

Efecto de los pretratamientos físico, químico y biológico, en la hidrólisis enzimática de la cáscara de piña (*Ananas comosus*)

M.R. González-González*¹, R. Miranda-López¹ y J.E. Botello-Alvarez¹

¹ Tecnológico Nacional de México en Celaya, Tecnológico Nacional de México, Doctorado en Ciencias de la Ingeniería. Antonio García Cubas 600, Fovissste, 38010, Celaya, Guanajuato, México.

*marglez.ibq@live.com.mx

RESUMEN

La piña ocupa el tercer lugar de frutos tropicales cultivados en el mundo. La cáscara corresponde por lo menos al 25% del peso total del fruto, y posee importante actividad biológica como antioxidante. A la actualidad se ha empleado en la producción de biocombustibles, sin embargo, se busca que mediante la acción de las glicosil hidrolasas (GH) se promueva la liberación de compuestos fenólicos, para ello los pretratamientos juegan un papel importante para promover la disponibilidad del sustrato a la enzima. El tratamiento físico (mecánico) reduce el tamaño de partícula, ejerciendo efectos favorables sobre la producción de glucosa y compuestos fenólicos. En el caso aquí descrito, el tratamiento químico con CH_3COOH y la NaHCO_3 no producen cambios significativos, incluso reduce el avance de la hidrólisis. Finalmente, el tratamiento biológico con xilanasas causó la degradación de la hemicelulosa, reduciendo la barrera para la celulasas e incrementando la producción de glucosa. Se identificaron las condiciones óptimas de reacción para la GH. Para determinar el avance de la hidrólisis se midió la concentración de glucosa (mg/dL) y el contenido fenólico total (mg GAE/g muestra).

Palabras clave: Hidrólisis enzimática, *Ananas comosus*, glicosil hidrolasas, fenoles totales, cáscara, piña.

ABSTRACT

The pineapple occupies the third place of cultivated tropical fruits in the world. The peel corresponds to at least 25% of the total weight of the fruit and has important biological activity as an antioxidant. At present it has been used in the production of biofuels, however, it is sought that through the action of glycosyl hydrolases (GH) the release of phenolic compounds is promoted, for this the pretreatments play an important role to promote the availability of the substrate to the enzyme. The physical (mechanical) treatment reduces the particle size, exerting favorable effects on the production of glucose and phenolic compounds. In the case described here, chemical treatment with CH_3COOH and NaHCO_3 do not produce significant changes, even reducing the progress of hydrolysis. Finally, the biological treatment with xylanases caused hemicellulose degradation, reducing the cellulase barrier and increasing glucose production. Optimal reaction conditions for GH were identified. To determine the progress of hydrolysis, glucose concentration (mg/dL) and total phenolic content (mg GAE/g sample) were measured.

Key words: Enzymatic hydrolysis, *Ananas comosus*, glycosyl hydrolases, total phenols, peel, pineapple.

INTRODUCCIÓN

La piña es considerada el tercer cultivo de frutas tropicales más importante a nivel mundial, en 2019 alcanzó una producción total de 29.40 millones de TM (FAOSTAT, 2020). El 80% de la producción mundial es utilizada por la industria procesadora, la cual genera alrededor de 5.50 millones de TM anuales de cáscara, esto se ve reflejado como un problema creciente ya que es propensa a la descomposición microbiana y causa graves problemas ambientales. Por otro lado, la cáscara de piña está compuesta principalmente por fibra dietaria, pectinas, azúcares, polifenoles, vitaminas, minerales y posee importante actividad biológica como antioxidante, antimicrobiana y efecto protector gastrointestinal (Hu *et al.*, 2019). La cáscara de piña posee un mayor contenido de compuestos fenólicos incluso que la propia pulpa (Da Silva *et al.*, 2014). Dadas las características nutricionales, las propiedades bioactivas y el problema que genera su disposición, este subproducto se puede considerar como materia prima de uso potencial para la generación de productos con valor agregado.

