses. *Ind Crops Prod* 50:145–153. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2013.06.037>
 35. Romaní A, Garrote G, López F, Parajó JC (2011) *Eucalyptus globulus* wood fractionation by autohydrolysis and organosolv delignification. *Bioresour Technol* 102:5896–5904. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.070>
 36. Y. Zhou, Y. Li, C. Wan, et al (2010) Effect of Hot Water Pretreatment Severity on the Degradation and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. *Trans ASABE* 53:1929–1934. <https://doi.org/10.13031/2013.35792>

37. Moniz P, João L, Duarte LC, et al (2015) Fractionation of Hemicelluloses and Lignin from Rice Straw by Combining Autohydrolysis and Optimised Mild Organosolv Delignification. *BioResources* 10:2626–2641. <https://doi.org/10.15376/biores.10.2.2626-2641>
38. Ximenes E, Kim Y, Mosier N, et al (2010) Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme Microb Technol* 46:170–176. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.11.001>
39. Shimizu FL, Monteiro PQ, Ghiraldi PHC, et al (2018) Acid, alkali and peroxide pretreatments increase the cellulose accessibility and glucose yield of banana pseudostem. *Ind Crops Prod* 115:62–68. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.02.024>

Capítulo 6. Obtención de oligosacáridos a partir de la pulpa: hidrólisis enzimática

Contenido

1.	Procedimientos empleados en la hidrólisis enzimática de la pulpa.....	174
1.1.	Hidrólisis enzimática del material original	176
1.1.1.	Hidrólisis con celulasa de la pulpa sin pretratar	176
1.1.2.	Efecto de suplementación con pectinasa sobre la hidrólisis de la pulpa sin pretratar.....	177
1.2.	Hidrólisis enzimática del material pretratado.....	177
1.2.1.	Hidrólisis enzimática del sólido pretratado a una temperatura final de 170 °C.	177
1.2.2.	Hidrólisis enzimática del sólido pretratado a una temperatura final de 150 °C.	177
1.3.	Hidrólisis enzimática multi-etapa.....	178
1.4.	Caracterización de los hidrolizados.....	179
1.5.	Determinación de las actividades enzimáticas	180
1.5.1.	Actividad sobre papel de filtro (FPU)	180
1.5.2.	Actividad sobre carboximetilcelulosa	181
1.5.3.	Actividad β -glucosidasa	182
1.6.	Capacidad de bacterias probióticas de consumir el hidrolizado.....	183
2.	Resultados	184
2.1.	Hidrólisis enzimática del material original	184
2.1.1.	Hidrólisis con celulasa	184
2.1.2.	Efecto de suplementación con pectinasa	186
2.2.	Hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada	187
2.2.1.	Hidrólisis enzimática, con celulasa, del sólido pretratado a una temperatura final de 170 °C.	187
2.2.2.	Hidrólisis enzimática, con celulasa, del sólido pretratado a una temperatura final de 150 °C.....	188
2.2.3.	Hidrólisis enzimática, con endo-glucanasa, del sólido pretratado a una temperatura final de 150 °C	191
2.3.	Hidrólisis enzimática multi-etapa de la pulpa pretratada a una temperatura final de 150 °C.....	192
2.4.	Capacidad de bacterias probióticas de consumir el hidrolizado.....	195
3.	Índice de tablas y figuras.....	197
3.1.	Índice de tablas.....	197
3.2.	Índice de figuras	197
4.	Bibliografía	198

En este capítulo se estudia la hidrólisis enzimática de la fracción de celulosa presente en la pulpa obtenida a partir del pseudotallo de la platanera, con el objetivo de obtener celooligosacáridos que puedan tener propiedades prebióticas.

En primer lugar, y dado el bajo contenido en lignina y el valor alto de digestibilidad obtenido para la pulpa sin tratar, se decidió probar la hidrólisis enzimática directa de este material. Se usó para ello un complejo enzimático celulasa (de *Trichoderma reesei*) disponible comercialmente. Se fijó el pH, la relación sólido-líquido, la temperatura y la velocidad de agitación y se evaluó la influencia de la carga de enzima (10, 30 y 45 FPU/g de materia prima seca) y el tiempo de tratamiento. Además, se estudió la influencia de suplementar el medio con pectinasa.

Por otro lado, se probó este mismo complejo enzimático de celulasa con la pulpa pretratada mediante autohidrólisis, dadas las ventajas de este pretratamiento frente al alcalino (permite obtener valores de digestibilidad comparables a la vez que obtener oligosacáridos de otras fracciones de la biomasa, además del beneficio medioambiental). Se empleó el sólido pretratado mediante este tratamiento a dos temperaturas finales (150 y 170 °C). En este caso también se fijó el pH, la relación sólido-líquido, la temperatura y la velocidad de agitación y se estudió la evolución del proceso a lo largo del tiempo empleando diferentes cargas de enzima (10 y 30 FPU/g de materia prima seca para el sólido pretratado a 170 °C y 10 y 1 FPU/g de materia prima seca para el sólido pretratado a 150 °C). En el caso del sólido pretratado a una temperatura final de 150 °C se probó también una endo-1,4- β -D-glucanasa de *Aspergillus niger*, disponible comercialmente.

Para todas las condiciones probadas se analizó el rendimiento en obtención de oligosacáridos, rendimiento total del proceso (producción de oligosacáridos y de glucosa) y selectividad en la obtención de oligosacáridos. Una vez elegidas las condiciones más favorables (sólido pretratado a 150 °C y carga de celulasa de 1 FPU/g de materia prima seca) se evaluó un proceso de hidrólisis en varias etapas, con intercambios del medio de reacción a intervalos regulares de tiempo. De esta forma, se pretendía mejorar la selectividad y rendimiento en oligosacáridos del proceso.

Finalmente, se evaluó la capacidad de dos cepas bacterianas probióticas (*Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus plantarum*) de consumir el hidrolizado.

Como en el resto de capítulos se incluyen en primer lugar los procedimientos seguidos y a continuación un análisis de los resultados obtenidos.

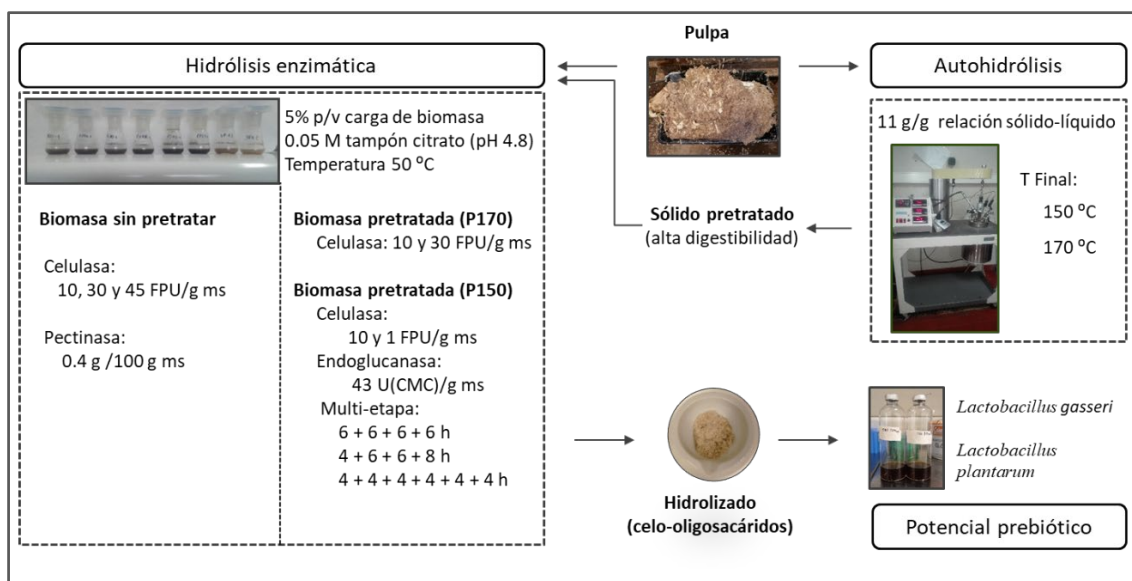


Figura 1. Ensayos de hidrólisis enzimática probados en la pulpa

1. Procedimientos empleados en la hidrólisis enzimática de la pulpa

Existen diversos factores implicados en la hidrólisis enzimática que pueden dividirse en aquellos relacionados con los sustratos y con las enzimas. En relación a los factores dependientes del sustrato, podemos encontrar efectos relacionados con sus propiedades físicas y químicas. Entre las primeras destacan la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa, junto con la accesibilidad a la misma. Dentro de las propiedades químicas del sustrato que intervienen en la hidrólisis se encuentran la composición del sólido en celulosa, hemicelulosa y lignina y la presencia de productos de degradación que actúan como inhibidores [1]. El pretratamiento intenta influir en uno o varios de estos factores para mejorar los rendimientos conseguidos en la hidrólisis enzimática.

Por otro lado, teniendo en cuenta la complejidad en la composición de los materiales lignocelulósicos, las enzimas empleadas en su hidrólisis deben proporcionar una óptima combinación de actividades. Como ya se comentó en el Capítulo 2, el sistema de celulasas típico incluye 3 tipos de enzimas: las endoglucanasas, que cortan al azar en el interior de la celulosa amorfa, generando oligosacáridos de varias longitudes y, en consecuencia, nuevos extremos de cadena, las exoglucanasas, que actúan de una manera progresiva en los extremos reductores y no reductores de las cadenas del polisacárido, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas), y las β -glucosidasas, que hidrolizan las celodextrinas solubles y la celobiosa a glucosa [2]. Puesto que tradicionalmente la hidrólisis enzimática ha sido vista como una forma de obtener monosacáridos a partir de la fracción de carbohidratos presentes en la biomasa [3], los complejos enzimáticos y la combinación de actividades presentes han sido optimizadas con tal fin. En este caso, en el que el objetivo no es la hidrólisis completa a glucosa, sino la obtención de oligosacáridos, la presencia de ciertas actividades es desfavorable. En el caso del complejo producido por *Trichoderma reesei* (uno de los hongos filamentosos celulolíticos más conocido y estudiado), es rico en actividades celobiohidrolasas y endoglucanasas y presenta bajos niveles de β -glucosidasas [4, 5], por lo que presenta unas buenas características para ser empleado en la obtención de celo-oligosacáridos.

La actividad de las celulasas se ve afectada además por la temperatura y el pH. La temperatura es el factor más importante y su valor óptimo se encuentra en el intervalo 40-60 °C, usando frecuentemente 50 °C. El valor óptimo de pH se encuentra, normalmente, entre 4,5 y 5,5 [1]. La carga de la enzima es otro factor que afecta al proceso y depende del tipo de sustrato, de su composición y del pretratamiento al que haya sido sometido. De manera general, el incremento en la carga se traduce en la mejora del rendimiento de la hidrólisis. Sin embargo, si la carga enzimática es muy elevada, se producirá una competición entre las enzimas por los sitios de unión de la celulosa y se reducirá la velocidad de hidrólisis [6], además de suponer un mayor coste.

Con respecto a la carga de sustrato, muchos de los estudios enfocados a la evaluación de los pretratamientos para mejorar la hidrólisis enzimática se llevan a cabo bajo condiciones de carga de sustrato que se encuentran comprendidas entre 1-5 % (peso/volumen) [1], sin embargo, es interesante, desde un punto de vista económico, el uso de altas cargas de sólido y para ello se están desarrollando tecnologías que permitan una buena agitación.

Un factor clave es la interacción (adsorción y desorción) entre la enzima y el sustrato, que está influida por las propiedades del sustrato comentadas anteriormente, como la cristalinidad, el área superficial disponible, el tamaño de partícula o el contenido en lignina y celulosa; también la agitación del sistema tiene importancia. Una agitación insuficiente puede no favorecer esta interacción, pero una agitación excesiva puede evitar la adsorción.

Otras variables que afectan a los rendimientos de la hidrólisis enzimática incluyen el secado del sustrato (se relaciona con la reducción del rendimiento, debido al colapso de la estructura interna) o la adición de surfactantes o aditivos (Tween 20, Tween 80 y Triton u otros aditivos como proteínas no catalíticas, como la seroalbúmina bovina (BSA), y polímeros como el polietilenglicol (PEG)) que suponen una mejora en la conversión de la celulosa, pues previenen los enlaces no productivos de la enzima con la lignina [1].

En este estudio, tanto para el material sin pretratar como el pretratado, se fijó el pH, la relación sólido-líquido, la temperatura y la velocidad de agitación y se evaluó la influencia de la carga de enzima y el tiempo de tratamiento. Todos los ensayos se realizaron con una carga de biomasa del 5% (p/v) (relación que permitía una buena agitación del medio) y un volumen total de ensayo de 10 mL en un recipiente de reacción de 50 mL de capacidad. El medio fue preparado con tampón citrato 0.05 M (pH 4.8), la cantidad de enzima correspondiente (las actividades enzimáticas fueron determinadas de acuerdo con [7] y se incluyen en el apartado 1.5) y azida de sodio (2%, p/v) como agente anti-microbiano. Los ensayos se llevaron a cabo en una incubadora con agitación orbital (TEQ, Portugal) a 50 °C, con una agitación constante de 150 rpm. Se extrajeron muestras a diferentes tiempos durante las 24 horas de ensayo, empleándose recipientes independientes para cada tiempo de reacción a fin de mantener constante la carga de sólido. El tiempo inicial (t=0 h) se usó como blanco (blanco de enzima y blanco de sustrato) para corregir los resultados de azúcares libres que pudieran estar inicialmente presentes en la biomasa y en la enzima. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

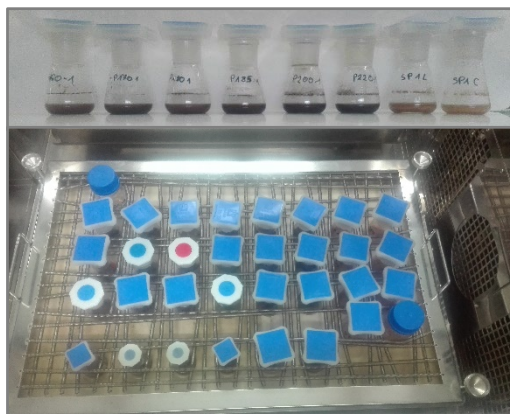


Figura 2. Ensayos de hidrólisis enzimática

Las muestras fueron extraídas a diferentes tiempos, tras lo cual se introdujeron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y enfriadas rápidamente en hielo para inactivar la enzima, pero sin producir la degradación de los sacáridos presentes. A continuación, se centrifugó a 13000 g y los hidrolizados se filtraron a través de un filtro de tamaño de poro de 0.20 μm para su análisis en HPLC. Una parte fue sometida a post-hidrólisis como se indica en la sección 1.4. Se determinó el contenido en monosacáridos y oligosacáridos y se calcularon los rendimientos enzimáticos según las ecuaciones incluidas en este mismo apartado.

El procedimiento, volúmenes de reacción y materiales descritos fueron los empleados para todos los ensayos de hidrólisis enzimática llevados a cabo excepto para la estrategia multi-etapa.

1.1. Hidrólisis enzimática del material original

El bajo contenido en lignina y el elevado valor de digestibilidad obtenidos para la pulpa sin tratar llevaron a plantearse, como una alternativa más sostenible, la posibilidad de llevar a cabo la hidrólisis enzimática directa de este material. Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente con el material molido a un tamaño de partícula inferior a 0.5 mm. Se probó la eficiencia de una celulasa, administrada en diferentes dosis, y el impacto de suplementarla con una pectinasa.

1.1.1. Hidrólisis con celulasa de la pulpa sin pretratar

Se probaron diferentes cargas de la enzima celulasa de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 de Sigma Aldrich (54 FPU/mL; actividad β -glucosidasa 19 U/mL; actividad endo-glucanasa 2138 U/mL). Dependiendo del tipo de sustrato, es común emplear cargas de celulasa que varían entre 7 y 33 FPU/g de sustrato [8], siendo 10 FPU/g de celulosa una de las concentraciones más empleadas, puesto que, en general, permite obtener buenos rendimientos en tiempos razonables (48–72 h) con un coste de enzima razonable [9]. En este estudio se decidió probar 10, 30 y 45 FPU/g de materia prima seca (g ms). Se extrajeron muestras a diferentes tiempos tal y como se describió anteriormente y los hidrolizados fueron analizados por HPLC para determinar el contenido en glucosa y celo-oligosacáridos como se describe en la sección 1.4.

1.1.2. Efecto de suplementación con pectinasa sobre la hidrólisis de la pulpa sin pretratar

Por otro lado, se estudió la influencia de suplementar el medio con pectinasa. El uso de otras enzimas en combinación con las celulasas para lograr la hidrólisis de sustratos celulósicos ha sido ampliamente estudiada [8]. Por ejemplo, Ghose y Bisaria [10] y Beldman [11] lograron aumentar la hidrólisis de la celulosa empleando una mezcla de hemicelulasas o pectinasas con celulasas.

En este caso se empleó la pectinasa ENARTIS ZYM COLOR PLUS de Enartis. Esta enzima venía en formato liofilizado y para su preparación se disolvieron 5 g en 50 mL de solución buffer de citrato 0.1 M (pH=5.8) tal y como especificaba el fabricante. La pectinasa se añadió al medio previamente descrito en una dosis del 0.4% (g de pectinasa /g de materia seca). Se estudió el efecto de esta enzima sola y en combinación con la celulasa (30 FPU/g ms). De esta forma se quería evaluar si la pectina podía tener efecto en la hidrólisis, no solo aumentando los azúcares obtenidos sino mejorando la mezcla y el contacto entre la biomasa y la enzima pues, al eliminar la pectina del medio de reacción, podría dar lugar a un medio menos viscoso. Por otro lado, la pectina podría actuar como agente surfactante reduciendo la adsorción física improductiva de la celulasa a la lignina. Se tomaron muestras tal y como se describió anteriormente y los hidrolizados fueron analizados por HPLC para determinar el contenido en glucosa y celo-oligosacáridos como se describe en la sección 1.4.

