



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**FRACCIONAMIENTO HIDROTHERMAL DE
ZANAHORIA EN PLANTA PILOTO Y SEPARACIÓN
POR MEMBRANAS DE ULTRAFILTRACIÓN**

Autora:

Aguilera Torre, Beatriz

Tutores:

García Serna, Juan

**Departamento de Ingeniería Química y
Tecnología del Medio Ambiente.**

Andrés Iglesias, Cristina

**Instituto Universitario de Oftalmobiología
Aplicada (IOBA)**

Valladolid, septiembre 2020.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



Resumen

Las zanahorias descartadas son un residuo de gran potencial, porque solo se recuperan un 30% para la alimentación animal de alrededor de 120 kt/a que se desechan en España. Es buen candidato para la valorización en una biorrefinería orientada a productos de alto valor añadido.

La zanahoria se licuó para separar el zumo de la pulpa. El zumo se sometió a diafiltración para la obtención de una fracción rica en azúcares y otra en carotenoides. Los carotenoides fueron encapsulados mediante dos técnicas, secado por atomización y liofilización. La fracción rica en azúcar se fermentó con microorganismos autóctonos, con bacterias de ácido láctico y con levaduras, obteniéndose ácido láctico y etanol.

La pulpa se introdujo en una planta de extracción hidrotermal a 140°C, 160°C y 180°C durante 80 minutos. El líquido obtenido paso por ultrafiltración y diafiltración con membranas. Donde se obtuvieron hemicelulosa y pectinas de alta calidad y diferentes pesos moleculares controlados.

Palabras clave

Biorrefinería; Tratamiento Hidrotermal; Hemicelulosa; Carotenoides; Fermentación.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



Abstract

Discarded carrots are a residue with great potential, since only 30% of it is recovered for its use as animal food from the 120 kt/a that are thrown away in Spain. Thus, it is a good candidate for valorization in a biorefinery orientated to produce high added value products.

The carrot was liquidised to separate juice from pulp. The juice was diafiltrated to enrich in two fractions of sugars and carotenoids. The carotenoid fraction was encapsulated using two different techniques, lyophilization and spray drying. The fraction rich in sugars went through fermentation with autochthonous microorganisms, with lactic acid bacteria and with yeast, obtaining lactic acid and ethanol.

The pulp was placed in a plant of hydrothermal extraction at 140 °C, 160 °C and 180 °C for 80 minutes. The hydrolysate obtained was ultrafiltrated and diafiltrated using membranes, obtaining fractions rich in hemicellulose and pectins with controlled molecular weights.

Keywords

Biorefinery; Hydrothermal Treatment; Hemicellulose; Carotenoids; Fermentation.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



ÍNDICE

ÍNDICE	7
1 INTRODUCCIÓN	15
2 OBJETIVOS	21
3 ANTECEDENTES GENERALES	25
4 MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1. Origen y acondicionamiento de la materia prima	39
4.2 Caracterización de la materia prima: pulpa y zumo	39
4.3 Tratamiento Hidrotermal	41
4.4 Concentración, separación y purificación de las hemicelulosas y las pectinas por ultrafiltración/diafiltración	43
4.5 Separación de azúcares y pigmentos por diafiltración	48
4.6. Encapsulación y secado de pigmento	49
4.7. Fermentación de la fracción de azúcar	51
4.8. Análisis	53
4.8.1 Composición química	53
4.8.2 Distribución del peso molecular	54
4.8.3 Contenido en carotenoides totales (TCC)	54
5 RESULTADOS	59
5.1. Caracterización de la materia prima: pulpa y zumo	59
5.2 Extracción de hemicelulosas, pectinas, azúcares libres y subproductos de la pulpa de zanahoria.	60
5.2.1 Arabinogalactanos, pectinas, azúcares libres y subproductos	60
5.2.2 Sacarosa, glucosa y fructosa	64
5.2.3 Subproductos	67
5.2.4 Rendimiento de extracción (wt%) de arabinogalactanos, pectinas y azúcares libres.	71
5.2.5 Distribución del peso molecular de los extractos	73
5.3 Ultrafiltración y diafiltración	77
5.3.1 Composición y distribución de peso molecular de los extractos usados como alimentación de las membranas	77



5.3.2 Aumento de la concentración tras la ultrafiltración y diafiltración .	81
5.3.3 Separación tras la ultrafiltración y diafiltración.....	83
5.3.4 Purificación tras diafiltración	86
5.3.5 Caracterización química y molecular de los productos finales obtenidos.....	89
5.4 Separación de azúcares y carotenoides	93
5.4.1 Contenido de azúcares en los ciclos de diafiltración.....	93
5.5 Encapsulación y secado de pigmentos del zumo.....	94
5.5.1 Degradación de los carotenoides totales durante el secado y el almacenamiento	94
5.5.2 Solubilidad en agua de pigmentos encapsulados.....	96
5.5.3 Caracterización estructural de los pigmentos (FTIR)	97
5.6 Fermentación de la fracción rica en azúcar	101
6 CONCLUSIONES	107
7 BIBLIOGRAFÍA.....	111
ANEXO I	117



Índice de figuras.

Figura 1 Estructura de la lignocelulosa (Julien et al., 2017)	26
Figura 2 Estructura de la celulosa(Julien et al., 2017)	26
Figura 3 Hexosas y pentosas típicas de la hemicelulosa(Julien et al., 2017).27	
Figura 4 (a) Mecanismo de la ruptura de la pared celular (b) Difusión de los solventes en la estructura(Shirsath et al., 2012)	28
Figura 5 Tornillo extrusor de biomasa (Zeitoun et al., 2010)	29
Figura 6 Pigmentación típica de los alimentos (Carotenóides, n.d.).....	31
Figura 7 Estructuras químicas de los principales carotenoides. (biochemtech, 2020)	32
Figura 8 Diagrama de MAE: (1) Microondas ; (2) matraz con biomasa licuada y disolvente ; (3) condensador externo ; (4) Matraz externo; y (5) Controlador de temperatura (Hiranvarachat & Devahastin, 2014).	33
Figura 9 Planta piloto donde se llevó a cabo la extracción.....	42
Figura 10 Diagrama de flujo de la planta de extracción Hidrotermal	43
Figura 11 Diagrama del proceso de Ultrafiltración y Diafiltración para 140°C y 160°C.....	46
Figura 12 Diagrama del proceso de Ultrafiltración y Diafiltración a 180°C.....	47
Figura 13 Diafiltración zumo de zanahoria para la obtención de azúcares y pigmentos.	48
Figura 14 Diagrama de flujo del secadero usado para la obtención de pigmentos	50
Figura 15 Liofilizador usado para liofilizar los productos obtenidos.....	51
Figura 16 Fermentación de zumo con los microorganismos.....	52
Figura 17 Extracción hidrotermal a 180°C (g/kg de pulpa seca) de hemicelulosas, azúcares libres, pectinas y subproductos.	61
Figura 18 Extracción hidrotermal a 160°C (g/kg de pulpa seca) de hemicelulosas, azúcares libres, pectinas y subproductos.	62
Figura 19 Extracción hidrotermal a 140°C (g/kg de pulpa seca) de hemicelulosas, azúcares libres, pectinas y subproductos.....	64
Figura 20 Extracción hidrotermal a 180°C (g/kg de pulpa seca) de glucosa, sacarosa y fructosa.....	65
Figura 21 Extracción hidrotermal a 160°C (g/kg de pulpa seca) de glucosa, sacarosa y fructosa.....	66
Figura 22 Extracción hidrotermal a 140°C (g/kg de pulpa seca) de glucosa, sacarosa y fructosa	67
Figura 23 Extracción hidrotermal a 180°C (g/kg de pulpa seca) de ác,fórmico, ác.acético, ác.acrílico, 5-HMF,furfural, glicolaldehído, arabinosa, ác.levulínico.	68



Figura 24 Extracción hidrotermal a 160°C (g/kg de pulpa seca) de ác,fórmico, ác.acético, ác.acrílico, 5-HMF,furfural, glicolaldehido, arabinosa, ác.levulínico.	69
Figura 25 Extracción hidrotermal a 140°C (g/kg de pulpa seca) de ác,fórmico, ác.acético, ác.acrílico, 5-HMF,furfural, glicolaldehido, arabinosa, ác.levulínico.	70
Figura 26 Rendimiento de la extracción de 180°C de hemicelulosa, pectinas y azúcares libres.	72
Figura 27 Rendimiento de la extracción de 160°C de hemicelulosa, pectinas y azúcares libres.	72
Figura 28 Rendimiento de la extracción de 140°C de hemicelulosa, pectinas y azúcares libres.	73
Figura 29 Distribución del peso molecular en la salida del reactor a 180°C..	74
Figura 30 Distribución del peso molecular en la salida del reactor a 160°C..	75
Figura 31 Distribución del peso molecular en la salida del reactor a 140°C..	76
Figura 32. Distribución de pesos moleculares de los tres ensayos.	80
Figura 33 Concentración de los grupos de moleculares de la extracción a 180°C tras la ultrafiltración.	82
Figura 34 Concentración de los grupos de moleculares de la extracción a 160°C tras la ultrafiltración.	82
Figura 35 Concentración de los grupos de moleculares de la extracción a 140°C tras la ultrafiltración.	83
Figura 36 Hemicelulosas y pectinas obtenidas tras la ultrafiltración/diafiltración. (A) entre 30-10 KDa (B) entre 10-5 KDa (C) 5-1 KDa (D) 10-5 KDa.	92
Figura 37 De izquierda a derecha: (vial 1) Pigmentos sin encapsular liofilizados, (vial 2) pigmento con encapsulante 1:1 secados en el secadero; (vial 3) pigmento con encapsulante 1:0,5 liofilizados; (vial 4) pigmento con encapsulante 1:1 liofilizados; (vial 5) pigmento con encapsulante 1:1,5 liofilizados. En la figura se puede ver esos pigmentos en detalle.	95
Figura 38 Pigmentos obtenidos en detalle.	96
Figura 39 Solubilidad en tiempo 0 de los carotenoides.	97
Figura 40 Solubilidad tras 7 días de los carotenoides.	97
Figura 41 FTIR de los pigmentos y azúcar	100
Figura 42 Esquema de los diferentes procesos que se siguieron y productos que se obtuvieron.	107



Índice de Tablas.

Tabla 1 Composición de la alimentación de las membranas tras la extracción	78
Tabla 2 Recuperación de grupos moleculares a 180°C	84
Tabla 3 Recuperación de grupos moleculares a 160°C	85
Tabla 4 Recuperación de grupos moleculares a 140°C	86
Tabla 5 Recuperación de arabinogalactanos, pectinas, azúcares libres y subproductos a 180°C	87
Tabla 6 Recuperación de arabinogalactanos, pectinas, azúcares libres y subproductos a 160°C	88
Tabla 7 Recuperación de arabinogalactanos, pectinas, azucare libres y subproductos a 140°C	88
Tabla 8 Caracterización de los productos finales obtenidos tras UF/DF a 180°C	90
Tabla 9 Caracterización de los productos finales obtenidos tras UF/DF a 160°C	91
Tabla 10 Caracterización de los productos finales obtenidos tras UF/DF a 140°C	92
Tabla 11 Evolución de los azúcares con las distintas diafiltraciones	93
Tabla 12 Degradación de los sólidos dependiendo del tipo de secado tras 15 días guardados	95
Tabla 13 Producción (g/L)	103
Tabla 14 Productividad (g/L/h)	103
Tabla 15 Rendimiento (g/g sustrato)	104
Tabla 16 Fermentación sin microorganismos.	117
Tabla 17 Fermentación sin microorganismos con sal.	117
Tabla 18 Fermentación con Lactobacillus.	117
Tabla 19 Fermentación con Lactobacillus con sal.	118
Tabla 20 Fermentación con Saccharomyces cerevisiae.	118
Tabla 21 Fermentación Saccharomyces cerevisiae con sal.	118
Tabla 22 Comparativa del azúcar que hay antes y después de la fermentación.	118



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

1. INTRODUCCIÓN



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



1 INTRODUCCIÓN

Los problemas sujetos a la dependencia de los hidrocarburos procedentes de fuentes no renovables como el petróleo, afectan a nuestra sociedad en multitud de campos. Por suerte, la población cada vez está más concienciada y se empiezan a buscar alternativas para poder reducir su uso, y que en un futuro lleguen a ser sustituidos por materiales que tengan el mínimo impacto en el medio ambiente y en nuestra salud. El objetivo, en último término será, alcanzar una economía circular sostenible.

PETRÓLEO COMO FUENTE DE ENERGÍA

El hecho de que el petróleo sea una fuente de recursos no renovables de la que hasta la fecha no podemos prescindir es un factor crítico. Las alternativas actuales están implantándose de manera muy lenta debido a, entre otras cosas, su alto coste. Por ejemplo, la competitividad económica del coche eléctrico es inferior a la de los vehículos de combustión debido a su alto coste de adquisición, además de los problemas tecnológicos como pueden ser el tiempo de recarga o la falta de una infraestructura adaptada. Otro ejemplo es la obtención de energía eléctrica mediante placas solares o aerogeneradores, la cual tiene el problema de no ser una fuente constante de energía debido a que depende de las condiciones climáticas teniendo, además, un retorno de la inversión muy lento (normalmente entre 8 y 12 años según la instalación).

Un problema distinto se da en la obtención del petróleo mediante el método de fracking. El fracking consiste en la fracturación de la roca mediante un fluido a presión. Este fluido puede provocar fugas que conllevan la contaminación de acuíferos, extendiéndose por la red fluvial. También existen evidencias de peligro sísmico, como consecuencia de la actividad de fracturación hidráulica.

En otro orden, ocasionalmente se producen fallos en el transporte del petróleo, como fue el caso del desastre natural ocasionado por el Prestige. Esto se sumaría a la gran cantidad de residuos que se generan de su uso. A modo de ejemplo, destaca el CO₂ producido de la combustión de los hidrocarburos, y su papel en el cambio climático, o el residuo plástico también obtenido del petróleo.



PETRÓLEO COMO FUENTE DE PRODUCTOS

El petróleo forma parte de una gran cantidad de productos de uso cotidiano, como lubricantes, asfaltos, ceras, fertilizantes, cosméticos fabricados con elementos obtenidos del petróleo, colorantes como glicerol, propilenglicol, derivados del petróleo, que están presentes en productos alimentarios. Mención aparte se puede hacer a la obtención de plásticos, presentes en casi cualquier objeto de nuestra vida desde embalajes, bolsas, juguetes, artículos tecnológicos, coches y un largo etcétera.

Todos estos productos derivados del petróleo son fundamentales para el ser humano, pero tienen sus problemas asociados. La mayor parte de los artículos mencionados no cuentan con un proceso de reciclado específico adecuado y en algunos casos, como el plástico de un solo uso, su vida útil es muy corta. Esta situación ha llevado a la comunidad global a buscar una solución alternativa para estos productos que hoy en día suponen un grave problema medioambiental, vertiéndose la mayoría de ellos sin ningún tipo de tratamiento al mar, lo que provoca un impacto negativo en la biodiversidad de estas zonas.

El gran impacto que supone el uso del petróleo lleva a considerar en el presente trabajo el uso de biomasa residual como recurso alternativo para la obtención de productos de alto valor añadido. La biomasa residual suple los principales problemas mencionados anteriormente por ser un recurso renovable, no contaminante y de fácil obtención. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el uso de biomasa residual para su valorización no tiene por qué entrar en competencia directa con otro posible uso en la industria alimentaria, es por ello que es un requisito indispensable que se trate de un residuo.

En este proyecto, se eligió la zanahoria por su gran potencial a la hora de su valorización (Sagar et al., n.d.). En España se cultivan unas 420 kt/a de zanahorias, de las cuales casi el 30% se descarta por tamaño, forma, color o porque sufren algún daño. Cuando han pasado esta primera criba del productor todavía puede haber camiones rechazados por el distribuidor al no cumplir alguno de los estándares o especificaciones de calidad pactados. Sólo una pequeña parte se valoriza destinándola a la alimentación animal, pero la gran mayoría termina vertiéndose en el campo, lo que representa un



daño ambiental debido al proceso de descomposición que se produce casi inmediatamente (es un producto muy perecedero), además de generar muy malos olores y atraer insectos y roedores.

A nivel estructural las zanahorias están compuestas por pectina (3.88%), hemicelulosas (12.3%), celulosa (51.6%) y lignina (32.2%) (Nawirska & Kwaśniewska, 2005) y contiene carotenoides (β -caroteno y α -caroteno, característico color naranja). Otros compuestos minoritarios son proteínas, lípidos, minerales, vitaminas y aminoácidos.

Por estas razones se plantea el uso de zanahoria como materia prima de una biorrefinería. Se puede definir biorrefinería como una industria integrada que, usando biomasa como materia prima y una variedad de tecnologías diferentes, produce energía y/o biocombustibles, a la par de productos químicos, materiales, alimentos y piensos (BioPlat. et al., 2017).

La creación de una biorrefinería basada en residuos de descartes de zanahoria permitiría:

- 1) La obtención de hemicelulosa para la producción de biofilms que puedan sustituir a parte de los films plásticos en la actualidad.
- 2) Conseguir pigmento natural de los carotenos como sustitutivo a colorantes artificiales.
- 3) Fermentación del azúcar residual produciendo bioetanol o ácido láctico.

Todos estos aspectos impulsaron la elección de esta materia prima como potencial estudio para una biorrefinería orientada a la obtención de productos de alto valor añadido.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



2. OBJETIVOS



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



2 OBJETIVOS

El objetivo principal es revalorizar descartes de zanahorias a través de una biorrefinería orientada a productos.

Este objetivo se alcanzará con los siguientes objetivos específicos:

1. Separar la pulpa y el zumo y realizar tratamientos diferentes específicos para cada uno de ellos.
2. Someter a pulpa a extracción hidrotermal a distintas temperaturas para obtener hemicelulosa y pectinas de alta calidad y con una amplia distribución de pesos moleculares.
3. Someter los extractos hidrotermales a un sistema de ultrafiltración/diafiltración en varias etapas para la obtención de múltiples fracciones de hemicelulosas y pectinas de alta calidad.
4. Obtener una fracción sólida estabilizada de carotenoides a partir del zumo.
5. Recuperar los azúcares libres del zumo para el estudio de distintas opciones de fermentación y los productos obtenidos a partir de ellas.

Este trabajo se enmarca en la tesis doctoral de Marta Ramos Andrés.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



3. ANTECEDENTES GENERALES



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



3 ANTECEDENTES GENERALES

Se define como biomasa vegetal aquellos productos y residuos de materia vegetal procedentes de distintas actividades cuyo contenido energético se puede valorizar. Anualmente se producen unos 5.000 millones de toneladas de biomasa residual provenientes del sector agrícola (UNEP, s.f.) Los residuos de este tipo de actividades se suelen almacenar en vertederos donde se descomponen, lo que implica una inmovilización grande de tierra para este uso. La opción de quemar los residuos suele presentar dificultades en los casos de alto contenido en humedad, y en el resto de casos el problema radica no solo en la emisión de monóxido de carbono si no también la liberación de otros productos químicos nocivos como dioxinas o hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (CEC, 2014).

Siendo la biomasa una fuente importante de biopolímeros, cada vez se considera más interesante la valorización de este residuo mediante diferentes métodos de extracción de dichos biopolímeros, destacando las hemicelulosas. Muchas veces estos métodos de extracción de hemicelulosas requerirán un tratamiento posterior de concentración y purificación.

Estructuralmente la biomasa lignocelulósica se conforma mayoritariamente, por, celulosa, hemicelulosas y el biopolímero aromático lignina. También puede contener cantidades más pequeñas de pectinas, compuestos inorgánicos, proteínas y extractivos, como ceras y lípidos. Los porcentajes de estos componentes dependen de la especie, el tejido vegetal y el crecimiento de la biomasa. La celulosa forma microfibrillas que se mantienen unidas a la hemicelulosa y a la lignina mediante una combinación de enlaces de hidrógeno y covalentes como se puede observar en la Figura 1.

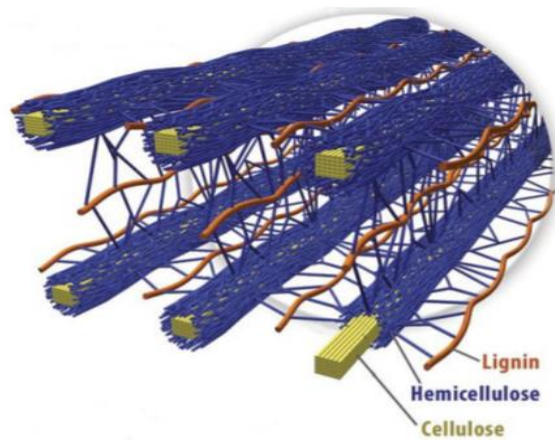


Figura 1 Estructura de la lignocelulosa (Julien et al., 2017).

Celulosa.

La celulosa es el polímero más abundante en la biomasa constituyendo el 30-50% de peso total. Es un polímero lineal formado por unidades de glucosa unidas por un enlace β -1,4 enlace glicosídico (Figura 2) En las cadenas lineales de celulosa existe interacciones de fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno, lo que le confiere un alto grado de empaquetamiento a las cadenas (Julien et al., 2017).

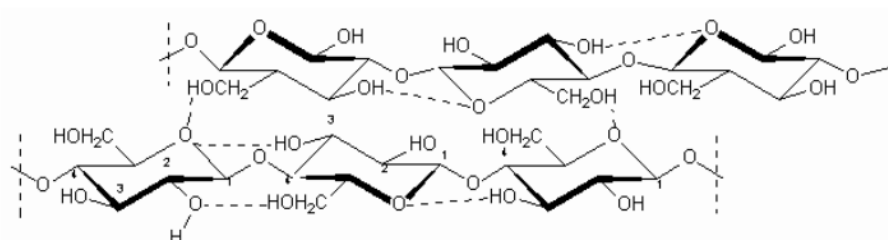


Figura 2 Estructura de la celulosa (Julien et al., 2017).

Hemicelulosa

La hemicelulosa constituye aproximadamente el 25% de la biomasa y tiene un peso molecular menor que la celulosa. Es un heteropolímero compuesto de azúcares de hexosa y pentosa (Figura 3), la cadena es más corta que en la celulosa y tiene ramificaciones con distintos grupos funcionales que varían

según la materia prima. La hemicelulosa se une de forma no covalente a la superficie de la celulosa (Julien et al., 2017).

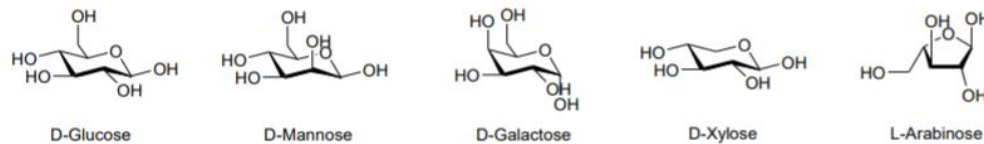


Figura 3 Hexosas y pentosas típicas de la hemicelulosa (Julien et al., 2017).

Lignina

Es un polímero aromático insoluble en agua que proporciona impermeabilidad y rigidez estructural a la biomasa protegiendo a la celulosa y hemicelulosa. Constituye sobre el 10-20% de la biomasa y está compuesta por unidades de fenilpropano (Julien et al., 2017).

Respecto a los métodos de extracción y purificación de hemicelulosa, biopolímero objetivo en el presente trabajo, pueden considerarse los siguientes:

- Extracción alcalina.

Es un método de tratamiento químico. Los compuestos de extracción alcalinos más usados son: hidróxido de calcio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco hidróxido de amonio, peróxido de hidrogeno y unas combinaciones de ellos.

Esta extracción se basa en la ruptura por hidrólisis de los enlaces de éster entre hemicelulosa y lignina evitando la fragmentación de los polímeros de hemicelulosa y permitiendo su extracción con alto peso molecular. La principal desventaja que tiene este tipo de extracción es la conversión de alcalinos en sales irrecuperables que posteriormente se incorporan a la biomasa (Behera et al., 2014).

- Ultrasonidos.

El uso de los ultrasonidos se basa en la difusión de ondas de presión en una biomasa en la cual se ha vertido un disolvente adecuado. En la biomasa se da el fenómeno conocido como cavitación, que consiste en generar pequeñas turbulencias en las burbujas de aire provocando que se expandan y propaguen creando corrientes internas. Debido al "espacio" limitado para que las burbujas se expandan, la mayoría de las burbujas colapsan asimétricamente en los vasos, lo que da lugar a importantes corrientes de circulación de líquido acopladas con intensas turbulencias (Figura 4). Estas corrientes derivan en la descomposición del material (Shirsath et al., 2012).

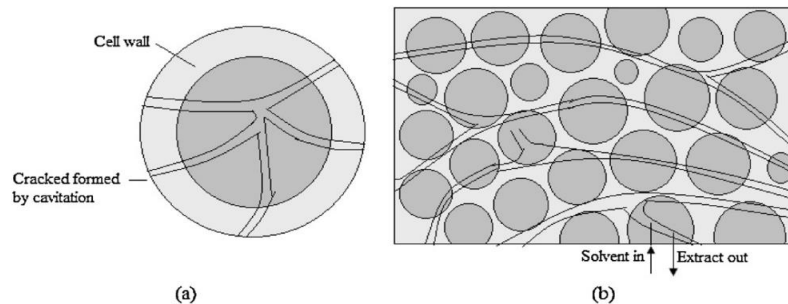


Figura 4 (a) Mecanismo de la ruptura de la pared celular (b) Difusión de los solventes en la estructura (Shirsath et al., 2012).

- Extrusión.

La extrusión de la biomasa se aplica por medio de tornillos, los cuales se empujan el material a través de un área lateral específica (Figura 5). A consecuencia del cizallamiento se rompe la estructura celular de la biomasa lo que mejora el acceso a la hemicelulosa de las sustancias extractoras, como el agua o el NaOH. La extrusión permite un gran control del desgaste que se aplica a la biomasa y la consiguiente extracción de hemicelulosa (Zeitoun et al., 2010).

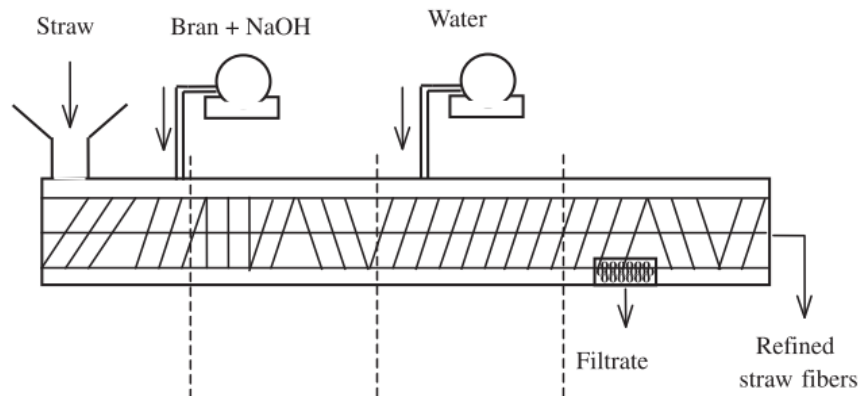


Figura 5 Tornillo extrusor de biomasa (Zeitoun et al., 2010)

- Choque de Vapor

Consiste en la introducción de la biomasa en una cámara donde el vapor de agua caliente la biomasa, el vapor se introduce en la cámara en unas condiciones de 140-180°C y 1-3,4 MPa. Esto, produce una descompresión súbita, donde la estructura rígida de la biomasa es destruida y se desfibra la hemicelulosa, mejorando así su accesibilidad. Este sistema tiene unos tiempos de residencia muy bajos comparados con los de otros tipos de extracción vistos anteriormente (Singh et al., 2014).