La piña posee microfibrillas insolubles de celulosa, altamente ordenadas y fuertemente empaquetadas, esto debido a su asociación con otras sustancias como lignina y hemicelulosa, dando como resultado morfologías complejas y heterogéneas que encapsulan los compuestos bioactivos (Seguí & Fito Maupoey, 2018). La descomposición mecánica y bioquímica de la matriz de la planta durante la ruptura celular, permite la liberación de compuestos bioactivos y cadenas cortas de fibra dietaria portadora de una cantidad significativa de polifenoles, que pueden ejercer funciones biológicas asociadas con su consumo (González *et al.*, 2017).

La hidrólisis enzimática de matrices lignocelulósicas, consiste en mediante la adición de enzimas específicas lograr la degradación de la pared celular, la hidrólisis de la celulosa se obtiene mediante la interacción cooperativa de las GH (Moreda-Piñeiro *et al.*, 2018). El grado de polimerización de las celulasas afecta la actividad relativa de las enzimas, al reducirse el tamaño de partícula, el grado de polimerización de la cadena de celulosa se ve reducido, y facilita la posterior hidrólisis enzimática (Kafle *et al.*, 2015). Diferentes autores demuestran que pretratamientos químicos promueven una degradación de la barrera física generada por la lignina, dando como resultado un mejor acceso por parte de las GH a la cadena de celulosa. La hemicelulosa por su parte juega un papel importante en restringir el acceso de las celulasas, por lo que, enzimas auxiliares tales como las xilanasas, reducen la barrera generada por la hemicelulosa, proporcionando mejores rendimientos durante la hidrólisis enzimática (Wojtusik, 2019). En el presente trabajo se analizó el tamaño de partícula de la cáscara de piña, la aplicación de un medio ácido o base para la degradación de la lignina, así como el tratamiento biológico con xilanasas para lograr una hidrólisis enzimática más efectiva, utilizando como variable de respuesta el contenido de fenoles totales y el contenido de glucosa en las muestras hidrolizadas, todo esto con la finalidad de lograr la hidrólisis de la pared celular de la cáscara de piña, liberar una mayor cantidad de compuestos fenólicos y en una posterior investigación generar productos de valor agregado a partir de los hidrolizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 La piña

La piña variedad Cayena Lisa se adquirió en la central de Abastos de Celaya Gto. El fruto tiene su procedencia del pueblo de Isla del estado de Veracruz y de Compostela Nayarit, fue adquirida con una madurez mínima de $\frac{3}{4}$ (NMX-FF-028-1995). Se lavó y sanitizó con hipoclorito de sodio a 200 ppm.

1.2 Pretratamientos

Como pretratamientos se llevaron a cabo la reducción del tamaño de partícula de la cáscara de piña; el tratamiento químico ácido y base y el tratamiento biológico con xilanasas. Posteriormente las muestras tratadas se hidrolizaron con Celulasas, a una temperatura de 50 °C y una agitación de 150 rpm. Junto al pretratamiento se describen las condiciones de hidrólisis consideradas para cada experimento.

1.2.1 Pretratamiento físico, tamaño de partícula

En cuanto al tamaño de partícula se consideraron dos factores, el primero de ellos consistió en trocear la cáscara a un tamaño de 1 cm³ aproximadamente, el segundo fue una molienda fina colocando la cáscara en un procesador de alimentos (Nutribullet 900 W) durante 60 segundos.

A la par del tratamiento físico, se corrió un experimento donde se observó la hidrólisis con dos tipos de enzimas, la “Enzima S” que corresponde a un coctel enzimático de GH > 5000 U/g, y la “Enzima C” celulasas de *Trichoderma reesei* >700 U/g. El experimento se llevó a cabo en una proporción 1:3 cáscara de piña: agua destilada, a una concentración de enzima S de 0.40% y para C de 0.52 % con respecto a la muestra en fresco. La hidrólisis se llevó a cabo en una incubadora con agitación (marca Shel lab modelo SS15) a una temperatura de 50 °C y una agitación de 150 rpm., se midió el contenido de fenoles totales cada 2 horas durante 24 horas. Se eligió la enzima S y la muestra molida para continuar con la experimentación y observar el efecto de los tratamientos químicos y biológicos.