1.2. Hidrólisis enzimática del material pretratado

Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. En este caso, el material no fue previamente molido sino que se usó tal y como quedaba tras el pretratamiento. Por otro lado, aunque se recomienda no secar el material después del tratamiento de autohidrólisis, pues puede producirse un colapso de los poros, reduciéndose así la superficie disponible y pudiendo, por tanto, afectar al rendimiento enzimático, en este caso se decidió secar el material en estufa a 40 °C, pues así se facilitaba una toma de muestra más representativa del mismo. Se empleó el material pretratado mediante autohidrólisis no isotérmica a una temperatura final de 150 °C (temperatura óptima desde el punto de vista de obtención de oligosacáridos en el licor obtenido en el pretratamiento) y 170 °C (temperatura para la cual prácticamente toda la fracción de almidón había sido solubilizada).

1.2.1. Hidrólisis enzimática del sólido pretratado a una temperatura final de 170 °C

El sólido obtenido tras autohidrólisis a una temperatura final de 170 °C (P170) fue hidrolizado con distintas cargas de celulasa: 10 y 30 FPU/g ms.

1.2.2. Hidrólisis enzimática del sólido pretratado a una temperatura final de 150 °C

En cuanto al material pretratado obtenido tras autohidrólisis a una temperatura final de 150 °C (P150) se emplearon cargas de celulasa de 10 y 1 FPU/g de materia prima seca. En este

último caso se usó una carga de enzima tan baja puesto que, como se comenta en los resultados, una vez vistas las ventajas de trabajar con P150 se buscó reducir la dosis de enzima.

Además, se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de P150 en lugar de con celulasa, con la endo-1,4- β -D-glucanasa E-CELAN (70 U/mg) de *Aspergillus niger*, de Megazyme. Esta enzima ataca de manera aleatoria el interior de las regiones amorfas de la celulosa, rompiendo los enlaces β -1,4-glucosídicos y generando oligosacáridos de diferentes grados de polimerización. Con el uso de esta enzima pura se pretendía evitar la presencia de actividad β -glucosidasa, responsable de la generación de glucosa a partir de celobiosa, que aunque en baja cantidad, está presente en el complejo enzimático usado de celulasa. Además, también se evitaría la presencia de las exoglucanasas (concretamente las glucanohidrolasas) que actúan sobre los extremos no reductores, liberando unidades de glucosa. De esta forma, por tanto, se esperaba reducir considerablemente la generación de glucosa y, por tanto, mejorar la selectividad del proceso en la generación de oligosacáridos.

Esta enzima fue proporcionada en formato liofilizado y para su uso se diluyó en 11 mL de disolución buffer de acetato de sodio (100 mM, pH=4.5) con 0.5 mg/mL de Albúmina de Suero Bovino (BSA), tal y como indicaba el fabricante. La actividad endo- β -glucanasa de la enzima una vez diluida, medida conforme el ensayo de carboximetil celulosa (CMC) que se describe en la sección 1.5 fue de 14 U/mL. La enzima se añadió al sustrato (P150) en una concentración de 43 U (CMC)/g de materia seca.

1.3. Hidrólisis enzimática multi-etapa

La hidrólisis en varias etapas, con intercambios del medio de reacción a intervalos regulares de tiempo ya ha sido previamente estudiada en la literatura [12–14]. Con esta estrategia se pretendía mejorar el rendimiento en oligosacáridos gracias a la acción de varios mecanismos. En primer lugar, se podría evitar la ruptura de los oligosacáridos recuperándolos del medio de reacción antes de que tuviera lugar su hidrólisis completa. En segundo lugar, al eliminar los productos de reacción del medio, se podría evitar la posible inhibición de las endo-glucanasas y exo-glucanasas. Y, por último, dado que la β -glucosidasa se encuentra libre en el medio de reacción puesto que, a diferencia de las exo-glucanasas y endo-glucanasas, presenta una baja afinidad a los sustratos celulósicos, esta podría ser selectivamente eliminada del medio de reacción durante los reemplazamientos. El primer y tercer aspecto descrito daría lugar a una mejora de la selectividad en la generación de oligosacáridos del proceso, mientras que el segundo contribuiría a mejorar el rendimiento global.

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática multi-etapa se empleó el sólido P150 y una dosis de enzima (la celulasa de *Trichoderma reesei* previamente usada) de 1 FPU/g de materia seca. En este caso, en lugar de matraces Erlenmeyer como recipientes de reacción, se emplearon tubos de centrifuga de 50 mL de capacidad, facilitando así la etapa de reemplazamiento del medio. Al final de cada etapa, el líquido del medio de reacción se separó del sólido mediante centrifugación. El sobrenadante se recuperó y se midió la cantidad recuperada para reemplazarla con buffer nuevo (0.05 M tampón citrato pH 4.8 y 0.02% de azida de sodio) sin añadir nueva enzima, para la siguiente etapa. La hidrólisis se llevó a cabo durante 24 horas, reemplazando el medio a diferentes intervalos de tiempo. La primera estrategia consistió en un proceso en 6 etapas, en las que cada etapa tuvo una duración de 4 horas. En la segunda estrategia se llevaron a cabo los

reemplazamientos cada 6 horas quedando, por tanto, el proceso dividido en 4 etapas. Por último, la tercera estrategia fue un proceso de 4 etapas de diferente duración: 4 + 6 + 6 + 8 h. Los sobrenadantes obtenidos en cada etapa fueron analizados por HPLC para determinar el contenido en glucosa y celo-oligosacáridos como se describe en la sección 1.4. Los rendimientos enzimáticos se calcularon de acuerdo a las ecuaciones incluidas en esta misma sección, teniendo en cuenta el volumen que se lograba recuperar en cada etapa. Por otro lado, el rendimiento global de cada estrategia se obtuvo mediante la suma de los rendimientos individuales obtenidos en cada etapa que formaba la estrategia.

1.4. Caracterización de los hidrolizados

Los hidrolizados obtenidos fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución. Se determinaron los contenidos de glucosa, xilosa y arabinosa empleando el equipo Agilent Technologies Liquid Chromatographer 1100 Series System (Santa Clara CA, USA) equipado con la columna de intercambio catiónico Aminex HPX-87H (7.8 × 300 mm), precedida por una precolumna de protección (50x7.8 mm) con el mismo relleno de Bio-Rad (USA) y con detector de índice de refracción. Las condiciones de operación de la columna se establecieron en 50 °C y como fase móvil se usó H₂SO₄ 5 mM con un caudal de 0.6 mL/min.

Para la determinación del contenido en oligosacáridos, una muestra de los hidrolizados fue sometida a post-hidrólisis con ácido sulfúrico al 4% (peso/peso) a 121 °C durante 60 minutos, y la cantidad de oligosacáridos fue obtenida a partir del incremento medido en los monómeros.

Para la caracterización del grado de polimerización de los oligosacáridos se empleó la columna Phenomenex Rezex RSO-Oligosaccharide Ag+ (200 x 10 mm), en combinación con una precolumna (60x10 mm) con el mismo relleno. En este caso se empleó como fase móvil agua ultrapura a un caudal de 0.3 mL/min y la temperatura de la columna se fijó a 80 °C. Para la calibración de la columna se emplearon celo-oligosacáridos (celobiosa, celotriosa, celotetraosa, celopentaosa y celohexaosa) de Megazyme.

A partir de las concentraciones de glucosa y de gluco-oligosacáridos medidas en HPLC, se determinaron los rendimientos enzimáticos de acuerdo a las ecuaciones que se incluyen a continuación.

El rendimiento en glucosa (RHE_G) se calculó según la ecuación:

$$RHE_G = \frac{\text{glucosa obtenida en el hidrolizado (g)}}{\text{glucosa potencial en el sustrato (g)}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde la glucosa potencial en el sustrato se calcula teniendo en cuenta el contenido total en glucanos del sólido y la relación entre los pesos moleculares de glucano y glucosa (180/162).

El rendimiento en oligosacáridos (RHE_{OS}) se calculó según la ecuación:

$$RHE_{OS} = \frac{\text{celo-oligosacáridos en el hidrolizado (g)}}{\text{glucanos en el sustrato (g)}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

El rendimiento total (RHET) se obtuvo como la suma de ambos rendimientos:

$$RHET = RHE_G + RHE_{OS} \quad (\text{Ecuación 3})$$

La selectividad del proceso en la obtención de oligosacáridos (objetivo del estudio) se obtuvo según la ecuación:

$$OS_{\text{selectividad}} = \frac{RHE_{\text{os}}}{RHE_{\text{T}}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

1.5. Determinación de las actividades enzimáticas

Como se ha comentado, el complejo enzimático de celulasa está constituido por diversas enzimas, por lo que para su completa caracterización es necesario determinar las diferentes actividades enzimáticas presentes. Los tres ensayos más utilizados para deducir la capacidad de un complejo celulolítico de hidrolizar la celulosa son la actividad sobre papel de filtro (FPU), como una medida de la actividad global, la actividad sobre carboximetilcelulosa (CMC), como una medida de la endo-actividad, y la actividad β -glucosidasa. A continuación se incluyen los procedimientos seguidos para la realización de cada una de estas pruebas, de acuerdo con las normas elaboradas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) [7]. Aunque para una mayor comprensión del comportamiento de la enzima habría resultado interesante, también, la determinación de la exo-actividad. En la presente tesis doctoral no se pudo abordar este estudio ya que los ensayos se hicieron en varias estancias y no se dispuso del material ni del tiempo necesario.

1.5.1. Actividad sobre papel de filtro (FPU)

El ensayo más común para la determinación de la actividad global de la celulasa es el ensayo sobre papel de filtro. Su determinación implica encontrar la dilución de la enzima tal que 0.5 mL de esta, sean capaces de producir 2 mg de azúcares reductores (medidos como glucosa) a partir de 50 mg de papel de filtro (lo cual implica una conversión del 4%) en 60 minutos, definición establecida por la IUPAC.

Para su determinación se hicieron al menos dos diluciones en tampón citrato de la solución de enzima, una de ellas capaz de liberar en el medio de reacción algo menos de 2 mg y la otra algo más de 2 mg de azúcares reductores (expresados como glucosa), empleando papel de filtro (Whatman n°1) como sustrato. Los patrones de glucosa para obtener la curva de calibrado se prepararon a partir de una solución madre de 10 mg/mL de glucosa en tampón citrato 0.05 M, pH 4.8. Se realizaron diluciones con el mismo tampón citrato para obtener concentraciones de: 6.7, 5.0, 3.3 y 2.0 mg/mL. Se prepararon los siguientes tubos de reacción:

	Disolución enzima correspondiente	Disolución de glucosa correspondiente	Tampón citrato	Tira papel de filtro (dimensiones 1 x 6 cm)
Muestras problema	0.5 mL	-	1 mL	1
Blancos enzima	0.5 mL	-	1 mL	-
Patrones	-	0.5 mL	1 mL	-
Cero	-	-	1.5 mL	-

Tabla 1. Tubos de reacción preparados para la determinación de la actividad sobre papel de filtro

Los tubos de muestra problema se introdujeron en baño termostático a 50 °C durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió, tanto a los tubos de muestra problema como a los blancos de enzima, los patrones y el cero, 3 mL de reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Se colocaron los tubos en un baño en ebullición durante 5 minutos y a continuación se enfriaron en un baño con agua y hielo. Mientras se enfriaban los tubos, se añadió a cada uno de ellos 16 mL de agua desionizada. Transcurridos los 20 minutos se realizó la lectura de los colores desarrollados en espectrofotómetro a 540 nm.

Se construyó la recta de calibrado representando las cantidades absolutas de glucosa (mg/0.5mL) frente a absorbancia (habiéndole restado el cero). A partir de esta recta y de las absorbancias obtenidas para las muestras problemas (una vez sustraído el valor de blanco de enzima correspondiente), se obtuvieron los valores de glucosa liberada (próximos a 2 mg). Como se dijo anteriormente, la actividad enzimática sobre papel de filtro debe medirse a diluciones de la solución de enzima tales que liberen en el medio de reacción una cantidad de 2 mg de azúcares reductores, puesto que es el punto donde la relación entre ambas variables (log de la concentración y masa de glucosa) se hace razonablemente lineal. Se representó el log de la concentración frente a la masa de glucosa liberada y se estimó el valor de concentración (C) que liberaría exactamente 2 mg.

La unidad de papel de filtro (FPU) se define como la formación de 1 µmol/min de azúcares reductores en las condiciones de ensayo descritas previamente. Haciendo las transformaciones correspondientes se comprueba que 2 mg de glucosa, en las condiciones de ensayo descritas, corresponden a 0.37 µmoles de glucosa liberados por minuto y por mL de la dilución enzimática ensayada, o lo que es lo mismo 0.37 UI por mL de dilución. La actividad sobre papel de filtro se calculó entonces mediante la expresión:

$$FPU = \frac{0.37 \text{ unidades}}{C} \frac{\text{mL}}{\text{mL}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

1.5.2. Actividad sobre carboximetilcelulosa

Para la determinación de la actividad endoglucanasa suelen emplearse derivados de celulosa que sean solubles en agua, como carboximetilcelulosa (CMC). En este ensayo se empleó una disolución de CMC al 2% en tampón citrato 0.05 M pH=4.8. De acuerdo con [7], se prepararon dos diluciones de la enzima cuya actividad quería medirse en tampón citrato, una de las cuales liberó en el medio de reacción algo menos de 0.5 mg de azúcares reductores y la otra, algo más.

Para la obtención de la curva de calibrado se emplearon los mismos patrones de glucosa que en el ensayo de papel de filtro. Se prepararon los siguientes tubos de reacción:

Muestras problema	Blancos enzima	Patrones	Cero
0.5 mL disolución enzima correspondiente + 0.5 mL CMC (1%)	0.5 mL CMC (1%)	0.5 mL CMC (1%)	0.5 mL CMC (1%)
30 min, 50 °C			
+ 3.0 mL DNS	+ 3.0 mL DNS + 0.5 mL disolución enzima correspondiente	+ 3.0 mL DNS + 0.5 mL patrón correspondiente	+ 3.0 mL DNS + 0.5 mL tampón citrato
Hervir 5 min, enfriar en baño con agua fría y añadir 16 mL de agua			
Leer absorbancias a 540 nm			

Tabla 2. Tubos de reacción preparados para la determinación de la actividad sobre carboximetilcelulosa

Los tubos se introdujeron en baño termostático a 50 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió, tanto a los tubos de muestra problema como a los blancos de enzima, los patrones y el cero, 3 mL de reactivo DNS. Se colocaron los tubos en un baño en ebullición durante 5 minutos y a continuación se enfriaron en un baño con agua y hielo. Mientras se enfriaban los tubos, se añadió a cada uno de ellos 16 mL de agua desionizada. Transcurridos los 20 minutos se midieron los colores desarrollados en espectrofotómetro a 540 nm.

Al igual que en el ensayo de papel de filtro, se construyó la recta de calibrado representando las cantidades absolutas de glucosa (mg/0.5 mL) frente a absorbancia (habiéndole restado el cero). A partir de esta recta y de las absorbancias obtenidas para las muestras problemas (una vez sustraído el valor de blanco de enzima correspondiente), se obtuvieron los valores de glucosa liberada (próximos en este caso a 0.5 mg). Se representó el log de la concentración frente a la masa de glucosa liberada y se estimó el valor de concentración (C) que liberaría exactamente 0.5 mg. En este caso, se deduce que 0.5 mg de glucosa corresponden a 0.185 UI/mL.

$$CMC = \frac{0.185 \text{ unidades}}{C} \frac{\text{mL}}{\text{mL}} \text{ (Ecuación 6)}$$

1.5.3. Actividad β -glucosidasa

La actividad β -glucosidasa es la responsable de romper la celobiosa presente en el medio en glucosa. Para su determinación se empleó una disolución de celobiosa 15 mM en tampón citrato 0.05 M, con pH=4.8. De acuerdo con [7], se prepararon dos diluciones de la enzima en tampón citrato, una de las cuales liberó en el medio de reacción algo menos de 1 mg de glucosa y la otra algo más.

Los tubos de muestra conteniendo 1.0 mL de la enzima diluida fueron estabilizados en baño termostático a 50 °C. A cada tubo se le añadió 1.0 mL de la disolución de sustrato y se mezcló. Se incubaron los tubos a 50 °C durante 30 minutos exactos y transcurrido este tiempo se finalizó la reacción sumergiendo los tubos en un baño en ebullición durante 5 minutos y a continuación se enfriaron en un baño con agua y hielo. En este caso no se puede emplear DNS para la medida de la glucosa, pues la celobiosa también reacciona con este, por lo que las medidas de glucosa se

realizaron en HPLC. Se prepararon también los blancos de enzima y blanco de celobiosa (también fueron incubados 30 min y hervidos).

	Disolución enzima correspondiente	Disolución de celobiosa	Tampón citrato
Muestras problema	1 mL	1 mL	-
Blancos enzima	1 mL	-	1 mL
Blanco celobiosa	-	1 mL	1 mL

Tabla 3. Tubos de reacción preparados para la determinación de la actividad celobiasa

Se midieron las concentraciones de glucosa mediante HPLC y se corrigieron los resultados con los valores del blanco correspondiente. Se representó el log de la concentración frente a la masa de glucosa liberada y se estimó el valor de concentración (C) que liberaría exactamente 1 mg. En este caso, se deduce que 1 mg de glucosa corresponden a 0.0926 UI/mL.

$$CB = \frac{0.0926 \text{ unidades}}{C} \frac{\text{mL}}{\text{mL}} \text{ (Ecuación 7)}$$

1.6. Capacidad de bacterias probióticas de consumir el hidrolizado

Una vez determinadas las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática, se probó, en una parte, el “potencial prebiótico” del hidrolizado obtenido bajo estas condiciones (rico en celooligosacáridos). Para evaluar y validar el carácter prebiótico de un compuesto, en primer lugar suelen realizarse estudios *in vitro*, que permitan el escrutinio y selección de sustratos con potencial prebiótico, seguido posteriormente de una validación en modelos animales. Para finalizar, el sustrato seleccionado con los modelos anteriores, sería candidato para llevar a cabo los estudios de intervención en humanos [15].