- Extracción con disolventes orgánicos.

Este sistema utiliza disolventes orgánicos que pueden ir mezclados con álcali o con agua para la extracción de la hemicelulosa. Los más comunes son; alcohólicos como metanol, etanol, etilenglicerol y glicerol o ácidos orgánicos como ácido acético, el ácido fórmico y el ácido oxálico. Este método tiene una alta tasa de recuperación de hemicelulosa de la biomasa, sin embargo los disolventes utilizados son altamente inflamables, lo que conlleva el uso de unas elevadas medidas de seguridad (Naidu et al., 2018).

- Tratamiento hidrotermal.

El tratamiento hidrotermal se basa en la extracción con agua caliente de la hemicelulosa de la biomasa. La hemicelulosa es soluble en agua y el agua caliente es capaz de romper los enlaces del éter en la biomasa con lo que la hemicelulosa queda libre para su extracción. Es un método exento de sustancias químicas y respetuoso con el medio



ambiente. (Naidu et al., 2018). Debido a estas características fue el escogido para el desarrollo del presente trabajo.

- Purificación de la hemicelulosa:

- Precipitación con solventes

Una de las formas de purificación de hemicelulosa es adicionando un disolvente orgánico miscible en agua que provoca la precipitación de la hemicelulosa, siendo el más utilizado el etanol (efecto similar al salting-out). El control del fraccionamiento de la hemicelulosa se produce por el control de la concentración de la mezcla y la temperatura. La hemicelulosa extraída es mayor cuanto mayor sea la concentración de solventes, al contrario que el peso molecular de la hemicelulosa extraída, que será menor cuando mayor sea la concentración (Bian et al., 2010).

- Cromatografía

Permite la extracción selectiva de hemicelulosa con un alto grado de pureza. Los tipos de columnas que se pueden utilizar incluyen: columnas de intercambio iónico, de exclusión por tamaños o cromatografía de reparto. Aunque es una técnica muy eficiente el uso a escala industrial no es posible lo cual la reduce a uso exclusivo de laboratorios.(Bian et al., 2010).

- Membranas.

La ultrafiltración es un proceso de separación, donde las hemicelulosas se purifican, ya que los solutos de baja masa molecular pasan a través de la membrana mientras que las moléculas de altos pesos moleculares quedan retenidas.(Cassano, 2003). Es un método sencillo y no contaminante y por ello fue el elegido para el desarrollo del presente trabajo.

Además de los biopolímeros, la biomasa vegetal y especialmente los alimentos como frutas y verduras tienen unos colores naturales característicos ligados a los pigmentos que contienen. Así, se pueden dividir en cuatro grupos principales (Figura 6): las clorofilas (verdes), los carotenoides (amarillo-naranja-rojo), las antocianinas (rojo-azul-morado) y la betanina (roja). El uso de colorantes naturales que puedan ser extraídos de los alimentos es cada vez de mayor interés para el consumidor, ya que actualmente está aumentando la preocupación sobre la seguridad de los colorantes artificiales, que a su vez, se contraponen a los posibles beneficios para la salud de los pigmentos naturales (Aryee et al., 2018).

El objeto del presente trabajo fue los pigmentos carotenoides, que son los principales en la zanahoria. En la actualidad hay más de 600 tipos de carotenoides identificados. Su consumo está relacionado con la provitamina A, la actividad antioxidante, la fotoprotección y desempeñan otras funciones fisiológicas frente a diversas enfermedades.



Figura 6 Pigmentación típica de los alimentos (Carotenóides, n.d.)

Los carotenoides son tetraterpenos constituidos por múltiples unidades isoprenoides. Algunos son lineales como el licopeno, pero la gran mayoría poseen uno (γ -caroteno) o dos anillos terminales (β - y α -carotenos) (Figura 7) (Yúfera, 1994).

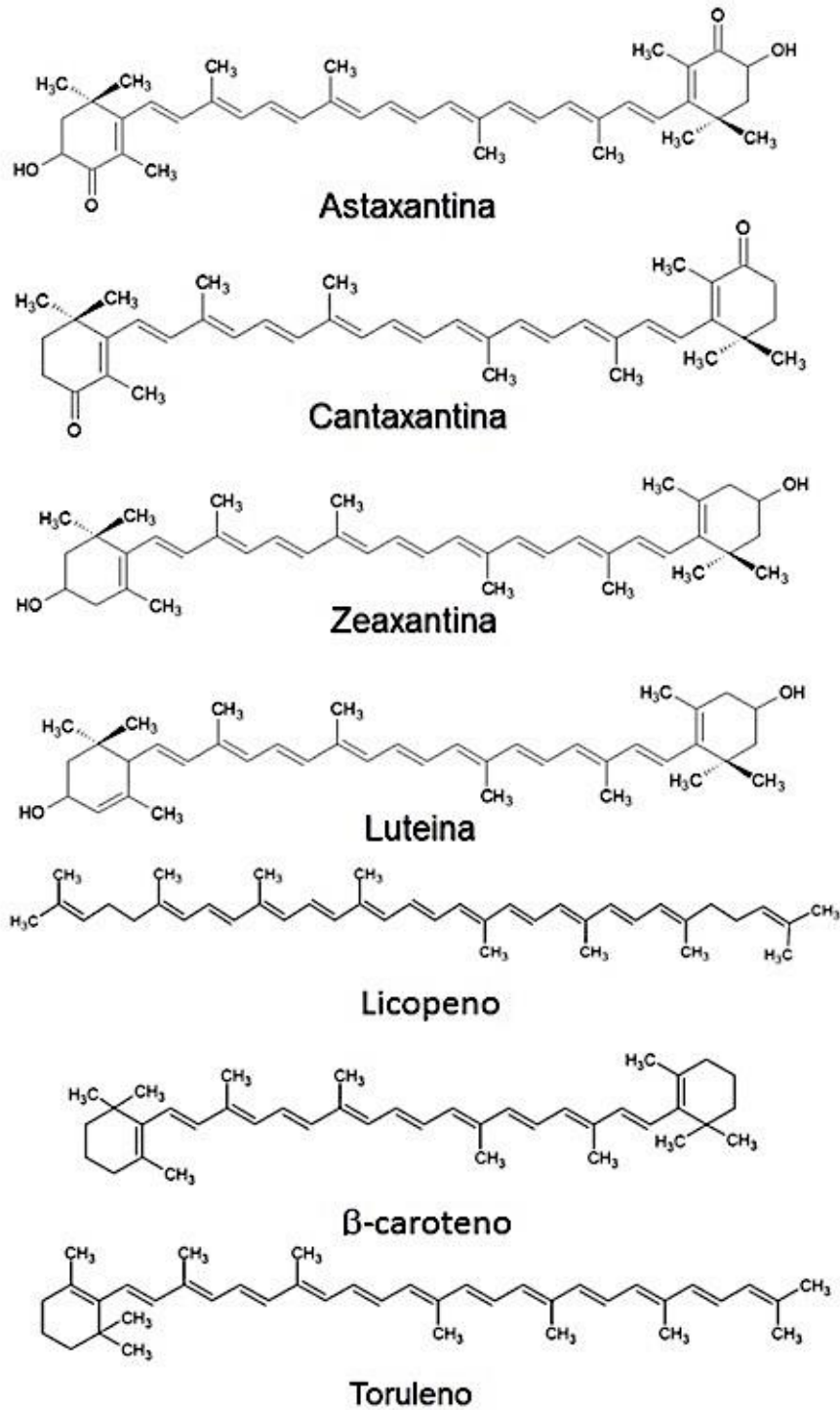


Figura 7 Estructuras químicas de los principales carotenoides (biochemtech, 2020).

A continuación, se detallan algunas de las técnicas para la extracción de carotenoides como; la técnica de extracción asistida por microondas (MAE), el uso de CO₂ supercrítico o el uso de disolventes siendo este último el método más habitual (Nigam & Luke, 2016).

- Técnica de extracción asistida por microondas (MAE)

La extracción de carotenoides mediante MAE (Figura 8) se realiza con la ayuda de disolventes. Los disolventes más usados para este tipo de técnicas son: el hexano, la acetona y el etanol. La biomasa de la cual se van a obtener los carotenoides se introduce previamente en una trituradora para facilitar la función del disolvente. El disolvente y la biomasa triturada se introducen en un matraz y este se aloja en un microondas. El punto de ebullición al que se debe someter la mezcla variará en función de la concentración y disolventes utilizados. El líquido, tras ebullicir, se condensa. Tras el tratamiento, se obtiene por una parte, el disolvente donde se han extraído los carotenoides y por otra parte, la biomasa sólida, que se separa mediante filtración (Hiranvarachat & Devahastin, 2014).

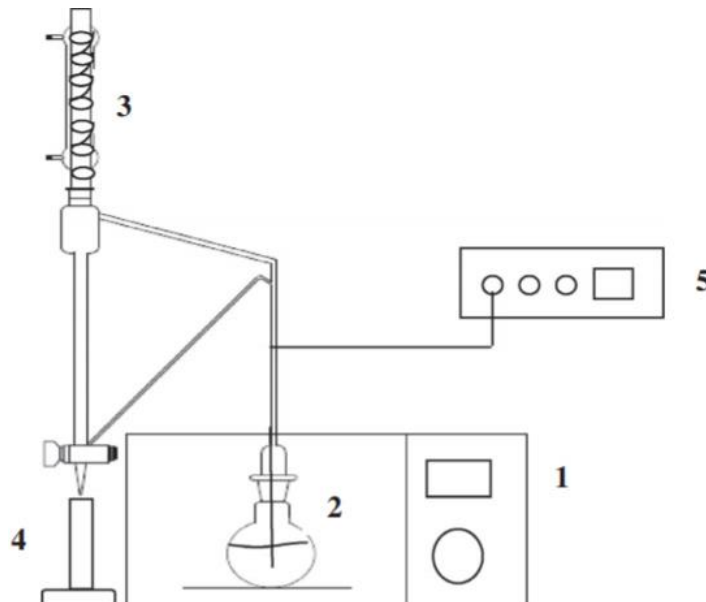


Figura 8 Diagrama de MAE: (1) Microondas ; (2) matraz con biomasa licuada y disolvente ; (3) condensador externo ; (4) Matraz externo; y (5) Controlador de temperatura (Hiranvarachat & Devahastin, 2014).



- Extracción con CO₂ supercrítico (scCO₂).

El uso de fluidos supercríticos ha demostrado ser una técnica viable para la extracción de compuestos termolábiles como es el caso de los carotenoides que se encuentran en la biomasa. El uso de CO₂ supercrítico como disolvente de extracción tiene la ventaja de penetrar rápidamente entre los poros de la biomasa siendo superior a los disolventes convencionales. A su vez, es más fácil su eliminación ya que tras el proceso de despresurización no hay residuos de disolventes. Así, se consigue una alta concentración de carotenoides mediante un proceso respetuoso y limpio para el medio ambiente (Saini & Keum, 2018). No obstante, hay que indicar, que la solubilidad de los carotenoides en CO₂ supercrítico es muy baja, y se requieren grandes cantidades de disolvente para que funcione correctamente.

- Uso de solventes

El uso de solventes orgánicos es el método convencional de extracción de carotenoides. Cloroformo, hexano, metanol, acetona, metanol son los más comunes, pudiendo utilizar mezclas de ellos.

La elección de determinados solventes se realiza en función de la polaridad, el grupo funcional, la longitud de la cadena, la matriz de la muestra y contenido el humedad (Saini & Keum, 2018).

Uno de los principales componentes de los descartes de zanahoria es el zumo, muy abundante en azúcares y nutrientes. En consecuencia, es un material idóneo para fermentación. **A partir de dicha fermentación** puede observarse por ejemplo ácido láctico y etanol (Rakin, 2007).

Tanto el etanol como el ácido láctico son productos de alto valor añadido para la industria. Su obtención a partir de los descartes de la zanahoria es una importante valorización de esta materia prima dada la importancia de los biocombustibles en las investigaciones actuales a nivel mundial.

En concreto el ácido láctico (C₃H₆O₃), también denominado 2-hidroxipropiónico, es un compuesto de gran importancia en la industria del plástico, alimentaria, farmacéutica, química, textil, cosmética y del cuero. Puede ser producido por vía química o por vía biotecnológica. Cuenta con actividad óptica debido a su carbono asimétrico. El trabajo propuesto, se centra en la obtención del ácido láctico por vía biotecnológica, en la que mediante un proceso de fermentación el sustrato se degrada gracias a un



microorganismo dando lugar a ácido láctico entre otros subproductos (Okano et al., 2010).

Por otra parte, el etanol (C_2H_5OH) es también un compuesto de gran importancia en la industria alimentaria, química, cosmética y como combustible. Puede producirse por fermentación de algunos productos agrícolas o por síntesis industrial mediante hidratación del etileno. En este trabajo se obtiene mediante fermentación alcohólica, originado por la actividad de microorganismos (Okano et al., 2010).



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



4. MATERIALES Y MÉTODOS



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Origen y acondicionamiento de la materia prima

La materia prima utilizada en este estudio fueron zanahorias descartadas suministradas por la empresa MUÑOZVAL (Valdestillas, España). Una vez recibidas, fueron almacenadas en un lugar fresco y oscuro para poder mantener las propiedades físicas y la composición sin que se vieran afectadas por las condiciones ambientales.

Inicialmente, las zanahorias descartadas se exprimieron para separar la pulpa del zumo. El exprimidor utilizado (Moulinex ZU5008 Infinity Press Revolution) tiene una potencia de 300W y, hace un prensado en frío lo que reduce la humedad de la pulpa y favorece la separación del zumo. Aproximadamente por cada 1000 g de zanahorias se obtuvieron 545 g de pulpa.

4.2 Caracterización de la materia prima: pulpa y zumo

La composición de las zanahorias se determinó de acuerdo con los métodos estándar publicadas por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL).

Se determinó la **cantidad de humedad** de la biomasa para poder expresar los resultados en base al peso seco, calculando la diferencia entre el peso de la biomasa inicial y el peso después de introducirlo en el horno al 105°C.

La estimación de las **cenizas totales** se realizó mediante una oxidación en seco a 575°C hasta que se obtuvo un peso constante. La parte que no resulte carbonizada corresponde a las cenizas.

Para la determinación del **contenido de extractivos**, la biomasa se sometió a dos extracciones en un Soxhlet utilizando hexano y agua como disolventes, respectivamente durante 24h cada uno. Lo que se consigue con el hexano es la extracción de compuestos apolares debido al carácter no polar del disolvente, destacando la extracción de los carotenoides. Los extractos que se consiguen por medio del uso del agua son azúcares no estructurales y ácidos de azúcar.



El **contenido de proteínas** se evaluó por el método Kjeldahl. La medida del contenido de nitrógeno fue corregida por el factor de conversión que relaciona el contenido de nitrógeno y de proteína para así estimar la cantidad de proteína contenida en la biomasa.

Para la obtención de la cantidad de **carbohidratos estructurales y de lignina** se utilizó una hidrólisis ácida. Este proceso de hidrolisis consigue separar la biomasa lignocelulósica en dos fracciones: carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa hidrolizables a azúcares monoméricos) y lignina, aunque hay una parte de la lignina que se hidroliza y por tanto que pasa a estar con la celulosa y la hemicelulosa. La lignina insoluble en ácido no se hidroliza y se queda en el sólido junto con las cenizas. En el proceso se vertieron 3 mL de ácido sulfúrico (72%) sobre una muestra de 300 mg de biomasa bajo agitación. Posteriormente, la muestra se incubó a una temperatura de 30°C durante 1 h en un baño termostático. Finalmente, se añadieron 84 mL de agua Milli-Q y la muestra fue esterilizada en autoclave a 121°C durante 1 h. El producto obtenido, se filtró a vacío y 50 mL de esta disolución fueron utilizados para cuantificar los carbohidratos estructurales y solubles en ácido.

Por una parte, los carbohidratos estructurales fueron cuantificados mediante HPLC. La fracción de lignina soluble fue cuantificada mediante espectroscopia UV-VIS, mientras que la fracción de lignina insoluble se determinó gravimétricamente de la siguiente forma: el residuo sólido que se obtuvo tras la filtración a vacío se secó a 105°C durante 24h y se pesó. El sólido seco se pasó a un horno a una temperatura de 575°C y se volvió a pesar, anotando nuevamente su peso. Cuando el peso medio fue constante, esa cantidad fue considerada como ceniza. La diferencia entre el peso de los sólidos antes y después de la combustión se asocia a la cantidad de lignina insoluble.

La composición química del zumo se determinó por HPLC siguiendo en método del apartado 4.8.1. El contenido total de carotenoides del zumo se determinó una vez llevado a cabo el proceso de separación de los azúcares, de acuerdo al método del apartado 4.8.3.



4.3 Tratamiento Hidrotermal

La extracción de los componentes de la pulpa de zanahoria se realizó utilizando la planta piloto que se muestra en la Figura 9. Las extracciones se llevaron a cabo utilizando un único reactor en semicontinuo cuyo diagrama de flujo se muestra en la Figura 10.

La biomasa se aloja en una malla dentro de un cartucho metálico que posteriormente se introduce en el reactor de 2 L de volumen (R-01). Se bombea un flujo constante de agua destilada con ayuda de una bomba (P-01), desde un tanque de alimentación previamente llenado (D-01). El agua circula a través de dos intercambiadores de calor de tubo concéntrico y un calentador eléctrico con una potencia máxima de 5 kW (E-01, E-02 y H-01, respectivamente). Después de calentarse, el agua pasa por una válvula de tres vías (VT-01), que permite que el agua entre en el reactor desde la parte superior o que sea desviada a la salida del reactor. El reactor cargado de biomasa se llena inicialmente de agua y se precalienta a 90°C con ayuda de las resistencias situadas en la pared del reactor. Cuando el agua que se encuentra circulando en by-pass alcanza la temperatura de operación, se posiciona la válvula de tres vías (VT-01) para permitir que el agua entre en el reactor, y paralelamente se abre la válvula de salida (V-01) iniciando la operación de extracción. Por último, la corriente de salida pasa a través de dos intercambiadores de calor (E-01 y E-02) que permite recuperar gran parte de la energía para calentar la alimentación, siguiendo a continuación un intercambiador de calor (E-03) que funciona con agua de refrigeración y asegura que el flujo de salida está a una temperatura adecuada. Dicha salida pasa a través de una válvula de presión (V-GO) que es la encargada de mantener la planta presurizada. El producto de extracción es recogido en un tanque (D-03). Un puerto de toma de muestras (VM-01) colocado a la salida del reactor permite la toma de muestras que se realizan a 0, 10, 20, 30, 40, 60 y 80 minutos del inicio de la operación. Las temperaturas de reacción fueron de 140, 160 y 180°C. Los experimentos de extracción se llevaron a cabo a un flujo de agua constante (10 L/h). La presión fue suficiente para mantener el agua en fase líquida (alrededor de 10 bar). La pulpa de zanahoria introducida en el cartucho se recogió al finalizar la autohidrólisis y se secó durante 24 h a 60 °C para una mejor caracterización estructural. El líquido obtenido de la hidrólisis térmica se recogió en diferentes garrafas a diferentes tiempos de extracción: una garrafa se llenó con el líquido de 0-25 minutos de extracción, otra de 25-50 minutos y la última garrafa se llenó de 50-80 minutos. Solo las garrafas correspondientes al intervalo entre 0-25 min

fueron transferidas a la posterior etapa con membranas, pues fueron las muestras más representativas.



Figura 9 Planta piloto donde se llevó a cabo la extracción

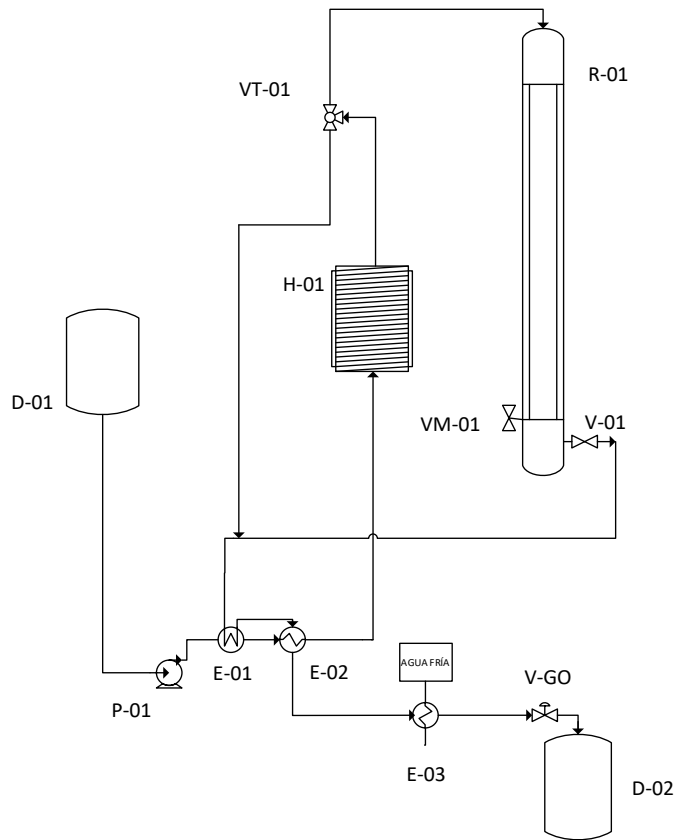


Figura 10 Diagrama de flujo de la planta de extracción Hidrotermal

4.4 Concentración, separación y purificación de las hemicelulosas y las pectinas por ultrafiltración/diafiltración

El líquido extraído de la planta correspondiente a las muestras de 0-25 minutos de extracción fue prefiltrado ($50\ \mu\text{m}$) para eliminar posibles partículas. Tres membranas poliméricas Pellicon 2 Mini Biomax (Millipore, Bedford, MA), configuración de placas planas, hechas de polietersulfona, con área de filtración $0,1\ \text{m}^2$ y corte de peso molecular (MWCO) de 30, 10 y 5 kDa, se emplearon en cascada (Figura 11). Las tres membranas estuvieron seguidas por una cuarta membrana de 1 kDa de tipo Prep Scale-TFF, configuración en espiral, hecha de celulosa regenerada y de $0,23\ \text{cm}^2$ de área de filtración. Las hemicelulosas y pectinas se concentraron mediante la reducción del volumen de la alimentación separando el permeado en un recipiente y recirculando de manera continua el retenido al recipiente de alimentación de la membrana. La ultrafiltración se llevó a cabo hasta que se



obtuvo una reducción del volumen de alimentación del 80%. La secuencia de operación que se siguió para los extractos de 140 y 160°C fue: (1) el líquido de alimentación pasó a través de la membrana de 30 kDa, (2) el permeado de 30 kDa pasó a través de la membrana de 10 kDa, (3) el permeado de 10 kDa pasó a través de la membrana de 5 kDa y el permeado de 5 kDa pasó a través de la membrana de 1 kDa. Por otro lado, la disposición de las membranas del extracto de 180°C fue diferente: (1) el líquido de alimentación pasó a través de la membrana de 5 kDa, (2) el permeado de 5 kDa paso a la membrana de 1 kDa, (3) el retenido de de 5 kDa pasó a través de la membrana de 10 kDa. La configuración en cascada permitió obtener cuatro corrientes de productos con diferentes pesos moleculares, mientras que la configuración mixta aplicada al extracto de 180 °C permitió obtener tres productos finales, dos de ellos muy concentrados.

Para purificar las hemicelulosas y pectinas retenidas en las diferentes etapas, los retenidos fueron sometido a un proceso discontinuo de diafiltración en ciclos. La diafiltración en este caso consistió en la adición de un volumen de agua destilada igual al volumen del retenido, haciendo pasar a este de nuevo por la membrana hasta que se recupere como permeado la cantidad de agua añadida. El proceso se repetirá cíclicamente, llevándose a cabo 5 ciclos con agua destilada y hasta un máximo de 3 ciclos con agua reutilizada de diafiltraciones anteriores (un ciclo extra por cada membrana que estuviera en posición anterior en la configuración en cascada). El retenido de la membrana de 30 kDa fue sometido a cinco diafiltraciones (cinco diavolumenes) con agua destilada. En el retenido de la membrana 10 kDa se realizaron seis diafiltraciones, la primera con el agua de diafiltración de la membrana anterior, y las siguientes cinco con agua destilada. El retenido de la membrana de 5 kDa se diafiltró siete veces, la primera con el volumen proveniente de la diafiltración de la membrana de 30 kDa y 5 kDa y otra diafiltración con las aguas de diafiltración que solo habían pasado por la membrana de 5 kDa, seguidamente se hicieron otras cinco diafiltraciones con agua destilada. Por último, la diafiltración del permeado de la membrana de 1 kDa se realiza en mediante ocho diafiltraciones. La primera diafiltración con el agua de diafiltración que ha pasado por las membranas de 30 kDa, 10 kDa y 5 kDa la segunda con el agua de la diafiltración de las membranas de 10 kDa y 5 kDa, la tercera con el agua de diafiltración de la membrana de 5 kDa y cinco diafiltraciones con agua destilada.

Con el proceso de diafiltración se consigue que aquellas sustancias de bajo peso molecular que no atravesaron la membrana lo hagan por la acción del flujo convectivo de agua. La reutilización de parte de las aguas de diafiltración



permite la recuperación de ciertas sustancias que fueron retiradas en otras membranas.

Tras la ultrafiltración y diafiltración se tomaron muestras de la alimentación, el retenido de la membrana de 30 kDa (Ret-30 kDa), el retenido de la membrana de 10 kDa (Ret-10 kDa), el retenido de la membrana de 5 kDa (Ret-5 kDa), el retenido de la membrana de 1 kDa (Ret-1kDa), permeado de la membrana de 1 kDa (Perm-1 kDa), y los retenidos después del proceso de diafiltración (Ret-30 kDa-DF, Ret-10 kDa-DF, Ret-5 kDa-DF, Ret-1 kDa-DF) (Figura 11). El contenido de hemicelulosas, pectinas, azúcares libres y subproductos se determinó mediante HPLC y se verificó por balance de materia. Asimismo, se determinó la distribución de peso molecular de cada una de las muestras. Después de cada experimento, las membranas de UF se sometieron a una limpieza y lavado según lo recomendado por el fabricante.