1.2.2 Pretratamiento químico ácido y base

Se realizó un pretratamiento ácido y uno básico, los tratamientos consistieron en dejar en reposo la cáscara de piña en una solución de ácido acético en agua destilada al 5%, y una solución de bicarbonato de sodio al 9% durante 8 horas, se efectuó un lavado con agua destilada seguido de un ajuste de pH con bicarbonato de sodio hasta 5.5 y 6, a la par se corrió un hidrolizado sin tratamiento previo únicamente ajustando el valor de pH al reportado previamente. Posteriormente se efectuó la hidrólisis durante 10 horas, utilizando la misma proporción y condiciones de temperatura y agitación de la enzima S reportado en el experimento previo. Se midió el contenido de fenoles totales al inicio y término del proceso.

1.2.3 Pretratamiento biológico con xilanasas

Se consideró la muestra molida, se colocó la xilanasas (Pentopan mono BG) a una relación enzima sustrato del 5% y se hidrolizó a tres temperaturas, 45, 50 y 55 °C durante 72 horas. Se llevó a cabo la medición de glucosa liberada cada 12 horas durante la hidrólisis.

1.2.3.1 Hidrólisis enzimática de los diferentes pre-tratamientos biológicos

Los hidrolizados previos denominados TP45C, TP50C y TP55C (correspondiente a las temperaturas del pretratamiento de 45, 50 y 55 °C, respectivamente) fueron sometidos a una segunda hidrólisis enzimática esta vez con la enzima S, bajo las condiciones previamente descritas.

1.3 Análisis

Se midió el contenido de fenoles totales para monitorear el avance de la hidrólisis del pretratamiento físico, para ello se siguió la metodología de Folin Ciocalteu reportada por Banerjee *et al.*, (2018). Se realizó una extracción fenólica con metanol de la cáscara de piña. Se generó una curva estándar con ácido gálico y se preparó la muestra problema con Na₂CO₃ al 20% y el reactivo de Folin, después de una agitación vigorosa y reposo de 2 horas se leyó la muestra en un espectrofotómetro de masas a 760nm.

Para la determinación de glucosa se consideró un medidor de glucosa de marca Accu-Chek performance, la medición se llevó a cabo en el sobrenadante en disolución 1:10 con agua destilada. Modificación de lo realizado por Pocan *et al.*, (2018)

Los datos se expresan como media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Se llevó a cabo un ANOVA para identificar las diferencias existentes entre los tratamientos y el tiempo de proceso para cada uno de los análisis, posteriormente se realizó un post hoc de Tuckey con un intervalo de confianza de 0.05 y una diferencia intermuestral de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 Efecto del pretratamiento físico de molienda y tipo de enzima

En la figura 2.1 se puede apreciar el contenido de fenoles totales durante 10 horas de hidrólisis, el producto EnzSM corresponde a la hidrólisis enzimática con la enzima S y pretratamiento de molienda, este presenta una tendencia creciente hasta la hora 8 de trabajo, que fue donde se apreció el mayor contenido de compuestos fenólicos de los 4 tratamientos. El experimento EnzCM mostró un incremento de compuestos fenólicos hasta la hora 6 y posterior decremento. El ensayo EnzST presentó un ligero incremento en el contenido de compuestos fenólicos hasta la hora 8; comportamiento muy semejante al ocurrido en EnzCT. No existen diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos para los diferentes tratamientos.

En el caso de la accesibilidad de las GH comprenden principalmente los elementos estructurales presentes en el sustrato. El grado de polimerización de las celulasas afecta la actividad relativa de las GH, al incrementarse o verse reducidos los sitios de unión relacionados directamente con la longitud de la cadena. Al extenderse la cadena de glucano, también se incrementa la cantidad de enlaces entre las microfibrillas, aumentando la resistencia a la hidrólisis (Kafle *et al.*, 2015; Zoghلامي & Paës, 2019). Al reducirse el tamaño de partícula, el grado de polimerización de la cadena de celulosa se ve aminorado, generando mayor actividad enzimática como ocurre con la muestra molida a diferencia de la troceada. Por otro lado, el uso del coctel enzimático (enzimas S) que posee hemicelulasas, reduce la cadena de xilano promoviendo el acceso de las GH a la celulosa. Es por ello que en posteriores experimentos se utiliza la muestra molida y la enzima S.