Para que un ingrediente o alimento pueda considerarse como prebiótico debe cumplir una serie de requisitos tales como: i) no ser hidrolizado o absorbido en el tracto gastrointestinal superior (esófago, estómago y duodeno) y, por lo tanto, ser resistente a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas digestivas y no absorberse en el intestino delgado; ii) ser fermentado selectivamente por bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal y; iii) ser capaz de inducir efectos fisiológicos beneficiosos para la salud [15]. Por tanto, un estudio del potencial prebiótico de un ingrediente debería incluir una evaluación de su resistencia a la digestión gastro-intestinal (existen modelos *in vitro* que simulan las condiciones de organismos vivos) y la evaluación de su fermentación en el colon (existen sistemas de fermentación *in vitro* que pueden alcanzar diversos grados de complejidad).

En este trabajo se evaluó la biodegradación del hidrolizado mediante el empleo de sistemas de fermentación *in vitro*. El modelo más simple y ampliamente utilizado en el contexto de los primeros estudios con prebióticos consiste en evaluar el comportamiento, como inóculo, de cultivos simples definidos (de cepa única) generalmente pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en presencia del sustrato [15].

Se probaron dos cepas bacterianas probióticas *Lactobacillus gasseri* DSM20077, de DSMZ (Braunschweig, Germany), y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, de ATCC (Manassas, VA, USA) que fueron elegidas por su capacidad para consumir celobiosa comercial [16]. Para su posterior uso con el hidrolizado, ambas cepas fueron precultivadas en el medio de cultivo 232 DSMZ (medio de Man-Rogose-Sharpe (MRS) con cisteína).

Para evaluar el potencial prebiótico del hidrolizado, este fue añadido al medio MRS preparado a pH 6.0 (en ausencia de ningún otro carbohidrato) de manera que la concentración inicial de carbohidrato (celobiosa+glucosa) fuera del 2% (peso/volumen). Para la esterilización del medio este se introdujo en el recipiente empleado para el cultivo, previamente esterilizado, haciéndolo pasar a través de un filtro también estéril de tamaño de poro de 0.22 µm.

Para la inoculación del medio (20 mL), las células bacterianas fueron recuperadas de los precultivos mediante centrifugación (1800 x g durante 10 min) y resuspendidas en el medio de manera que la densidad óptica inicial fuera de 0.3. Los cultivos fueron incubados a 36 °C, sin agitación, y se siguió el crecimiento mediante medida de la densidad óptica a 600 nm (OD600nm) a lo largo del tiempo. Además, se analizó mediante HPLC el consumo de glucosa y celobiosa, así como la generación de productos de fermentación (ácido láctico, ácido acético, etc.). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

La velocidad de crecimiento (μ) de la bacteria se calculó mediante la expresión:

$$\mu = \frac{2.303 (\lg OD_2 - \lg OD_1)}{(t_2 - t_1)} \text{ (Ecuación 8)}$$

donde OD₁ and OD₂ se tomaron de la fase exponencial de la curva de crecimiento bacteriano.

2. Resultados

2.1. Hidrólisis enzimática del material original

Como ya se ha comentado, dada la alta digestibilidad obtenida para la pulpa sin necesidad de ser pretratada, se estudió, en primer lugar, su hidrólisis directa. Se emplearon diferentes dosis de celulasa así como una pectinasa sola y en combinación con la celulasa.

2.1.1. Hidrólisis con celulasa

Un aumento de la dosis de enzima, hasta cierto punto, puede mejorar el rendimiento y la velocidad de la hidrólisis, pero también implicará un aumento importante en el coste del proceso. Como se comentó, normalmente la carga de enzima empleada suele variar entre 7 y 33 FPU/g de materia seca, siendo 10 FPU/g el valor más empleado [8, 9]. En este caso se emplearon cargas de enzima de 10, 30 y 45 FPU/g de materia prima seca. Por otro lado, dado que las enzimas tienen una mayor actividad durante las primeras 24 horas [17] y que es durante las primeras horas cuando tiene lugar la generación de los oligosacáridos, la hidrólisis fue evaluada durante este periodo de tiempo (24 horas). Los hidrolizados obtenidos a diferentes tiempos fueron caracterizados para obtener su contenido en monosacáridos y celo-oligosacáridos. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos. Se incluye la evolución, a lo largo del tiempo, del rendimiento total (RHET)

y el rendimiento en oligosacáridos (RHE_{OS}) para las diferentes cargas de enzima evaluadas. Se incluyen solamente los valores de glucosa y celo-oligosacáridos puesto que no se detectó la generación de xilosa o arabinosa ni de sus oligosacáridos durante el proceso.

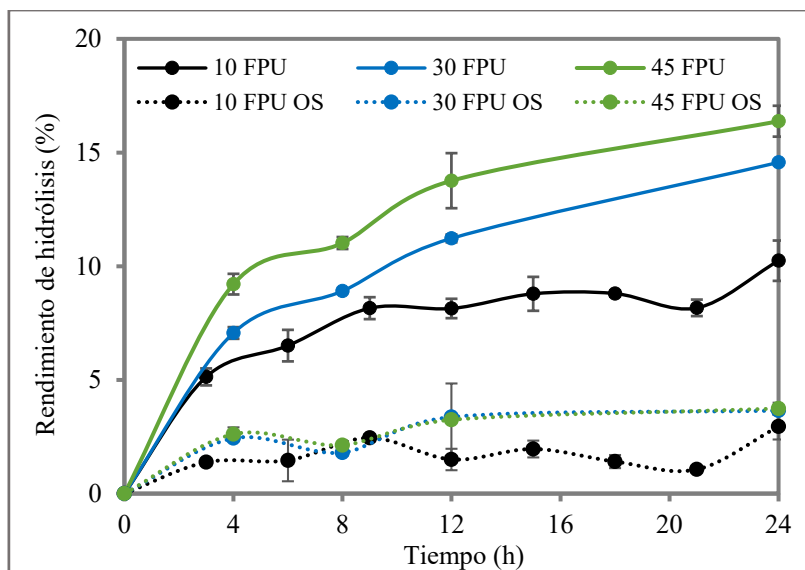


Figura 3. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de la pulpa con diferentes cargas de enzima (10, 30 y 40 FPU/g materia seca). Las líneas continuas indican los rendimientos totales ($RHET$) y las punteadas se refieren a los rendimientos en oligosacáridos (RHE_{OS})

Tal y como se esperaba, al aumentar la dosis de enzima, el rendimiento total también aumentó, manteniéndose esto durante las 24 horas evaluadas. Sin embargo, el aumento logrado en el rendimiento fue relativamente bajo si se compara con el incremento realizado en la dosis de enzima: para las 24 horas de tratamiento el rendimiento total pasó del 10 al 16% cuando la dosis de enzima se aumentó de 10 a 45 FPU/g, lo cual puede no estar justificado desde un punto de vista económico. Este comportamiento podría estar asociado a la adsorción no-productiva de la celulasa a la lignina o incluso al almidón. En relación a la producción de oligosacáridos, se observa en la Figura 3, que la mayor parte de la fracción hidrolizada se encuentra en forma de azúcar simple y no como oligosacárido, cuyo rendimiento máximo fue del 4% sin que además existan mejoras al aumentar la dosis de enzima. El hecho de que al aumentar la carga de enzima mejore el rendimiento total pero no en oligosacáridos, para ninguna de las horas evaluadas, puede deberse al alto grado de cristalinidad y polimerización de la celulosa presente en la pulpa [18], lo cual no permite a la endo-glucanasa presente en el complejo enzimático actuar sobre los enlaces internos de la cadena de celulosa y siendo únicamente la exo-glucanasa capaz de actuar sobre los extremos de las cadenas, generándose así glucosa.

Los rendimientos obtenidos incluso usando 45 FPU/g ms fueron bajos, comparados con los valores obtenidos en el ensayo de digestibilidad (73%). Probablemente esto sea, en mayor medida, consecuencia de que en el ensayo de digestibilidad se añadió Novozyme 188, la cual contiene una alta actividad amilasa [19] que puede hidrolizar los enlaces alfa del almidón y generar glucosa adicional procedente de esta fracción. Otros factores que también pueden estar afectando son, por ejemplo, la mayor carga de enzima (60 FPU/g) y el mayor tiempo de reacción (72 horas) que se empleó en el ensayo de digestibilidad, aunque no se espera que estos factores afectaran en tanta medida. También, la presencia de almidón puede haber limitado la adsorción productiva de la celulasa, como se dijo anteriormente. Finalmente, la baja presencia de actividad β -glucosidasa en

la celulasa empleada (19 U/mL) podría haber provocado un efecto de acumulación de celobiosa y, a su vez, de inhibición de las endoglucanasas [20]. Sin embargo, los cromatogramas obtenidos en HPLC no mostraron una alta presencia de celobiosa en el medio de reacción, estando la mayor parte del material hidrolizado en forma de glucosa, como se ha comentado anteriormente.

2.1.2. Efecto de suplementación con pectinasa

Puesto que el uso de otras enzimas en combinación con celulosa ha mostrado ser capaz de mejorar los rendimientos logrados en la hidrólisis enzimática [8, 10, 11], en la presente tesis se decidió evaluar la influencia del empleo de una pectinasa. Se estudió el efecto de esta enzima sola y en combinación con la celulasa (30 FPU/g ms). En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse, no se lograron mejoras en el rendimiento total, ni en el rendimiento en oligosacáridos (estos últimos datos no se muestran, pues no aportaron resultados interesantes y dificultan la lectura del gráfico).

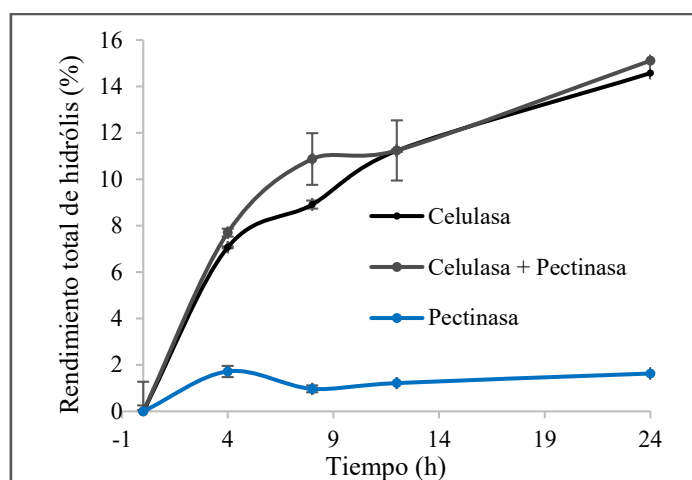


Figura 4. Efecto de la suplementación con pectinasa sobre el rendimiento total (RHET) en la hidrólisis enzimática de la pulpa sin pretratar

El estudio realizado con el material original mostró que, a pesar de que la pulpa tiene un contenido en lignina (componente que ha sido relacionado con la naturaleza recalcitrante de la biomasa) inferior al de otros materiales lignocelulósicos, esta presenta una naturaleza fibrosa que limita los rendimientos enzimáticos que pueden alcanzarse [18]. Por tanto, el empleo de un pretratamiento que altere su estructura y la haga más accesible a las enzimas es un factor clave para la efectividad del proceso. Otros autores han llegado a conclusiones similares trabajando con residuos procedentes del cultivo del plátano, entre ellos el pseudotallo (material más próximo a la pulpa empleada en este estudio) [21, 22]. Por ejemplo, Shimizu [22] obtuvo un rendimiento máximo del 15.9% durante la hidrólisis enzimática (72 horas) del pseudotallo sin pretratar con 15 FPU/g de celulasa suplementada con celobiasa, valor comparable con el 16.4% obtenido en este estudio para 24 h y 45 FPU/g ms.

2.2. Hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada

Dado que el material sin pretratar no permitió obtener buenos rendimientos enzimáticos, se evaluó la hidrólisis enzimática del material pretratado mediante autohidrólisis, por las ventajas ya mencionadas de este tratamiento frente al alcalino. Se empleó el material pretratado mediante autohidrólisis a una temperatura final de 150 °C y de 170 °C (P150 y P170, respectivamente), bajo condiciones no isotermas.

2.2.1. Hidrólisis enzimática, con celulasa, del sólido pretratado a una temperatura final de 170 °C

En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos trabajando con P170 a diferentes cargas de enzima (10 y 30 FPU/g ms). Se incluye la evolución, a lo largo del tiempo, del rendimiento en glucosa, el rendimiento en oligosacáridos, y la suma de ambos, rendimiento total. Los resultados obtenidos muestran la ventaja de emplear el pretratamiento, el cual no solo permite obtener mejores rendimientos, sino además, reducir el tiempo de tratamiento y la carga de enzima, manteniendo la productividad.

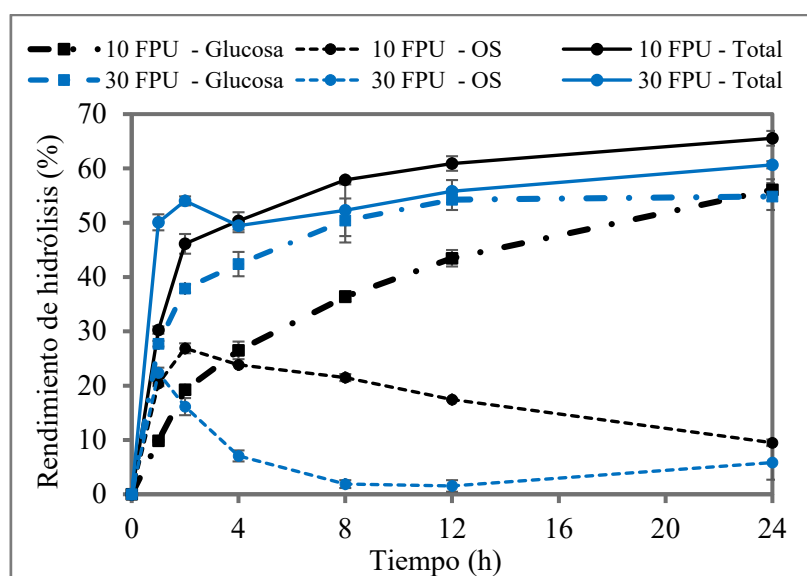


Figura 5. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 170 °C con diferentes cargas de enzima (10 y 30 FPU/g materia seca). Las líneas continuas indican los rendimientos totales (RHET), las punteadas se refieren a los rendimientos en oligosacáridos (RHE_{OS}) y la línea guion-punto se refiere a los rendimientos en glucosa (RHE_G)

En esta ocasión, además de rendimientos en glucosa y totales superiores, se logró aumentar también la cantidad de oligosacáridos generados, aunque estos fueron transformados rápidamente en glucosa. En la etapa inicial del proceso, en la que la velocidad de reacción es mayor, las endoglucanasas pueden atacar las regiones amorfas de la celulosa dando lugar a la generación de oligosacáridos. En la Figura 5 puede observarse como durante esta etapa inicial se generaron oligosacáridos en la misma cantidad (para el caso de 30 FPU) o incluso en mayor cantidad (para 10 FPU) que de glucosa. Sin embargo, estos oligosacáridos fueron rápidamente transformados a monosacáridos. En el caso de trabajar con 30 FPU/g esta ruptura fue más rápida debido a la presencia de una mayor actividad β -glucosidasa en el medio. El mayor rendimiento en

oligosacáridos logrado fue de 26.9%, a las 2 horas de tratamiento y trabajando con una carga de enzima de 10 FPU/g ms, que estuvo acompañado por un rendimiento en producción de glucosa del 19% (lo que corresponde a una selectividad del 58%).

En lo que respecta al rendimiento total, al inicio de la hidrólisis (primeras 2 horas), donde la velocidad de reacción es mayor, puede observarse que la carga de enzima tuvo efecto, siendo mayor el rendimiento cuanto mayor carga de enzima fue empleada. Después de este tiempo, la velocidad de reacción decrece, pues la enzima se encuentra con la región cristalina de la celulosa (más recalcitrante) que no es susceptible al ataque de las endo-enzimas y, por tanto, a partir de este punto, no aumenta la cantidad de oligosacáridos. A partir de este punto el rendimiento solo aumenta por la acción de las exo-glucanasas y de la β -glucosidasa. A partir de las dos horas, las diferencias en el rendimiento total empiezan a desaparecer y transcurrido un tiempo de 24 horas no hay diferencias entre las cargas de enzima usadas. Guerrero [23] concluyó que en la fase final de la hidrólisis enzimática, la carga de enzima no es un parámetro importante, sobre todo cuando se trabaja con cargas de sólido medias o bajas (como es el caso de este estudio). Este comportamiento se debe al hecho de que a bajas cargas, la cantidad de productos de reacción en el medio es baja y por tanto las enzimas no se ven inhibidas [24]. En contraste con estos resultados, Raghavendran et al. [25] triplicaron el rendimiento de sacarificación de abedul pretratado al doblar la dosis de enzima empleada, pero en su caso, usaron cargas de enzima muy bajas (3 FPU/g); al trabajar con cargas mayores de enzima tampoco encontraron diferencias importantes.

2.2.2. Hidrólisis enzimática, con celulasa, del sólido pretratado a una temperatura final de 150 °C

Dado que trabajando con P170 el empleo de 10 FPU/g ms permitió obtener un mayor rendimiento en celo-oligosacáridos y el empleo de cargas superiores no aportó ningún beneficio, para el sólido pretratado por autohidrólisis a 150 °C (P150) se decidió usar esta carga de enzima. En la Figura 6 se incluye la evolución, a lo largo del tiempo, del rendimiento en glucosa, el rendimiento en oligosacáridos, y el rendimiento total. El comportamiento obtenido fue similar al observado con P170 y 10 FPU. Al inicio del proceso, los oligosacáridos fueron generados en mayor cantidad que la glucosa (debido a la acción de las endo-glucanasas en las regiones amorfas) pero estos oligosacáridos comienzan a ser transformados en glucosa a las pocas horas. Sin embargo, trabajando con P150 esta ruptura fue más lenta. Mientras que para P170 los oligosacáridos fueron generados durante las 2 primeras horas y, tras esto, su ruptura es rápida, para P150 los oligosacáridos permanecen estables durante las primeras 4 horas. Se obtuvo en esta ocasión un rendimiento en oligosacáridos máximo del 25%, acompañado por un rendimiento en glucosa del 9.7% (selectividad del 72%).