En el caso del experimento a 180°C (Figura 12) el retenido de la membrana de 5 kDa fue sometido a cinco diafiltraciones (cinco diavolumenes) con agua destilada de la misma manera que el retenido la membrana de 10 kDa. El retenido de la membrana de 1 kDa como en el resto de retenidos, primero se sometió a DF con agua reutilizada de la membrana anterior (5 kDa) y luego a 5 diafiltraciones con agua destilada. Después de terminar los experimentos en cascada, se tomaron muestras de la alimentación, el retenido de la membrana de 10 kDa (Ret-10 kDa), el retenido de la membrana de 5 kDa (Ret-5 kDa), el retenido de la membrana de 1 kDa (Ret-1kDa), el permeado de la membrana de 1 kDa (Perm-1 kDa), y los retenidos después del proceso de diafiltración (Ret-10 kDa-DF, Ret-5 kDa-DF, Ret-1 kDa-DF) . Después de cada experimento, las membranas de UF se sometieron a una limpieza y lavado según lo recomendado por el fabricante.

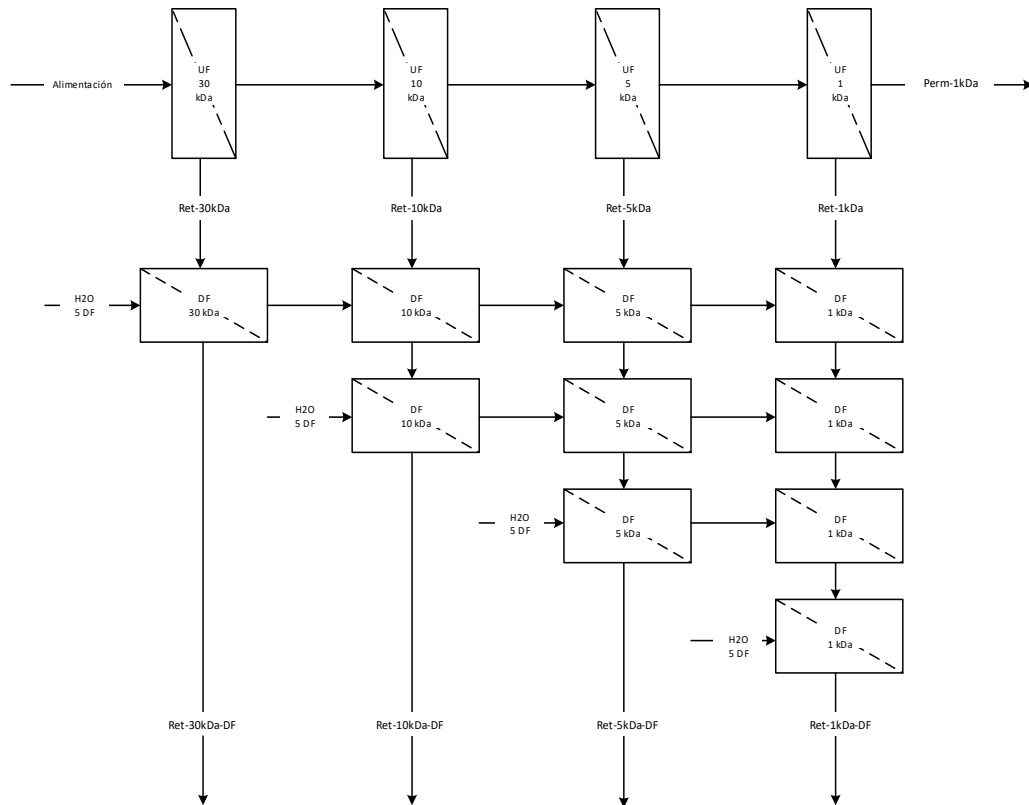


Figura 11 Diagrama del proceso de Ultrafiltración y Diafiltración para 140°C y 160°C

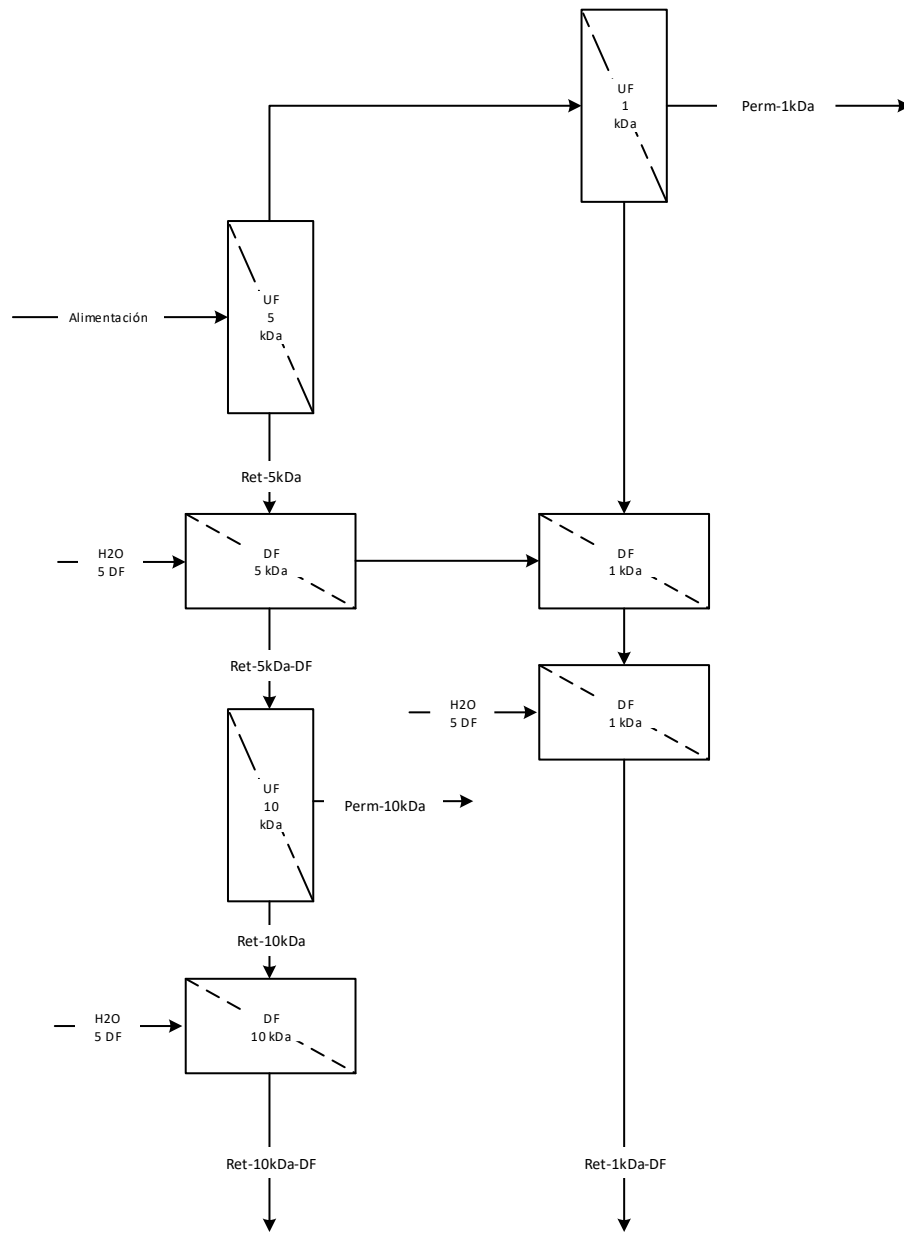


Figura 12 Diagrama del proceso de Ultrafiltración y Diafiltración a 180°C.

4.5 Separación de azúcares y pigmentos por diafiltración

Para la separación de azúcares y pigmentos de la zanahoria, se empleó una membrana polimérica Pellicon 2 Mini Biomax (Millipore, Bedford, MA) con corte de peso molecular (MWC0) de 30 kDa y cuyo diagrama de flujo se puede observar en la Figura 13. Para ello inicialmente, 1 L del zumo de zanahoria obtenido tras la licuar la zanahoria se diluyó a la mitad, pasando de tener 111.28 g/L de azúcares totales a 55.64 g/L. Y por tanto pasando de un volumen inicial de 1 L a 2 L. A partir de este volumen se realizaron 6 diafiltraciones con agua tipo III añadiendo en cada diafiltración un 50% del volumen inicial.

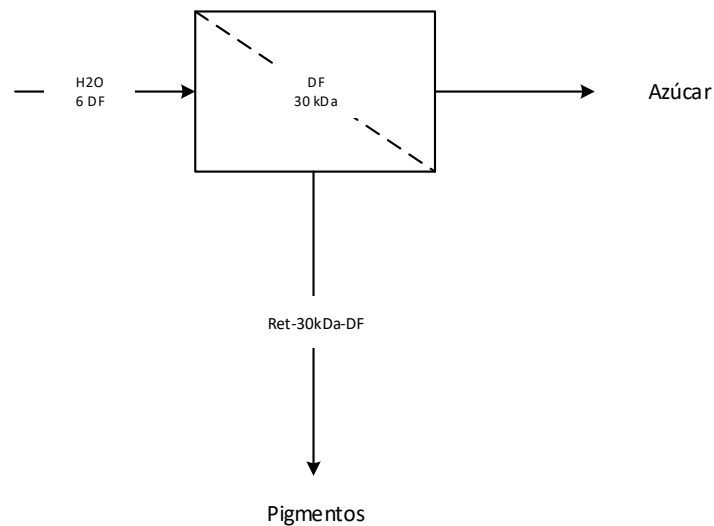


Figura 13 Diafiltración zumo de zanahoria para la obtención de azúcares y pigmentos.



4.6. Encapsulación y secado de pigmento

La encapsulación de los carotenoides y su secado para la obtención de un pigmento se realizó mediante liofilización y mediante secado por atomización o spray-dryer (Mobile Minor, Gea Niro) cuyo diagrama de flujo está representado en la Figura 14.

La fracción rica en carotenoides se mezcló con goma arábica como agente encapsulante en relación 1:1 en recipiente con agitación (D-01). Tras unas 12 horas de agitación, la mezcla se bombeó con una bomba peristáltica (B-01) hacia la parte superior del secadero. La disolución entró a un rotor (R -01) que gira gracias a un sistema mecánico de accionamiento por aire y que genera la atomización del líquido. Por otro lado, el aire que va entra al secadero desde el exterior pasa por un filtro (F-01), se calienta gracias a una resistencia (H-01) y entra al secadero, al igual que la disolución, por la parte superior del mismo. La entrada por donde se introduce el aire tiene forma de corona circular, lo que implica que el perfil del aire al entrar en el secadero será similar a la forma de un paraguas.

Las líneas del líquido que se han generado por el rotor chocan con el paraguas de aire caliente y como consecuencia el líquido se evapora. El aire arrastra el producto encapsulado hacia un ciclón (C-01), este aire es extraído gracias a un soplante (S-01) que genera vacío en el sistema. La temperatura del aire a la entrada fueron 115°C a lo largo de todo el experimento.

Una pequeña parte de la mezcla de carotenoides y agente encapsulante en relación 1:1 fue secada por liofilización. Asimismo, se prepararon mezclas en relación 1:0,5 (fracción carotenica: agente encapsulante) y relación 1:1,5, que también se secaron por liofilización. Por liofilización se secó también la muestra rica en carotenoides sin ningún tipo de encapsulante, actuando como muestra de control. El proceso consistió en la congelación de las muestras durante toda una noche a -25 °C. El liofilizado se llevó a cabo en un liofilizador Telstar Lyoquest -55 que opera a vacío (0.180 mbar) durante 96 horas. El liofilizador puede verse en la Figura 15.

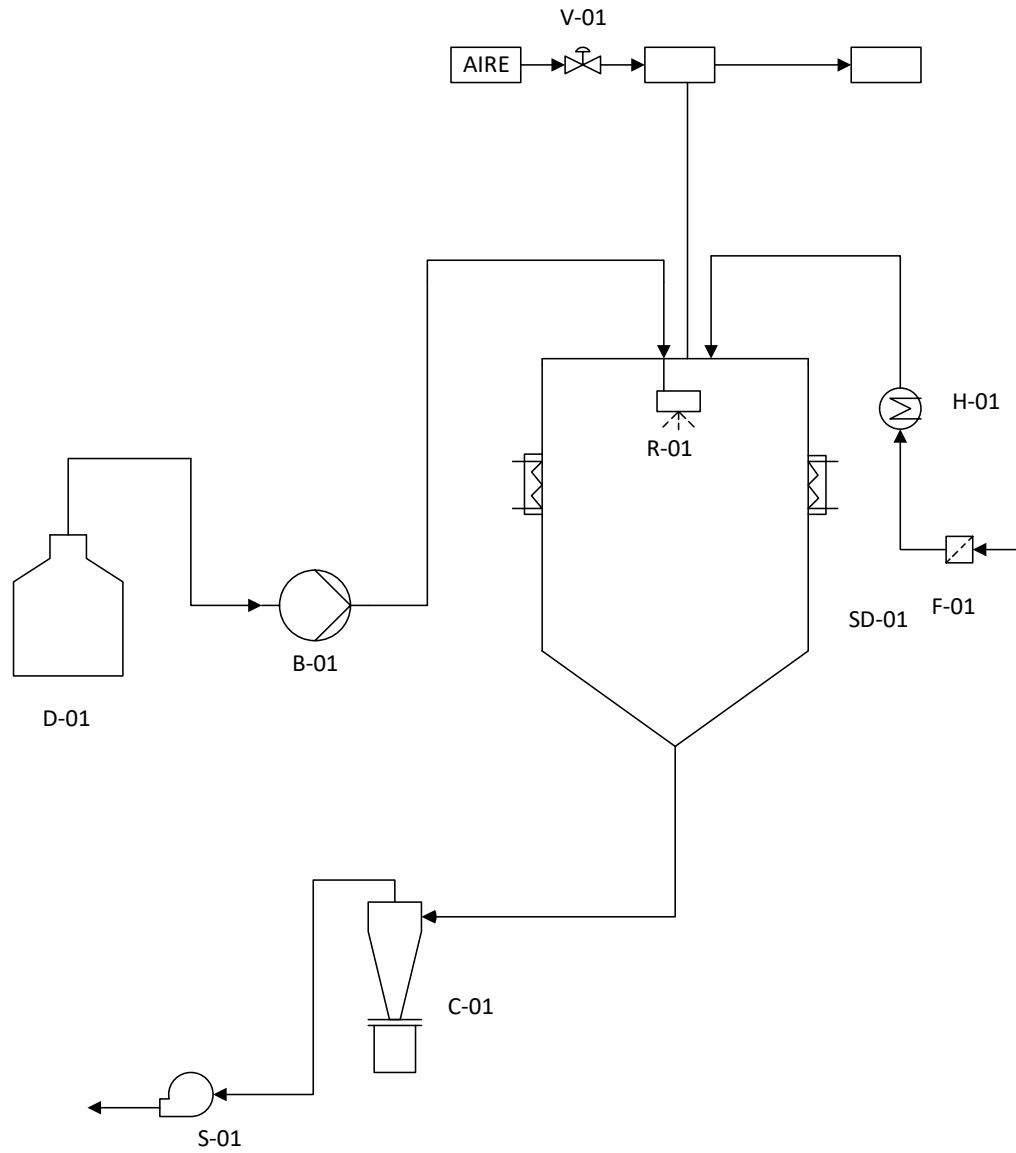


Figura 14 Diagrama de flujo del secadero usado para la obtención de pigmentos.



Figura 15 Liofilizador usado para liofilizar los productos obtenidos.

4.7. Fermentación de la fracción de azúcar

El permeado obtenido de la ultrafiltración del zumo de zanahorias descartadas se utilizó como caldo de fermentación. Este caldo tuvo una concentración de azúcar de 84,83 g/l. Se plantearon dos tipos diferentes de fermentación dependiendo del producto de final que se quería obtener y, cada una de estas fermentaciones se realizó con un microorganismo diferente:

- *Saccharomyces cerevisiae*: levadura para producir etanol.
- *Lactobacillus reuteri* RC-14® y *Lactobacillus rhamnosus* GR-1®: bacterias para la obtención de ácido láctico.

Cada uno de los dos tipos de microorganismos se incubaron en dos tipos de caldo de cultivo: el permeado del zumo de zanahorias descartadas y ese mismo permeado con un 6 p/v% de NaCl. Las condiciones de incubación

fueron anaerobias, 35°C y durante 24h, con agitación continua. La concentración de microorganismo incubada fue de 2 p/v% para *Saccharomyces cerevisiae* y de 0,89 p/v% para *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus rhamnosus*.

Tras la incubación los microorganismos se inocularon usando el mismo tipo de caldo de cultivo, en una proporción de 50 v/v % dando lugar a un volumen final de 20 mL por cada experimento. Los experimentos Figura 16 se realizaron por duplicado, y se tomaron muestras de manera periódica para poder determinar la composición mediante HPLC de acuerdo con el método del apartado 4.8.1, así como la concentración de microorganismos (g/L).

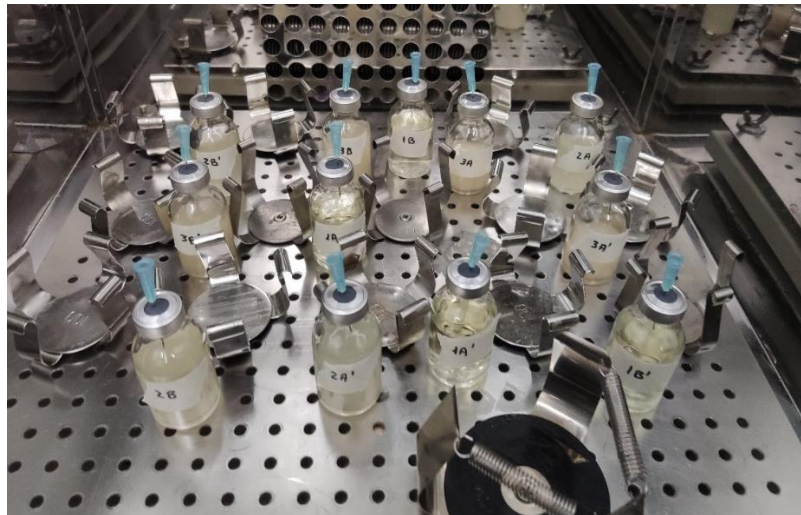


Figura 16 Fermentación de zumo con los microorganismos.



4.8. Análisis

4.8.1 Composición química

Mediante la técnica analítica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se han podido determinar varios componentes de la biomasa como fracción lipídica, ácidos, azúcares, aldehídos o compuestos de degradación.

El análisis de lípidos se realizó mediante HPLC, usando un equipo HPLC Agilent serie 1200 con un detector de dispersión de luz por evaporación (ELSD). Para la separación de los analitos se utilizó una columna Shodex SH-1011 que permite la detección de ácidos urónicos, ácidos orgánicos, azúcares, aldehídos y compuestos de degradación. El análisis se realizó con un flujo de 0,8 ml/min en fase móvil (agua Mili-Q + 0.01N ácido sulfúrico) y temperatura de la columna de 50°C. Los compuestos de degradación (5-HMF y furfural) se determinaron con un detector dual Waters λ 2487 (210 nm y 254 nm). Azúcares, aldehídos y ácidos fueron identificados con un detector de infrarrojos Waters 2414. La cantidad de hemicelulosas y pectinas se determinó con una hidrólisis estandarizada que rompe los polisacáridos y oligosacáridos en monómeros. El método utilizado fue el siguiente: se mezclaron 15 mL de agua de Milli-Q y 0,8 mL de ácido sulfúrico (72 %) con 5 mL de la muestra líquida. La solución se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 1 h. Las muestras hidrolizadas se neutralizaron con CaCO_3 y se filtraron (tamaño del poro 0,22 μm , diámetro 25 mm, Nylon; FILTRO-LAB) antes de ser analizadas con en el HPLC. La concentración de hemicelulosas se calculó utilizando correcciones anhidras de 0,9 y 0,88 para la galactosa y la arabinosa, respectivamente y para las pectinas (compuestas de galacturona) se usó el factor 0,9.



4.8.2 Distribución del peso molecular

La caracterización del tamaño molecular de las diferentes fracciones de hemicelulosa y pectinas se llevó a cabo mediante la cromatografía de exclusión de tamaño molecular (HPLC-SEC) siguiendo el método descrito por Ramos-Andrés et al., 2019. Para ello, se utilizó una columna GPC (SB-803 HQ; Shodex) protegida por una columna de centinela (SB-G; Shodex) con un flujo de 0,5 mL/min en la fase móvil (NaNO_3 0,1 M + NaN_3 0,02% en agua de Milli-Q) y 35 °C. La distribución del peso molecular de la hemicelulosa y la pectina se determinó utilizando un detector IR Waters 2414. Para establecer la curva de calibración se utilizaron 5 estándares pululanos (ESTÁNDAR P-82; Shodex) disueltos en agua Milli-Q, comprendidos entre 6,1 y 113 kDa de peso medio molecular. Asumiendo que la concentración de los diferentes grupos de compuestos de peso molecular es proporcional a la señal del detector de índice de refracción (RI), se integraron las curvas cromatográficas y el área bajo la curva de la intensidad del detector RI fue dividido en diferentes regiones. Las hemicelulosas y pectinas pueden ser clasificadas según su peso molecular en diferentes grupos: (1) monómeros, (2) dímeros, (3) pentámeros, (4) hexámeros, (5) 1-5 kDa, (6) 5-10 kDa, (7) 10-30 kDa, y (8) >30 kDa. Los grupos de trímeros y tetrámeros eran extremadamente bajos y su presencia fue obviada.

4.8.3 Contenido en carotenoides totales (TCC)

El contenido de pigmentos secos se determinó por TCC (Total Carotenoid Content), esta técnica fue aplicada para los pigmentos secos con encapsulante y sin encapsulante, y también para los que fueron secados por atomización o por liofilización. El proceso que se siguió fue muy similar al de (Knockaert et al., 2012) Se mezclaron 2mL de hexano con 0,005 g de la muestra. La mezcla resultante se agitó en un vórtex durante 5 minutos. A continuación, la muestra se centrifugó durante 3 minutos a 10000 rpm y el líquido se recuperó. Este líquido se diluyó hasta el máximo de absorbancia del espectrofotómetro (0,7-1) del espectrofotómetro. El TCC se calculó con la ecuación 1:

$$TCC (mg/kg) = \frac{A \times V \times 10^4}{E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times M}$$

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo del contenido en carotenoides totales (TCC).



Donde A es la absorbancia de la muestra a 450 nm, V es el volumen total del extracto (mL), M es el peso de la muestra (g), $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ fue el coeficiente de corrección para betacarotenos en hexano.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



5. RESULTADOS



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



5 RESULTADOS

5.1. Caracterización de la materia prima: pulpa y zumo

Las zanahorias descartadas que se han usado en este estudio tienen un contenido de humedad de $89.70 \text{ wt}\% \pm 1.56$. Siendo su composición en base seca: celulosa ($10,91\% \pm 0,40$), hemicelulosas ($8,58 \% \pm 0,02$), proteínas ($2,30 \% \pm 0,44$), pectina ($5,88 \% \pm 0,34$), lignina ($7,89 \% \pm 0,24$) extractivos en agua ($65,03 \text{ wt}\% \pm 1.28$), y extractivos en hexano ($1,22 \% \pm 0,79$).

A la vista de los resultados cabe destacar que la mayor parte de su composición en base seca está formada por los extractivos en agua. Estos componentes son fundamentalmente azúcares libres: sacarosa ($47,28\% \pm 1,71$), glucosa ($30,44\% \pm 0,78$) y fructosa ($14,27\% \pm 2,06$), y una menor cantidad de pectina ($8,01\% \pm 1,13$). Tras estudiarse la distribución del peso molecular de los extractivos en agua se confirmó la presencia de monómeros (glucosa y fructosa), dímeros (sacarosa) y polisacáridos con un peso molecular medio de 2 kDa (pectina hidrosoluble). **Estos extractos también acompañan a los polisacáridos del extracto obtenido del tratamiento hidrotérmico.** Tanto los azúcares libres como la pectina que es soluble en agua son compuestos de gran interés y al no proceder de ningún proceso de degradación, se han considerado como parte de los productos del extracto hidrotérmico.

Las hemicelulosas fueron de tipo arabinogalactano, como ya se demostró en investigaciones previas (Ribas-Agustí et al., 2014). Estuvieron formadas por $68.60 \% \pm 0.18$ de galactosa y $31.40 \% \pm 0.18$ de arabinosa, com. Además de los azúcares propios de las hemicelulosas y de los azúcares libres presentes (sacarosa, glucosa y fructosa), se identificó ácido galacturónico. Por lo tanto, la pectina presente en las zanahorias descartadas se ha considerado como homogalacturonano, es decir, pectina formada por unidades monoméricas de ácido galacturónico. Es probable que la pectina esté parcialmente ligada a la hemicelulosa arabinogalactano, lo que implica en lo referente a la extracción hidrotérmica que se obtienen ambos polisacáridos, aunque cada uno tiene una estructura molecular diferente y, por lo tanto, podrían tener un peso molecular diferente.

La lignina que encontramos en la pulpa de zanahoria la forma en un $90,22 \%$ en peso de la lignina que se considera soluble en ácido, y el $9,78 \%$ restante la lignina insoluble en ácido. Además de que el porcentaje de lignina insoluble



es bajo, cabe destacar que el porcentaje de cenizas es inferior al límite de detección del equipo de análisis o nulo. El porcentaje de lignina soluble puede estar formado por compuestos de tipo antioxidante como los compuestos fenólicos o los flavonoides.

Los resultados mostraron que el zumo tiene un contenido de sólidos solubles de 111,28 g/L. Estos sólidos solubles fueron analizados por HPLC. La composición resultó: sacarosa (70,52 g/L), glucosa (28,89 g/L) y fructosa (11,87 g/L). Los sólidos no solubles están formados por micropartículas de la pulpa de la zanahoria, por lo que es ahí donde se encuentran los carotenoides. Estos sólidos son los que se han utilizado para la recuperación de los carotenoides, mientras que el permeado del zumo, formado por los sólidos solubles, se utilizó para la valorización del azúcar al ser el componente mayoritario.

5.2 Extracción de hemicelulosas, pectinas, azúcares libres y subproductos de la pulpa de zanahoria.

5.2.1 Arabinogalactanos, pectinas, azúcares libres y subproductos.

En todos los casos de estudio presentados a continuación, los ensayos se llevaron a cabo en la planta de extracción hidrotermal. Esta sección se centra en el estudio del grado de extracción de arabinogalactanos, pectinas, azúcares libres y subproductos a diferentes temperaturas 140°C, 160°C y 180°C. Se tomó muestra en los instantes 0, 10, 20, 30, 40, 60 y 80 minutos desde el inicio de la operación, recogiendo parte del extracto a través de la válvula VM-01 (Figura 10).

5.2.1.1 Ensayo a 180°C

En la Figura 17 se puede observar que las condiciones de operación a alta presión y temperatura dieron lugar a una mayor extracción de hemicelulosas, azúcares libres y pectinas, y a una mayor formación de subproductos durante los primeros 20 minutos de extracción. Se observa que la composición mayoritaria de esta extracción es la de azúcares libres, 161,91 g azúcares/kg de pulpa seca, mientras que, la extracción de subproductos y hemicelulosas fue muy similar, 69 g/kg de pulpa seca y 63 g/kg de pulpa seca,

respectivamente. Por último, la extracción de pectinas fue la minoritaria siendo de 29 g/kg de pulpa seca.