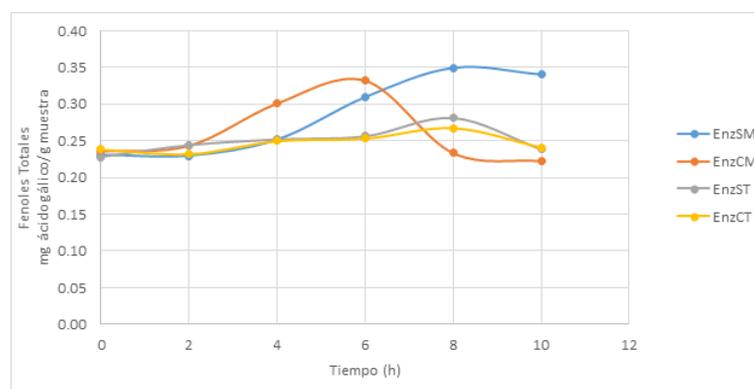


Figura 2.1 Contenido de fenoles para el diseño factorial 2^2 . Media de 3 repeticiones. Medición mostrada de 10 horas de hidrólisis para enzima S y enzima C, así como pretratamiento de molido y troceado. No hay diferencias significativas por efecto de los pretratamientos.

2.2 Pretratamiento ácido y base.

Debido a que el producto está enfocado hacia el consumo se consideran ácidos y bases comunes en la alimentación humana (cómo el ácido acético y el bicarbonato de sodio). En la **figura 2.2** se aprecia la medición de los compuestos fenólicos en mg de ácido gálico por gramo de muestra, la medición se llevó a cabo al finalizar la hidrólisis tras 8 horas de proceso. Se comparó una muestra en fresco molida y sin tratamiento químico (H1M), una muestra molida con tratamiento ácido (HTAM) y finalmente una con tratamiento básico (HTBM). También es posible observar la medición en fresco de la cáscara. La mayor cantidad de compuestos fenólicos al término del proceso se observó en la muestra a la que se le ajustó únicamente el pH, sin tratamientos químicos.

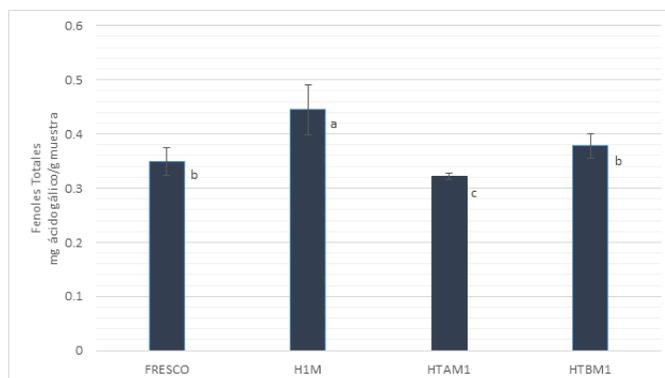


Figura 2.2. Contenido de compuestos fenólicos totales en pretratamientos químicos. Letras iguales no presentan diferencia significativa por efecto del pre-tratamiento. Tuckey ($p < 0.05$).

De acuerdo a lo descrito previamente se confirma que el ajuste de pH en las muestras mejora la hidrólisis enzimática. Los tratamientos ácido-base se descartan como pretratamientos para la hidrólisis enzimática al no generar cambios significativos en las muestras. Huang *et al.*, (2015) demostraron que los pretratamientos a base de ácido y álcali no son efectivos para mejorar la sacarificación enzimática del bambú, lo cual puede estar relacionada por el alto contenido de lignina presente en la muestra, semejante al 10% de lignina de la porción de fibras en la cáscara de piña, o bien como inhibición de la actividad enzimática atribuido al pretratamiento por la presencia del alcohol p-cumarílico y coniferílico.

Existen diferentes toxinas solubles en el medio hidrolítico que puede generar la desactivación enzimática, o bien generar la precipitación proteica de la enzima, uno de ellos corresponde a la generación de compuestos durante el proceso, como los compuestos fenólicos derivados de la lignina, esto debido a que el grupo OH podría formar puentes de hidrógeno con el residuo aminoacídico de las celulasas, ocupando el sitio activo e impidiendo la acción enzimática sobre la celulosa y por ende reduciendo el contenido final de compuestos fenólicos (Yao *et al.*, 2018). Otros inhibidores son los residuos de los pretratamientos, principalmente del tipo químico para lograr la amorfogénesis de la lignina, estos pueden verse reducidos al llevar a cabo un lavado abundante de la materia prima posterior al tratamiento (Agrawal *et al.*, 2021). Ahmed *et al.*, (2019) concluye que un secado posterior al pretratamiento y lavado secuencial, reduce la cantidad de toxinas solubles del producto.