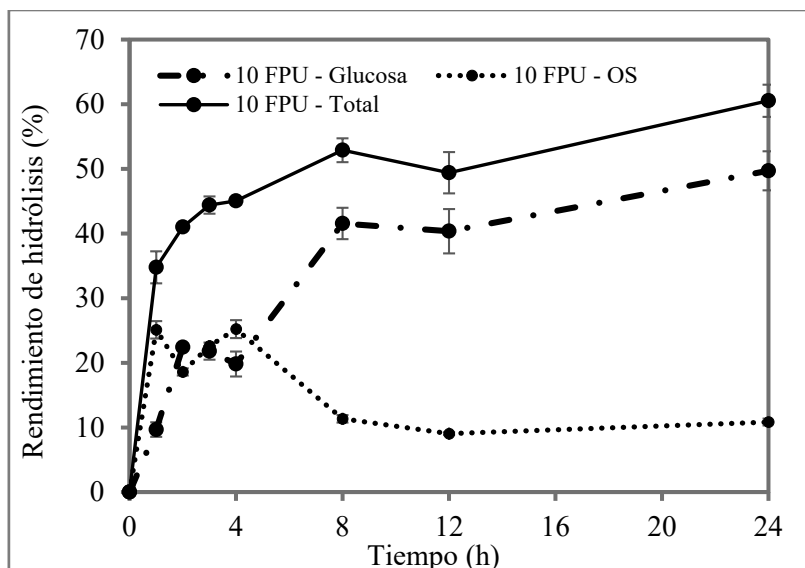


Figura 6. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C con una carga de enzima de 10 FPU/g materia seca. Las líneas continuas indican los rendimientos totales (RHET), las punteadas se refieren a los rendimientos en oligosacáridos (RHEos) y la línea guion-punto se refiere a los rendimientos en glucosa (RHEg)

En cuanto al rendimiento total del proceso, el máximo rendimiento obtenido (24 horas) en este caso fue 60.5%, comparado con el 65.5% obtenido con P170 bajo las mismas condiciones. Dado que la estructura del sólido obtenido en el pretratamiento a 150 °C se encuentra menos alterada, es razonable que el rendimiento obtenido fuese algo inferior. Si se comparan los rendimientos obtenidos con los valores de digestibilidad (83.2% para P170 y 78.6% para P150), para los dos sólidos estos fueron inferiores, lo cual, en parte, puede estar explicado por el insuficiente tiempo de reacción. Por ejemplo, un estudio realizado con el pseudotallo de platanera pretratado con sosa mostró que durante su hidrólisis enzimática con 30 FPU/g ms, el rendimiento aumentó de un 65%, a las 24 horas, a un 84% (110 horas) [21]. Además, durante el ensayo de digestibilidad se emplea una relación sólido-líquido inferior, lo cual facilita la transferencia de masa, y un tamaño de partícula inferior, que puede hacer el proceso más rápido. Por otra parte, en el caso de P150, que aun presenta algo de almidón en su composición, el uso de Novozyme 188 durante el ensayo pudo hacer que el rendimiento aumentara debido a la generación de azúcar de esta fracción.

En base a los resultados obtenidos, el uso de P150 presentó algunas ventajas frente a P170. Por una parte, durante el pretratamiento se obtiene una mayor cantidad de oligosacáridos en el licor (24.07 vs 16.05 g/100 g de materia prima para 150 °C y 170 °C, respectivamente) usando unas condiciones menos severas, con el consiguiente ahorro energético. En cuanto al rendimiento total obtenido durante la hidrólisis enzimática (aunque no es el objetivo de este estudio) no se encontraron grandes diferencias (65.5% para P170 vs 60.5% para P150) entre ambos pretratamientos, que además podrían compensarse con un mayor tiempo de reacción. Por otro lado, en relación al rendimiento en celo-oligosacáridos, objetivo de este trabajo, se obtuvieron rendimientos similares (alrededor del 25%) con ambos materiales, con la ventaja de que la selectividad fue mayor para P150 (72% para P150 vs 58% para P170).

Dadas las ventajas de P150, para el resto del estudio se decidió trabajar con este material. Se valoró la posibilidad de reducir la cantidad de enzima empleada y, consecuentemente, el coste del

proceso. En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos empleando una carga de enzima de 1 FPU/g ms. Puesto que la cantidad de enzima empleada fue muy baja, se evaluó el proceso durante 48 horas en lugar de 24 h, como en los casos anteriores. Si se compara con los resultados obtenidos con 10 FPU/g ms, la velocidad de reacción y el rendimiento total alcanzado fue inferior (49% frente a 61%) para el tiempo de reacción estudiado, si bien el uso de tiempos de reacción superiores podría haber llevado a alcanzar un rendimiento total más próximo

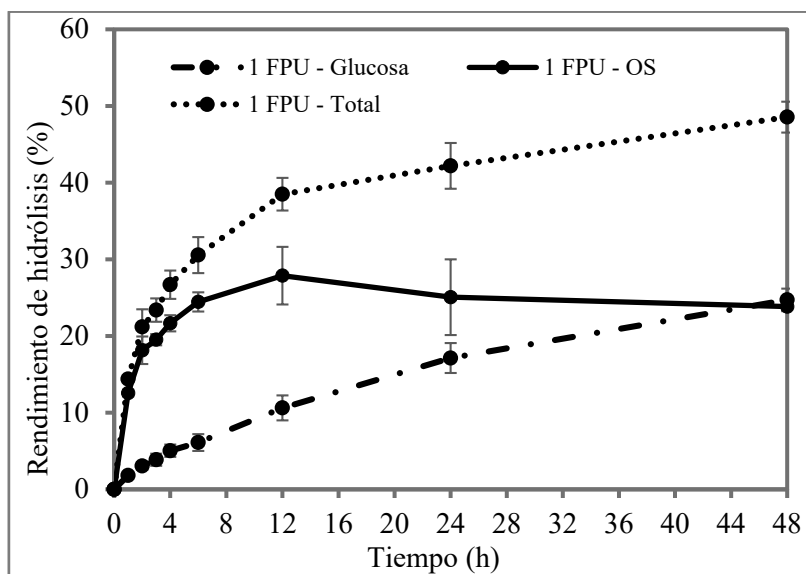


Figura 7. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C con una carga de enzima de 1 FPU/g materia seca. Las líneas continuas indican los rendimientos totales (RHET), las punteadas se refieren a los rendimientos en oligosacáridos (RHE_{OS}) y la línea guion-punto se refiere a los rendimientos en glucosa (RHE_G)

El uso de una baja cantidad de enzima tuvo ventajas desde el punto de vista de la producción de oligosacáridos. Dada la baja presencia de actividad β -glucosidasa en el medio, los oligosacáridos generados no fueron hidrolizados en glucosa tan rápido como sucedía con 10 FPU/g, generándose la glucosa a un ritmo mucho más lento en este caso. El máximo rendimiento en oligosacáridos obtenido fue algo superior (28%) al logrado con 10 FPU/g (25%), con una selectividad similar (72%). Si en lugar del rendimiento en oligosacáridos se prioriza la selectividad (un parámetro interesante cuando se llevan a cabo estrategias diferentes, como reemplazamiento del medio) el máximo valor obtenido fue del 87%, con un rendimiento en oligosacáridos del 12.56%, obtenido para el menor tiempo evaluado (1 h).

La caracterización de los hidrolizados realizada en la columna Phenomenex Rezex RSO-Oligosaccharide reveló que la mayor parte de los oligosacáridos generados se encontraban en forma de celobiosa, con pequeñas cantidades de DP3-6 (Ver ejemplo de cromatograma en la Figura 1 del Anexo 3). Este es el comportamiento normal durante la hidrólisis de la celulosa con celulasa, en la que los celo-oligosacáridos obtenidos son rápidamente hidrolizados a glucosa. Para solventar este problema es necesario separar rápidamente los oligosacáridos generados del medio de reacción, antes de que sean completamente hidrolizados a glucosa [26, 27]. No obstante, dada la baja cantidad de celulosa empleada en el ensayo y el bajo contenido en actividad β -glucosidasa obtenida para el complejo enzimático (actividad β -glucosidasa: 19 U/mL; actividad endoglucanasa: 2138 U/mL), no se esperaba que los oligosacáridos fueran tan rápidamente hidrolizados. El alto contenido en glucosa puede estar también asociado a la acción de las exo-

glucanasas, actividad que no fue determinada en este estudio. Se conoce que el complejo celulolítico producido por *Trichoderma reesei* (como el empleado en este estudio) presenta una mayor actividad exo- β -glucanasa que endo- β -glucanasa [36]. Una evidencia de esto es, la disminución observada, entre las 24 y 48 horas de reacción, en la concentración de oligosacáridos, que debería corresponder a un incremento de 0.33 mg/mL de glucosa y, sin embargo, el incremento observado durante este intervalo fue de 2.04 mg/mL.

2.2.3. Hidrólisis enzimática, con endo-glucanasa, del sólido pretratado a una temperatura final de 150 °C

En base a los resultados obtenidos con el complejo enzimático celulasa, se decidió emplear una enzima pura con actividad específicamente endo-glucanasa. De esta forma, al no tener presente las actividades β -glucosidasa y exo- β -glucanasa, que sí estaban presentes en el complejo enzimático y que eran responsables de la generación de glucosa, podría aumentarse la producción de oligosacáridos y la selectividad. La cantidad de endo-enzima añadida se calculó con el objetivo de obtener una actividad CMC similar a la que se añadió con la dosis de 1 FPU/g ms de celulasa.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8. Los rendimientos obtenidos fueron inferiores a los obtenidos con el complejo de celulasa, aunque entre las 24 y 48 horas se observó un incremento importante en la producción de oligosacáridos (del 1.33% al 11.53%) y en el rendimiento total (de 1.42 a 13.94%). La baja cantidad de enzima, así como el uso de una mono-enzima, podría requerir de tiempos de reacción superiores, por lo que sería interesante evaluarlo, siendo necesario evaluar también la posibilidad de que existan problemas de inhibición.

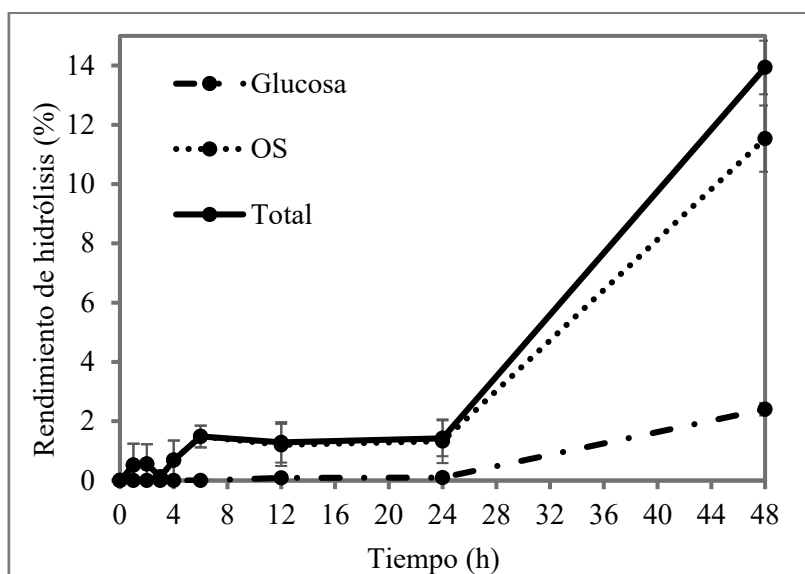


Figura 8. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C con endo-glucanasa. Las líneas continuas indican los rendimientos totales (RHET), las punteadas se refieren a los rendimientos en oligosacáridos (RHE_{OS}) y la línea guion-punto se refiere a los rendimientos en glucosa (RHE_G)

El cromatograma obtenido en la columna Phenomenex Rezex RSO-Oligosaccharide en este caso para el tiempo de 48 horas, no mostró diferentes picos correspondientes a diferentes DP, sino que mostró un pico inicial que debe corresponder a oligosacáridos de DP superiores a 10 y que la columna no fue capaz de retener. En la columna 87H, que permite obtener un pico definido para

la celobiosa, no se detectó tampoco que existiese una acumulación de la misma. El hecho de que no se detectara la presencia de este compuesto (procedente de la actividad exo-glucanasa) así como la baja generación de glucosa (asociada a la actividad β -glucosidasa) y, como consecuencia, la alta selectividad (83% para 48 horas), son indicativos de la alta pureza de la enzima empleada. Barbosa et al. en su estudio de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar tratado mediante un proceso hidrotérmico obtuvieron resultados similares [28]. El empleo de cócteles enzimáticos disponibles comercialmente les permitió obtener mayores rendimientos en oligosacáridos que el uso de endo-enzimas, pero con estas se obtuvieron selectividades muy superiores, mostrando que estas enzimas producen naturalmente muy poca glucosa.

Por otro lado, al comparar con el ensayo con celulasa en baja dosificación (1 FPU/g ms), el resultado obtenido para 1 h (rendimiento en oligosacáridos de 12.56% y selectividad del 87%) presentó una selectividad incluso superior a la obtenida en este caso. Lo que sí fue diferente es el tipo de oligosacáridos obtenidos. En el caso de la celulasa, la mayor parte fue celobiosa, como se comentó, mientras que con la enzima pura fueron oligosacáridos de mayor DP, que como se ha dicho, no pudieron ni tan siquiera separarse en la columna Rezex RSO-Oligosaccharide empleada.

Karnaouri et al. probaron la hidrólisis de residuos forestales (abedul y abeto) pretratados mediante el proceso organosolv, empleando también enzimas puras (aunque la combinación de cuatro diferentes) y en combinación con una enzima adicional (enzima monooxigenasa lítica de polisacáridos), lo cual les permitió alcanzar conversiones de celulosa en celobiosa del 22.3% [16]. En este mismo trabajo, los autores resaltaron el hecho de que, aunque la producción de mezclas de enzimas personalizadas para cada sustrato pueda ofrecer ventajas, existen muchos factores que dificultan el poder realizar esto a mayor escala, como son los costes de producción y la laboriosidad de las técnicas. La posibilidad de adaptar complejos enzimáticos disponibles comercialmente sea probablemente una opción más viable [14]. En este sentido, por ejemplo Chu et al. [13], desarrollaron un proceso de adsorción-separación para eliminar la β -glucosidasa presente en un complejo celulasa y lograron un aumento en la selectividad en oligosacáridos del 29.73 al 60.19% y en el rendimiento en oligosacáridos del 15 al 25%. Además, lo combinaron con un proceso multi-etapa (como el que se realiza más adelante en este estudio) para solventar problemas debidos a la inhibición y para evitar la posible ruptura de los oligosacáridos generados, logrando mejorar los rendimientos. Karnaouri et al. [14], por su parte, propusieron una adaptación del complejo Celluclast (similar al usado en este estudio) a través de una estrategia que incluía la modificación del pH, hidrólisis en multi-etapa con intercambio de buffer y adición de un inhibidor de la β -glucosidasa.

2.3. Hidrólisis enzimática multi-etapa de la pulpa pretratada a una temperatura final de 150 °C

Aunque el uso de la endo-enzima pura permitió obtener una alta selectividad en el proceso, los rendimientos alcanzados fueron considerablemente inferiores a los obtenidos cuando se trabajó con el complejo enzimático de celulasa, del que además se usó una carga muy baja de enzima (1 FPU/g ms). Además, el uso de tiempos bajos con la celulasa permitió obtener selectividades similares. Esto, unido a que la obtención de enzimas puras puede aumentar considerablemente los costes del proceso, llevó a la elección del complejo enzimático como una opción más viable para la obtención de oligosacáridos. Como ya se ha comentado, otros autores

también han señalado el uso de complejos enzimáticos disponibles comercialmente (que puedan ser adaptados) como una opción más viable al empleo de mezclas de enzimas puras [14].

Por tanto, para esta parte del estudio, se empleó la celulasa en una dosis de 1 FPU/g ms, y se evaluó la posibilidad de mejorar los rendimientos por medio de una hidrólisis en varias etapas, estrategia que ya ha sido usada previamente por otros autores en la obtención de celoligosacáridos de manera satisfactoria [12–14]. La hidrólisis se llevó a cabo durante 24 horas, reemplazando el medio a diferentes intervalos de tiempo (Tabla 4). Al final de cada etapa, el hidrolizado se separó del sólido mediante centrifugación y el sobrenadante recuperado fue reemplazado con buffer nuevo, sin añadir nueva enzima, para la siguiente etapa. El reemplazamiento del medio es una forma de adaptar el complejo enzimático, pues se elimina parte de la β -glucosidasa, responsable de la generación de glucosa a partir de celobiosa, no deseada para el objetivo de este trabajo. Además, como se comentó anteriormente, con los reemplazamientos se podría evitar la ruptura de los oligosacáridos al recuperarlos del medio de reacción antes de que tuviera lugar su hidrólisis completa. Por otro lado, al eliminar los productos de reacción del medio, se podría evitar la posible inhibición de las endo-glucanasas y exo-glucanasas. Con todo ello se esperaba influir tanto en la selectividad del proceso como en la mejora del rendimiento.

En la Tabla 4 se muestran los rendimientos globales obtenidos en cada estrategia (calculados mediante la suma de los rendimientos de cada etapa). Se incluye el rendimiento en glucosa (RHE_G), el rendimiento en oligosacáridos (RHE_{OS}), el rendimiento total (RHET) y la selectividad ($OS_{Selectividad}$).