Se observan dos tendencias en el proceso de extracción: (1) durante los primeros 20 minutos y respecto al total extraído de cada componente, se extrajeron un 83,38% de los azúcares libres, el 72,98% de hemicelulosas, 78,13% de pectinas y un 53,82% de subproductos; (2) a partir de los 20 minutos en todos los casos excepto en los subproductos se vio una tendencia lineal con una pendiente mucho menos pronunciada o nula respecto a los primeros 20 minutos. Los subproductos sufrieron un ligero aumento debido a la degradación de los azúcares libres, hemicelulosas y las pectinas.

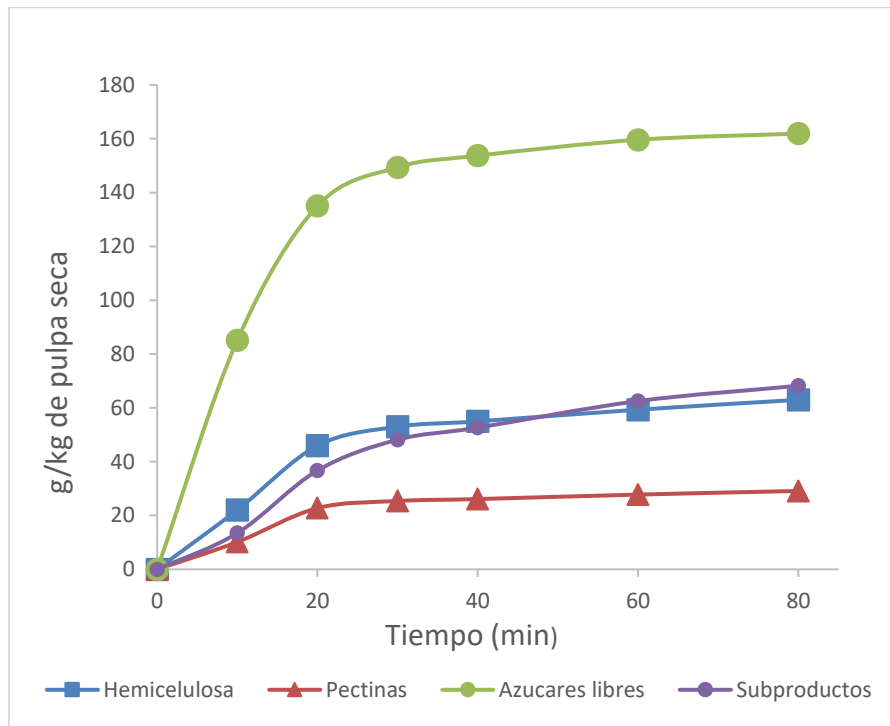


Figura 17 Extracción hidrotermal a 180°C (g/kg de pulpa seca) de hemicelulosas, azúcares libres, pectinas y subproductos.

5.2.1.2 Ensayo a 160°C

En la Figura 18 se puede observar que la extracción en estas condiciones de operación dio una producción final de 207,67 g/kg de pulpa seca azúcares libres, 59,59g/kg de pulpa seca de hemicelulosa, 54,4 g/kg de subproductos y 11,85 g/kg de pectinas.

Como en el ensayo anterior se apreciaron dos tendencias de extracción para todos los productos excepto para los subproductos. (1) En los 20 primeros minutos se extrajo un 55,18% de los azúcares libres de la extracción total, el 50,78% de hemicelulosas, y 49,78% de pectinas. (2) A partir de los 20 minutos y hasta el final del ensayo las hemicelulosas y las pectinas adquirieron una tendencia lineal con una pendiente algo menos pronunciada o llegando a nula. Por otra parte, los azúcares libres se siguieron extrayendo a lo largo de todo el ensayo de manera significativa. El comportamiento de los subproductos es lineal ascendente a lo largo de todo el ensayo.

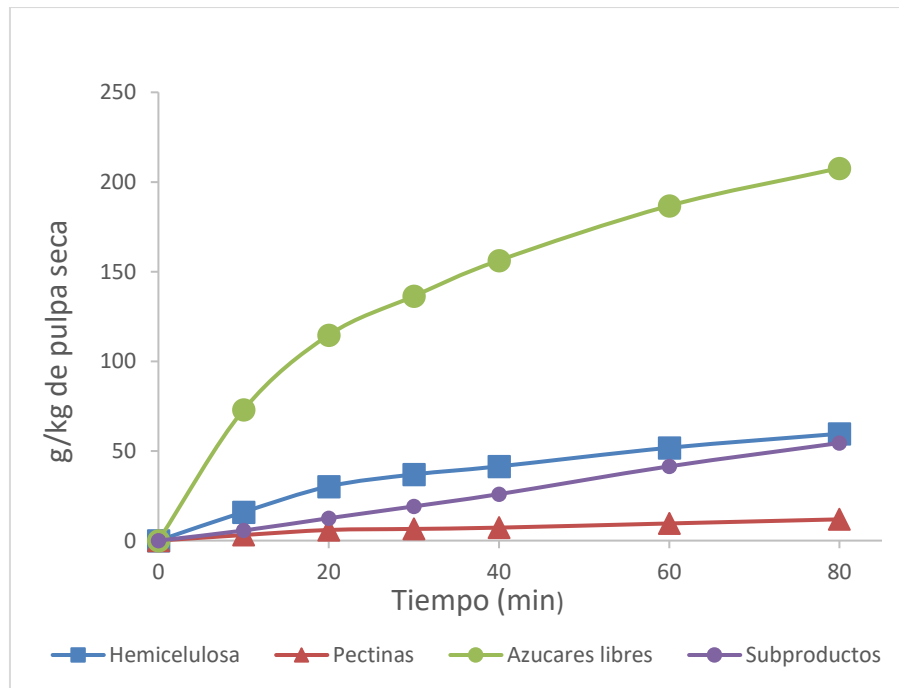


Figura 18 Extracción hidrotérmica a 160°C (g/kg de pulpa seca) de hemicelulosas, azúcares libres, pectinas y subproductos.



5.2.1.3 Ensayo a 140°C

En la Figura 19 se muestra cómo en estas condiciones de operación la extracción tuvo lugar con una cinética más lenta que con respecto a las temperaturas anteriores. Se obtuvo una producción final de azúcares libres de 227,22 g/kg de pulpa seca, de hemicelulosa 76,84 g/kg de pulpa seca, de subproductos 15,88 g/kg de pulpa seca y 12,34 g/kg de pulpa seca de pectinas.

En este ensayo, hasta el minuto 40 de proceso se lograron extraer un 61,27% del total extraído. Para el caso de la hemicelulosa, se extrajo el 49,38 % del total, y la extracción se mantuvo constante hasta el final del ensayo. Las pectinas siguieron una tendencia muy similar a la hemicelulosa con un 47,63% del total de la extracción a los 40 minutos de ensayo. Por último, la extracción de subproductos en ese tiempo fue de 36,64%, y continuó aumentando de manera constante debido a los procesos de degradación del resto de productos.

Por tanto, se puede observar las diferencias en la cantidad que se obtienen de cada compuesto en las diferentes temperaturas. La concentración de azúcares libres es mucho mayor a bajas temperaturas que a altas, esto es así porque a mayores temperaturas se produce una mayor degradación de los azúcares. Los subproductos en cambio aumentan a medida que aumenta la temperatura, esto tiene sentido porque la aparición de estos subproductos esta favorecida por la degradación del resto de componentes. A 180°C se obtiene algo menos de hemicelulosa esto es así por la degradación por efecto de la temperatura. En el caso de las pectinas, a 180°C se consigue extraer bastantes más que a 140°C y 160°C, en este caso la degradación no es tan significativa, y parece claro que hacen falta temperaturas muy altas para extraer ciertas pectinas.

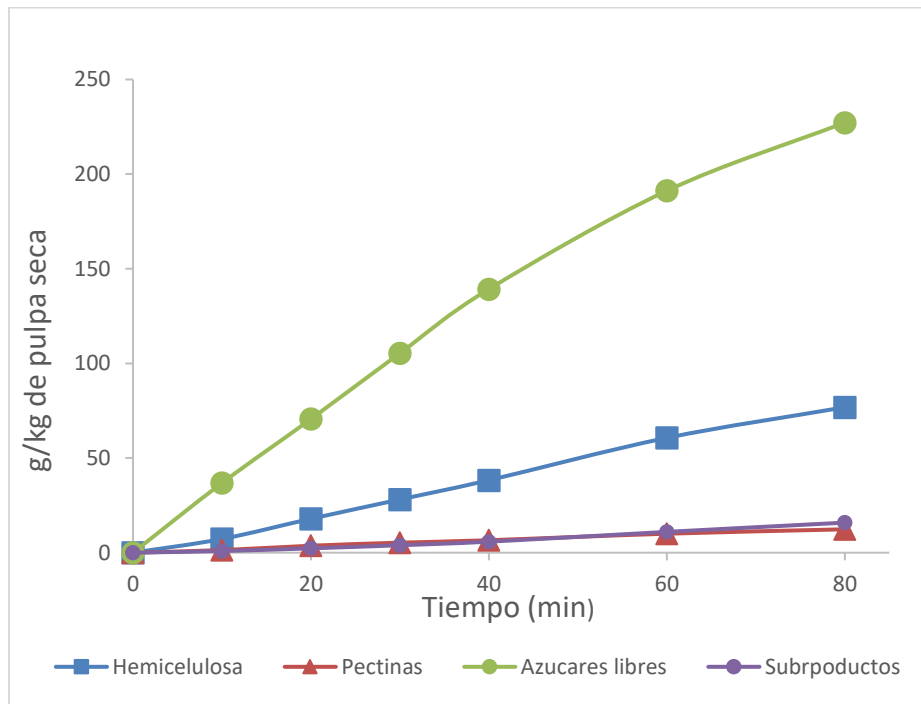


Figura 19 Extracción hidrotermal a 140°C (g/kg de pulpa seca) de hemicelulosas, azúcares libres, pectinas y subproductos

5.2.2 Sacarosa, glucosa y fructosa

Esta sección se centra en el estudio del grado de extracción de los azúcares libres de forma individual, formados por glucosa, fructosa y sacarosa. Como el resto de componentes, se estudió su extracción a las temperaturas de 140°C, 160°C y 180°C tomando muestra en los instantes 0, 10, 20, 30, 40, 60 y 80 minutos a la salida del reactor.

5.2.2.1 Ensayo a 180°C

En la Figura 20 se puede observar la sacarosa, fructosa y glucosa. Tras 30 minutos de extracción la sacarosa alcanza un punto de pendiente nula, lo que implica que ya no se extrajo prácticamente nada más de lo que se había extraído durante esos primeros 30 minutos. La fructosa y glucosa también se extrajeron mayoritariamente en los 30 primeros minutos, pero como la sacarosa se hidroliza en glucosa y fructosa, no llegan a tener una pendiente nula como la de la sacarosa. Se obtuvo una producción final de sacarosa de 48,38 g/kg de pulpa seca y de fructosa 52,27 g/kg de pulpa seca. La máxima extracción fue la de glucosa, con 61,25 g/kg de pulpa seca.

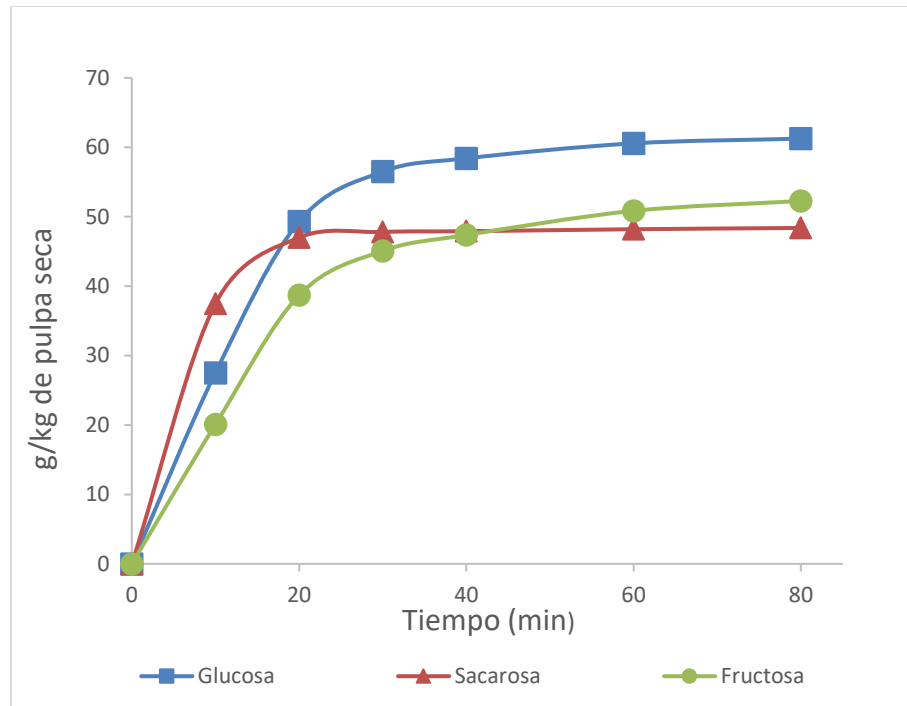


Figura 20 Extracción hidrotermal a 180°C (g/kg de pulpa seca) de glucosa, sacarosa y fructosa.

5.2.2.2 Ensayo a 160°C

En la Figura 21 se puede observar que la extracción de fructosa y sacarosa tuvo una tendencia similar a la comentada en el ensayo anterior (180°C) En los primeros 20 minutos una fuerte pendiente (se extrae la mayor parte de azúcares), y desde los 20 hasta el final del ensayo la pendiente disminuye con respecto al primer tramo. La cantidad final que obtenemos de glucosa fue de 68,37g/kg de pulpa seca y la de fructosa 54,15 g/kg. La extracción de sacarosa se produjo solo en los 20 primeros minutos del ensayo. Se obtuvieron 66,75 g de sacarosa /kg de pulpa seca final.

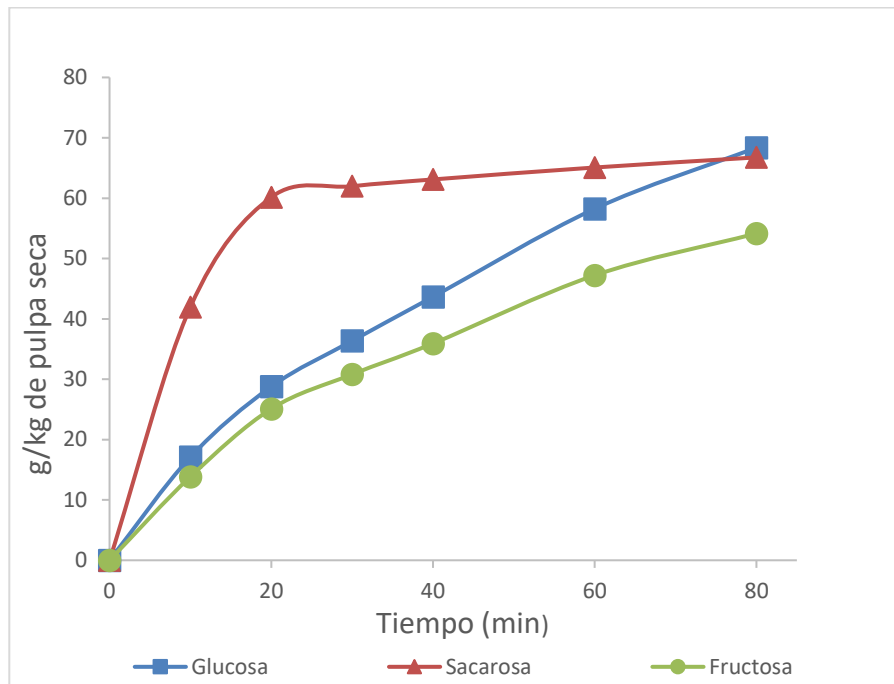


Figura 21 Extracción hidrotérmica a 160°C (g/kg de pulpa seca) de glucosa, sacarosa y fructosa.

5.2.2.3 Ensayo a 140°C

En la Figura 22 se puede observar un comportamiento lineal de la fructosa y la glucosa durante todo el ensayo mientras que la sacarosa para de extraerse a partir del minuto 60 de extracción. Esto puede tener su explicación en que se produzca la hidrólisis en la sacarosa, rompiéndose y formando los compuestos de glucosa y fructosa. Se obtuvo 78,56g de glucosa /kg de pulpa seca, 67,89 g de fructosa /kg de pulpa seca y 81 g/kg de pulpa seca de sacarosa.

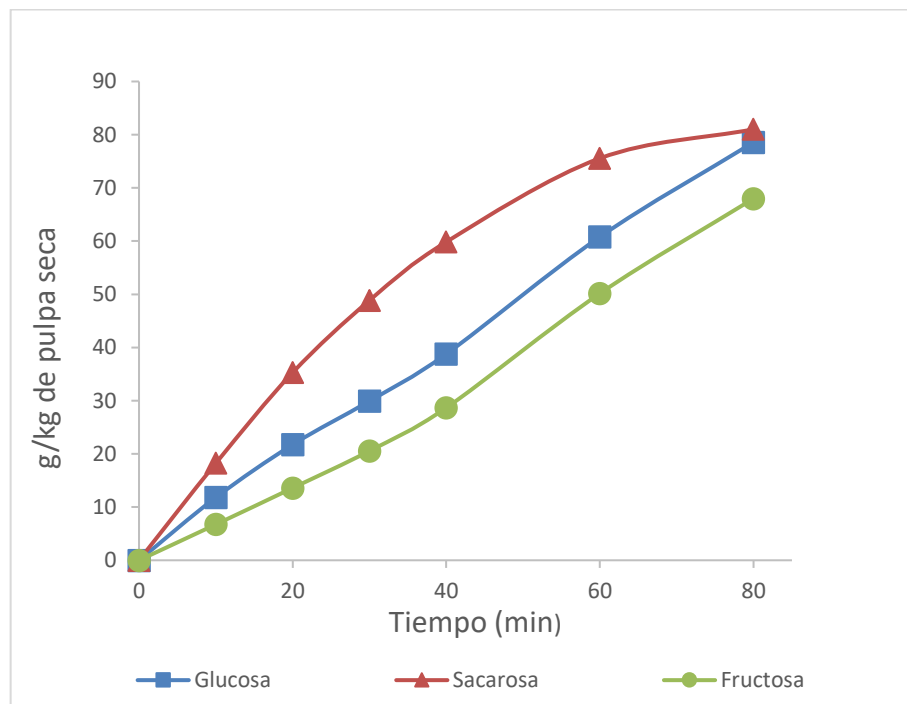


Figura 22 Extracción hidrotermal a 140°C (g/kg de pulpa seca) de glucosa, sacarosa y fructosa

5.2.3 Subproductos

Esta sección se centra en el estudio del comportamiento de los subproductos de degradación de azúcares libres, pectinas y hemicelulosas: ácido fórmico, ácido acético, ácido acrílico, 5-hidroximetilfurfural, furfural, glicolaldehído, arabinosa y ácido levulínico. En todos los casos, se observa un aumento de su concentración con el tiempo de extracción debido a esta degradación.

Los subproductos estudiados pueden ser de primer o de segundo nivel respecto a su formación. Los de primer nivel, proceden de alguno de los productos obtenidos. Es el caso tanto del ácido acético como de la arabinosa, que provienen de la autohidrólisis de la hemicelulosa y pectinas. El glicolaldehído viene de forma directa de la condensación retro-aldólica de la glucosa. De forma similar, el furfural se produce por deshidratación de la fructosa y la arabinosa, y el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) por la deshidratación de la glucosa y galactosa. En un segundo nivel, el ácido levulínico proviene de la degradación del HMF, mientras que el ácido acrílico y el ácido fórmico de la degradación de ambos HMF y furfural (Nitsos et al., 2013).

5.2.3.1 Ensayo a 180°C

En estas condiciones se observa una gran formación de todos los subproductos en los primeros 20 minutos y luego un descenso de la velocidad de formación a partir de ese momento (Figura 23). Cabe destacar que el subproducto que más se forma fue el ácido fórmico, 18,05 g/kg de pulpa seca, que como se ha comentado anteriormente se obtiene a partir de 5-HMF. Es lógico que el subproducto mayoritario sea de segundo nivel (proveniente de otro subproducto) debido a la alta temperatura de extracción. Al ácido fórmico le siguen la arabinosa (11,76 g/kg de pulpa seca) y el ácido acrílico (10,91 g/kg de pulpa seca).

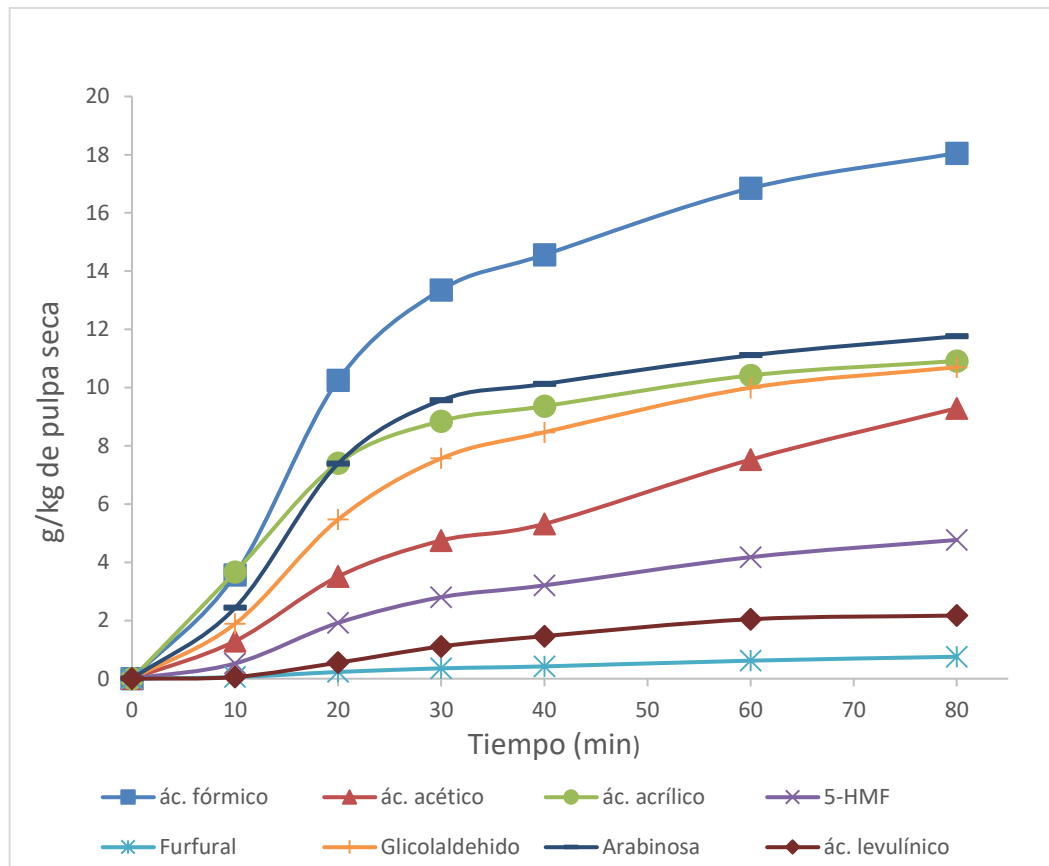


Figura 23 Extracción hidrotérmica a 180°C (g/kg de pulpa seca) de ácido fórmico, ácido acético, ácido acrílico, 5-HMF, furfural, glicolaldehído, arabinosa, ácido levulínico.

5.2.3.2 Ensayo a 160°C

En estas condiciones los subproductos que se formaron mayoritariamente fueron ácido acrílico (12,48 g/kg de pulpa seca), el ácido fórmico (11,61 g/kg de pulpa seca) y la arabinosa (11,22 g/kg de pulpa seca). Se observa un descenso de los productos de segundo nivel respecto a la extracción a 180 °C. En esta extracción destaca la arabinosa, proveniente de la autohidrólisis de la hemicelulosa (Figura 24).

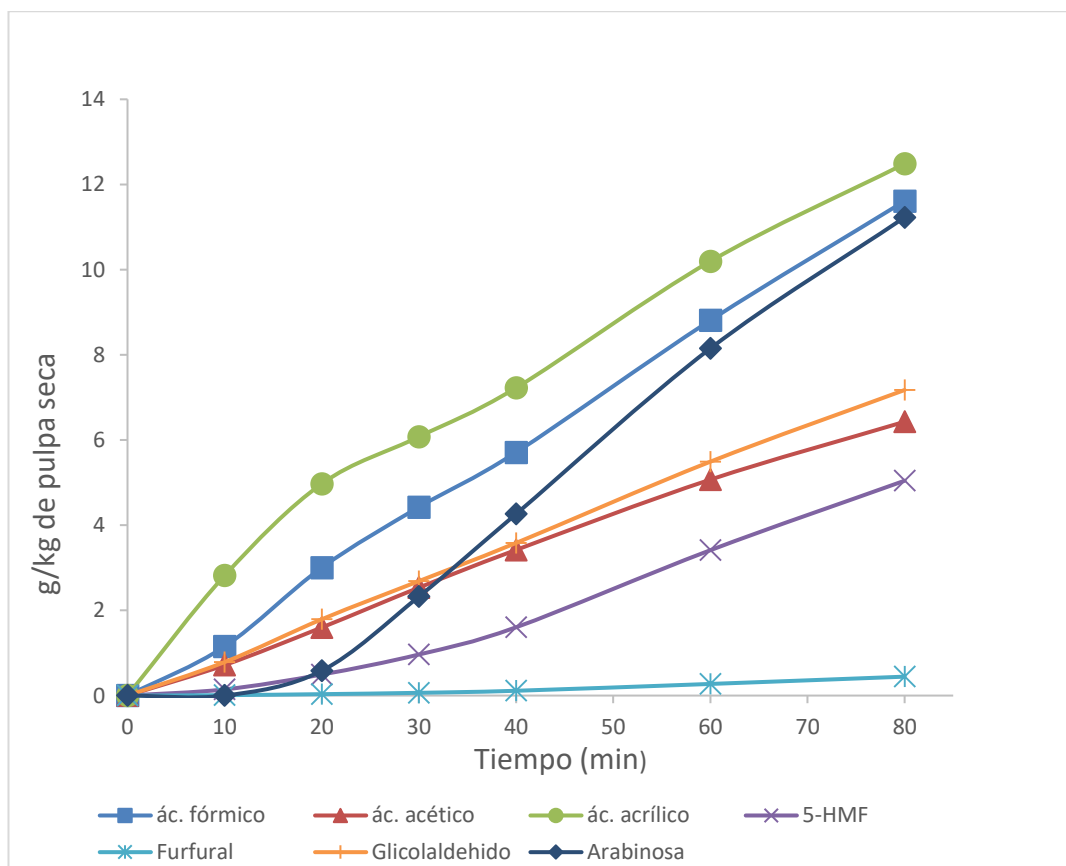


Figura 24 Extracción hidrotérmica a 160°C (g/kg de pulpa seca) de ácido fórmico, ácido acético, ácido acrílico, 5-HMF, furfural, glicolaldehído, arabinosa, ácido levulínico.