2.3 Pretratamiento enzimático

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática a 45, 50 y 55 °C de la cáscara de piña con xilanasas durante 72 horas, durante el procesamiento enzimático se realizó la medición de glucosa en las muestras, observándose un incremento de 300 a 700 mg/dL principalmente en las muestras trabajadas a 45 y 50 °C. Se observaron diferencias significativas en la hora 48 y 72 entre las 3 temperaturas (**figura 2.3**).

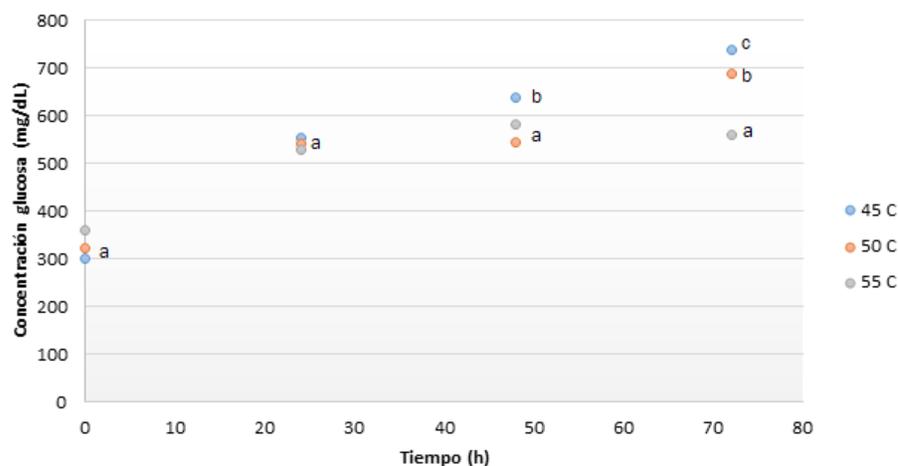


Figura 2.3 Hidrólisis enzimática de cáscara de piña con xilanasas. Medía de 3 repeticiones, letras iguales no presentan diferencia significativa por efecto de la temperatura. Tuckey ($p < 0.05$)

Dado que la hemicelulosa generalmente recubre a las microfibrillas en la pared celular de la planta, y forman una barrera física para la degradación eficiente, es considerada un obstáculo para la digestibilidad enzimática (Hu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019). Debido a ello se realizó el tratamiento enzimático previo para promover la ruptura de cadenas de celulosa. Las xilanasas se han aplicado para degradar el xilano y romper los enlaces químicos entre la hemicelulosa y las microfibrillas de celulosa, facilitando la sacarificación enzimática de la biomasa pretratada (Huang *et al.*, 2019). Prueba de ello es el contenido de glucosa que se incrementa en el medio durante la hidrólisis enzimática.

El uso de xilanasas se ha extendido para la obtención de xilooligosacáridos con excelente actividad antioxidante (Huang *et al.*, 2019). En un estudio se realizó el tratamiento del bambú moso y se obtuvieron xilooligosacáridos que promovían la producción de *Lactobacillus acidophilus* que mejoran la salud intestinal (Antov & Đorđević, 2017).

2.3.1 Hidrólisis enzimática de los diferentes pre-tratamientos biológicos

Posterior a la hidrólisis con xilanasas y subsecuente desactivación de la misma (5 min, 100 °C), se procedió a la adición de celulasas con la finalidad de romper las cadenas de celulosa en la matriz de la cáscara de piña. Como previamente se ha descrito las GH en acción sinérgica rompen los enlaces α -1,4 glucosídicos de celulosa transformándola en glucosa libre, por tal motivo se midió la glucosa presente en las muestras en ambas de hidrólisis. En la **figura 2.4** se muestra la concentración de glucosa durante la hidrólisis.