Estrategia	RHE_{OS} Global	RHE_G Global	RHET Global	OS selectividad
Multi-etapa				
6 + 6 + 6 + 6 h	29.80 ^a ±0.44	12.74 ^{ab} ±0.44	42.54 ^a ±0.33	70.05 ^a
4 + 6 + 6 + 8 h	29.61 ^a ±0.03	13.42 ^{ab} ±1.39	43.03 ^a ±1.41	68.80 ^a
4 + 4 + 4 + 4 + 4 + 4 h	29.95 ^a ±0.35	11.69 ^a ±0.00	41.64 ^a ±0.35	71.93 ^a
Hidrólisis simple				
12 h (óptimo)	27.87 ^a ±3.76	10.62 ^a ±1.63	38.49 ^a ±2.13	72.4 ^a
24 h	25.07 ^a ±4.94	17.12 ^b ±1.95	42.19 ^a ±2.99	59.4 ^a

Tabla 4. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática multi-etapa de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C con una carga de enzima de 1 FPU/g materia seca. Se muestran los rendimientos totales (RHET), en oligosacáridos (RHE_{OS}) y en glucosa (RHE_G) globales, así como la selectividad ($OS_{selectividad}$) de las diferentes estrategias probadas. Los valores corresponden a la media de los duplicados $\pm$ desviación típica. Los valores con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Aunque las desviaciones típicas obtenidas hacen que, al aplicar el test de comparaciones múltiples de Tukey, no se detectaran diferencias entre los ensayos, si se comparan los resultados obtenidos para las estrategias multi-etapa con los obtenidos tras las 24 horas de tratamiento empleando una hidrólisis simple, puede verse ciertas ventajas al emplear una estrategia con reemplazamientos. En lo que respecta al rendimiento global, en todas las estrategias de múltiples etapas, este fue similar al obtenido en la hidrólisis simple de 24 horas, aunque a costa de rendimientos en oligosacáridos y glucosa diferentes. En el caso de las hidrólisis multi-etapa, los rendimientos en oligosacáridos fueron de alrededor del 30% para todas ellas, 5 unidades superior al obtenido para la hidrólisis en una etapa. En cuanto a los rendimientos en glucosa pasó al contrario, alrededor de 5 unidades superior para el caso de la estrategia simple. Esto se vio

traducido en una selectividad en oligosacáridos de 10 unidades superior cuando se trabaja con alguna de las estrategias multi-etapa frente a la opción de etapa única. Sin embargo, si los resultados se comparan con los obtenidos tras las 12 horas de tratamiento sin interrupción, el empleo de los reemplazamientos no aportó ventajas, pues se obtienen rendimientos en oligosacáridos y selectividades similares.

Un aspecto a considerar es el hecho de que, debido a la naturaleza higroscópica del material, el volumen de hidrolizado recuperado en cada etapa fue menos de la mitad del volumen del medio de reacción, tal y como se muestra en la Tabla 1 del Anexo 3. Una mayor recuperación del hidrolizado podría haber dado lugar a mejores resultados, aunque en base a los resultados obtenidos, no serían de esperar grandes mejoras. Por ejemplo, no parece que exista un problema de inhibición, puesto que, a pesar de que en las últimas etapas las concentraciones de oligosacáridos y glucosa fueron bastante bajas, los rendimientos no mejoraron. En las últimas etapas se generaron algunos oligosacáridos extra (ver columna “OS generados” de la tabla 1 del Anexo 3) pero la mayor parte de ellos fueron producidos en las 12 primeras horas, como ocurrió en la hidrólisis en una etapa, lo cual puede también significar que no existe una inhibición de las endo-glucanasas. En cambio, sí podría haber algún problema de desactivación de la enzima o que parte de esta se desorbiera (aunque esto último no se espera que sucediera [12]), lo que podría contrarrestarse con adición de nueva enzima en los reemplazamientos (aunque se estaría añadiendo también actividad celobiasa).

En cuanto a la eliminación de la β -glucosidasa durante los reemplazamientos, aunque esta puede quedar atrapada en la matriz tridimensional de la lignina pretratada [29], la mayor parte de esta es probable que haya sido eliminada. El hecho de que no se hayan obtenido resultados tan diferentes en cuanto a la generación de glucosa, a pesar de haberse eliminado, es indicativo de que al trabajar con cargas tan bajas de enzima, la poca presencia que pueda haber de esta actividad no es la principal responsable de la generación de glucosa, sino que pueden ser las exo-glucanasas las principales responsables. Esta misma conclusión fue extraída del estudio de hidrólisis en una etapa.

Por tanto, en base a los resultados obtenidos, el empleo de una estrategia formada por varias etapas, con su consecuente complejidad, no se encuentra justificado en este estudio, pues el empleo de una única etapa de 12 horas de duración permitió obtener una selectividad y rendimiento en oligosacáridos muy cercanos a los obtenidos en las estrategias multi-etapa.

Otros autores, en cambio, sí han logrado mejorar los rendimientos al emplear una hidrólisis multi-etapa, como es el caso de Chu et al. [13]. En su caso lograron mejoras en la selectividad del 29.73 al 60.19% y en el rendimiento en oligosacáridos del 15 al 26% al emplear una etapa de adsorción-separación inicial, como ya se comentó. Es importante señalar que en este estudio la carga de enzima empleada fue muy superior (15 FPU/g de celulosa) a la empleada en esta tesis, por lo que la presencia de la beta-glucosidasa es normal que en su caso tuviera un mayor efecto y que, por tanto, la etapa de adsorción-separación fuera tan efectiva. Al combinar esta operación con una hidrólisis en varias etapas lograron mejorar el rendimiento en oligosacáridos hasta un 51.78% y la selectividad hasta un 68% (para el mismo tiempo de reacción de 24 horas). En cuanto a la mejora en el rendimiento, en su caso se detectó la existencia de un problema de inhibición (que no fue observado en la presente tesis) que lograron reducir con el uso de varias etapas. Un factor que podría haber ocasionado estas diferencias es que ellos usaron una relación de 0.05 g de celulosa/mL y en el presente trabajo se empleó 0.024 g de celulosa/mL. Al trabajar ellos con una

carga superior, los problemas de inhibición pueden ser mayores, al generarse una mayor cantidad de productos de reacción en el medio.

Karnaouri et al., por su parte, adaptando el complejo Celluclast (similar al usado en este estudio) a través de una estrategia que incluía la modificación del pH, hidrólisis en multi-etapa con intercambio de buffer y adición de un inhibidor de la β -glucosidasa, lograron un producto rico en celobiosa con un alto ratio celobiosa-glucosa (37.5) y una conversión de celulosa en celobiosa del 9.78%, empleando abedul pretratado mediante el proceso organosolv; fueron capaces de obtener mayores conversiones en celobiosa (hasta un 35.2%), aunque con una relación celobiosa:glucosa muy inferior (3.3) [14].

Es interesante también la alta relación celo-oligosacáridos:glucosa (298.31) obtenida por Barbosa et al., acompañada con una producción de 60.49 mg de celo-oligosacáridos/g de bagazo de caña de azúcar tratada hidrotérmicamente [28] empleando una combinación de diferentes endo-glucanasas en combinación con lactosa y cobre como aditivos.

Como puede observarse, en base a los estudios encontrados sobre la obtención de celo-oligosacáridos a partir de materiales lignocelulósicos, existen dos estrategias: el uso de enzimas puras seleccionadas o la adaptación de complejos enzimáticos disponibles comercialmente. Como ya se ha comentado anteriormente, el empleo de cada una de estas estrategias tiene sus ventajas e inconvenientes. En cuanto a los resultados publicados, se puede observar que en general existe un compromiso entre la selectividad y el rendimiento en oligosacáridos: cuando se logran mejorar los rendimientos es a costa de una pérdida en la selectividad, o si lo que prima es la selectividad, los rendimientos alcanzados no son tan altos. La combinación de rendimiento y selectividad obtenidos en este estudio (28% RHE_{OS}, correspondientes a una producción de 134.48 mg de COS por g de materia prima, con una OS_{selectividad} del 72%, usando P150, 1 FPU durante 12 h) son comparables con los mencionados, con la ventaja de que en este caso se emplea una enzima disponible comercialmente, en una baja dosis y usando una estrategia simple de hidrólisis en una etapa.

2.4. Capacidad de bacterias probióticas de consumir el hidrolizado

Una vez elegidas las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática (P150, 1 FPU/g ms, 12 horas), se obtuvo una cantidad suficiente de hidrolizado que permitiera llevar a cabo los ensayos de fermentación. Se emplearon dos cepas bacterianas probióticas: *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus plantarum*. Las figurasFigura 9 y Figura 10 muestran las tasas de crecimiento (obtenida a través de la densidad óptica medida a 600 nm, OD) para ambas cepas. En estas representaciones gráficas se incluyen también las curvas de consumo de glucosa y celobiosa. Para obtener la cantidad suficiente de hidrolizado fue necesario el uso de diferentes lotes de material de partida y además realizar diferentes pretratamientos. Dada la heterogeneidad de los residuos vegetales, tanto en el pretratamiento como en la hidrólisis enzimática, los resultados obtenidos no fueron siempre iguales lo que llevó a que las concentraciones de los hidrolizados de partida no fueran tampoco exactamente iguales (como se muestra en las figurasFigura 9 y Figura 10).

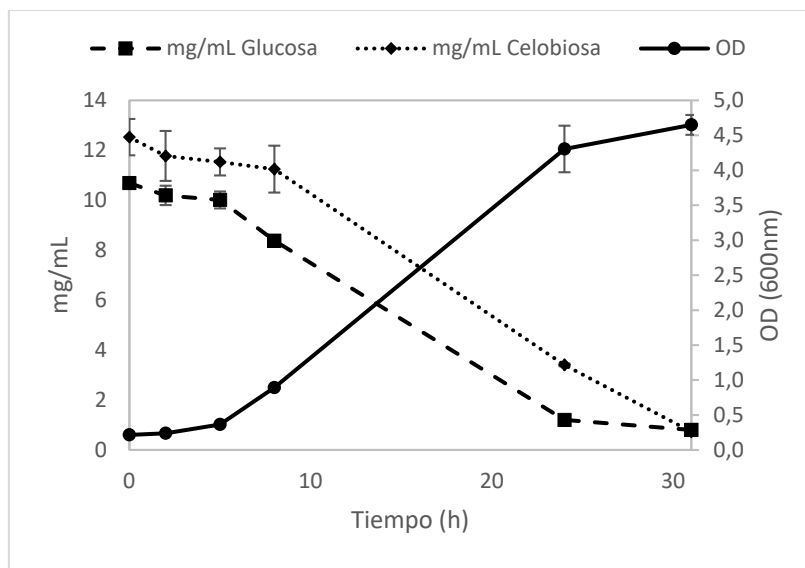


Figura 9. Curva de crecimiento (OD600 nm) y de consumo de carbohidrato (glucosa y celobiosa) obtenida en el cultivo de *L. plantarum* en un medio de cultivo suplementado con el hidrolizado obtenido mediante hidrólisis enzimática (1 FPU/g ms, 12 horas) de la pulpa de platanera pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C.

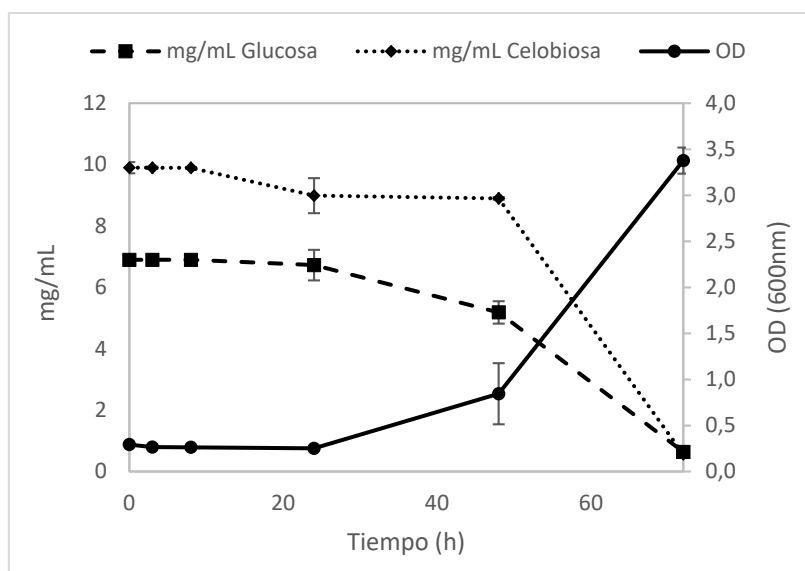


Figura 10. Curva de crecimiento (OD600 nm) y de consumo de carbohidrato (glucosa y celobiosa) obtenida en el cultivo de *L. gasserii* en un medio de cultivo suplementado con el hidrolizado obtenido mediante hidrólisis enzimática (1 FPU/g ms, 12 horas) de la pulpa de platanera pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C.

Como se muestra, ambas cepas fueron capaces de consumir el hidrolizado. *L. Plantarum* exhibió un crecimiento más rápido ($\mu=0.30 \text{ h}^{-1}$) y necesitó 31 horas de incubación para consumir prácticamente todos los carbohidratos, comparado con las 72 horas que fueron necesarias en el caso de *L. gasserii* ($\mu=0.07 \text{ h}^{-1}$). El único metabolito detectado para ambas cepas fue ácido láctico; no se detectó la producción de otros ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, ácido butírico o ácido propiónico) procedentes de la ruptura de carbohidratos. Por otro lado, la cantidad de ácido láctico (Tabla 5) medida para ambas bacterias fue mayor que la cantidad que correspondería según el consumo de celobiosa y glucosa que tuvo lugar. Es probable que esta bacteria fuese capaz de consumir otros oligosacáridos de mayor grado de polimerización existentes en el hidrolizado y que fueron detectados en la columna Phenomenex Rezex RSO-Oligosaccharide.

	<i>L. plantarum</i>		<i>L. gasseri</i>	
	0 h	31 h	0 h	72 h
Celobiosa (mg/mL)	11.73±0.73	0.00±0.00	8.89±0.18	0.00±0.00
Glucosa (mg/mL)	10.17±0.09	0.00±0.00	5.97±0.15	0.00±0.00
Ácido láctico (mg/mL)	0.00±0.00	34.10±1.40	0.00±0.00	25.02±0.68
Ácido acético (mg/mL)	3.63±0.72	4.86±0.12	4.00±0.01	4.39±0.11
Ácido propiónico (mg/mL)	0.99±0.63	1.23±0.06	1.04±0.00	1.39±0.00

Tabla 5. Metabolitos producidos durante la fermentación de *L. plantarum* y *L. gasseri* en cultivo suplementado con el hidrolizado obtenido mediante hidrólisis enzimática de la pulpa. No se detectó ácido butírico ni fórmico.

3. Índice de tablas y figuras

3.1. Índice de tablas

Tabla 1. Tubos de reacción preparados para la determinación de la actividad sobre papel de filtro 181

Tabla 2. Tubos de reacción preparados para la determinación de la actividad sobre carboximetilcelulosa 182

Tabla 3. Tubos de reacción preparados para la determinación de la actividad celobiasa 183

Tabla 4. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática multi-etapa de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C con una carga de enzima de 1 FPU/g materia seca. Se muestran los rendimientos totales (RHET), en oligosacáridos (RHE_{OS}) y en glucosa (RHE_G) globales, así como la selectividad (OS_{selectividad}) de las diferentes estrategias probadas. Los valores corresponden a la media de los duplicados ± desviación típica. Los valores con diferente superíndice son significativamente diferentes (p<0.05)..... 193

Tabla 5. Metabolitos producidos durante la fermentación de *L. plantarum* y *L. gasseri* en cultivo suplementado con el hidrolizado obtenido mediante hidrólisis enzimática de la pulpa. No se detectó ácido butírico ni fórmico. 197

3.2. Índice de figuras

Figura 1. Ensayos de hidrólisis enzimática probados en la pulpa 174

Figura 2. Ensayos de hidrólisis enzimática 176

Figura 3. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de la pulpa con diferentes cargas de enzima (10, 30 y 40 FPU/g materia seca). Las líneas continuas indican los rendimientos totales (RHET) y las punteadas se refieren a los rendimientos en oligosacáridos (RHE_{OS}) 185

Figura 4. Efecto de la suplementación con pectinasa sobre el rendimiento total (RHET) en la hidrólisis enzimática de la pulpa sin pretratar..... 186

Figura 5. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 170 °C con diferentes cargas de enzima (10 y 30 FPU/g materia seca). Las líneas continuas indican los rendimientos totales (RHET), las punteadas se refieren a los rendimientos en oligosacáridos (RHE_{OS}) y la línea guion-punto se refiere a los rendimientos en glucosa (RHE_G) 187

Figura 6. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C con una carga de enzima de 10 FPU/g materia seca. Las líneas continuas indican los rendimientos totales (RHET), las punteadas se refieren a los rendimientos en oligosacáridos (RHE_{OS}) y la línea guion-punto se refiere a los rendimientos en glucosa (RHE_G) 189

Figura 7. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C con una carga de enzima de 1 FPU/g materia seca. Las líneas continuas indican los rendimientos totales (RHET), las punteadas se refieren a los rendimientos en oligosacáridos (RHE_{OS}) y la línea guion-punto se refiere a los rendimientos en glucosa (RHE_G) 190

Figura 8. Rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C con endo-glucanasa. Las líneas continuas indican los rendimientos totales (RHET), las punteadas se refieren a los rendimientos en oligosacáridos (RHE_{OS}) y la línea guion-punto se refiere a los rendimientos en glucosa (RHE_G) 191

Figura 9. Curva de crecimiento (OD_{600 nm}) y de consumo de carbohidrato (glucosa y celobiosa) obtenida en el cultivo de *L. plantarum* en un medio de cultivo suplementado con el hidrolizado obtenido mediante hidrólisis enzimática (1 FPU/g ms, 12 horas) de la pulpa de platanera pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C..... 196

Figura 10. Curva de crecimiento (OD_{600 nm}) y de consumo de carbohidrato (glucosa y celobiosa) obtenida en el cultivo de *L. gasseri* en un medio de cultivo suplementado con el hidrolizado obtenido mediante hidrólisis enzimática (1 FPU/g ms, 12 horas) de la pulpa de platanera pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C..... 196

4. Bibliografía

1. Santos Meneses TM (2018) Autohidrólisis y deslignificación organosolv de madera de *Pinus radiata* para la recuperación de hemicelulosas y lignina con aprovechamiento de la fracción celulósica por vía enzimática. Univeridad Complutense de Madrid
2. Gutiérrez-Rojas I, Moreno-Sarmiento N, Montoya D (2015) Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. Rev Iberoam Micol 32:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
3. Stickel JJ, Elander RT, Mcmillan JD, Brunecky R (2014) Enzymatic Hydrolysis of