5.2.3.3 Ensayo a 140°C

En este ensayo se obtuvieron como principales productos el glicolaldehído (4,28 g/kg de pulpa seca), ácido fórmico (3,50 g/kg de pulpa seca) y ácido acrílico (3,45 g/kg de pulpa seca) (Figura 25). El primero se formó por la degradación de la glucosa, y el ácido fórmico y el ácido acrílico son subproductos de segundo nivel. Dado que 140°C es la menor temperatura de extracción empleada, tiene sentido que el subproducto mayoritario, glicolaldehído, sea de primer nivel y provenga de forma directa de alguno de los productos. Se observa respecto a las temperaturas anteriores como algunos subproductos secundarios no se formaron ya que como se ha comentado en el caso anterior, a menores temperaturas la formación de subproductos secundarios disminuye.

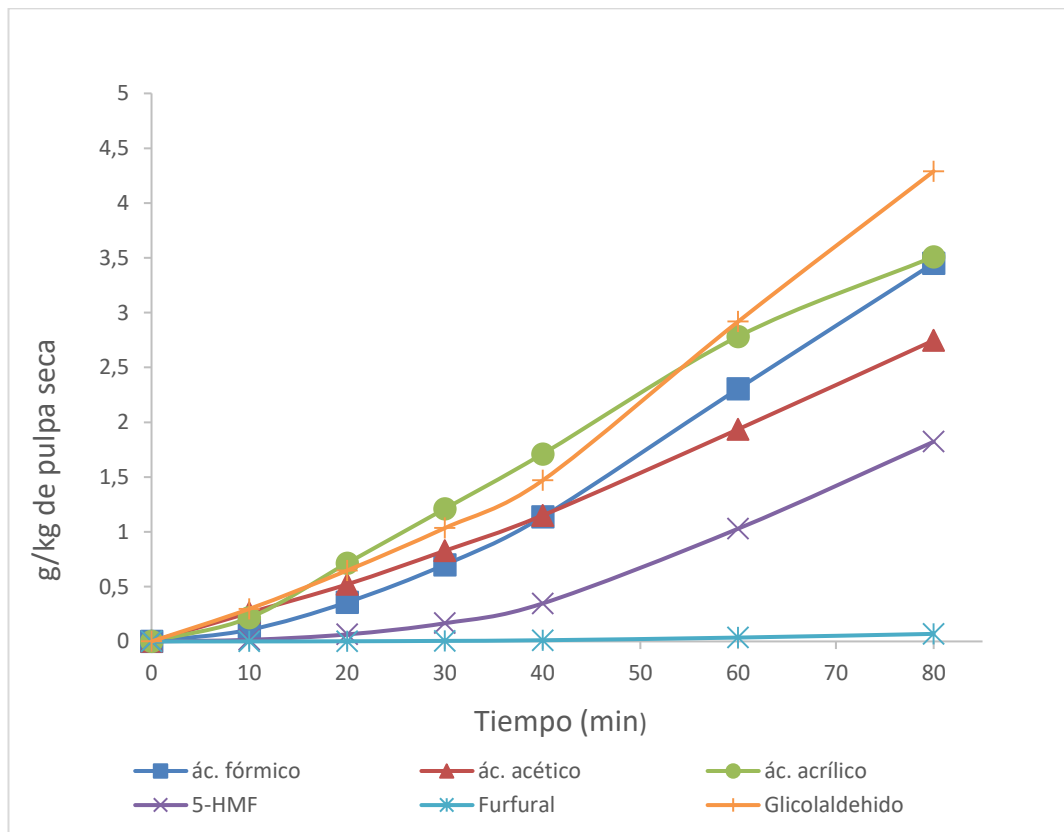


Figura 25 Extracción hidrotérmica a 140°C (g/kg de pulpa seca) de ácido fórmico, ácido acético, ácido acrílico, 5-HMF, furfural, glicolaldehído, arabinosa, ácido levulínico.



5.2.4 Rendimiento de extracción (wt%) de arabinogalactanos, pectinas y azúcares libres.

A continuación, se estudió la comparativa de los tres ensayos con respecto al rendimiento de la extracción (Figura 26, Figura 27 y Figura 28) para ello, se tomó como referencia la cantidad de arabinogalactanos, pectinas y azúcares libres de la materia prima que se introdujo en el reactor. Hay que tener en cuenta que los rendimientos obtenidos no corresponden a la cantidad total real que se extrajo, ya que siempre va a existir una pérdida por degradación durante el ensayo y una pre-extracción durante el precalentamiento en batch del reactor hasta alcanzar la temperatura de operación en la planta.

La hemicelulosa tiene un rendimiento de extracción de 89,56% a 140°C, mientras que, en los ensayos a temperaturas superiores, fue algo inferior, 69,45 % a 160°C y 73,40% a 180°C. Esto indica que a mayor temperatura existe mayor hidrólisis y degradación de las hemicelulosas durante la extracción.

Los rendimientos de la extracción de pectinas fueron 49,53% a 180°C, 20,16% a 160°C y 21% a 140°C. La cantidad extraída a la temperatura de 180°C es mucho mayor que la que se obtuvo a 160°C y 140°C, esto es así porque hay un cierto tipo de pectinas que solo se extraen a temperaturas altas.

Los rendimientos correspondientes a los azúcares libres fueron de 27,06% a 180°C, 34,71% a 160°C y 37,98% a 140°C. Los azúcares se degradaron a medida que aumentó la temperatura y en general tienen un bajo rendimiento porque un porcentaje importante se extrajo en la etapa de precalentamiento del reactor a 90°C, ese líquido proveniente del precalentamiento no se recupera, pero contiene azúcares libres.

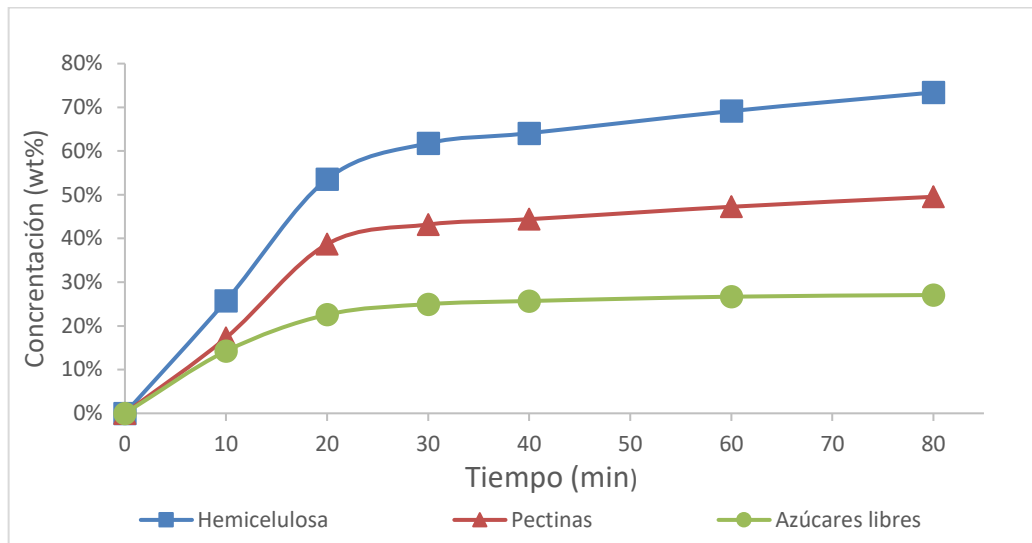


Figura 26 Rendimiento de la extracción de 180°C de hemicelulosa, pectinas y azúcares libres.

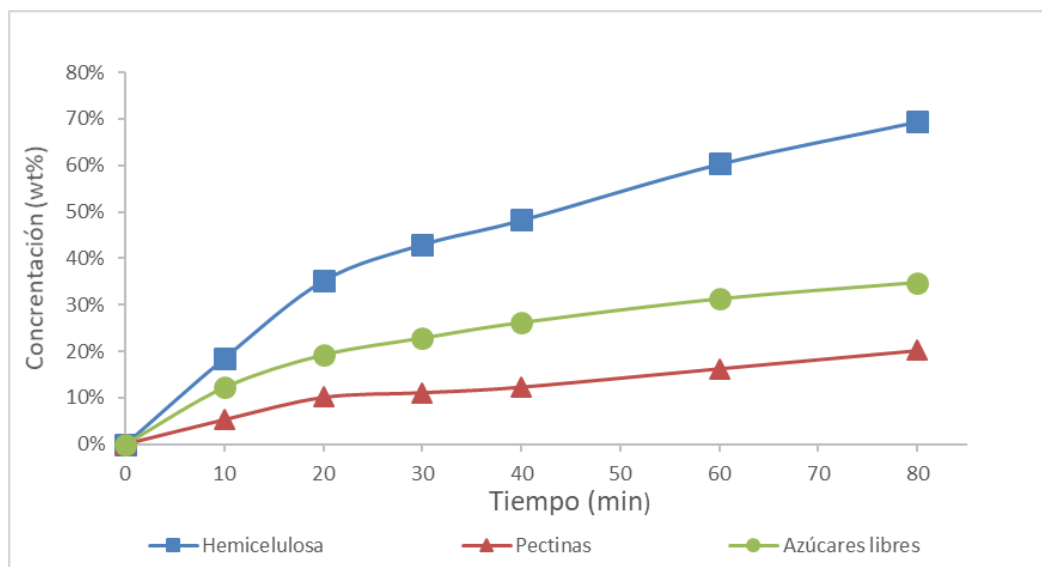


Figura 27 Rendimiento de la extracción de 160°C de hemicelulosa, pectinas y azúcares libres.

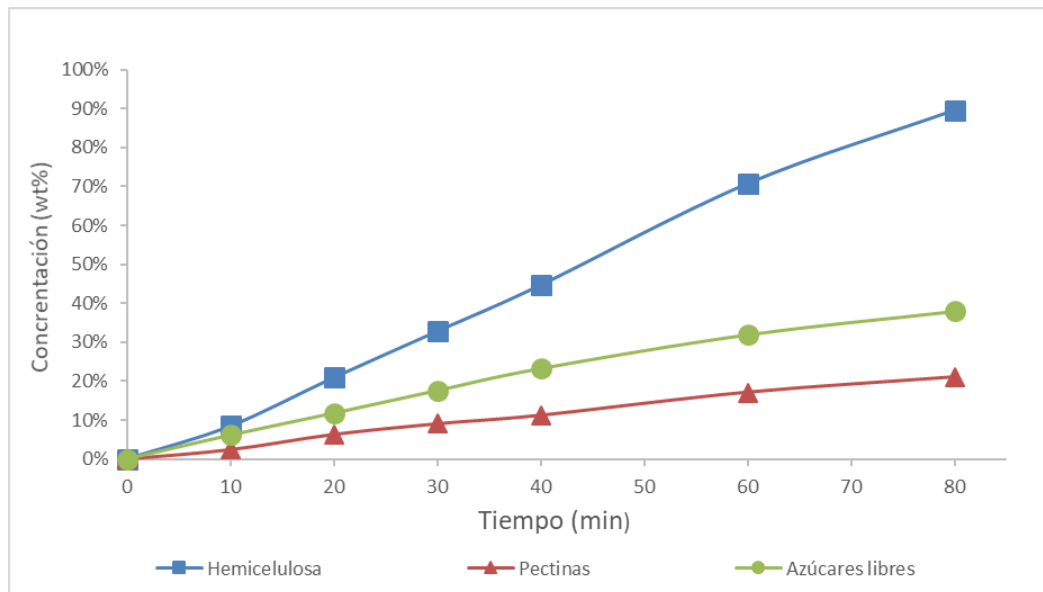


Figura 28 Rendimiento de la extracción de 140°C de hemicelulosa, pectinas y azúcares libres.

5.2.5 Distribución del peso molecular de los extractos

Se estudió las diferentes distribuciones del peso molecular a la salida de la extracción a 140, 160 y 180 °C. Se tomó muestra en los instantes de tiempo 0, 10, 20, 30, 40, 60 y 80 minutos desde el inicio de la operación, gracias a la válvula toma-muestra VM-01 situada a la salida del reactor (Figura 10). Los grupos moleculares estudiados son; monómeros, dímeros, pentámeros, hexámeros, 1-5 kDa, 5-10 kDa, 10-30 kDa, >30 kDa.

Se observó que en el ensayo a 180°C mostrado en Figura 29 en el minuto 0 de extracción los grupos moleculares con mayor presencia fueron en primer lugar los dímeros y en segundo lugar los monómeros, el resto de los grupos moleculares, a excepción de 1-5 kDa, fueron casi inexistentes. Ello parece indicar que el grupo molecular 1-5 kDa es el más fácilmente extraíble, a 180°C, de la materia prima. A partir del minuto 0 la presencia de los dímeros disminuyó manteniéndose constante a partir del minuto 30 de la extracción. Los monómeros aumentaron su presencia hasta el minuto 10, donde tuvieron su máximo y decrecieron progresivamente en los siguientes minutos hasta el fin del experimento. Esta evolución se puede deber a la hidrólisis que sufren la sacarosa y a un agotamiento de glucosa y fructosa en la materia prima. La presencia de los grupos moleculares de pesos moleculares más altos, 5-10 kDa, 10-30 kDa, >30 kDa, aumentaron hasta el instante 10 min, reduciéndose progresivamente debido a la hidrólisis. Finalmente, los grupos

moleculares de pentámeros, hexámeros y 1-5 kDa, tuvieron su máximo en el instante 20 min y luego, como los grupos moleculares de mayor peso, se reducen progresivamente, esto se debe a que los fragmentos de los grupos moleculares de alto peso molecular (>30 kDa) que se van rompiendo pasan a engrosar los grupos moleculares más pequeños.

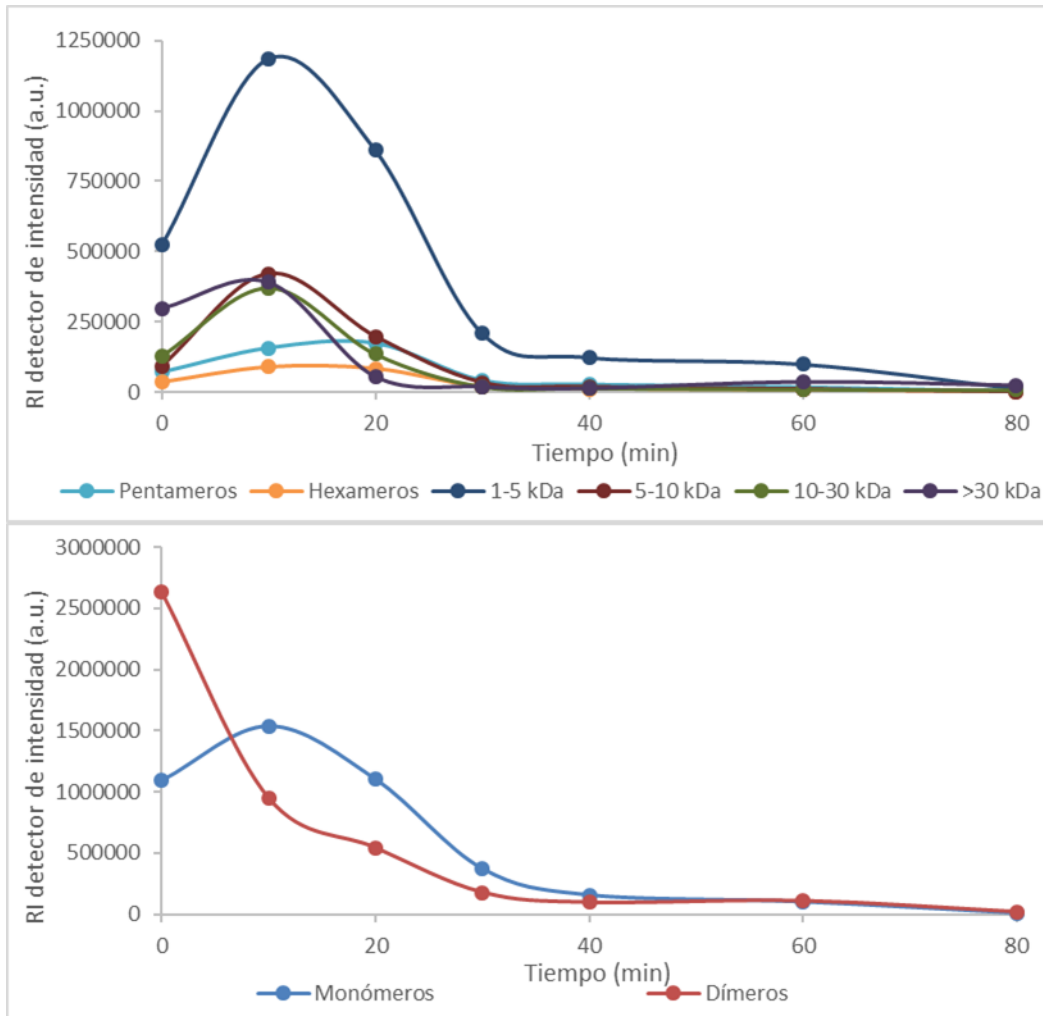


Figura 29 Distribución del peso molecular en la salida del reactor a 180°C

Se puede observar en la Figura 30 el ensayo a 160°C donde la extracción de los dímeros fue muy similar al ensayo anterior, se produjo principalmente en los primeros 20 minutos de extracción donde alza su mínimo. Desde aquí al final del ensayo la presencia de dímeros se mantiene casi constante no siendo significativa. La extracción de los monómeros fue menor que en ensayo anterior, alcanzaron su máximo tras 10 minutos y siguiendo una curva de extracción prácticamente igual a la de los dímeros a partir del minuto 20. Los grupos de mayor peso molecular 5-10 kDa, 10-30 kDa, >30 kDa, tuvieron su máximo a los 10 minutos y llegaron a agotarse durante el ensayo debido a la hidrólisis que se produce, lo que repercute en un aumento de la concentración de pentámeros, hexámeros y 1-5 kDa durante todo el ensayo y permite que no se agoten al finalizar el tiempo de extracción.

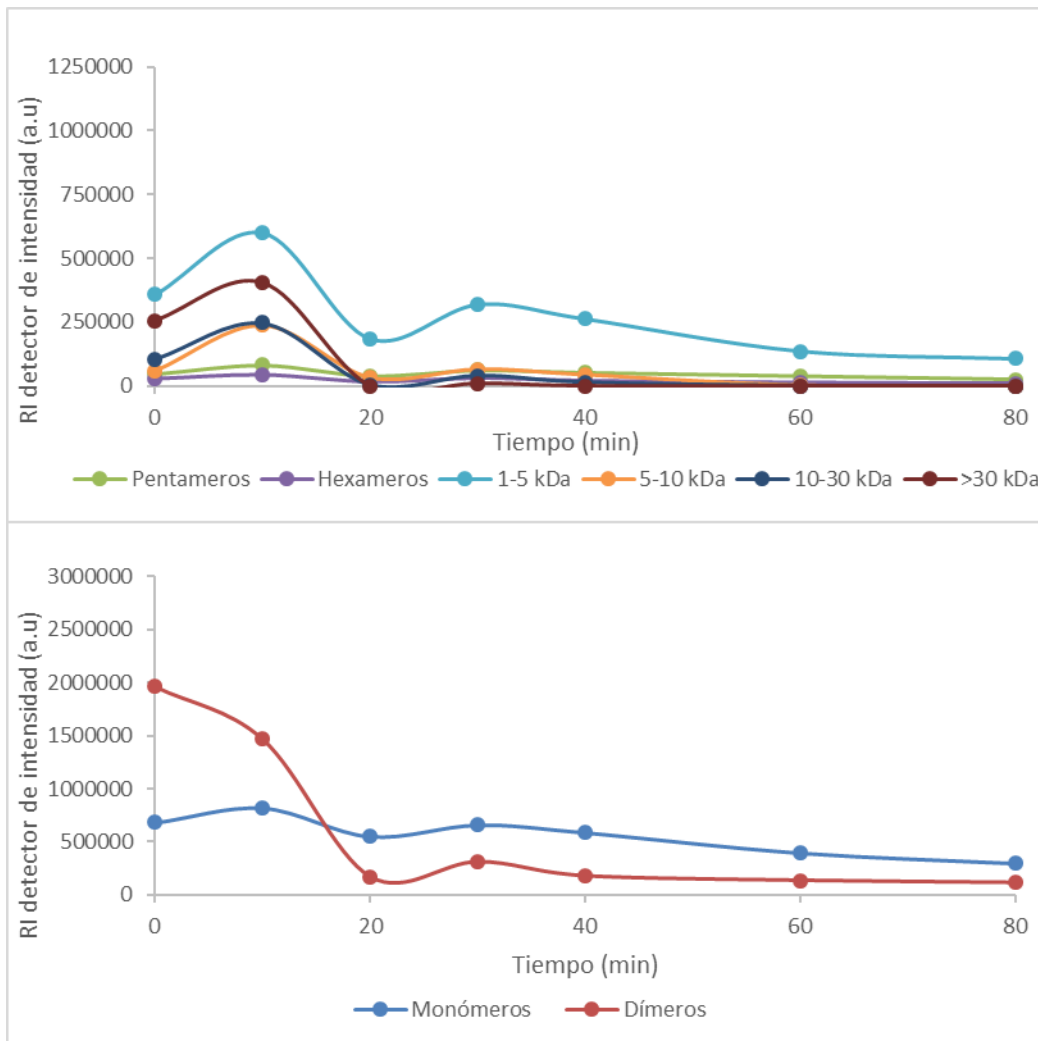


Figura 30 Distribución del peso molecular en la salida del reactor a 160°C

El ensayo realizado a 140°C se puede ver en la Figura 31. Los dímeros no sufrieron una bajada tan brusca como en los ensayos anteriores y se mantiene un descenso constante en su extracción, lo mismo pasa en los monómeros que tuvieron un máximo a los 30 minutos y luego un descenso muy progresivo. Esto se debe a que es una temperatura mucho menor a las dos anteriores y no se llega a agotar la materia prima de estos grupos moleculares. Los grupos de mayor peso molecular 5-10 kDa, 10-30 kDa, >30 kDa no aparecieron hasta el minuto 10 extracción y decrecieron desde este momento por hidrólisis, lo que influyó en el aumento de la presencia de hexámeros, pentámeros y 1-5 kDa durante el ensayo.

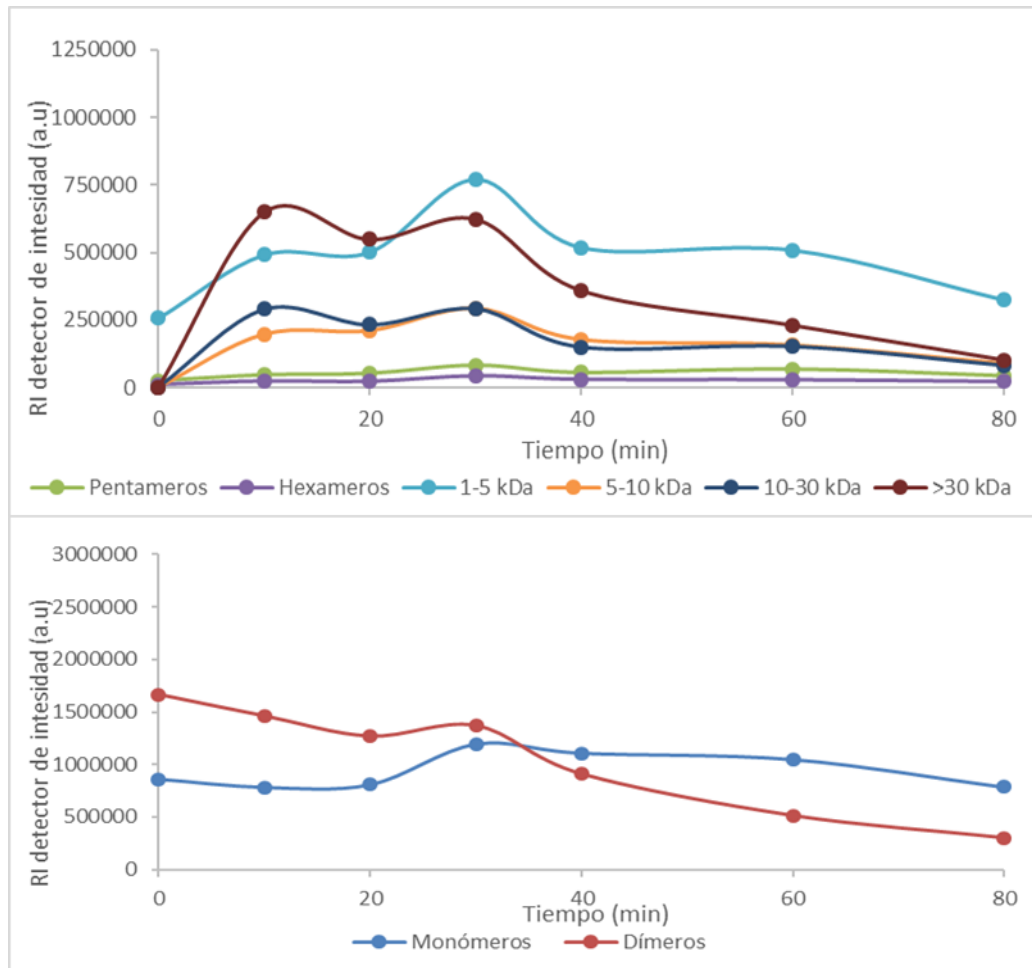


Figura 31 Distribución del peso molecular en la salida del reactor a 140°C.



5.3 Ultrafiltración y diafiltración

5.3.1 Composición y distribución de peso molecular de los extractos usados como alimentación de las membranas.

La Tabla 1 muestra la composición en mg/L de los líquidos recuperados en cada uno de los ensayos a 140°C, 160°C y 180°C. Estos extractos provenientes de la planta piloto fueron guardados en garrafas y sirvieron como alimentación en los procesos de ultrafiltración y diafiltración por membranas. Es necesario conocer de qué cantidades se parte en cada caso para luego analizar qué productos se obtienen en cada membrana. Se observa que cuanto mayor es la temperatura a la que se ha operado mayor es la concentración de los componentes en la alimentación que vamos a introducir en las membranas, pues se recogieron los primeros 25 minutos de operación, donde la degradación tiene menos importancia que la acelerada cinética provocada por una mayor temperatura.

De manera general: la alimentación de 140°C cuenta con 1765,42 mg/L de azúcares libres, 175,45 mg/L de subproductos y 928,83 mg/L de biopolímeros. La alimentación de 160°C cuenta con 2340,79 mg/L de azúcares libres, 491,72 mg/L de subproductos y 1427,47 mg/L de biopolímeros. Por último, la alimentación de 180°C cuenta con 3093,90 mg/L de azúcares libres, 952,82 mg/L de subproductos y 2133,97 mg/L de biopolímeros.

La Tabla 1 muestra la composición de las alimentaciones en mayor detalle.

Tabla 1 Composición de la alimentación de las membranas tras la extracción.