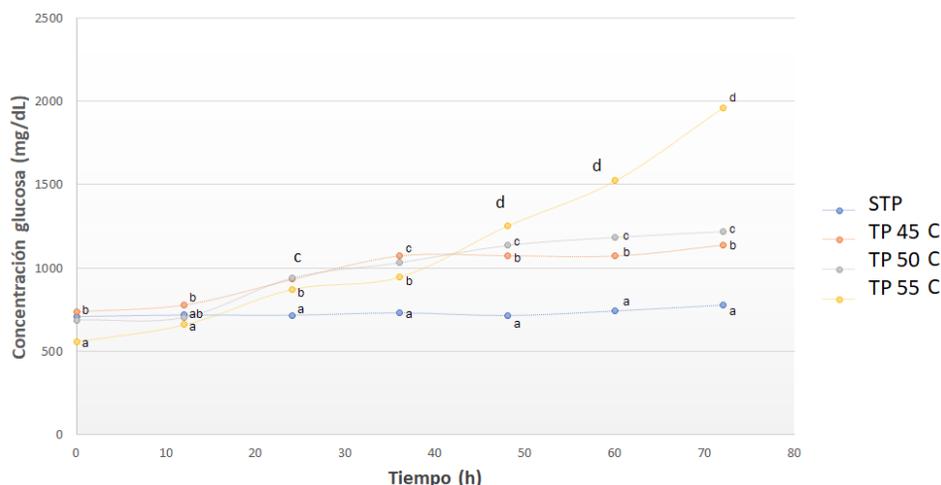


Figura 2.4. Efecto del pretratamiento en la concentración de glucosa. Media de 3 repeticiones. Letras iguales no presentan diferencias significativas por efecto del pretratamiento. Tukey ($p < 0.05$).

Como se puede observar en la figura el experimento sin tratamiento previo (STP) no presenta diferencias significativas a lo largo del tiempo de proceso. En TP45C se puede apreciar el incremento de glucosa en el sobrenadante de 700mg/dL aproximadamente hasta los 1150 mg/dL en la última evaluación, lo cual indica que la hidrólisis se está llevando a cabo en la muestra. Para TP50C, se observa un incremento de la concentración de glucosa en el sobrenadante de la muestra del tiempo 0 al final del proceso, de 700mg/dL de glucosa hasta 1200 mg/dL, un comportamiento semejante al tratamiento anterior. Finalmente, en TP55C se tiene un incremento exponencial de la concentración de glucosa en la muestra de 600mg/dL hasta casi 2000mg/dL, dicha concentración fue la más alta observada de los tres tratamientos previamente descritos. Si se obtuvieron diferencias significativas por efecto del tiempo de proceso en los tratamientos con xilanasas (figura 2.4)

Las xilanasas son un soporte para aumentar la accesibilidad de la celulasa para actuar en la celulosa, al degradar el recubrimiento de xilano alrededor de las fibras, las estructuras de los carbohidratos complejos unidos a éster, así como los restos de lignina acetilados en el enlace β de la biomasa (Ponnusamy *et al.*, 2019). Es por ello que los resultados aquí descritos demuestran que el tratamiento biológico es prometedor para eficientar la hidrólisis enzimática, y que la temperatura a 55° C del pretratamiento genera una mayor sacarificación en la hidrólisis posterior.

CONCLUSIÓN

El tratamiento físico de molienda fina reduce el tamaño de partícula, disminuye el grado de polimerización de la matriz lignocelulósica, aumenta el área de acción de las glicosil hidrolasas observándose como un incremento en el contenido de fenoles totales de la cáscara hidrolizada.

Los tratamientos ácido-base se descartan como pretratamientos para la hidrólisis enzimática al no generar cambios significativos en las muestras, atribuido a una posible inhibición de la actividad enzimática por la presencia de los aholes al degradar la lignina.