- Lignocellulosic Biomass. In: *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 77–103
4. Rosales-Calderon O, Arantes V (2019) A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnol Biofuels* 12:240. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1529-1>
5. Maitan-Alfenas GP, Visser EM, Guimarães VM (2015) Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Curr Opin Food Sci* 1:44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.10.001>
6. Van Dyk JS, Pletschke BI (2012) A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol Adv* 30:1458–1480. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2012.03.002>
7. Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 59:257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
8. Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* 83:1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
9. Gregg DJ, Saddler JN (2000) Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnol Bioeng* 51:375–383. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960820\)51:4<375::AID-BIT1>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960820)51:4<375::AID-BIT1>3.0.CO;2-F)
10. Ghose TK, Bisaria VS (1979) Studies on the mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulosic substances. *Biotechnol Bioeng* 21:131–146. <https://doi.org/10.1002/bit.260210110>
11. Beldman G, Rombouts FM, Voragen AGJ, Pilnik W (1984) Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass. *Enzyme Microb Technol* 6:503–507. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(84\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(84)90004-8)
12. Vanderghem C, Boquel P, Blecker C, Paquot M (2010) A multistage process to enhance cellobiose production from cellulosic materials. *Appl Biochem Biotechnol* 160:2300–2307. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8724-7>
13. Chu Q, Li X, Xu Y, et al (2014) Functional cello-oligosaccharides production from the corncob residues of xylo-oligosaccharides manufacture. *Process Biochem* 49:1217–1222. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2014.05.007>
14. Karnaouri A, Matsakas L, Bühler S, et al (2019) Tailoring celluclast® cocktail's performance towards the production of prebiotic cello-oligosaccharides from waste forest biomass. *Catalysts* 9:. <https://doi.org/10.3390/catal9110897>
15. Corzo N, Alonso JL, Azpiroz F, et al (2015) Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutr Hosp* 31:99–118. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8715>
16. Karnaouri A, Matsakas L, Krikigianni E, et al (2019) Valorization of waste forest biomass toward the production of cello-oligosaccharides with potential prebiotic activity by utilizing customized enzyme cocktails. *Biotechnol Biofuels* 12:. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1628-z>
17. Low JC, Halis R, Shah UKM, et al (2015) Enhancing Enzymatic Digestibility of Alkaline Pretreated Banana Pseudostem for Sugar Production. *BioResources* 10:1213–1223

18. Gabhane J, Prince William SPM, Gadhe A, et al (2014) Pretreatment of banana agricultural waste for bio-ethanol production: Individual and interactive effects of acid and alkali pretreatments with autoclaving, microwave heating and ultrasonication. *Waste Manag* 34:498–503. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.013>
19. Ximenes E, Kim Y, Mosier N, et al (2010) Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme Microb Technol* 46:170–176. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.11.001>
20. Romero Pulido MI (2003) Hidrólisis ácida y enzimática del residuo de poda de olivo. Universidad de Jaén
21. Chittibabu S, Saseetharan MK, Kalaivani MR, Rajesh MP (2014) Optimization of microwave assisted alkali pretreatment and enzymatic hydrolysis of Banana pseudostem for bioethanol production. *Energy Sources, Part A Recover Util Environ Eff* 36:2691–2698. <https://doi.org/10.1080/15567036.2011.574193>
22. Shimizu FL, Monteiro PQ, Ghiraldi PHC, et al (2018) Acid, alkali and peroxide pretreatments increase the cellulose accessibility and glucose yield of banana pseudostem. *Ind Crops Prod* 115:62–68. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.024>
23. Guerrero AB, Ballesteros I, Ballesteros M (2018) The potential of agricultural banana waste for bioethanol production. *Fuel* 213, 176–185. of agricultural banana waste for bioethanol production. *Fuel* 213:176–185. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.10.105>
24. Qing Q, Yang B, Wyman CE (2010) Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour Technol* 101:9624–9630. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.137>
25. Raghavendran V, Nitsos C, Matsakas L, et al (2018) A comparative study of the enzymatic hydrolysis of batch organosolv-pretreated birch and spruce biomass. *AMB Express* 8:114. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0643-y>
26. Arantes V, Saddler JN (2010) Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol Biofuels* 3:4. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-4>
27. Kuba Y, Kashiwagi Y, Okada G, Sasaki T (1990) Production of cello-oligosaccharides by enzymatic hydrolysis in the presence of activated carbon. *Enzyme Microb Technol* 12:72–75. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(90\)90183-Q](https://doi.org/10.1016/0141-0229(90)90183-Q)
28. Barbosa FC, Kendrick E, Brenelli LB, et al (2020) Optimization of cello-oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane straw using cellulolytic and oxidative enzymes. *Biomass and Bioenergy* 141:105697. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105697>
29. Yang J, Zhang X, Yong Q, Yu S (2010) Three-stage hydrolysis to enhance enzymatic saccharification of steam-exploded corn stover. *Bioresour Technol* 101:4930–4935. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.079>

Capítulo 7. Conclusiones y líneas futuras

Contenido

1. Conclusiones	205
1.1. Caracterización de la materia prima	205
1.2. Extracción de antioxidantes	205
1.3. Obtención de oligosacáridos a partir de la pulpa: pretratamiento	206
1.4. Obtención de oligosacáridos a partir de la pulpa: hidrólisis enzimática	207
2. Líneas futuras	208
3. Conclusions	210
3.1. Chemical characterization of raw materials	210
3.2. Antioxidants' extraction	210
3.3. Oligosaccharides production from banana's pseudostem pulp: pretreatment	211
3.4. Oligosaccharides production from banana's pseudostem pulp: enzymatic hydrolysis	212
4. Future research lines.....	213

En este capítulo se recogen las principales conclusiones extraídas de la investigación. Estas se han dividido en diferentes secciones, correspondiente a los distintos capítulos en los que se divide la parte de experimentación. Por otro lado, se incluyen posibles líneas futuras de investigación en el campo. Además, puesto que el trabajo pretende acogerse a la mención internacional, esta información se incluye también traducida al inglés.

1. Conclusiones

1.1. Caracterización de la materia prima

- Los tres materiales objeto de estudio de la presente tesis (pulpa procedente del pseudotallo de la platanera, raquis y plátano de rechazo) están, en su mayoría, compuestos por carbohidratos de diferente naturaleza. El contenido en carbohidratos fue superior al 60% para los tres materiales.
- La pulpa y el raquis, de naturaleza lignocelulósica, se componen principalmente de celulosa (26% la pulpa y 30% el raquis), hemicelulosa (19% para la pulpa y 15% para el raquis) y lignina, con bajos contenidos en lípidos (prácticamente nulo) y proteína (algo superior en el caso del raquis).
- La pulpa presentó, además, un alto contenido en almidón (22%), al igual que el plátano, que en su mayoría está formado por este carbohidrato (57%).
- Es destacable el bajo contenido en lignina observado para las dos fracciones lignocelulósicas (7.9% para la pulpa y 9.7% para el raquis) y los altos contenidos en cenizas, especialmente en el caso del raquis (30%).
- Los tres materiales presentaron un alto contenido en extraíbles. La presencia de estos extraíbles mostró afectar en algunos de los análisis, por lo que se recomienda una extracción previa de los mismos. También las diferentes técnicas empleadas en la cuantificación de un mismo componente, en algunos casos, pueden llevar a resultados significativamente diferentes.

1.2. Extracción de antioxidantes

- Los tres materiales se sitúan como una fuente interesante de antioxidantes naturales. El raquis es el que mayor contenido en polifenoles (TPC) presenta (1110.46 mg/100g de materia seca inicial), seguido por el plátano (823.42 mg/100 g de materia seca) y, en último lugar, la pulpa (408.61 mg/100g de materia seca).
- Para los tres subproductos se obtuvo un comportamiento similar durante las extracciones con etanol. En general, temperaturas altas y concentraciones intermedias de etanol-agua dieron lugar a los mejores resultados, siendo el porcentaje de etanol la variable que mayor impacto tiene sobre la extracción de polifenoles. El tiempo, por su parte, tiene una menor influencia sobre la extracción.

- Para el plátano, las condiciones óptimas de extracción fueron un 50% de etanol, una temperatura de 78 °C y 60 min; para la pulpa y el raquis, por su parte, un 60%, 78 °C y 30 min dieron lugar a los mejores resultados.
- El mayor rendimiento de extracción, determinado bajo las condiciones optimizadas para cada material, fue obtenido para el raquis (26.0%), seguido por la pulpa (16.2%) y el plátano (9.6%).
- Las diferencias en los rendimientos de extracción llevaron a que, al caracterizar los extractos obtenidos, en esta ocasión el plátano fuera el que ocupaba la primera posición (TPC de 27.26 mg/g extracto, correspondiente a 54.59 mg eq. Trolox/g extracto) seguido por el raquis (22.52 mg/g extracto, correspondiente a 42.5 mg eq. Trolox/g extracto) y finalmente la pulpa (10.17 mg/g extracto equivalentes a 15.16 mg eq. Trolox/g extracto).
- Los resultados obtenidos mediante la determinación del contenido en polifenoles (TPC) y mediante la capacidad antioxidante (DPPH inhibición) fueron coherentes entre ellos. Para mayores TPC se obtienen también mayores valores de DPPH inhibición, obteniéndose incluso una buena regresión entre ambas variables. Esto sugiere que los compuestos fenólicos son los responsables de la actividad antioxidante observada y que la determinación del TPC, en este caso, es un buen indicador de la capacidad antioxidante.
- Los valores de IC₅₀ (concentración de muestra necesaria para disminuir en un 50% la absorbancia inicial del DPPH) determinados en los extractos obtenidos bajo las condiciones optimizadas, fueron también coherentes con los valores de TPC: cuanto mayor es el TPC, menor concentración de extracto se necesita para conseguir una inhibición del 50%.
- Los resultados obtenidos demuestran que los subproductos del cultivo del plátano bajo estudio, y especialmente el raquis, pueden ser un buen candidato para la obtención de polifenoles, empleando, además, una tecnología de extracción simple y respetuosa con el medio ambiente y fácilmente escalable, como es la extracción con etanol, disolvente además apto para alimentación.

1.3. Obtención de oligosacáridos a partir de la pulpa: pretratamiento

- Los dos pretratamientos probados en la pulpa (tratamiento de autohidrólisis y tratamiento alcalino con sosa) permitieron alterar satisfactoriamente la estructura del material, dando lugar a mejoras en la digestibilidad.
- En el caso del tratamiento con sosa se logró alcanzar un valor de digestibilidad prácticamente del 100%. Para el caso de autohidrólisis, los valores de digestibilidad enzimática variaron entre 79% y 90% para las condiciones menos y más severas, respectivamente.

- Por otro lado, el pretratamiento de autohidrólisis, además de un sólido con mayor digestibilidad, permitió obtener un licor con un alto contenido en oligosacáridos y baja presencia de productos de degradación, bajo unas condiciones de operación moderadas.
- La mayor parte de los oligosacáridos obtenidos fueron malto-oligosacáridos procedentes de la fracción de almidón. Estos oligosacáridos podrían tener potencial prebiótico. La concentración máxima de oligosacáridos fue de 24 g/100 g material prima, obtenida para un factor de severidad de 2.3 (temperatura máxima de 150 °C).
- La autohidrólisis en dos etapas permitió obtener una mayor cantidad de oligosacáridos (30 g/100 g materia prima) y un sólido con mayor digestibilidad (97%).
- El tratamiento de autohidrólisis presenta algunas ventajas frente al alcalino, como son las ventajas medioambientales de este tipo de pretratamiento, en el que no se requiere de la adición de agentes químicos y que permite obtener un licor con un alto contenido en oligosacáridos que podrían tener potencial prebiótico. Además, para el caso de la pulpa, el pretratamiento de autohidrólisis ha demostrado su efectividad bajo unas condiciones de operación suaves, lo que implica un consumo energético relativamente bajo.

1.4. Obtención de oligosacáridos a partir de la pulpa: hidrólisis enzimática

- La hidrólisis enzimática de la pulpa original, sin haber sido sometida previamente a ningún tratamiento, no permitió obtener buenos rendimientos enzimáticos, por lo que se demuestra que el pretratamiento es un factor clave para la efectividad del proceso.
- El pretratamiento de autohidrólisis permitió mejorar los rendimientos obtenidos durante la hidrólisis enzimática con celulasa, tanto globales como en celo-oligosacáridos, obteniéndose rendimientos similares con las dos fracciones pretratadas usadas, correspondientes a temperaturas máximas de tratamiento de 150 °C (P150) y 170 °C (P170).
- El uso de P150 presentó algunas ventajas frente a P170. Por una parte, durante el pretratamiento se obtiene una mayor cantidad de oligosacáridos en el licor (24.07 vs 16.05 g/100 g de materia prima para 150 y 170 °C, respectivamente) usando unas condiciones menos severas, con el consiguiente ahorro energético. En cuanto al rendimiento total obtenido durante la hidrólisis enzimática (aunque no era el objetivo de este estudio) no se encontraron grandes diferencias (65.5% para P170 vs 60.5% para P150) entre ambos pretratamientos, que además podrían compensarse con un mayor tiempo de reacción. Por otro lado, en relación al rendimiento en celo-oligosacáridos, objetivo de este trabajo, se obtuvieron rendimientos similares (alrededor del 25%) con ambos materiales, con la ventaja de que la selectividad fue mayor para P150 (72% para P150 vs 58% para P170).
- El uso de una carga de enzima baja (1 FPU/g ms), además del beneficio económico, permitió un mayor control del proceso, pues dada la baja presencia de actividad β -glucosidasa en el medio, los oligosacáridos generados no fueron hidrolizados en glucosa

tan rápido como cuando se usó una carga de enzima mayor (10 FPU/g ms), generándose la glucosa a un ritmo mucho más lento en este caso.

- El máximo rendimiento en oligosacáridos obtenido fue del 28% con una selectividad del (72%), trabajando con P150, 1 FPU/g ms y un tiempo de reacción de 12 horas. Bajo estas mismas condiciones, pero con un tiempo de tratamiento muy inferior (1 h), se logró obtener una selectividad del 87%, aunque en ese caso el rendimiento en oligosacáridos que puede obtenerse es bastante inferior (12.56%).
- El uso de una endo-enzima pura permitió obtener una alta selectividad, pero rendimientos inferiores a los obtenidos empleando el complejo de celulasa usado en el resto de experimentos.
- El empleo de una estrategia formada por varias etapas, con su consecuente complejidad, no se encuentra justificado en este estudio, pues el empleo de una única etapa de 12 horas de duración permitió obtener una selectividad y rendimiento en oligosacáridos muy cercanos a los obtenidos en las estrategias multi-etapa.
- El hidrolizado rico en celo-oligosacáridos obtenido fue usado satisfactoriamente por dos bacterias probióticas del género *Lactobacilli*, demostrando que puede tener potencial prebiótico.
- Los resultados muestran que la pulpa procedente del pseudotallo de la platanera, pretratada mediante autohidrólisis bajo condiciones moderadas, es una buena candidata para la producción de celo-oligosacáridos, con potencial prebiótico, mediante hidrólisis enzimática, empleando una dosis muy baja (1 FPU/g ms) de un complejo enzimático de celulasa disponible comercialmente y mediante una estrategia simple.

2. Líneas futuras

Los resultados obtenidos muestran que los subproductos del cultivo del plátano que han sido estudiados en la presente tesis presentan compuesto de interés para su uso en acuicultura. Por un lado, los tres materiales y, en especial el raquis, se sitúan como una fuente interesante de antioxidantes naturales que pueden ser extraídos mediante, una tecnología de extracción simple y respetuosa con el medio ambiente como es la extracción con etanol, disolvente además apto para alimentación, y que además sería fácilmente escalable. Si bien los dos ensayos empleados en la caracterización de los extractos arrojaron resultados complementarios, sería interesante llevar a cabo una caracterización más completa del extracto, haciendo uso, por ejemplo, de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tecnología que permite detectar qué compuestos concretos están presentes y pueden ser los responsables de la capacidad antioxidante. También podría hacerse uso de otras tecnologías de extracción más complejas que podrían permitir recuperar una mayor cantidad de los antioxidantes presentes en el material.

Por otro lado, sería también interesante valorar la posibilidad de llevar a cabo una etapa de purificación del extracto obtenido, a fin de obtener un extracto lo más puro posible. Una posibilidad sería el uso de membranas, de interés creciente para la recuperación de compuestos

bioactivos presentes en corrientes acuosas debido a que presenta ventajas tales como el empleo de bajas temperaturas, ausencia de transición de fase o bajo consumo energético. Finalmente, sería también interesante la inclusión de estos extractos en piensos para peces y evaluar su capacidad para conservarlos durante su almacenamiento. En este sentido, actualmente se está llevando a cabo un ensayo en el que se ha incorporado el extracto obtenido a partir del raquis en diferentes aceites, componente de los piensos más susceptible a la oxidación.

Para el caso de la pulpa, se ha visto que esta, además de ser una posible fuente de antioxidantes, presenta otros compuestos (oligosacáridos) que pueden tener interés para su uso en acuicultura (como prebióticos). El tratamiento de autohidrólisis permitió obtener un licor con un alto contenido en malto-oligosacáridos bajo unas condiciones de operación suaves, lo que implica un consumo energético relativamente bajo. El sólido pretratado, por otro lado, permitió obtener buenos rendimientos en la obtención de celo-oligosacáridos mediante hidrólisis enzimática, empleando una dosis muy baja de una enzima disponible comercialmente y mediante una estrategia simple. Aunque en este estudio se han probado varias estrategias, existen muchas otras que podrían probarse con el objetivo de mejorar los rendimientos y selectividades obtenidos, como el uso de inhibidor de la β -glucosidasa u otros aditivos. En este caso, la pureza de los oligosacáridos obtenidos es también un aspecto que debe tenerse en cuenta, pues pueden presentar, además de monómeros y polisacáridos no hidrolizados, sales u otros compuestos. Sería interesante, por tanto, un estudio sobre la purificación tanto del licor obtenido en autohidrólisis como del hidrolizado obtenido en la hidrólisis enzimática. La cromatografía en columna, precipitación con ayuda de disolventes orgánicos o la separación por membranas son algunas de las opciones que podrían valorarse.

Por otro lado, aunque el uso de cultivos puros es interesante como prueba preliminar sobre el potencial prebiótico de un ingrediente, sería necesario completar este estudio para poder justificar la capacidad prebiótica del producto. Sería interesante llevar cabo por ejemplo ensayos *in vitro* haciendo uso de cultivos que incluyan microbiota intestinal completa, como cultivos fecales.