	Alimentación 140 (mg/L)	Alimentación 160 (mg/L)	Alimentación 180 (mg/L)
Galacto-	356,08	660,35	1149,21
Arabino-	236,57	274,94	367,24
Arabinogalactanos	639,25	935,29	1516,45
Pectinas	289,59	492,18	617,52
Sacarosa	820,11	1012,85	1166,58
Glucosa	483,36	704,63	1130,61
Fructosa	461,94	623,30	796,70
Arabinosa	21,88	n.d.	174,68
Glycolaldehyde	32,21	82,72	140,72
Ácido fórmico	30,74	216,12	278,56
Ácido acético	41,58	45,40	88,32
Ácido levulínico	1,93	15,76	3,89
Ácido acrílico	45,31	120,63	218,08
5-HMF	1,80	11,09	45,54
Furfural	n.d.	n.d.	3,04
Azúcares libres	1765,41	2340,79	3093,90
Subproductos	175,45	491,72	952,82
Biopolimeros	928,83	1427,47	2133,97

(n.d) no detectado

La distribución de los pesos moleculares de los tres extractos obtenidos se puede ver en la Figura 32. La curva de distribución de pesos moleculares fue muy similar en los tres ensayos, observándose los picos más fácilmente reconocibles aquellos correspondientes a monómeros y dímeros, ya que fueron los que estuvieron presentes en mayor proporción dada la Tabla 1. En el ensayo a 180°C, el pico correspondiente a los monómeros alcanzó mayor intensidad que en los ensayos a 160°C y 140°C, debido a que cuanto mayor sea la temperatura, mayor es la extracción y mayor es la hidrólisis de sacarosa a sus monómeros. La tendencia para el resto de los pesos moleculares es muy similar en las tres temperaturas de extracción. Se observa que en el tramo de 1 kDa a 5 kDa existe pico entre esos dos pesos, siendo más claro en el caso de los ensayos a 180°C y 160°C. Dicho pico corresponde a un peso molecular aproximado de 2 kDa. A de 140°C puede apreciarse la presencia de otro pico, que a temperaturas mayores parece hidrolizarse a pesos menores. También puede apreciarse la existencia de un pico entre 5 kDa y 10 kDa que corresponde un peso molecular aproximado de 7 kDa. Las líneas verticales en la Figura 32 representan los cortes moleculares de las membranas empleadas. En consecuencia, podrían



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

separarse los grupos presentes en fracciones correspondientes a esos rangos. La región que parece menos abundante es aquella entre 10-30 kDa, por lo que sería un producto minoritario dentro de los obtenidos.

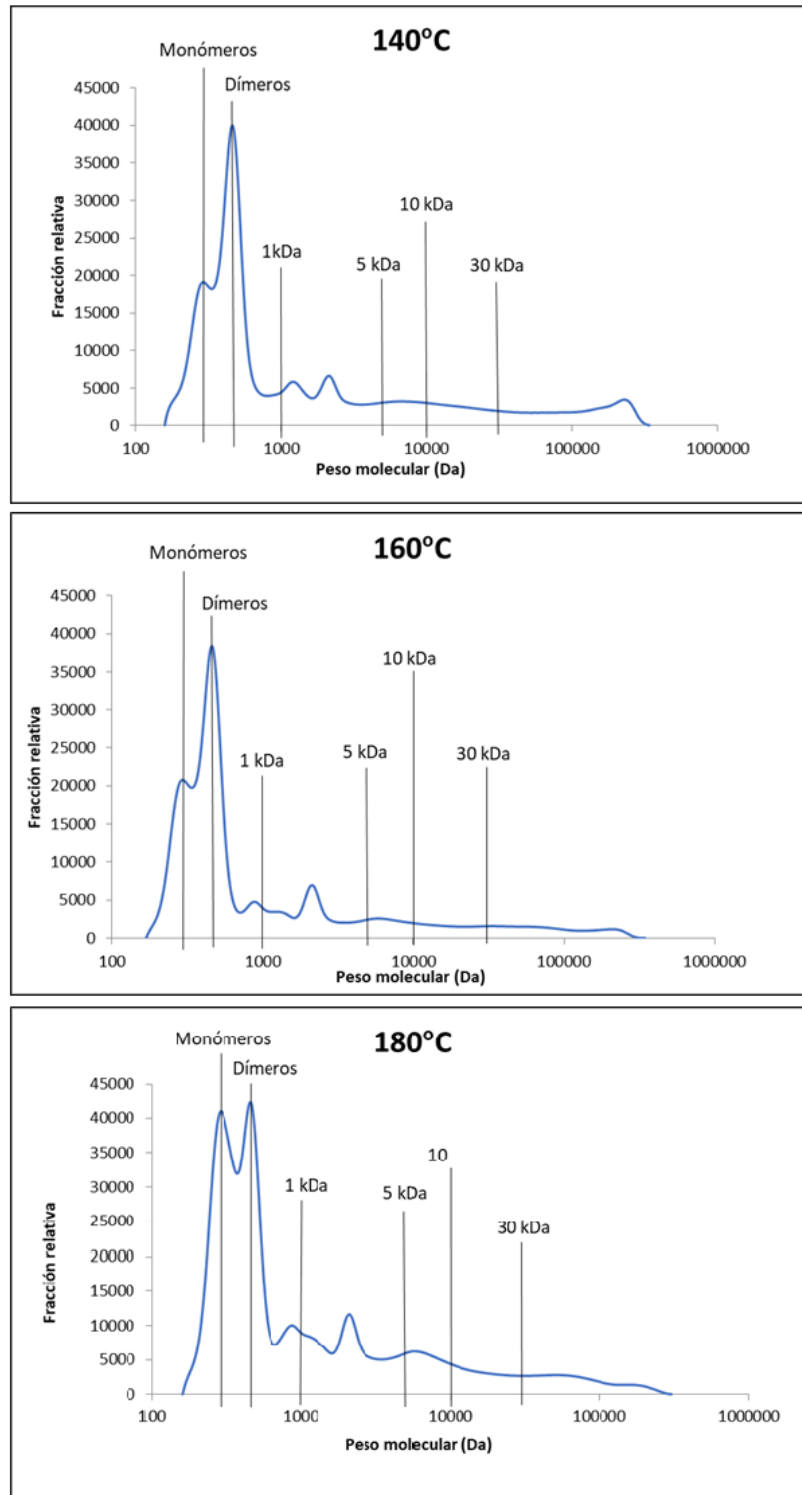


Figura 32. Distribución de pesos moleculares de los tres ensayos.



5.3.2 Aumento de la concentración tras la ultrafiltración y diafiltración

Se consiguió un aumento de la concentración de los distintos grupos moleculares a través de la ultrafiltración y diafiltración. En las membranas se fijó cada una de ellas una reducción de volumen del 80%, esto implicó un aumento de la concentración de máximo 5 veces respecto a la concentración de la entrada de la membrana. Dada la configuración de las membranas, de tipo mixto, que se empleó en el ensayo a 180°C (Figura 12) la concentración pudo aumentar hasta un máximo de 25 veces con respecto a la alimentación. El incremento en la concentración de los grupos moleculares tras atravesar las membranas con respecto a la concentración de la alimentación es lo que hemos llamado **factor de concentración**. El peso molecular promedio en la alimentación fue de 9,02 kDa para el ensayo de 180°C, 10,98 kDa para el de 160°C y en el ensayo de 140°C fue de 18,83 kDa. Estas diferencias en el peso molecular se deben a que a temperaturas más altas la hemicelulosa sufre una mayor hidrólisis que a bajas temperaturas.

Los resultados del ensayo a 180°C respecto al factor de concentración se muestran en la Figura 33. A esta temperatura, se obtuvo una mayor concentración, como se ha comentado anteriormente, por la configuración mixta de las membranas. Los grupos de 10-30 kDa y > 30 kDa fueron mayoritariamente retenidos en la membrana de 10 kDa con un factor de concentración de 25 en el retenido, que es el máximo que se puede alcanzar. Cabe destacar en el retenido de la primera membrana, de 5 kDa, aumentó la concentración de todos los grupos moleculares, incluso de aquellos grupos que tendrían que atravesar la membrana de 5 kDa. Esto fue así porque fue la primera membrana que recibió la alimentación de 180°C, y su MWCO era más bien moderado. Tras los ciclos de diafiltración, en el retenido de 5 kDa diafiltrado se observó un gran descenso de la presencia de los grupos de pesos moleculares bajos, ya que lograron atravesar la membrana de 5 kDa mientras que se retuvieron los grupos de pesos moleculares más altos.

En el caso del ensayo a 160°C (Figura 34) y el ensayo a 140°C (Figura 35) se obtuvieron unos resultados similares ya que la configuración de las membranas fue la misma, de tipo cascada. El grupo molecular de > 30 kDa y 10-30 kDa fue prácticamente retenido en su totalidad en la primera membrana de 30 kDa, y en ambos casos, llegaron a 5 que es el máximo valor de factor concentración posible en esta configuración de membranas.

Para el resto de las membranas 10 kDa, 5 kDa y 1 kDa no hubo un incremento importante del factor concentración con respecto a la

alimentación. Esto se explica por la alta retención que proporcionó la primera membrana en ambos ensayos. De manera general, los grupos moleculares retenidos en estas 3 últimas membranas fueron algo superior en el ensayo de 160°C que a 140°C, debido al menor peso molecular medio que hay en esta alimentación.

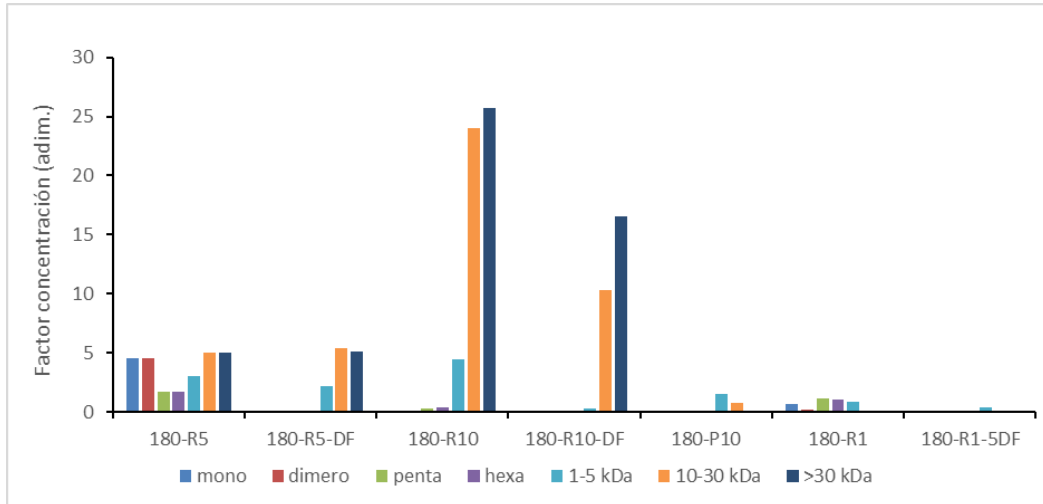


Figura 33 Concentración de los grupos de moleculares de la extracción a 180°C tras la ultrafiltración.

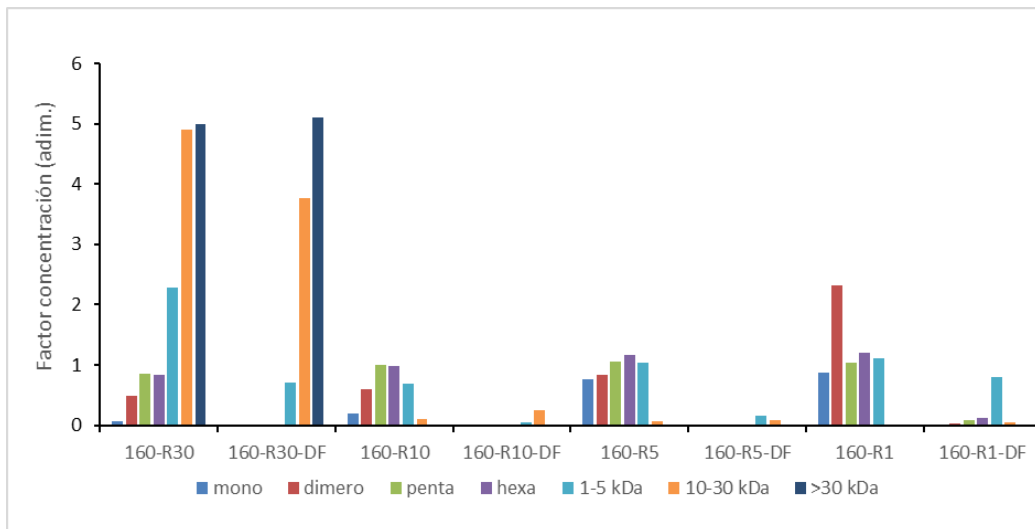


Figura 34 Concentración de los grupos de moleculares de la extracción a 160°C tras la ultrafiltración.

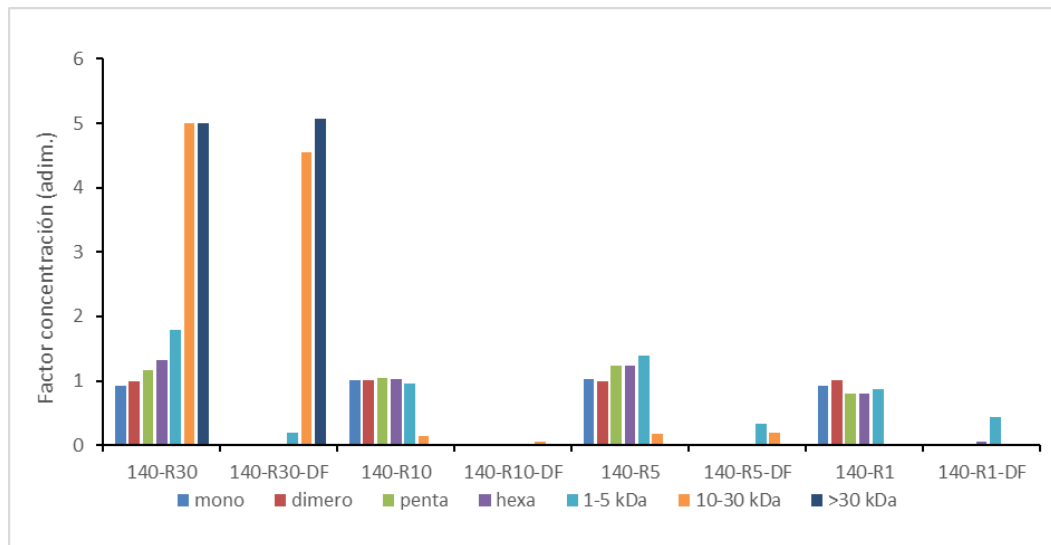


Figura 35 Concentración de los grupos de moleculares de la extracción a 140°C tras la ultrafiltración.

5.3.3 Separación tras la ultrafiltración y diafiltración

Uno de los objetivos del ensayo es estudiar la separación de los diferentes grupos moleculares por su peso molecular tras la ultrafiltración y la diafiltración. En las Tablas 2, 3 y 4 se puede observar el porcentaje de recuperación de los diferentes grupos moleculares a las distintas temperaturas.

En Tabla 2 se puede apreciar la separación de los grupos moleculares antes y después de los ciclos de diafiltración a 180°C. Los monómeros antes de los ciclos de diafiltración se encontraban en un 14% en el Ret-1, el resto se perdieron en el Perm-1 y tras los ciclos se consiguieron eliminar totalmente yéndose en las aguas de diafiltración. El grupo molecular dímeros, antes de los ciclos de diafiltración se encontraba en un 20% en el Ret-1 y se consiguió eliminar casi por completo tras los ciclos quedando solo un 1%. Un 26% de los pentámeros se encontraban distribuidos entre el Ret-1, Perm-10 y Ret-1 antes de los ciclos de diafiltración, tras ellos se consiguió eliminar este grupo molecular prácticamente por completo quedando un 2% en el Ret-1-DF. Un 28% de los pentámeros se encontraban distribuidos entre el Ret-1, Perm-10 y Ret-1 antes de los ciclos de diafiltración, tras ellos se consiguió eliminar este grupo molecular prácticamente por completo quedando un 3% en el Ret-1-DF.



Los grupos de mayor interés son 1-5 kDa, 5-10 kDa, 10-30 kDa y >30KDa, debido a que son el tamaño del corte de las membranas que se usaron en el presente trabajo.

El grupo molecular de 1-5 KDa se encontraba distribuido antes de los ciclos de diafiltración como; 23% en Ret-10, 31% en Perm-10 y 17% en el Ret-1. Tras el ciclo de diafiltraciones la mayor parte fueron arrastrados por las aguas de diafiltración reteniéndose tan solo un 1% en Ret-10-DF y un 8% en Ret-1-DF. El grupo molecular de 5-10 kDa se encontraba distribuido antes de los ciclos de diafiltración como; 60% en Ret-10, 39% en Perm-10 y 1% en el Ret-1. Como en el grupo anterior de 1-5 KDa, tras el ciclo de diafiltraciones la mayor parte fue arrastrado por las aguas de diafiltración reteniéndose tan solo un 1% en Ret-10-DF y un 8% en Ret-1-DF. En el grupo molecular de 10-30KDa la distribución previa a los ciclos de diafiltración fue la siguiente 89% en Ret-10, 11% en Perm-10 tras los ciclos se consiguieron recuperar el 38% en el Ret-10-DF. El grupo molecular de >30KDa antes de los ciclos de diafiltración se encuentran el 100% en el Ret-10 tras ellos se consiguen recuperar el 65%.

Tabla 2 Recuperación de grupos moleculares a 180°C.

	Ret-10	Perm-10	Ret-1	Perm-1	Ret-10-DF	Ret-1-DF	Agua DF
Monómeros	0%	0%	14%	86%	0%	0%	14%
Dímeros	0%	0%	20%	79%	0%	1%	20%
Pentámeros	2%	1%	23%	75%	0%	2%	23%
Hexámeros	2%	2%	24%	72%	0%	3%	25%
1-5 kDa	23%	31%	17%	29%	1%	8%	61%
5-10 kDa	60%	39%	1%	0%	9%	3%	88%
10-30 kDa	89%	11%	0%	0%	38%	0%	62%
>30 kDa	100%	0%	0%	0%	65%	0%	35%

En el ensayo a 160°C , en la Tabla 3 se puede ver que los grupos moleculares de los monómeros y dímeros antes de los ciclos de diafiltración se encontraban en un 43% y 24% respectivamente, distribuidos entre Ret-30, Ret-10, Ret-5, Ret-1 y tras los ciclos se consiguió eliminar totalmente yéndose en las aguas de diafiltración. Los grupos moleculares de pentámeros y hexámeros se encontraban distribuidos entre Ret-30, Ret-10, Ret-5 y Ret-1 con porcentajes de 64% y 66% respectivamente antes de los ciclos de diafiltración. Tras ellos se consiguió eliminar estos grupos moleculares prácticamente por completo quedando un 4% de pentámeros y un 6% de hexámeros en Ret-1-DF.

El grupo molecular de 1-5 KDa se encontraba distribuido antes de los ciclos de diafiltración como; 49% en Ret-30, 12% en Ret-10, 14% en Ret-5 y 12% en



Ret-1. Tras el ciclo de diafiltraciones se pudo recuperar la mayoría del grupo con la siguiente distribución; 15% en Ret-30-DF, 1% en Ret-10-DF, 2% en Ret-5-DF y 35% en Ret-1. El grupo molecular de 5-10 kDa se encontraba distribuido antes de los ciclos de diafiltración como; 83% en Ret-30, 7% en Ret-10, 7% en Ret-5 y 3% en Ret-1. Tras el ciclo de diafiltraciones también se pudo recuperar una gran parte con la siguiente distribución 32% en Ret-30-DF, 5% en Ret-10-DF, 6% en Ret-5-DF y 24% en Ret-1. En el grupo molecular de 10-30KDa la distribución previa a los ciclos de diafiltración fue la siguiente; 97% en Ret-30, 2% en Perm-10, 1% en Ret-5. La mayor parte se perdió en las aguas de diafiltración (un 61%) lo que se recuperó tuvo la siguiente distribución; 32% en Ret-30-DF, 4% en Ret-10-DF y 1% en Ret-5-DF. El grupo molecular de >30KDa antes de los ciclos de diafiltración se encuentran el 100% en el Ret-10 y tras ellos se consiguió recuperar completamente.

Tabla 3 Recuperación de grupos moleculares a 160°C.

	Ret-30	Ret-10	Ret-5	Ret-1	Pem-1	Ret-30-DF	Ret-10-DF	Ret-5-DF	Ret-1-DF	Agua DF
Monómeros	2%	6%	18%	17%	57%	0%	0%	0%	0%	43%
Dímeros	4%	4%	5%	11%	76%	0%	0%	0%	0%	24%
Pentámeros	19%	18%	15%	12%	36%	0%	0%	0%	4%	60%
Hexámeros	18%	17%	16%	13%	37%	0%	0%	0%	6%	57%
1-5 kDa	49%	12%	14%	12%	13%	15%	1%	2%	35%	34%
5-10 kDa	83%	7%	7%	3%	0%	32%	5%	6%	24%	34%
10-30 kDa	97%	2%	1%	0%	0%	32%	4%	1%	2%	61%
>30 kDa	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%

A la temperatura de 140°C en la Tabla 4 se puede ver que los grupos moleculares de los monómeros, dímeros y pentámeros antes de los ciclos de diafiltración se encontraban en un 62%, 67% y 69% respectivamente, distribuidos entre Ret-30, Ret-10, Ret-5, Ret-1 y tras los ciclos se consiguió eliminar totalmente yéndose en las aguas de diafiltración. El grupo molecular de hexámeros se encontraba distribuido entre Ret-30, Ret-10, Ret-5 y Ret-1 con un porcentaje del 71% antes de los ciclos de diafiltración. Tras ellos se consiguió eliminar este grupo molecular prácticamente por completo quedando un 2% de hexámeros en Ret-1-DF.

El grupo molecular de 1-5kDa se encontraba distribuido antes de los ciclos de diafiltración como; 38% en Ret-30, 16% en Ret-10, 19% en Ret-5 y 9% en Ret-1. Tras el ciclo de diafiltraciones la mayor parte fue arrastrado por las aguas de diafiltraciones quedando la siguiente distribución 4% en Ret-30-DF, 5% en



Ret-5-DF y 19% en Ret-1. El grupo molecular de 5-10 kDa se encontraba distribuido antes de los ciclos de diafiltración como; 87% en Ret-30, 5% en Ret-10, 8% en Ret-5. Tras el ciclo de diafiltraciones se obtuvo la siguiente distribución 58% en Ret-30-DF, 2% en Ret-10-DF, 6% en Ret-5-DF y 3% en el Ret-1-DF. En el grupo molecular de 10-30KDa la distribución previa a los ciclos de diafiltración fue la siguiente; 95% en Ret-30, 2% en Perm-10, 2% en Ret-5. Tras los ciclos de diafiltración se obtuvo la siguiente distribución; 58% en Ret-30-DF, 1% en Ret-10-DF y 2% en Ret-5-DF. El grupo molecular de >30KDa antes de los ciclos de diafiltración se encuentran el 100% en el Ret-10 y tras ellos se consiguió recuperar completamente.

Tabla 4. Recuperación de grupos moleculares a 140°C.

	Ret-30	Ret-10	Ret-5	Ret-1	Perm-1	Ret-30-DF	Ret-10-DF	Ret-5-DF	Ret-1-DF	Agua DF
Monómeros	20%	18%	14%	10%	37%	0%	0%	0%	0%	63%
Dímeros	22%	18%	14%	11%	35%	0%	0%	0%	0%	65%
Pentámeros	25%	18%	17%	9%	32%	0%	0%	0%	0%	68%
Hexámeros	28%	17%	17%	9%	29%	0%	0%	0%	2%	69%
1-5 kDa	38%	16%	19%	9%	17%	4%	0%	5%	19%	55%
5-10 kDa	87%	5%	8%	0%	0%	58%	2%	6%	3%	31%
10-30 kDa	95%	2%	2%	0%	0%	58%	1%	2%	0%	39%
>30 kDa	100%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%

5.3.4 Purificación tras diafiltración

Se tiene como objetivo la purificación de arabinogalactanos y pectinas, reduciendo el contenido de azúcares libres y subproductos a través de sucesivos ciclos de diafiltración. En las Tablas 5, 6 y 7 se observa el porcentaje de recuperación de estos componentes para los tres extractos tratados.

En el caso de los subproductos de 180°C (Tabla 5), tras los ciclos de diafiltración del retenido de las membranas de 10 kDa (Ret-10-DF) y 1 kDa (Ret-1-DF) hubo una gran purificación del arabinogalactano y de las pectinas ya que los azúcares libres y subproductos se redujeron bajo el límite de detección. Por tanto, los ciclos de diafiltración son un buen método para su separación en esta ocasión. Cabe destacar que ya antes de los ciclos de diafiltración la mayor parte de los azúcares y subproductos, 74% y 72% respectivamente fueron eliminados en el Perm-1, esto es así debido a su menor peso molecular. Los arabinogalactanos antes de los ciclos de



diafiltración se reparten como 55% en el Ret-10, 20% en el Perm-10 y 9% Ret-1. Tras el ciclo de diafiltración su distribución fue 37% en Ret-10-DF, 2% en el Ret-1-DF y un porcentaje importante (46%) se pierden por las aguas de diafiltración. En las pectinas la distribución previa a los ciclos de diafiltración fue 62% en el Ret-10, 38% en el Perm-10 y tras los lavados fue 28% en el Ret-10-DF, 7% en el Perm-10-DF perdiéndose en las aguas de diafiltración un 65%.

Tabla 5 Recuperación de arabinogalactanos, pectinas, azúcares libres y subproductos a 180°C.

	Ret-10	Perm-10	Ret-1	Perm-1	Ret-10-DF	Ret-1-DF	Agua DF
Arabinogalactanos	55%	20%	9%	15%	37%	2%	46%
Pectinas	62%	38%	0%	0%	28%	7%	65%
Azúcares libres	1%	1%	24%	74%	0%	0%	26%
Subproductos	2%	7%	19%	72%	0%	0%	28%

En el ensayo que se realizó a 160°C (Tabla 6) se observó que los arabinogalactanos antes de los ciclos de diafiltración estaban repartidos como; 68% en Ret-30, 6% en Ret-10, 6% en Ret-5 y 6% en Ret-1. Tras los ciclos de diafiltración la distribución fue la siguiente; 59% en Ret-30-DF ,1% en Ret-10-DF y 2% en Ret-5-DF. El porcentaje de que se pierde en las aguas de diafiltración fue de un 23%, por lo tanto hubo una gran recuperación de arabinogalactanos tras los ciclos de diafiltración. Las pectinas antes de los ciclos de diafiltración se distribuían como; 71% en Ret-30, 13% en Ret-10, 7% en Ret-5 y 8% en Ret-1 tras los ciclos de la distribución fue la siguiente; 70% en Ret-30-DF ,10% en Ret-10-DF, 7% en Ret-5-DF y un 7% en Ret-1-DF, tan solo se perdió en las aguas de diafiltración un 6% . Las aguas de diafiltración como en el caso anterior, arrastraron los azúcares libres y los subproductos que no se habían perdido en el Perm-1 prácticamente por completo. Esto indica que los ciclos de diafiltración son un buen sistema para la purificación de pectinas y arabinogalactanos.