El tratamiento biológico con xilanasas efectivamente promueve la degradación de la hemicelulosa, dejando disponible la celulosa a la acción de la enzima, liberando de esta manera moléculas de glucosa de los hidrolizados, esto se concluye al comparar las muestras con tratamiento enzimático previo y aquel sin pretratamiento. De acuerdo con los resultados obtenidos se resalta la idea que la enzima a 55° C en el pretratamiento, promueve una mayor cantidad de glucosa al llevarse a cabo la segunda hidrólisis, es

decir refleja un mayor avance en la hidrólisis de la matriz lignocelulósica, atribuido a una mejor degradación de la hemicelulosa a dicha temperatura.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, R., Verma, A., Singhanian, R. R., Varjani, S., Di Dong, C., & Kumar Patel, A. (2021). Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioresource Technology*, 332(February), 125042. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125042>
- Ahmed, F., Yan, Z., & Bao, J. (2019). Dry biodegradation of acid pretreated wheat straw for cellulosic ethanol fermentation. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0260-x>
- Antov, M. G., & Đorđević, T. R. (2017). Environmental-friendly technologies for the production of antioxidant xylooligosaccharides from wheat chaff. *Food Chemistry*, 235, 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.058>
- AOAC International. (1995). *Official methods of analysis of AOAC International*. Arlington, Va: AOAC International.
- Banerjee, S., Ranganathan, V., Patti, A., & Arora, A. (2018). Trends in Food Science & Technology Valorisation of pineapple wastes for food and therapeutic applications. *Trends in Food Science & Technology*, 82(March), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.024>
- Da Silva, L. M. R., De Figueiredo, E. A. T., Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., De Figueiredo, R. W., Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143, 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.001>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). *FAOSTAT statistical database*. [Consultado:2022]:FAO.
- González-Aguilar, G. A., Blancas-Benítez, F. J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2017). Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: molecular interactions and bioaccessibility. *Current Opinion in Food Science*, 13, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.03.004>
- Hu, H., Zhao, Q., Xie, J., & Sun, D. (2019). Polysaccharides from pineapple pomace: new insight into ultrasonic-cellulase synergistic extraction and hypoglycemic activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.054>
- Huang, C., He, J., Li, X., Min, D., & Yong, Q. (2015). Facilitating the enzymatic saccharification of pulped bamboo residues by degrading the remained xylan and lignin-carbohydrates complexes. *Bioresource Technology*, 192, 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.008>
- Huang, C., Wang, X., Liang, C., Jiang, X., Yang, G., Xu, J., & Yong, Q. (2019). A sustainable process for procuring biologically active fractions of high-purity xylooligosaccharides and water-soluble lignin from Moso bamboo prehydrolyzate. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1527-3>
- Kafle, K., Shin, H., Lee, C. M., Park, S., & Kim, S. H. (2015). Progressive structural changes of Avicel, bleached softwood, and bacterial cellulose during enzymatic hydrolysis. *Scientific Reports*, 5(October), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep15102>
- Moreda-Piñero, J., Sánchez-Piñero, J., Mañana-López, A., Turnes-Carou, I., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., & Muniategui-Lorenzo, S. (2018). Multi-element determinations in foods from Amazon region by ICP-MS after enzymatic hydrolysis assisted by pressurisation and microwave energy. *Microchemical Journal*, 137, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.11.018>
- Pocan, P., Bahcegul, E., Oztop, M. H., & Hamamci, H. (2018). Enzymatic Hydrolysis of Fruit Peels and Other Lignocellulosic Biomass as a Source of Sugar. *Waste and Biomass Valorization*, 9(6), 929–937. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9875-3>

- Ponnusamy, V. K., Nguyen, D. D., Dharmaraja, J., Shobana, S., Banu, J. R., Saratale, R. G., Chang, S. W., & Kumar, G. (2019). A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresource Technology*, 271, 462–472. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.070>
- Seguí, L., & Fito Maupoey, P. (2018). An integrated approach for pineapple waste valorisation. Bioethanol production and bromelain extraction from pineapple residues. *Journal of Cleaner Production*, 172, 1224–1231. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.284>
- Wojtusik, M. (2019). *Hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos*.
- Yao, L., Yoo, C. G., Meng, X., Li, M., Pu, Y., Ragauskas, A. J., & Yang, H. (2018). A structured understanding of cellobiohydrolase i binding to poplar lignin fractions after dilute acid pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1087-y>
- Zhang, X., Li, Y., & Hou, Y. (2019). Preparation of magnetic polyethylenimine lignin and its adsorption of Pb(II). *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 1102–1110. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.061>
- Zoghlami, A., & Paës, G. (2019). Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry*, 7(December). <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>