Finalmente, en el caso de la pulpa, en el que se ha propuesto la recuperación de más de un compuesto, habría que valorar la mejor estrategia para la recuperación de estos productos. Por ejemplo, llevar a cabo en primer lugar la extracción de los antioxidantes (que podrían ser sensibles al tratamiento de autohidrólisis). El producto obtenido tras esta extracción, al haber sido sometido a un tratamiento, podría no comportarse igual durante el pretratamiento. También, en este estudio, entre el pretratamiento y la hidrólisis enzimática, se llevó a cabo el secado del material, puesto que facilitaba el manejo del mismo, pero como se comentó, esto puede producir un colapso de los poros, reduciéndose así la superficie disponible y afectando en la posterior hidrólisis enzimática, por lo que evitar el secado sería otro aspecto que podría tenerse en cuenta.

Por otra parte, la alta digestibilidad enzimática obtenida para la pulpa, hace que pueda plantearse la obtención de otros productos con aplicación en acuicultura como por ejemplo levadura, como una fuente potencial sostenible de proteínas en la dieta de los peces.

3. Conclusions

3.1. Chemical characterization of raw materials

- The three materials under study in the present work (the pulp coming from the mechanical fibre extraction of banana's pseudostem, the rachis and the discarded bananas) were mainly composed of different types of carbohydrates. Carbohydrates content was above 60% for the three materials.
- The pulp and the rachis, both lignocellulosic, were mainly composed of cellulose (26% for the pulp and 30% for the rachis), hemicellulose (19% the pulp and 15% the rachis) and lignin, with minor presence of lipids (close to zero) and protein (slightly upper for rachis).
- The pulp also presented a high content of starch (22%), as observed for the discarded bananas, which presented starch as the main component (57%).
- It is remarkable the low lining content obtained for the two lignocellulosic materials (7.9% for the pulp and 9.7% for rachis) and the high ash content, especially for the rachis (30%).
- The three materials presented a high extractable content, whose presence affected during some determinations and reason why, their previous extraction is recommended before analysis. On the other hand, some differences could be found in the composition when different protocols were used.

3.2. Antioxidants' extraction

- The three by-products presented an important content in antioxidants and can be considered as an interesting source for their extraction. Comparing the three materials, the rachis had the highest amount of polyphenols (1110.46 mg/100g raw material), followed by the discarded bananas (823.42 mg/100 g raw material) and finally the BPP (408.61 mg/100g raw material).
- A similar behavior was obtained for the three materials during ethanol extractions. In general, high temperatures and intermediate ethanol-water concentrations provided better results; the ethanol concentration had a greater impact on the polyphenols extraction than the temperature. The extract properties were less affected by the extraction time.
- The best extraction conditions found for the discarded bananas were a 50% of ethanol concentration, 78 °C of temperature and 60 min of extraction time; the pulp and the rachis, when extracted with a 60% of ethanol at 78 °C and for 30 min, gave the extracts with more antioxidant activity.

- The highest extraction yield, determined under the optimal conditions for each fraction, was obtained for the rachis (26%), followed by the pulp (16.2%) and the discarded bananas (9.6%).
- The great differences in the extraction yields, resulted in a different ranking when the activity of the extracts were compared, being, in this occasion, the banana extract the one with the highest polyphenol content (TPC of 27.26 mg/g extract corresponding to 54.59 mg Trolox equivalents/g extract), followed by the rachis (22.52 mg/g extract corresponding to 42.5 mg Trolox equivalents/g extract) and the pulp (10.17 mg/g extract corresponding to 15.16 mg Trolox equivalents/g extract).
- The results obtained with the different tests (TPC and DPPH inhibition) were consistent with each other. Extracts with higher polyphenol contents also exhibited higher antioxidant activity, even showing a good correlation when a regression analysis was performed between both variables for the three materials separately. Given the similarity of the results among these variables, it can be stated that phenolic compounds are responsible for the observed antioxidant activity and that, in this occasion, TPC assay is a good predictor of the antioxidant activity.
- The values obtained for IC₅₀ are also in accordance with the values of TPC: the higher the TPC, the less the concentration of the extract required to obtain a 50% antioxidant effect.
- The results obtained in this study demonstrate that the banana crops residues under study, and specially the rachis, might constitute a good source of phenolic compounds that can be extracted using ethanol extraction, a simple, environmentally friendly, and easily scalable to an industrial level technology.

3.3. Oligosaccharides production from banana's pseudostem pulp: pretreatment

- Both tested pretreatments (autohydrolysis and alkaline pretreatment) satisfactory disrupted the morphological structure of the pulp and improved results were obtained during enzymatic digestibility assay.
- Enzymatic digestibility values close to 100% were obtained with alkaline pretreated solids. For autohydrolysis pretreatment, the digestibility of the solid fractions varied between 79% and 90% for less and more severe conditions, respectively.
- On the other hand, the autohydrolysis pretreatment not only allowed to obtain a solid phase in advantageous conditions (altered surface and improved digestibility) for further processing, but also a liquor rich in oligosaccharides with minor presence of degradation products, using mild operational conditions.

- Most of oligosaccharides present in the liquor were malto-oligosaccharides coming from the starch fraction of the pulp. These oligosaccharides may have prebiotic potential. The highest oligosaccharides production (24 g/100 g raw material) was obtained at a severity factor of 2.3 (corresponding to a maximum temperature of 150 °C).
- Two stage autohydrolysis, with increasing severity, allowed to obtain a higher amount of oligosaccharides (30 g/100 g raw material) and higher digestibility of the remaining solid (up to 97%).
- Autohydrolysis pretreatment presents the advantage, over alkaline pretreatment, that no chemicals are added and that it allows obtaining oligosaccharides, added-value products with applications in the pharmaceutical and functional food markets. Besides, in this occasion, mild operational conditions were used, with the consequent low energy consumption and environmental impact.

3.4. Oligosaccharides production from banana's pseudostem pulp: enzymatic hydrolysis

- Enzymatic hydrolysis of untreated pulp did not provide good enzymatic yields, thus demonstrating that pretreatment is a key factor for the efficient enzymatic hydrolysis of this material.
- Autohydrolysis allowed improving the yields obtained during the enzymatic hydrolysis with cellulase, both total and cello-oligosaccharides, obtaining similar results for both pretreated fractions (maximum temperature of 150 °C and 170 °C, P150 and P170).
- Autohydrolysis treatment at 150 °C may present some advantages as a pretreatment method in comparison to 170 °C. On the one hand, at 150 °C a higher amount of OS was produced in the liquor (24.07 vs 16.05 g/100 g of raw material for 150 and 170 °C, respectively) using less severe conditions, with the consequent energy savings. Considering total yield, there were not major differences (65.5% for P170 vs 60.5% for P150) that could be probably compensated with longer reaction times. On the other hand, taking into consideration only OS production, which is the main objective of this work, similar yields (around 25%) were achieved with both materials, with the advantage that working with P150 a higher OS selectivity was obtained (72% for P150 vs 58% for P170).
- Using a very low dosage (1 FPU/g DB), besides de cost savings, enabled a greater stability of the cello-oligosaccharides and a very slow glucose production rate, due to the very low amount of β -glucosidase present in the media, which avoid OS breakage into glucose, as observed for 10 FPU/g DB.
- The best yield in cello-oligosaccharides was 28%, with a selectivity of 72%, working with P150, 1 FPU/g DB and a reaction time of 12 h. Under these conditions, but using a treatment time of 1 h, a higher selectivity of 87% can be obtained, although accompanied by much lower yield in oligosaccharides (12.56%).

- The use of an endo-glucanase produced high oligosaccharides selectivity but lower yield, compared with the use of the complex of cellulose.
- The use of multi-stage strategy, with its related complexity, is not justified. If the 12 h single stage strategy is compared with the multi-stage, both yield in OS production and the OS selectivity are very close, and so it seems that the single strategy constitutes a better treatment strategy.
- Obtained cello-oligosaccharides successfully support the in vitro growth of two *Lactobacilli* probiotic strains.
- The results obtained show that banana's pseudostem pulp, pretreated under mild operational conditions, is a good candidate for cello-oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis using a very low dosage (1 FPU/g DB) of a commercially available cellulase with a simple strategy.

4. Future research lines

The results obtained show that banana crops by-products under study in the present thesis contain different compounds in their composition that can be find application in aquaculture sector. On the one hand, the three materials, and specially the rachis, might constitute a good source of phenolic compounds that can be extracted using a simple, environmentally friendly and easily scalable to an industrial level technology as it is ethanol extraction, solvent that, besides, is Generally Recognized As Safe (GRAS). Although the two procedures used for the characterization of the ethanolic extracts showed complementary and consistent results, a deeper analysis through high performance liquid chromatography in order to identify the type of antioxidants present in the extracts would be interesting. Also, the possibility of using more complex technologies in order to get a higher recovery of the polyphenols could be explored.

On the other hand, in order to get an extract as pure as possible, a purification stage of it should be explored. The use of membrane technologies is of growing interest for the recovery of bioactive compounds from aqueous streams due to it shows advantages such us the use of low temperatures, absence of phase transition or low energy consumption. Finally, it would be also interesting the inclusion of these extracts in fish feed in order to evaluate the capacity of them to preserve it during storage. In this sense, a test is being conducted currently in order to evaluate the preservation of different oils (the component more susceptible to oxidation in fish feeds) in presence of the rachis extract.

In the case of the pulp, apart from being a good candidate for antioxidants recuperation, it presents other compounds (oligosaccharides) that can be used in aquaculture feeding as prebiotics. The autohydrolysis pretreatment allowed to obtain an oligosaccharide-rich liquor under mild operational conditions, with the consequent low energy consumption. The pretreated solid, on the other hand, allowed to obtain good enzymatic hydrolysis yields in cello-oligosaccharides, using a low dosage of a commercially available cellulase with a simple strategy. Although different strategies were tested in the present thesis, there are other alternatives that could be also tested with the objective of improving the combination of yield and selectivity, like the addition of β -

glucosidase inhibitor or other additives. Also in this case, oligosaccharides purity is an important aspect to be taken into consideration, as the hydrolysate can present, apart from monosaccharides or non-hydrolyzed polysaccharides, salts and other kind of compounds. So, the study of the purification of the liquor obtained in the autohydrolysis pretreatment and the hydrolysate obtained in the enzymatic hydrolysis would be interesting. Liquid chromatography, precipitation with the help of organic solvents or membrane separation are some of the possible options.

On the other hand, although the simple bacterial cultures (single-strain) are an interesting preliminary test, for the evaluation of the prebiotic capacity of an ingredient, more assays are needed. Current trends involve the evaluation of the entire gut microbiota and fecal cultures are broadly used.

Finally, in the case of the pulp, the possibility of recovering more than one fraction was proposed. The better approach, that allow the recovery of all this fractions, should be investigated. For example, the antioxidants could be extracted in a first moment, in order to avoid their possible degradation during autohydrolysis. The influence of this previous extraction in the behavior of the material during the pretreatment should then be investigated. Also, in this study the drying of the material between the pretreatment and the enzymatic hydrolysis was conducted, which can produce the collapse of the pores and consequently affect to the yields achieved, so the possibility.

On the other hand, the high digestibility obtained for the pulp open up the possibility of producing other kind of materials also with application in aquaculture sector, like yeast as a sustainable alternative protein source for the aquaculture industry.

Anexos

Contenido

Anexo I. Anexos del Capítulo 1	219
Anexo II. Anexos del Capítulo 5.....	221
Anexo III. Anexos del Capítulo 6	222
Anexo IV. Publicaciones.....	224

Anexo I. Anexos del Capítulo 1

Tabla 1. Valores medios y desviaciones típicas obtenidos en el análisis proximal de las dos fracciones de pulpa obtenidas en el proceso de extracción de fibra del pseudotallo de la platanera (Gran Enana) (% peso/peso, base seca).

	Pulpa Módulo 1	Pulpa Módulo 2
Lípidos (%)	1.05±0.21	1.19±0.54
Cenizas (%)	20.07±2.85	17.51±2.73
Proteína (%)	5.61±1.62	6.17±2.01

Tabla 2. Composición química de la pulpa obtenida en la extracción de fibra del pseudotallo de la platanera, tal cual y una vez se han eliminado los extraíbles (% peso/peso, base seca).

Componente	Pulpa original	Pulpa (libre de extraíbles)
Glucano	47.39 ± 0.20	44.59 ± 1.70
Hemicelulosa	16.76 ± 0.77	14.98 ± 0.29
Xilano	8.35 ± 0.42	7.65 ± 0.29
Arabinano	7.57 ± 0.35	6.61 ± 0.01
Grupos acetilo	0.85 ± 0.00	0.79 ± 0.01
Lignina Klason	6.33 ± 0.23	7.92 ± 0.27
Cenizas (total)	15.44 ± 0.05	6.39 ± 0.10
Cenizas extraíbles	9.05 ± 0.10	-
Extraíbles	21.11 ± 0.79	-
Almidón (no-resistente)	23.65±0.40	22.17 ± 0.36
Holocelulosa	64.07±2.33	57.48 ± 0.61
Celulosa	35.68±1.26	26.29 ± 2.10
Hemicelulosa	28.39±3.25	19.11 ± 2.31
Proteína	5.88 ± 1.82	-
Lípidos	1.09 ± 0.50	-

Tabla 3. Valores medio y desviaciones típicas obtenidos en el análisis proximal del raquis de la platanera (Gruesa Palmera y Gran Enana). Los % están expresados en base seca.

	Gruesa Palmera	Gran Enana
Lípidos (%)	1.57±0.17	1.82±0.10
Cenizas (%)	37.00±0.26	34.39±0.10
Proteína (%)	8.99±0.20	11.44±0.34
Suma	47.57%	47.65%

Tabla 4. Composición química del raquis, tal cual y una vez se han eliminado los extraíbles (% peso/peso, base seca).

Componente	Pulpa original	Pulpa (libre de extraíbles)
Glucano	27.08 ± 0.1	26.88± 0.21
Hemicelulosa	13.39±1,84	15.13±3.22
Xilano	12.12 ± 0.04	11.54±0.60
Arabinano	0.00±0.00	0.00±0.00
Grupos acetilo	1.27 ± 1.80	3.59±2.63
Lignina Klason	10.52 ± 0.16	9.71±0.21
Cenizas (total)	30.47±0.75	5.63±0.03
Cenizas extraíbles	24.84±0.03	-
Extraíbles	31.84±1.21	-
Almidón (no-resistente)	0.00±0.00	0.00±0.00
Holocelulosa	51.34±0.57	45.51±1.43
Celulosa	34.47±0.21	30.15±0.81
Hemicelulosa	16.87±0.60	15.36±2.06
Proteína	11.44±0.34	-
Lípidos	1.82±0.10	-

Anexo II. Anexos del Capítulo 5

Tabla 1. Composición química y valores de digestibilidad enzimática de los sólidos pretratados obtenidos durante la autohidrólisis no-isotérmica de la pulpa obtenida en la extracción de fibra del pseudotallo de la platanera (% peso/peso, base seca)

<i>Componente</i>	<i>% (peso/peso, base seca)</i>						
logR _o	2.26	2.3	2.73	3.01	3.37	3.79	4.40
Y _s	59.97	52.0	52.98	47.94	39.50	36.64	42.16
Glucano	45.52±0.34	48.21±0.08	45.65±1.01	47.89 ± 1.63	51.59±1.50	48.88±1.56	48.60±0.79
Hemicelulosa	16.39±0.66	14.97±0.71	27.93±0.64	21.10 ± 0.74	16.59±1.74	11.92±6.34	13.60±4.03
Xilano	10.78±0.97	10.43±0.2	12.62±0.02	10.33 ± 0.36	8.19±0.08	5.20±1.71	6.16±1.29
Arabinano	5.61±0.31	4.54±0.51	6.92±0.21	5.05±0.53	3.66±0.01	1.84±0.84	0.0±0.0
Grupos acetilo	-	-	8.39±0.40	5.73 ± 0.15	4.74±1.82	4.87±3.79	7.43±2.74
Lignina Klason	12.37±0.1	14.41±0.16	14.70±0.11	17.33 ± 0.47	20.94±0.31	24.67±0.30	30.04±0.09
Cenizas	8.82±0.26	8.88±0.11	6.96±0.77	7.64 ± 1.75	7.96±0.06	13.39±2.15	8.92±0.04
Digestibilidad	79.53±11.7	78.62±0.91	79.70±2.72	83.2±2.54	85.80±2.41	90.73±1.18	87.93±0.24

Anexo III. Anexos del Capítulo 6

Figura 1. Ejemplo de cromatogramas obtenidos en la columna Phenomenex Rezex RSO-Oligosaccharide correspondientes a los hidrolizados obtenidos en la sacarificación enzimática de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 170 °C, empleando una dosis de enzima de 10 FPU/g de materia seca.