Tabla 6 Recuperación de arabinogalactanos, pectinas, azúcares libres y subproductos a 160°C.

	Ret-30	Ret-10	Ret-5	Ret-1	Pem-1	Ret-30-DF	Ret-10-DF	Ret-5-DF	Ret-1-DF	Agua DF
Arabinogalactanos	68%	6%	6%	6%	14%	59%	1%	2%	0%	23%
Pectinas	71%	13%	7%	8%	1%	70%	10%	7%	7%	6%
Azúcares libres	8%	18%	16%	15%	43%	1%	0%	0%	0%	56%
Subproductos	20%	14%	13%	11%	42%	0%	0%	1%	0%	57%

En el ensayo a 140°C (Tabla 7) se observó que los arabinogalactanos antes de los ciclos de diafiltración estaban repartidos como; 59% en Ret-30, 6% en Ret-10, 10% en Ret-5 y 4% en Ret-1. Tras los ciclos de diafiltración la distribución fue la siguiente; 53% en Ret-30-DF ,1% y 2% en Ret-5-DF. El porcentaje de que se pierde en las aguas de diafiltración fue de un 25%, por lo tanto hubo una gran recuperación de arabinogalactanos tras los ciclos de diafiltración. Las pectinas antes de los ciclos de diafiltración se distribuían como; 95% en Ret-30, 2% en Ret-10, y 4% en Ret-5 tras los ciclos de la distribución fue la siguiente; 75% en Ret-30-DF ,9% en Ret-10-DF, 10% en Ret-5-DF y un 5% en Ret-1-DF, y no se detectaron pectinas en las aguas de diafiltración. Las aguas de diafiltración como en los casos anteriores, arrastraron los azúcares libres y los subproductos que no se habían perdido en el Perm-1 por completo.

Tabla 7 Recuperación de arabinogalactanos, pectinas, azucare libres y subproductos a 140°C.

	Ret-30	Ret-10	Ret-5	Ret-1	Pem-1	Ret-30-DF	Ret-10-DF	Ret-5-DF	Ret-1-DF	Agua DF
Arabinogalactanos	59%	6%	10%	4%	21%	53%	0%	2%	0%	25%
Pectinas	95%	2%	4%	0%	0%	75%	9%	10%	5%	0%
Azúcares libres	8%	15%	14%	14%	48%	0%	0%	0%	1%	51%
Subproductos	24%	26%	24%	2%	23%	4%	0%	0%	0%	73%



5.3.5 Caracterización química y molecular de los productos finales obtenidos.

En esta sección se muestran algunos parámetros de los flujos de alimentación, productos UF y los productos de UF/DF, peso molecular promedio (MW), polidispersión (PD), concentración de subproductos y pureza.

la Tabla 8 se muestra la caracterización correspondiente a la temperatura de 180°C. El grupo de los arabinogalactanos aumento su concentración tras su paso por la primera membrana pasando de una concentración de 1556,16 mg/L a una concentración de 21516,30 mg/L. En las pectinas pasó lo mismo, pasando de 617,52 mg/L en la alimentación a 9534,86 mg/L en Ret-10 kDa. Esto está unido a la bajada en la concentración que sufren los subproductos y los azúcares libres pasando respectivamente de una concentración de 952,82 mg/L a 386,69 mg/L y de 3093,90 mg/L a 293,34 mg/L. El aumento en el peso molecular medio tras cada diafiltración se debe a una correcta eliminación de sustancias de menor peso molecular en la diafiltración. A pesar de que hay algunos valores con los que no cuenta la tabla, es claro que la polidispersión se reduce significativamente con cada diafiltración y con respecto a la alimentación, la dispersión baja porque se obtiene una fracción purificada y se produce la separación de los polímeros. La pureza, definida como la presencia de biopolímeros con respecto al total de compuestos presentes, fue especialmente importante en las corrientes de Ret-5-DF, Ret-10, Ret-10-DF, Perm-10, siendo del 96%, 96%, 100% y 88%, respectivamente. La presencia del arabinogalactan respecto al total de biopolímeros se mantuvo en unos valores más o menos constantes de entre 0,8 y 0,6 (columna $AG/(AG+Pec)$). Destacaron la corriente de Ret-1 y Perm-1 donde el 100% de los biopolímeros fueron arabinogalactano. Los azúcares libres alcanzan mayor presencia con respecto a la entrada en Ret-5 llegando a 5126,73 mg/L con respecto a la entrada de 3093,90 mg/L. En el caso de los subproductos, la máxima concentración pasa de una entrada de 952,82 mg/L a 1191,50 mg/L en Ret-1, tiene su justificación ya que son los retenidos de las membranas de menos corte con las que se trabajó.



Tabla 8 Caracterización de los productos finales obtenidos tras UF/DF a 180°C

	MW (Da)	PD	Arabinogalactan (mg/L)	Pectinas (mg/L)	Azúcares libres (mg/L)	Subproductos (mg/L)	Biopolímeros %	AG/(AG+Pec)
Alimentación	9,02	16,2	1556,16	617,52	3093,90	952,82	35%	0,72
Ret-5	11,20	*	5676,95	3429,14	5129,72	817,86	60%	0,62
Ret-5-DF	30,58	4,1	5875,52	3087,60	293,34	98,66	96%	0,66
Ret-10	38,91	*	21516,30	9534,86	836,61	386,59	96%	0,69
Ret-10-DF	57,06	2,4	14202,51	4281,90	0,00	48,33	100%	0,77
Perm-10	5,71	1,4	1965,32	1475,79	157,52	323,72	88%	0,57
Ret-1	0,99	2,3	896,82	n.d.	4621,71	1191,50	13%	1,00
Ret-1-DF	3,33	1,5	233,98	277,10	19,28	2,03	96%	0,46
Perm-1	0,53	1,6	371,20	n.d.	3587,12	1085,80	7%	1,00

* Falta este dato

En la Tabla 9 se muestra la caracterización correspondiente a la temperatura de 160°C. Por el posicionamiento en cascada de membranas en este ensayo el arabinogalactan alcanzó su máxima concentración en el Ret-30 pasando de 935,29 mg/L a 3199,86 mg/L y lo mismo ocurre con las pectinas, que alcanzaron 1749,04 mg/L desde un valor inicial de 492,18 mg/L. Esto, como es lógico, vuelve a estar unido a la bajada en la concentración que sufren los subproductos y los azúcares libres pasando respectivamente de una concentración de 491,72 mg/L a 486,77 mg/L y de 2340,79 mg/L a 915,14 mg/L. El aumento en el peso molecular medio tras cada diafiltración se debe a una correcta eliminación de sustancias de menor peso molecular como los subproductos y los azúcares en la diafiltración. El peso molecular medio de este producto fue el segundo máximo con un valor de 44,22 Da, superado por el lavado por las aguas de diafiltración que alcanzaron un valor de 59,99 Da, valores esperables ya que se trató de la membrana con el corte de peso molecular más alto. La polidispersión se redujo a más de la mitad en cada diafiltración, lo que vuela a confirmar la purificación a través del sistema de diafiltración. En este ensayo el mayor porcentaje de aparición de biopolímeros con respecto a la corriente total fue el encontrado en las aguas de diafiltración mayoritariamente y en Ret-30, con resultados de: 78% en Ret-30, 98% en Ret-30-DF, 100% en Ret-10-DF, 87% en Ret-5-DF, Ret-1-DF en 90%. La presencia del arabinogalactan en el total de biopolímeros se mantuvo en unos valores más o menos constantes de entre 0,7 y 0,5 (columna AG/(AG+Pec)). Destaca el permeado de 1 kDa que cuenta con una presencia de 0,95 de AG/(AG+Pec). Los azúcares libres alcanzaron su máximo en el Ret-1 pasando de una concentración de 3404,53 mg/L a 2340,79 mg/L, el aumento de la concentración de subproductos fue muy pequeña con respecto a la entrada, se mantuvieron en torno a 500 mg/L en las aguas de ultrafiltración y con una concentración de 0 en las aguas de diafiltración.



Tabla 9 Caracterización de los productos finales obtenidos tras UF/DF a 160°C

	MW (Da)	PD	Arabinogalactan (mg/L)	Pectinas (mg/L)	Azúcares libres (mg/L)	Subproductos (mg/L)	Biopolímeros %	AG/(AG+Pec)
Alimentación	10,98	19,9	935,29	492,18	2340,79	491,72	34%	0,66
Ret-30	44,22	6,9	3199,86	1749,04	915,14	486,77	78%	0,65
Ret-30-DF	59,99	3,4	2768,64	1729,20	68,52	0,00	98%	0,62
Ret-10	2,83	3,5	345,07	399,36	2697,26	444,46	19%	0,46
Ret-10-DF	11,48	1,5	82,09	293,35	0,00	0,00	100%	0,22
Ret-5	1,97	3,7	409,24	270,36	2961,33	485,60	16%	0,60
Ret-5-DF	6,85	1,4	115,85	260,27	29,25	28,91	87%	0,31
Ret-1	1,28	2,7	526,97	365,45	3404,53	520,32	19%	0,59
Ret-1-DF	4,21	1,4	332,98	316,17	72,52	0,41	90%	0,51
Perm-1	0,54	1,4	326,58	15,73	2437,80	507,37	10%	0,95

En la Tabla 10 se muestran los resultados correspondientes a la caracterización del ensayo a 140°C. Al coincidir en este ensayo con el anterior a 160°C en el uso del orden de las membranas los máximos de arabinogalactan y pectinas coincidieron en el Ret-30. Pasando de 639,25 mg/L a 1895,82 mg/L y de 289,59 mg/L a 1372,22 mg/L respectivamente. También los máximos porcentajes en el retenido de polímeros fueron encontrados en las mismas situaciones y casi con el mismo porcentaje: 79% en Ret-30, 99% en Ret-30-DF, 100% en Ret-10-DF, 100% en Ret-5-DF y 78% en Ret-1-DF. La polidispersión como en los casos anteriores, baja muy significativamente en cada diafiltración confirmando la idoneidad de la diafiltración. La presencia del arabinogalactan en el total de biopolímeros difirió respecto al ensayo de 160°C oscilando principalmente entre 0,6 y 0,9 (columna AG/(AG+Pec)), Destaca la corriente de Perm-1 y Ret-1 que tuvieron una proporción de 1 siendo solo la presencia de arabinogalactan detectada en los biopolímeros y en el Ret-10-DF donde no fue detectado nada de arabinogalactan y todo lo que había era lo aportado por las pectinas. Azúcares y subproductos actuaron de igual manera que en el ensayo de 160°C manteniendo la concentración similar a la alimentación de las corrientes de ultrafiltración mientras que tras la diafiltración la concentración de estos dos grupos es muy baja o nula.

Tabla 10 Caracterización de los productos finales obtenidos tras UF/DF a 140°C

	MW (Da)	PD	Arabinogalactanos (mg/L)	Pectinas (mg/L)	Azúcares libres (mg/L)	Subproductos (mg/L)	Biopolímeros (%)	AG/(AG+Pec)
Alimentación	18,83	31,6	639,25	289,59	1765,41	175,45	32%	0,69
Ret-30	54,57	51,6	1895,82	1372,22	579,24	290,87	79%	0,58
Ret-30-DF	102,75	4,0	1691,05	1200,22	0,00	32,51	99%	0,58
Ret-10	1,04	2,4	229,19	29,78	1713,80	252,19	12%	0,88
Ret-10-DF	8,06	1,6	0,00	183,26	0,00	0,00	100%	0,00
Ret-5	1,06	2,3	496,76	81,09	2007,10	293,74	20%	0,86
Ret-5-DF	6,20	1,7	94,27	261,54	0,00	0,00	100%	0,26
Ret-1	0,61	1,4	278,38		2478,79	36,66	10%	1,00
Ret-1-DF	2,59	1,2	78,51	171,48	92,19	0,00	73%	0,31
Perm-1	0,51	1,3	320,61		2110,89	86,84	13%	1,00

Un ejemplo ilustrativo de las diferentes fracciones de hemicelulosa y pectinas que se obtuvieron en cada membrana de la extracción hidrotérmica a 160°C son los siguientes productos que se obtuvieron mostrados en Figura 36.

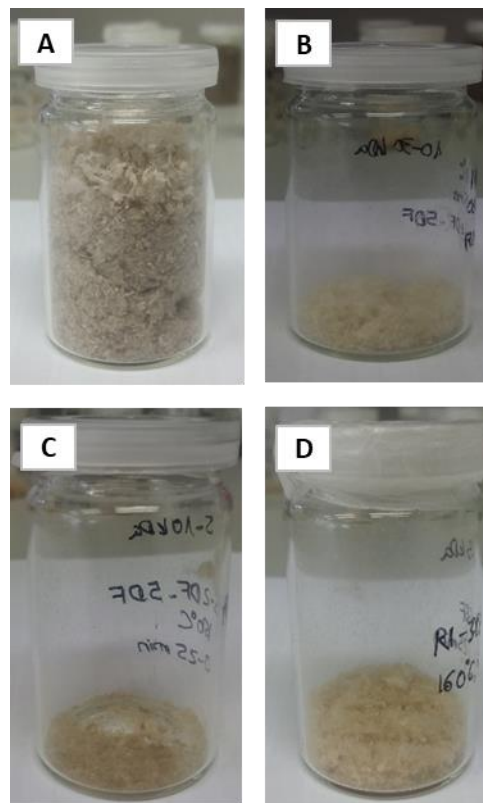


Figura 36 Hemicelulosas y pectinas obtenidas tras la ultrafiltración/diafiltración. (A) entre 30-10 KDa (B) entre 10-5 KDa (C) 5-1 KDa (D) 10-5 KDa.



5.4 Separación de azúcares y carotenoides

5.4.1 Contenido de azúcares en los ciclos de diafiltración.

En esta sección se estudia la reducción de los azúcares en el zumo de zanahoria que hemos obtenido tras aplicar los ciclos de diafiltración. Se analiza la evolución en la concentración de los azúcares en las seis aguas tras cada uno de los ciclos de diafiltración (DF1, DF2, DF3, DF4, DF5, DF6).

En la se puede observar una gran disminución de la concentración de los tres grupos de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) desde la alimentación de entrada hasta la concentración final obtenida tras las diafiltraciones. En el caso de la sacarosa paso de una concentración inicial de 35,26 g/L hasta llegar a un valor de 3,15 g/L. En la glucosa se partía de 14,4 g/L y se redujo a 1,39 g/L y la fructosa pasa de tener inicialmente una concentración de 5,94 g/L a 0,61 g/L. La disminución de manera general fue muy similar en los tres azúcares, paso en la primera diafiltración (DF1) a una disminución del 66-63% respecto a la alimentación. En la segunda diafiltración (DF2) la concentración se redujo hasta 46-44 %, en la tercera diafiltración (DF3) las concentraciones de los azúcares se redujeron hasta el 30-28 %, en la cuarta diafiltración (DF4) las aguas se redujeron hasta el 20-18 %, todas las aguas de la de la quinta diafiltración (DF5) se redujeron hasta el 13 % y en la última agua de diafiltración (DF6) en la que obtuvimos un 9-8 % con respecto a la alimentación de partida.

Tabla 11 Evolución de los azúcares con las distintas diafiltraciones

	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5	DF6	Alimentación	Diafiltración
Sacarosa (g/L)	22,20	15,75	10,17	7,21	4,80	3,28	35,26	3,15
Glucosa (g/L)	9,30	6,58	4,40	2,95	1,88	1,26	14,44	1,39
Fructosa (g/L)	3,96	2,74	1,72	1,08	0,79	0,53	5,94	0,61

A la vista de los resultados se pudo cumplir el objetivo de la reducción de los azúcares en el zumo. Además, hay que tener en cuenta que no se deben considerar las aguas de diafiltración como un residuo, sino que, al ser ricas en azúcares, se podrían usar para fermentación, o también mediante liofilización se podría obtener un producto sólido que podría utilizarse en la industria alimentaria como edulcorante natural.



5.5 Encapsulación y secado de pigmentos del zumo

5.5.1 Degradación de los carotenoides totales durante el secado y el almacenamiento

Se ha analizado el contenido total de carotenoides de cada fracción teniendo en cuenta la pérdida debida a los procesos de secado y el tiempo de almacenamiento, como se muestra en la Tabla 12. Partiendo de la muestra control (Diafiltración) donde los pigmentos son liofilizados directamente sin añadir ningún tipo de encapsulante (goma arábica) se obtuvo una cantidad de **Contenidos Teóricos de Carotenoides (CTC)** de 4996,4 $\mu\text{g/g}$ muestra. Tras 15 días de almacenamiento, el contenido total de carotenoides fue de 4072,6 $\mu\text{g/g}$ muestra almacenada, por tanto, durante el almacenamiento las pérdidas de la muestra sin encapsular fueron del 18,4 wt%. Las demás muestras sólidas también deberían tener cierto contenido en carotenoides (contenido teórico). La diferencia con el contenido teórico en los diferentes tipos de ensayos (Secadero-1:1, Lio-1:0.5, Lio-1:1, Lio-1:1.5) se ha asociado a pérdidas debido al secado. El método de secado que más pérdidas produce es el del secadero-1:1 (spray-dryer) ya que en el proceso de secado se pierde un 54,7%. Esto se debe a la degradación por efecto del oxígeno del aire y de la alta temperatura. A pesar de que existió una importante pérdida de los pigmentos, este secado es con el que menos degradación se produce con el paso del tiempo, debido a que el encapsulante utilizado consiguió encapsular correctamente a los pigmentos, tras su almacenamiento solo se degradaron un 8,8%.

En lo que a la liofilización corresponde (Lio-1:0.5, Lio-1:1, Lio-1:1.5) los pigmentos se degradaron más cuanto más encapsulante se añadió. Los pigmentos sin encapsulante dieron unas pérdidas por el almacenamiento de 18,49%, mientras que cuando se añadió encapsulante a razón de 1:1.5 se dieron unas pérdidas del 44,34%. Eso es debido a que el encapsulante no encapsula realmente en este método de secado, sino que crea un material más ligero y genera huecos traslúcidos que inducen a una mayor degradación de los pigmentos por oxidación con la luz y por la acción del oxígeno. En otros casos distintos al nuestro, la liofilización con encapsulante sí que funciona como método de encapsulación, pero es necesario que los carotenoides estén puros o realmente disueltos en el medio y no dentro de micropartículas de pulpa como es el caso. En las Figuras 37 y 38 se pueden observar los

pigmentos obtenidos tras los diferentes tipos de secado (liofilización y spray-dryer) y con las diferentes proporciones de encapsulante.

Tabla 12 Degradación de los sólidos dependiendo del tipo de secado tras 15 días guardados.

	Sólidos totales: Goma arábiga	Método de secado	CTC ($\mu\text{g/g}$ muestra)			Pérdidas (wt%)	
			Antes de secado	Después de secado	Tras 15 días	Secado	Almacenamiento
Diafiltración	1:0	Liofilización		4996,4	4072,6		18,49%
Secadero-1:1	1:1	Secadero	2498,2	1131,7	1031,2	54,70%	8,88%
Lio-1:0.5	1:0.5	Liofilización	3330,9	3564,0	2046,6	n.d.	42,57%
Lio-1:1	1:1	Liofilización	2498,2	2228,4	1362,8	10,80%	38,84%
Lio-1:1.5	1:1.5	Liofilización	1998,5	1602,9	892,2	19,80%	44,34%



Figura 37 De izquierda a derecha: (vial 1) Pigmentos sin encapsular liofilizados, (vial 2) pigmento con encapsulante 1:1 secados en el secadero; (vial 3) pigmento con encapsulante 1:0,5 liofilizados; (vial 4) pigmento con encapsulante 1:1 liofilizados; (vial 5) pigmento con encapsulante 1:1,5 liofilizados. En la figura se puede ver esos pigmentos en detalle.



Figura 38 Pigmentos obtenidos en detalle.

5.5.2 Solubilidad en agua de pigmentos encapsulados.

Para observar la solubilidad en agua de los distintos carotenoides, se disolvieron en todos los casos, la misma cantidad de producto en la misma cantidad de agua, en la Figura 39 se pueden observar los distintos productos a tiempo 0. En los obtenidos por liofilización (Lio 1:1, Lio 1:0,5, Lio 1:1,5) y en la muestra 0 sin encapsulante, se puede observar partículas suspendidas visibles, mientras que en el obtenido por secado en el secadero (SD 1:1) los carotenoides tuvieron una dispersión más homogénea en la disolución. Esto pudo ser así porque el producto que se obtuvo del secadero es más homogéneo que el que se obtiene en la liofilización, y está mejor encapsulado. En la Figura 40 se puede ver que después de 7 días la disolución más estable fue la del secado en el secadero con encapsulante, lo que corrobora que en este tipo de secado el encapsulante se adhiere correctamente. Por otra parte, la degradación en los pigmentos encapsulados por liofilización fue mayor que la obtenida sin el uso de un agente encapsulante. Esto vuelve a confirmar que, en este caso, el uso de encapsulante en liofilización no dio lugar a la microencapsulación de los carotenoides, y por lo tanto, no los protegió de la degradación.

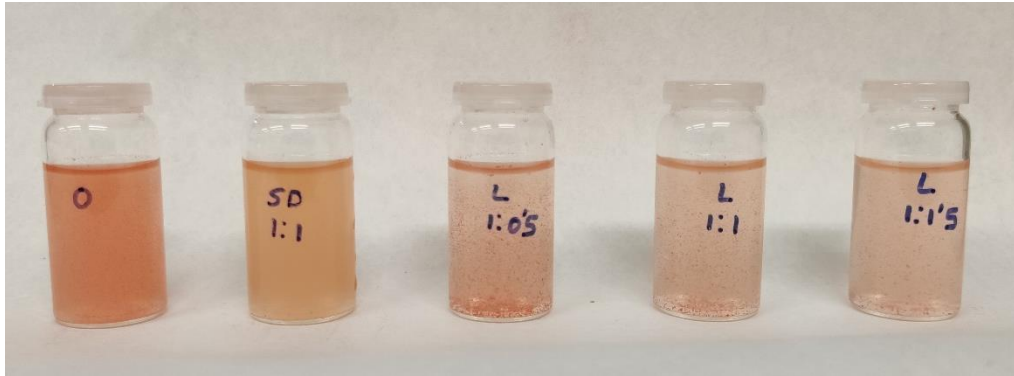


Figura 39 Solubilidad en tiempo 0 de los carotenoides.

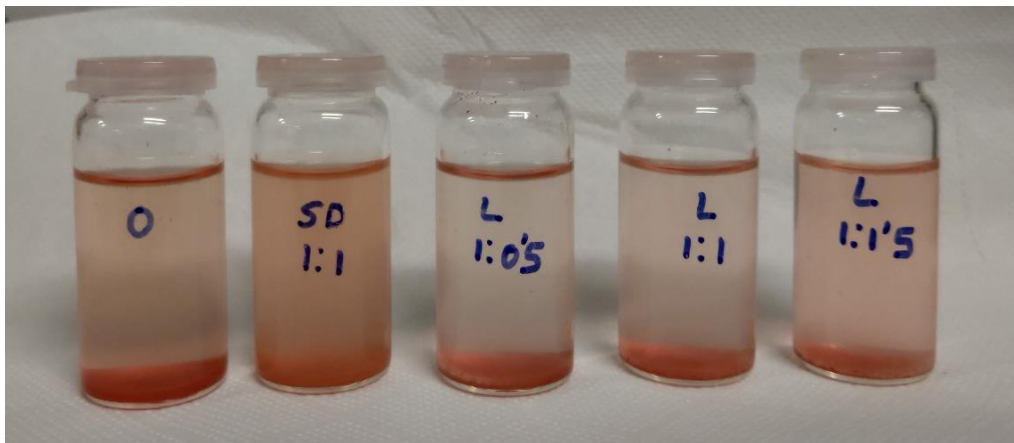


Figura 40 Solubilidad tras 7 días de los carotenoides.

5.5.3 Caracterización estructural de los pigmentos (FTIR)

En esta ocasión los espectros de FTIR se determinaron para las fracciones obtenidas tras la diafiltración del zumo, la parte rica en carotenoides (Diafiltración) y fracción rica en azúcares (Azúcar_Lio). Ambas partes siguieron el mismo proceso, tras la diafiltración pasaron al liofilizador donde se secaron y posteriormente se analizaron. Como se puede observar en la Figura 41 los espectros obtenidos en estas dos fracciones son muy parecidos, debido a que en ambas partes había azúcares. Sin embargo, hubo diferencias en el espectro que se obtuvo en de la Diafiltración ya que contaba mostraba con picos que no había en el espectro del Azúcar_Lio. Los picos que aparecen



podrían relacionarse con la existencia de partículas en el zumo con un peso molecular mayor que 30kDa o micropartículas en este caso los carotenoides. Concretamente estos picos aparecieron en: 2849 cm^{-1} relacionado con el estiramiento simétrico C-H del grupo CH_3 , presentes en los carotenoides pero no en los azúcares (Mohamed et al., 2011) el pico 1740 cm^{-1} relacionado con el estiramiento C=O éster lo que estaría relacionado con la existencia de ésteres metílicos y O-acetilos de hemicelulosas y pectinas, que aparecen en las micropartículas de Diafiltración (Liu et al., 2019). 1656 cm^{-1} relacionado con las vibraciones de la cadena de polietileno unidas con el estiramiento H-C=C-H del betacaroteno (Mohamed et al., 2011). 1529 cm^{-1} relacionado con las vibraciones de la cadena de polietileno y el estiramiento C=C (Schlücker et al., 2003). 1503 cm^{-1} relacionado con el anillo aromático en la lignina, la lignina no puede aparecer en el Azúcar_Lio ya que es soluble en agua y en este caso el azúcar está seco tras la liofilización, pero sí puede aparecer en las micropartículas de la pulpa que se encuentran en Diafiltración (Célineo et al., 2013).

También se obtuvieron los espectros de FTIR para observar cual fue resultado de la microencapsulación así como los dos diferentes secados que se realizaron, secado por atomización y por liofilización. Se observaron por tanto las diferencias en las muestras de Diafiltración, Secado 1:1 y Lio 1:1. Se observó que para los dos tipos de secado (Secado 1:1 y Lio 1:1) el microencapsulante provocó un mayor pico en la franja de absorbancia de $1185 - 891\text{ cm}^{-1}$. Esto puede deberse a que la absorbancia del material de partida (Diafiltración) se ve superada por la absorbancia en esta banda por parte del encapsulante. Como se ha comentado anteriormente, esa banda en la Diafiltración aparece también el Azúcar_lio, por lo que se puede relacionar con la presencia de azúcares. Estos picos fueron 1132 , 1109 , 1044 , 997 y 930 cm^{-1} . Estos picos son característicos de la sacarosa (Cadet et al., 1997), que era el azúcar principal, y representan las vibraciones de los enlaces C-O, CC y CCO. Otros tipos de polisacáridos que presentes en la muestra también podrían contribuir a este tipo de enlaces. En el resto de las regiones, se puede observar cómo aumentaron su absorbancia por el efecto del encapsulante, excepto la franja de $3700 - 3190\text{ cm}^{-1}$. Esta franja está asociada al grupo -OH, que se mantuvo igual. Los picos carotenoides característicos aumentaron en absorbancia después de la microencapsulación, lo que podría deberse a la degradación de un tipo de isómero carotenoide a otro durante el secado. Si se compara el secado por atomización en el secadero con la liofilización, se observan que en el secado por atomización los picos que están asociados a la absorción por parte de los carotenoides tienen una absorbancia algo mayor. Puede deberse a que parte del azúcar se perdió en el secado por atomización,



lo que supone una mayor proporción de pigmentos en la estructura. Comparando ambos espectros del secado por atomización y el secado por liofilización se corroboró que la cantidad de encapsulante fue la misma ya que mostraron la misma absorbancia en la franja de $1185 - 891 \text{ cm}^{-1}$.

Otra comparativa fue con los espectros FTIR de Lio 1:05, Lio 1:1, Lio 1:1,5 y Diafiltración para observar el resultado de la proporción del encapsulante. Esta diferencia se observó en la franja de $1185 - 891 \text{ cm}^{-1}$, donde se vio una mayor absorbancia cuando la relación encapsulante/materia era más grande. El resto del espectro se mantuvo invariable a la cantidad de encapsulante que se utilizó, lo que implica que el tipo de enlaces presentes eran los mismos. Por tanto, una mayor presencia de encapsulante en el proceso de liofilización no modificaba la interacción entre éste y los carotenoides, por lo que no se produjo ninguna microencapsulación real durante este tipo de secado.

La comparativa entre los distintos tipos de secado, en el secadero (Secado 1:1) y en las mismas proporciones de encapsulante en el Liofilizado (Lio 1:1) pone de manifiesto que los diferentes métodos no afectan las estructuras de las matrices ya que no se observaron cambios significativos (Ballesteros et al., 2017).

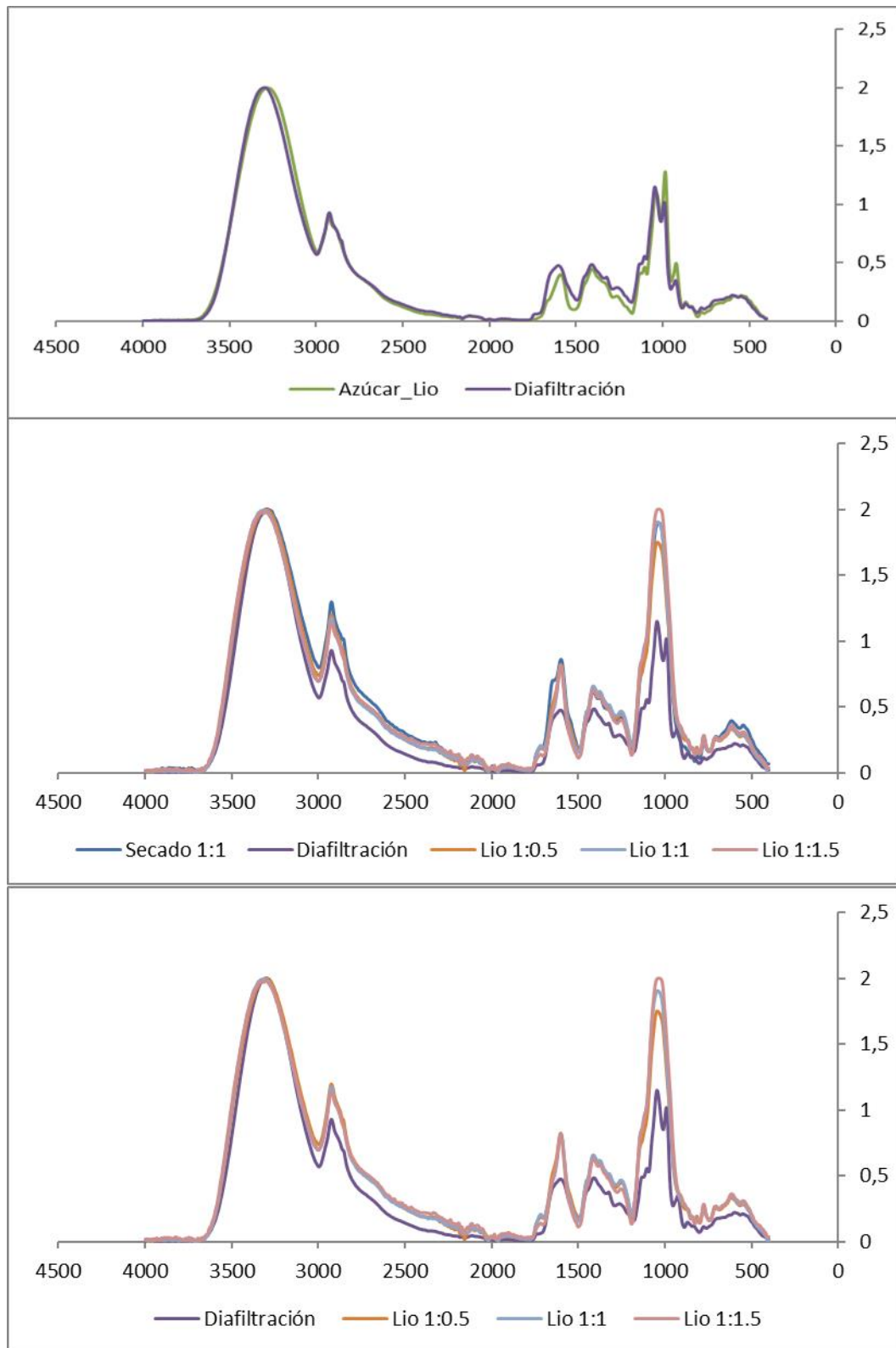


Figura 41 FTIR de los pigmentos y azúcar



5.6 Fermentación de la fracción rica en azúcar

La fracción que se sometió al proceso de fermentación, se obtuvo tras la filtración en la membrana de 30 kDa del zumo de zanahoria según fue licuado. Se fermentó a la parte rica en azúcar (84.83g/L) de diferentes formas: sin ningún tipo de microorganismo, con el microorganismo *Lactobacillus*, y con el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*, en todos los casos sin NaCl y con NaCl.

A la vista de los resultados obtenidos que se pueden observar en las Tablas 13, 14 y 15, que el sustrato utilizado fue adecuado ya que en todos los casos se obtuvieron productos de la fermentación. El consumo de los azúcares del zumo en la fermentación sin microorganismo sin añadir NaCl fue del 96%, con NaCl el consumo fue del 23%. Cuando se fermentó con *Lactobacillus* sin NaCl el consumo de azúcar fue del 92%, con NaCl fue del 44%. En la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* sin NaCl el consumo de azúcar fue del 95% con NaCl fue del 97%. El consumo de azúcar descendió considerablemente en el ensayo con *Lactobacillus* con sal, ya que las bacterias lácticas son muy sensibles al pH y mueren con relativa facilidad si este no se regula.

El proceso de fermentación proporcionó dos tipos de productos, el etanol y el ácido láctico, que son los productos buscados, y productos secundarios como los glicolaldehídos, ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico, ácido acrílico. La fermentación sin NaCl realizada con *Lactobacillus* fue en la que se obtuvo una mayor cantidad de ácido láctico: producción 17,638 (g/L), productividad 0,147 (g/L/h), rendimiento 0,185 (g/g sustrato). En la fermentación realizada con *Saccharomyces cerevisiae* sin NaCl se obtuvo una mayor cantidad de etanol: producción 49,462 (g/L), productividad 0,412 (g/L/h), rendimiento 0,441 (g/g sustrato). En la fermentación sin NaCl en la cual no se añadió ningún microorganismo la cantidad de ambos productos es mucho menor, ácido láctico: producción 12,304 (g/L), productividad 0,103 (g/L/h), rendimiento 0,154 (g/g sustrato). Etanol; producción 39,893 (g/L), productividad 0,332 (g/L/h), rendimiento 0,500 (g/g sustrato).

El resultado que se obtuvo fue el esperado al introducir estos microorganismos. El microorganismo *Lactobacillus* forma aparte de las bacterias lácticas que son las principales productoras de ácido láctico, mientras que *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura responsable de la fermentación alcohólica mediante la biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono.



El efecto de la adición de NaCl para la formación de los dos productos principales en las distintas fermentaciones fue las siguiente: en la fermentación sin microorganismos la producción sin NaCl fue de 12,304 g/L de ácido láctico y 0,500 g/L de etanol. Con NaCl fue de 6,616 g/L de ácido láctico y la formación tanto de etanol como de algún subproducto fue nula. En la fermentación con *Lactobacillus* la producción sin NaCl de ácido láctico fue 17,638 (g/L) y de etanol 35,013 (g/L) cuando se le añadió NaCl la producción fue 9,656 (g/L) de ácido láctico y de etanol 0,940 (g/L) y se produjo la desaparición de los subproductos, menos en el caso del ácido fórmico que se redujo mucho pero no llego a desaparecer completamente. En la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* la producción sin NaCl de ácido láctico fue 1,389(g/L) y de etanol 49,462 (g/L) cuando se le añadió NaCl la producción fue 3,944 (g/L) de ácido láctico y de etanol 44,598 (g/L), en este caso los subproductos no se redujeron tan notablemente como en los casos anteriores y en el caso del subproducto ácido fórmico aumento su concentración en el ensayo con NaCl.

A la vista de los resultados, queda claro que la adición de NaCl favorece la fermentación de ácido láctico en los tres casos y la reducción de los subproductos en los dos primeros. En el caso de las levaduras, la mayor producción de ácido fórmico al añadir NaCl es debido a que el NaCl genera un ambiente desfavorable para el crecimiento de las levaduras (Hohl & Joslyn, 1941).

Con respecto a la evolución de cada fermentación en función del tiempo, cuyas tablas correspondientes se encuentran en el apartado anexos, se obtuvo que en la fermentación sin microorganismos ni NaCl, la producción del ácido láctico no aparece hasta el segundo día con 5,718 g/L, mientras que el etanol aparece el tercer día con una concentración de 9,705 g/L ambas producciones se mantienen prácticamente constantes a partir del cuarto día de fermentación siendo su valor final 12,304 g/L y 39,893 g/L, respectivamente. En la fermentación sin microorganismos, pero con NaCl, la producción de etanol es nula durante todo el ensayo mientras que el ácido láctico aparece el día dos con un valor de 0,608 g/L y aumenta a lo largo de todos días que se controló el ensayo hasta llegar a 6,616 g/L. En la fermentación con *Lactobacillus* el ácido láctico aparece desde el primer día de fermentación con un valor de 4,206 g/L y se mantiene constante a partir del tercer día llegando a formarse 17,638 g/L, el etanol aparece a partir del segundo día con una concentración de 18,095 g/L y se mantiene prácticamente constante a partir del tercer día llegando a un valor final de 35,013 g/L. En la fermentación con *Lactobacillus* y con sal la aparición del

ácido láctico también fue en el primer día con una concentración de 3,029 g/L y a partir del tercer día también prácticamente constante hasta alcanzar un valor de 9,645 g/L, el etanol en este ensayo no apareció hasta el último día con una concentración de 0,940 g/L. En la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* el ácido láctico aparece desde el primer día con una concentración de 3,623 g/L y se va reduciendo progresivamente hasta llegar a 1,389 g/L el quinto día. El etanol aparece el primer día con una concentración de 29,826 g/L y se mantiene constante a partir del segundo día llegando en el último día que se controló el ensayo a 49,462 g/L. En la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* el ácido láctico aparece el primer día con un valor de 3,840 g/L y se mantiene constante durante todo el ensayo, el último día de toma de muestra se obtuvo una concentración de 3.944 g/L el etanol se obtiene desde el primer día con un valor de 19,442 g/L y se mantiene más o menos estable hasta el quinto día cuyo valor de concentración es de 44,598 g/L.

Tabla 13 Producción (g/L)

	Glicolaldehído	ác. láctico	ác. fórmico	ác. acético	ác. levulínico	ác. acrílico	Etanol
Sin microorganismos	1,700	12,304	0,971	1,385	1,087	0,372	39,893
Sin microorganismos con NaCl	0,000	6,616	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Lactobacillus	0,199	17,638	2,048	0,961	0,165	0,106	35,013
Lactobacillus con NaCl		9,656	0,455	0,000	0,000	0,000	0,940
Saccharomyces cerevisiae	1,215	1,389	1,807	6,644	1,707	0,292	49,462
Saccharomyces con NaCl	0,283	3,944	11,911	4,471	0,151	0,527	44,598

Tabla 14 Productividad (g/L/h)

	Glicolaldehído	ác. láctico	ác. fórmico	ác. acético	ác. levulínico	ác. acrílico	Etanol
Sin microorganismos	0,014	0,103	0,008	0,012	0,009	0,003	0,332
Sin microorganismos con NaCl	0,000	0,055	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Lactobacillus	0,002	0,147	0,017	0,008	0,001	0,001	0,292
Lactobacillus con NaCl	0,000	0,080	0,004	0,000	0,000	0,000	0,008
Saccharomyces cerevisiae	0,010	0,012	0,015	0,055	0,014	0,002	0,412
Saccharomyces con NaCl	0,002	0,033	0,099	0,037	0,001	0,004	0,372



Tabla 15 Rendimiento (g/g sustrato)

	Glicodaldehído	ác. láctico	ác. fórmico	ác. acético	ác. levulínico	ác. acrílico	Etanol
Sin microorganismos	0,021	0,154	0,012	0,017	0,014	0,005	0,500
Sin microorganismos con NaCl	0,000	0,278	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Lactobacillus	0,002	0,185	0,022	0,010	0,002	0,001	0,368
Lactobacillus con NaCl	0,000	0,167	0,008	0,000	0,000	0,000	0,016
Saccharomyces cerevisiae	0,011	0,012	0,016	0,059	0,015	0,003	0,441
Saccharomyces con NaCl	0,003	0,038	0,116	0,044	0,001	0,005	0,435



6. CONCLUSIONES



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

6 CONCLUSIONES

1. Se consiguió separar la pulpa y el zumo de zanahorias para tratamientos diferentes como se observa en el esquema mostrado en Figura 42.

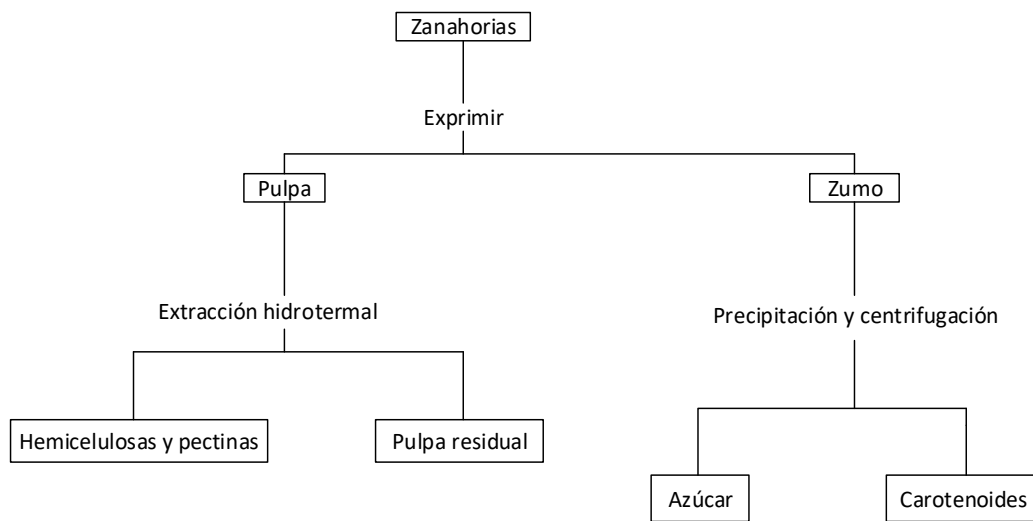


Figura 42 Esquema de los diferentes procesos que se siguieron y productos que se obtuvieron.

2. Se consiguió obtener tras la extracción en la planta piloto hemicelulosa y pectinas de alta calidad y varios pesos moleculares controlados.

Las hemicelulosas, las pectinas y los azúcares libres que fueron extraídos de la planta de tratamiento hidrotérmica (a las temperaturas de 140°C, 160°C y 180°C) tuvieron unos rendimientos de hasta 227,22g/kg peso seco, 29,13 g/kg peso seco y 79,84g/kg peso seco respectivamente.



3. Se procesaron los extractos hidrotermales mediante un sistema de ultrafiltración/diafiltración en varias etapas para la obtención de múltiples fracciones de hemicelulosas y pectinas de alta calidad.

Con la ultrafiltración se consiguió concentrar entre 5-25 veces más dependiendo de la configuración de las membranas. La mayoría de los grupos moleculares se retuvieron en la primera membrana, pero tras el proceso de los ciclos de diafiltración se consiguió un aumento de la pureza.

4. Se obtuvo una fracción estabilizada de carotenoides a partir del zumo de zanahoria con resultados positivos en cuanto a sus cualidades y su estabilidad.

La separación y purificación mediante el proceso de diafiltración proporcionó dos fracciones, una rica en azúcares y otra rica en carotenoides (4996,4 µg/g). Los carotenoides encapsulados con goma arábiga y secados en el secadero de atomización tras 15 días no llegaron a sufrir una degradación superior al 10%. Mientras que el secado mediante liofilización no dio unos resultados satisfactorios, por lo que no sería un proceso recomendable para preservar los carotenoides.

5. Se obtuvieron azúcares y productos de fermentación a partir de la fracción de zumo.

La fracción rica en azúcar (83,84 g/L) obtenida tras la purificación por diafiltración fue fermentada con microorganismos autóctonos, así como con bacterias productoras de ácido láctico y con levadura. La fermentación con la levadura dio una producción de etanol de 49.46 g/L. La adición de NaCl al medio controló la proliferación de levaduras y permitió la producción pura de ácido láctico tanto con microorganismos autóctonos (6,616 g/L) como con bacterias lácticas (9,656 g/L). Esta producción puede incrementarse controlando el pH ya que las bacterias lácticas son muy sensibles a los cambios de pH.



7. BIBLIOGRAFÍA



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



7 BIBLIOGRAFÍA

- Aryee, A. N., Agyei, D., & Akanbi, T. O. (2018). Recovery and utilization of seaweed pigments in food processing. *Current Opinion in Food Science*, 19, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.013>
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., & Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>
- Bian, J., Peng, F., Peng, P., Xu, F., & Sun, R. C. (2010). Isolation and fractionation of hemicelluloses by graded ethanol precipitation from *Caragana korshinskii*. *Carbohydrate Research*, 345(6), 802–809. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.01.014>
- Biochemtech. (13 de 02 de 2020). *carotenoids-properties-and-bioprotective-effects*. Obtenido de <http://www.biochemtech.uadec.mx/2020/02/17/carotenoids-properties-and-bioprotective-effects/>
- BioPlat., SusChem., Ministerio de Economía., & Competitividad, I. y. (2017). Manual sobre Biorrefinerías en España. Ministerio De Economía, Industria Y Competitividad, 1–92.
- Cadet, F., Robert, C., & Offmann, B. (1997). Simultaneous determination of sugars by multivariate analysis applied to mid-infrared spectra of biological samples. *Applied Spectroscopy*, 51(3), 369–375. <https://doi.org/10.1366/0003702971940224>
- Carotenóides. (n.d.). Retrieved April 26, 2020, from <https://www.projetovipnutricional.com.br/blog/novidades/carotenoides>
- Cassano, A. (2003). Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes. 57, 153–163.
- CEC. (2014). Burning Agricultural Waste: A Source of Dioxins. Montreal, Canada: Commission for Environmental Cooperation, January, 6.
- Céline, A., Fréour, S., Jacquemin, F., & Casari, P. (2013). Characterization and modeling of the moisture diffusion behavior of natural fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(1), 297–306. <https://doi.org/10.1002/app.39148>
- Hiranvarachat, B., & Devahastin, S. (2014). Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. *Journal of Food Engineering*, 126, 17–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.024>
- Hohl, L. A., & Joslyn, M. A. (1941). Formic Acid Formation in Alcoholic



- Fermentation. *Plant Physiology*, 16(4), 755–769.
<https://doi.org/10.1104/pp.16.4.755>
- Julien, P. A., Fri, T., & Julien, P. (2017). Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.*, 207890, 2729–2747.
<https://doi.org/10.1039/c7gc01078h>
- Knockaert, G., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2012). Changes in β -carotene bioaccessibility and concentration during processing of carrot puree. *Food Chemistry*, 133(1), 60–67.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.066>
- Liu, X., Liu, J., Bi, J., Yi, J., Peng, J., & Ning, C. (2019). Effects of high pressure homogenization on pectin structural characteristics and carotenoid bioaccessibility of carrot juice. *Carbohydrate Polymers*, 203(May 2018), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.055>
- Mohamed, G. F., Shaheen, M. S., Khalil, S. K. H., Hussein, A. M. S., & Kamil, M. M. (2011). Application of FT-IR Spectroscopy for Rapid and Simultaneous Quality Determination of Some Fruit Products. *Nature and Science*, 9(11), 21–31.
- Naidu, D. S., Hlangothi, S. P., & John, M. J. (2018). Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydrate Polymers*, 179(September 2017), 28–41.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.064>
- Nawirska, A., & Kwaśniewska, M. (2005). Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry*, 91(2), 221–225.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.005>
- Nigam, P. S., & Luke, J. S. (2016). Food additives: Production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Current Opinion in Food Science*, 7, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.004>
- Nitsos, C. K., Matis, K. A., & Triantafyllidis, K. S. (2013). Optimization of hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass in the bioethanol production process. *ChemSusChem*, 6(1), 110–122.
<https://doi.org/10.1002/cssc.201200546>
- Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., & Kondo, A. (2010). Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: Recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 413–423.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2280-5>
- Rakin, M. (2007). Food Chemistry Contribution of lactic acid fermentation to improved nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate. *Food Chemistry*, 100, 599–602.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.077>
- Ramos-Andrés, M., Andrés-Iglesias, C., & García-Serna, J. (2019). Production



- of molecular weight fractionated hemicelluloses hydrolyzates from spent coffee grounds combining hydrothermal extraction and a multistep ultrafiltration/diafiltration. *Bioresource Technology*, 292, 121940. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121940>
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (n.d.). Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240(July 2017), 90–103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28946359>
- Schlücker, S., Szeghalmi, A., Schmitt, M., Popp, J., & Kiefer, W. (2003). Density functional and vibrational spectroscopic analysis of β -carotene. *Journal of Raman Spectroscopy*, 34(6), 413–419. <https://doi.org/10.1002/jrs.1013>
- Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003>
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S., & Srivastava, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 713–728. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.051>
- UNEP. (s.f.). (13 de 09 de 2020) *UNEP.org*. Obtenido de <https://www.unep.org/>
- Unidad, N. (22 de 02 de 2020). *Unep.org*. Obtenido de *Unep.org*: <https://www.unep.org/>
- Yúfera, E. P. (1994). *Química Orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria*.
- Zeitoun, R., Pontalier, P. Y., Marechal, P., & Rigal, L. (2010). Twin-screw extrusion for hemicellulose recovery: Influence on extract purity and purification performance. *Bioresource Technology*, 101(23), 9348–9354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.022>



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

ANEXO I



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



ANEXO I

Tabla 16 Fermentación sin microorganismos.

Tiempo (día)	Glicocaldehído (g/L)	ác. láctico (g/L)	ác. fórmico (g/L)	ác. acético (g/L)	ác. levulínico (g/L)	ác. acrílico (g/L)	Etanol(g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	1,651	5,718	0,000	1,240	0,000	0,000	0,000
3	1,627	9,052	0,000	0,869	0,000	0,000	9,705
4	1,750	11,586	1,266	0,812	0,000	0,000	39,082
5	1,700	12,304	0,971	1,385	1,087	0,372	39,893

Tabla 17 Fermentación sin microorganismos con NaCl.

Tiempo (día)	Glicocaldehído (g/L)	ác. láctico (g/L)	ác. fórmico (g/L)	ác. acético (g/L)	ác. levulínico (g/L)	ác. acrílico (g/L)	Etanol(g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,608	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,000	3,338	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,000	5,239	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,000	6,616	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabla 18 Fermentación con *Lactobacillus*.

Tiempo (día)	Glicocaldehído (g/L)	ác. láctico (g/L)	ác. fórmico (g/L)	ác. acético (g/L)	ác. levulínico (g/L)	ác. acrílico (g/L)	Etanol(g/L)
0	0,000	4,206	0,000	0,611	0,000	0,000	0,000
2	0,123	14,509	1,317	0,886	0,000	0,000	18,095
3	0,233	17,154	1,796	0,894	0,000	0,000	34,009
4	0,262	17,777	1,549	1,031	0,000	0,000	34,215
5	0,199	17,638	2,048	0,961	0,165	0,106	35,013

Tabla 19 Fermentación con *Lactobacillus* con NaCl.

Tiempo (día)	Glicolaldehído (g/L)	ác. láctico (g/L)	ác. fórmico (g/L)	ác. acético (g/L)	ác. levulínico (g/L)	ác. acrílico (g/L)	Etanol(g/L)
0	0,000	3,029	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,000	7,890	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,000	9,065	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,000	9,742	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,000	9,656	0,455	0,000	0,000	0,000	0,940

Tabla 20 Fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

Tiempo (día)	Glicolaldehído (g/L)	ác. láctico (g/L)	ác. fórmico (g/L)	ác. acético (g/L)	ác. levulínico (g/L)	ác. acrílico (g/L)	Etanol(g/L)
0	0,395	3,623	0,000	0,685	0,000	0,000	29,826
2	0,959	1,785	6,350	2,767	0,000	0,000	49,613
3	1,168	1,835	4,841	3,903	0,000	0,000	49,399
4	1,173	1,493	3,501	4,837	0,000	0,000	49,854
5	1,215	1,389	1,807	6,644	1,707	0,292	49,462

Tabla 21 Fermentación *Saccharomyces cerevisiae* con NaCl.

Tiempo (día)	Glicolaldehído (g/L)	ác. láctico (g/L)	ác. fórmico (g/L)	ác. acético (g/L)	ác. levulínico (g/L)	ác. acrílico (g/L)	Etanol(g/L)
0	0,138	3,840	0,000	0,932	0,000	0,000	19,442
2	0,292	3,174	12,931	2,460	0,000	0,000	44,457
3	0,259	3,389	12,532	2,913	0,000	0,000	41,892
4	0,276	3,599	12,633	4,161	0,000	0,000	43,296
5	0,283	3,944	11,911	4,471	0,151	0,527	44,598

Tabla 22 Comparativa del azúcar que hay antes y después de la fermentación.

	Azúcar inicial (g/L)	Azúcar final (g/L)
Sin microorganismos	87,132	2,762
Sin microorganismos con NaCl	82,529	63,291
Lactobacillus	69,276	5,234
Lactobacillus con NaCl	71,564	40,248
Saccharomyces cerevisiae	55,005	2,588
Saccharomyces cerevisiae con NaCl	65,388	1,646