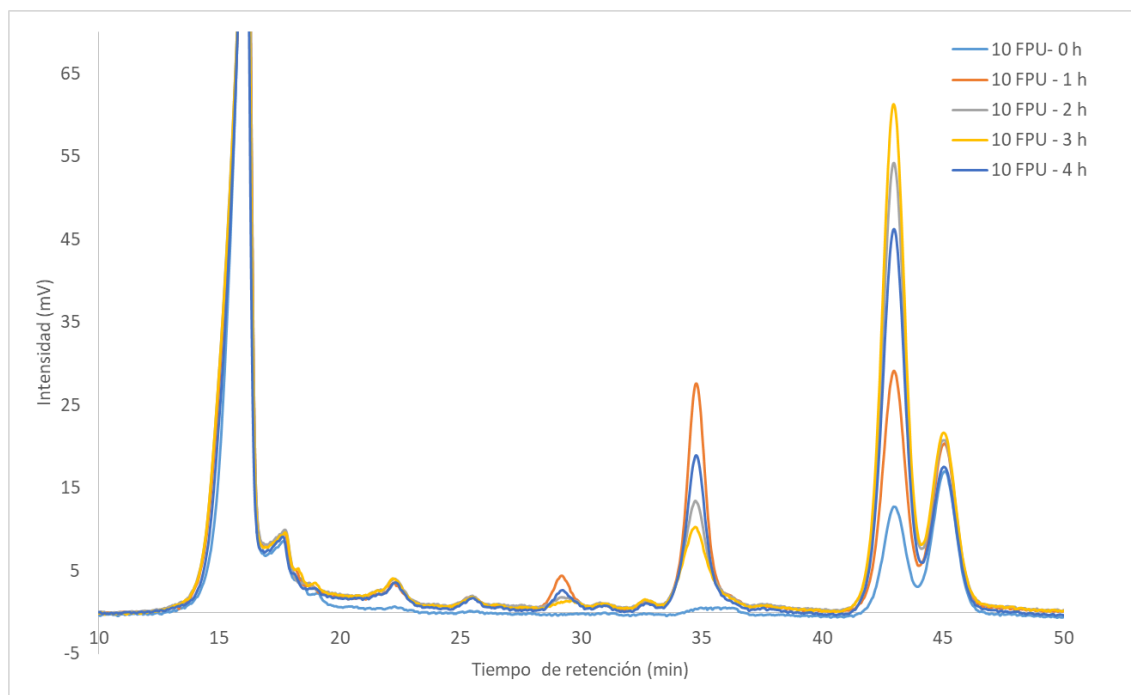


Tabla 1. Rendimientos obtenidos en la hidrólisis enzimática de la pulpa pretratada mediante autohidrólisis a 150 °C con una dosis de enzima de 1 FPU/g de materia seca, usando una estrategia multi-etapa con reemplazamientos del medio a diferentes intervalos. Se incluyen los valores de rendimiento en glucosa (RHEG), rendimiento en oligosacáridos (RHEOS), rendimiento total (RHET) y selectividad del proceso en la obtención de oligosacáridos (OS_{selectividad})

Estrategia	Fase	RHE _G (%)	RHE _{OS} (%)	RHET (%)	OS _{selectividad} (%)	Glucosa generada (mg/mL)	OS generados (mg/mL)
6/6 h	6h	2.18 ± 0.05	7.87 ± 0.20	10.05 ± 0.25	78.34 ± 0.00	-	-
	12h	2.69 ± 0.09	6.63 ± 0.28	9.32 ± 0.19	71.13 ± 1.52	0.98 ± 0.04	1.04 ± 0.28
	18h	2.70 ± 0.05	5.53 ± 0.25	8.24 ± 0.19	67.15 ± 1.42	0.47 ± 0.01	0.37 ± 0.02
	24h	5.17 ± 0.12	9.77 ± 0.24	14.94 ± 0.36	65.38 ± 0.04	0.30 ± 0.01	0.35 ± 0.15
4/6/6/8 h	4h	1.24 ± 0.16	7.12 ± 0.79	7.12 ± 0.79	82.58 ± 0.26	-	-
	10h	3.17 ± 0.45	8.08 ± 0.13	11.25 ± 0.59	71.98 ± 2.55	1.43 ± 0.37	1.94 ± 0.33
	16h	2.85 ± 0.13	5.50 ± 0.87	8.35 ± 1.00	65.57 ± 2.55	0.64 ± 0.09	0.39
	24 h	6.16 ± 0.55	10.15 ± 0.35	16.31 ± 0.20	62.25 ± 2.93	0.51 ± 0.10	0.46
4/4 h	4h	1.84 ± 0.01	6.96 ± 0.42	8.80 ± 0.43	79.09 ± 0.94	-	-
	8h	2.01 ± 0.20	6.59 ± 0.50	8.59 ± 0.70	76.68 ± 0.42	0.74 ± 0.03	1.77 ± 0.20
	12h	2.68 ± 0.01	6.30 ± 0.37	8.97 ± 0.39	70.10 ± 1.15	0.48 ± 0.01	0.08
	16 h	1.66 ± 0.06	3.65 ± 0.10	5.31 ± 0.16	68.71 ± 0.19	0.24 ± 0.04	0.35 ± 0.05
	20h	1.19 ± 0.06	2.28 ± 0.05	3.47 ± 0.10	65.72 ± 0.62	0.13 ± 0.01	0.05 ± 0.01
	24 h	2.32 ± 0.08	4.18 ± 0.16	6.49 ± 0.23	64.33 ± 0.10	0.14 ± 0.00	0.18 ± 0.02

Anexo IV. Publicaciones

Publicaciones en revistas

Díaz, S., Ortega, Z., Benítez, A. N., Costa, D., Carvalheiro, F., Fernandes, M. C., & Duarte, L. C. (2021). Assessment of the effect of autohydrolysis treatment in banana's pseudostem pulp. *Waste Management*, 119, 306 [10.1016/j.wasman.2020.09.034](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.034)

Waste Management 119 (2021) 306–314



Contents lists available at ScienceDirect

Waste Management

journal homepage: www.elsevier.com/locate/wasman



Assessment of the effect of autohydrolysis treatment in banana's pseudostem pulp



Sara Díaz^a, Zaida Ortega^a, Antonio N. Benítez^a, Diogo Costa^b, Florbela Carvalheiro^b, Maria C. Fernandes^{c,d}, Luís C. Duarte^{b,*}

^a Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Edificio de Fabricación Integrada, Parque Científico – Tecnológico de la ULPGC, Campus universitario de Tafira Baja, 35017, Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain

^b LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia, Unidade de Bioenergia, Estrada do Paço do Lumiar, 22, 1649-038 Lisboa, Portugal

^c Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo (CEBAL)/Instituto Politécnico de Beja (IPBeja), Apartado 6158, 7801-908 Beja, Portugal

^d MED – Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development, CEBAL – Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-Alimentar do Alentejo, Apartado 6158, 7801-908 Beja, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2020

Revised 20 August 2020

Accepted 20 September 2020

Available online 22 October 2020

Keywords:

Autohydrolysis

Banana wastes

Biomass pretreatment

Biorefinery

Enzymatic digestibility

Oligosaccharides

ABSTRACT

Banana's pseudostem pulp (BPP) is a potential by-product obtained in the mechanical fiber extraction of banana's pseudostem. Its chemical characterization revealed to have an interesting composition, with a high polysaccharides content and low content in lignin, which makes it particularly relevant for the biorefinery's biochemical platform. Autohydrolysis pretreatment, studied under isothermal (140 °C) and non-isothermal conditions (140–220 °C), yielded oligosaccharides, mainly gluco-oligosaccharides, as the main soluble products. The highest oligosaccharides production (24 g/100 g raw material) was obtained at a severity factor of 2.3. Autohydrolysis pretreatment effectively disrupted the structure of the material, inducing an improvement of the enzymatic digestibility from 73% for the raw material up to 90% for the most severe conditions. Two stage autohydrolysis, with increasing severity, was also studied, allowing to obtain a higher amount of oligosaccharides (32 g/100 g raw material) and higher digestibility of the remaining solid (up to 97%).

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, there has been an increasing trend towards more efficient utilization of agro-industrial residues. Banana is cultivated over 130 countries, being the second largest produced fruit, after citrus (Mohapatra et al., 2010), and its residues are available around the world (Gabhane et al., 2014), including in Europe. Global production reached a record of 114 million tons in 2017 (FAO). Canary Islands is the largest banana producer region in the European Union, with 0.4 million tons of bananas produced each year (ASPROCAN).

As banana plants only bear fruit once in its lifecycle, once they have been harvested the plant is cut, producing significant amounts of agricultural residues. For each ton of fruit harvested, around four tons of lignocellulosic wastes are generated, among

which 75% consists of banana plant pseudostem (Souza et al., 2014). This by-product is sometimes processed into low-grade animal feed by local farmers and has been used to produce various handicrafts, eating utensils, food wrapping, etc. (Santa-Maria et al., 2013); however in most cases it is usually left in the plantation, producing wastes accumulation and having no nutritional value for the soil. An interesting strategy to manage these wastes is the development of new applications, which could also represent an interesting income for banana producers, thus boosting the regional economy (Oliveira et al., 2007), particularly in the Canary Islands, where banana crop is an essential socio-economic pillar.

Mechanical fiber extraction is one of the most relevant alternatives proposed for the valorization of the pseudostem (Saraiva et al., 2012). This material contains 90% of moisture, 0.6% of fiber and 9.4% of pulp (Benítez et al., 2013). Banana fiber has high strength, lightweight, low elongation and shiny appearance, among other textile qualities (Sengupta et al., 2019) and it has been proven in different applications like composite materials (Ortega et al., 2013). Fiber extraction also produces important amount of a lignocellulosic by-product, banana's pseudostem pulp (BPP), which is the raw material in this study, and whose charac-

* Corresponding author.

E-mail addresses: sara.diazguzman@ulpgc.es (S. Díaz), zaida.ortega@ulpgc.es (Z. Ortega), antonioizardo.benitez@ulpgc.es (A.N. Benítez), florbela.carvalheiro@lneg.pt (F. Carvalheiro), maria.fernandes@cebal.pt (M.C. Fernandes), luis.duarte@neg.pt (L.C. Duarte).

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.034>

0956-053X/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Díaz, S., Benítez, A. N., Ramírez-Bolaños, S., Robaina, L., & Ortega, Z. (2021). Optimization of banana crop by-products solvent extraction for the production of bioactive compounds. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-12 <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01703-7>

Biomass Conversion and Biorefinery
<https://doi.org/10.1007/s13399-021-01703-7>

ORIGINAL ARTICLE



Optimization of banana crop by-products solvent extraction for the production of bioactive compounds

Sara Díaz¹ · Antonio N. Benítez¹ · Sara Ramírez-Bolaños² · Lidia Robaina² · Zaida Ortega¹

Received: 6 April 2021 / Revised: 18 June 2021 / Accepted: 26 June 2021
 © The Author(s) 2021

Abstract

The aim of this work is the optimization of phenolic compound extraction from three by-products of banana crops (rachis, discarded banana, and banana's pseudostem pulp), as a way to valorize them through a green extraction process. The influence of the temperature and aqueous ethanol concentration (Et-OH) on extract properties (total phenol content (TPC) and antioxidant activity) was firstly analyzed. 78 °C and ethanol concentrations close to 50% yielded the best results for the three materials. The equations obtained by the response surface methodology gave a satisfactory description of the experimental data, allowing optimizing the extraction conditions. Under optimized conditions, time influence was then assessed, although this parameter seemed not influence results. Among the three by-products, rachis extract (60% Et-OH, 78 °C, and 30 min) presented the highest TPC (796 mg gallic acid/100 g of dried material) and antioxidant activity (6.51 mg Trolox equivalents/g of dried material), followed by discarded banana, and pseudostem pulp. Under the optimal conditions, experiments were performed at a larger scale, allowing to determine the extraction yields (EY) and to characterize the extracts. The highest EY was obtained for the rachis (26%), but the extract with the highest activity was obtained for discarded banana (50% Et-OH, 78 °C, and 60 min), which presented a TPC of 27.26 mg/g extract corresponding to 54.59 mg Trolox equivalents/g extract. This study contributes to the valorization of banana crops residues as a source of polyphenolic compounds with bioactive functions that can be extracted under economic extraction conditions.

Keywords Banana wastes · Biomass valorization · Antioxidant extraction · Response surface methodology · Polyphenolic compounds · DPPH activity

1 Introduction

The agricultural production and the agro-food industry produce large volumes of residues and their utilization for the production of value-added products has received much attention in recent years. One example of it is the banana cultivation. Banana is cultivated over 130 countries and it is the second largest produced fruit, after citrus [1], with an estimated gross production exceeding 116 million tons [2]. Particularly, in the Canary Islands, 400, 000 tons of banana are produced each year [3], being the largest banana producer in the European Union.

Banana crops produce a great amount of wastes at the farming site (pseudostem, leaves, and inflorescences), because of the necessity of decapitation of the whole plant so that the young suckers can replace the mother plant, and at the processing sites (rachis and discarded bananas) where the fruit is packaged. Around four tons of wastes are generated for each ton of fruit harvested [4]. Such amount of

✉ Sara Díaz
sara.diazguzman@ulpgc.es

Antonio N. Benítez
antonionizardo.benitez@ulpgc.es

Sara Ramírez-Bolaños
sara.ramirez@ulpgc.es

Lidia Robaina
lidia.robaina@ulpgc.es

Zaida Ortega
zaida.ortega@ulpgc.es

¹ Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Edificio de Fabricación Integrada, Parque Científico – Tecnológico de la ULPGC, Campus universitario de Tafiira Baja, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Spain

² Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA), IU-ECOQUA, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Crta. Taliarte s/n, 35214 Telde, Spain

Ramírez-Bolaños, S., Pérez-Jiménez, J., Díaz, S., & Robaina, L. (2021). A potential of banana flower and pseudo-stem as novel ingredients rich in phenolic compounds. *International Journal of Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15072>



International Journal of Food Science and Technology 2021

Original article

A potential of banana flower and pseudo-stem as novel ingredients rich in phenolic compounds

Sara Ramírez-Bolaños,^{1*} Jara Pérez-Jiménez,² Sara Díaz³ & Lidia Robaina¹

¹ Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA), IU-ECOAQUA, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Crta. Taliarte s/n, Telde 35214, Spain

² Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, Madrid 28040, Spain

³ Fabricación Integrada y Avanzada Research Group, Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria 35017, Spain

(Received 28 January 2021; Accepted in revised form 27 April 2021)

Keywords Banana flower, banana pseudo-stem, extractable polyphenols, non-extractable polyphenols.

Introduction

World banana production in 2017–2019 reached 116 million tonnes, making it the most important fruit production worldwide (FAO, 2020). Due to the way bananas are harvested, the amount of waste generated in the plantations reaches 80% of the total biomass (Padam *et al.*, 2014), constituting both an environmental problem related to soil toxicity and elevated carbon print (Adsal *et al.*, 2020) and a food safety problem derived from food waste management (Campos *et al.*, 2020). Interest in banana residues has been renewed in recent times mostly due to their variety of bioactive compounds (Lau *et al.*, 2020), apart from the emerging uses of banana plant fibre in several industries (Ortega *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2020); all these usages and its processes generate waste as a secondary by-product after processing. The utilisation of these secondary by-products fit with the current FAO ODS actions on the Circular Economy (FAO, 2018).

Polyphenols are the most common bioactive compounds in plant residues (Singh *et al.*, 2016; Lau *et al.*, 2020). They are secondary metabolites with biological activities such as radical scavenging ability or microbiota modulation, which results in health benefits related to glucose homeostasis, obesity, type II diabetes, systemic inflammation or lipid metabolism, besides their use as a natural preservative (Cao *et al.*, 2019; Fraga *et al.*, 2019; Lau *et al.*, 2020). Interest in polyphenols have been traditionally focussed on the so-called extractable polyphenols (EPP), that is, low

molecular weight compounds present free in vegetal cells, although increasing evidence is showing the relevance of non-extractable polyphenols (NEPP) or macromolecular antioxidants, which are high molecular weight polyphenols or small ones associated with macromolecules such as protein or dietary fibre (Pérez-Jiménez *et al.*, 2013).

Among agricultural residues from banana production are the banana flowers, which arise upon the bracts axis of the inflorescence (Ram *et al.*, 1962) and cut down when they reach a specific size so that they do not interfere with the ripening and growth of the fruit (Lau *et al.*, 2020), and the whole pseudo-stem, which is left on the ground of the plantation. These by-products have been widely used in traditional medicine (Mathew & Negi, 2017; Lau *et al.*, 2020). There are currently several studies on the inclusion of banana by-products in animal and human diets. For instance, banana leftovers were used to replace up to 75% of the cornmeal in lamb diets without causing adverse effects (Menezes *et al.*, 2018). Likewise, several studies with pseudo-stem show that it can be considered as an alternative source to traditional livestock fodder (Wang *et al.*, 2016). The banana flower has been studied for its antioxidant and anti-diabetic capacity (Lau *et al.*, 2020); thus Bhaskar *et al.* (2012) showed that both, banana pseudo-stem and banana flower used as a dietary supplement in patients with diabetes may reduce associated complications.

Nevertheless, studies on the phytochemical characterisation of banana flower or banana pseudo-stem are still scarce. Thus, Bashkar *et al.* (2012) is the only found study with these two banana by-products

*Correspondent: E-mail: sara.ramirez@ulpgc.es

Díaz, S., Ortega, Z., Benítez, A., Marrero, M., Carvalheiro, F., Duarte, L., Matsakas, L., Krikigianni, E., Rova, U., Christakopoulos, P., Fernandez, M. Oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of banana pseudostem pulp. El artículo fue enviado a la revista *Biomass Conversion and Biorefinery* (16/06/2021). Se han recibido los comentarios de los revisores y, con fecha 24-09-2021, se han enviado las correcciones solicitadas y se espera su aceptación y publicación en breve.

Publicaciones en congresos

Autores: S. Díaz (1), L. Robaina (2), Z. Ortega (3), A. N. Benítez (4), S. Ramírez (5) M.D. Marrero (6), N. Díaz (7)

Título: Characterization and alkaline pretreatment of the pulp obtained from the pseudostem of banana plant

Tipo de participación: Ponencia

Congreso: 2nd International Conference on Chemical and Biochemical Engineering (ICCBE2)

Lugar celebración: Las Palmas de Gran Canaria

Fecha: 24-26 de julio de 2017

Autores: Díaz, S.; Ortega, Z.; Marrero, M. D.; Costa, D.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Oliveira, C.; Gírio, F.M.; Fernandes, M.C.; Benítez, A. N.

Título: Upgrade of banana's pseudostem pulp I. selective fractionation of hemicellulose and lignin

Tipo de participación: Póster

Congreso: 4th Iberoamerican Congress on Biorefineries (4-CIAB)

Lugar celebración: Jaen

Fecha: 24-26 de octubre de 2018

Autores: Díaz, S.; Benítez, A. N.; Ortega, Z.; Marrero, M. D. ; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C., Fernandes, M.C

Título: Upgrade of banana's pseudostem pulp II. enzymatic hydrolysis

Tipo de participación: Póster

Congreso: 4th Iberoamerican Congress on Biorefineries (4-CIAB)

Lugar celebración: Jaen

Fecha: 24-26 de octubre de 2018

Autores: S. Díaz, Z. Ortega, A.N. Benítez, S. Ramírez and M.C Fernandes

Título: Characterization of banana crop's by- products

Tipo de participación: Póster

Congreso: 5th International Conference - WASTES: Solutions, Treatments and Opportunities

Lugar celebración: Lisboa

Fecha: 4-6 de septiembre de 2019