



UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN QUÍMICA
TRABAJO DE FIN DE GRADO
Curso 2022-2023

Extracción con agua subcrítica y ultrafiltración para la obtención de pecto-oligosacáridos a partir de residuos de piel cebolla

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos
Área de Ingeniería Química

Tutores: María Olga Ruiz Pérez y Óscar Benito Román

Javier Hernández Manchado
Junio 2023



UNIVERSIDAD
DE BURGOS

Facultad de Ciencias

**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO** ⁽¹⁾

GRADO EN: QUÍMICA

CURSO: 2022-2023

D/Dña. María Olga Ruiz Pérez y Óscar Benito Román., Tutores Académicos, informan de que el alumno D/Dña. Javier Hernández Manchado, ha realizado el Trabajo Fin de Grado que lleva por título "Extracción con agua subcrítica y ultrafiltración para la obtención de pecto-oligosacáridos a partir de residuos de piel cebolla" bajo su tutela y considera que la memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(* En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 13 de Junio de 2023

Fdo.: Óscar Benito Román

Fdo.: María Olga Ruiz Pérez

(1) Las memorias presentadas deberán contar con el visto bueno de los tutores. A tal efecto, **se incluirá en la contraportada este documento con la firma de los mismos.** (Regulación del reglamento interno de la facultad de ciencias para la gestión de la asignatura "Trabajo Fin de Grado" de la Facultad de Ciencias, aprobada en Junta de Facultad de 11 de febrero de 2022)

AGRADECIMIENTOS:

El trabajo presentado ha sido desarrollado en el seno del Grupo de Investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental, reconocido por la UBU (GIR-UBU BIOIND) y por la Junta de Castilla y León como Unidad de Investigación Consolidada UIC-128, en el marco de los siguientes proyectos de investigación:

PID2020-116716RJ-I00 - Tecnologías de fluidos presurizados para la valorización de subproductos de la industria agroalimentaria: recuperación de pectina y otros compuestos bioactivos de alto valor, financiado por la Agencia Estatal de Investigación.

PDC2022-133443-I00 – Diseño de un prototipo para la extracción de bioproductos con agua subcrítica, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

TED2021-129311B-I00 - Tecnologías verdes basadas en el empleo de fluidos presurizados para valorizar biomasa lignocelulósica mediante la producción de furfural, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

BU050P20 - Valorización de la fracción proteica de subproductos de la industria agroalimentaria de Castilla y León mediante tecnologías de fluidos presurizados, financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

ÍNDICE:

ABSTRACT	1
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- OBJECTIVES	4
3.- PARTE EXPERIMENTAL	4
3.1.-PRODUCTOS QUÍMICOS Y MATERIALES	4
3.2.- PREPARACIÓN DEL SUBPRODUCTO DE PIEL DE CEBOLLA	4
3.3.-PROCESO DE EXTRACCIÓN CON AGUA SUBCRÍTICA	5
3.4.- EXPERIMENTOS DE ULTRAFILTRACIÓN.....	6
3.5.- MÉTODOS ANALÍTICOS	8
3.5.1. Determinación de POS y otros componentes estructurales	8
3.5.2. Distribución del peso molecular de la fracción POS	9
3.5.3. Identificación individual de compuestos fenólicos.....	9
3.5.4. Otros métodos analíticos.....	9
3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	10
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN	10
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL PROCESO DE ULTRAFILTRACIÓN	13
5.1.- ULTRAFILTRACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS CON UNA MEMBRANA DE 50 kDa	14
5.1.1. Densidad de flujo de permeado y ensuciamiento	14
5.1.2. Perfil de transporte de las impurezas a través de la membrana.....	15
5.2.- ESTUDIO DE LA ULTRAFILTRACIÓN DEL HIDROLIZADO OBTENIDO EN LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN	18
5.2.1. Pretratamiento del hidrolizado antes de la ultrafiltración	18
5.2.2. Perfil de transporte de las impurezas a través de una membrana de 50 kDa y de 5 kDa..	19
5.2.3. Evaluación de la composición POS del retenido final	20
6.- CONCLUSIONES	21

ABSTRACT

In this work the purification by ultrafiltration using tubular ceramic membranes of pectic oligosaccharides (POS) extracted from onion skin wastes (OSW) was studied.

In the first stage of the work, subcritical water was used to promote the hydrolysis of OSW and obtain a liquid hydrolysate rich in POS. For this purpose, three different combinations of temperature and extraction time (115 °C – 180 min; 125 °C – 150 min and 135 °C – 90 min) were used in a batch extractor at 25 bar. In order to consider the combined effect of the temperature and the extraction time, the severity factor ($\log R_o$) was calculated, resulting to be in the range 2.88 to 3.29. The best results in terms of POS concentration (5643 ± 84 mg/L) in the hydrolysate was obtained in the experiment carried out at 125 °C ($\log R_o = 3.16$). It was also possible to demonstrate that the composition of the liquid hydrolysate was strongly influenced by the extraction conditions: the higher the severity factor the higher the concentration of impurities (organic acids, HMF and furfural) and higher the POS hydrolysis rate. This was demonstrated by the increased concentration of free monosaccharides (glucose, xylose, galactose and arabinose) and the decrease in the POS molecular weight.

In the second stage of the work, the aim was to study the separation of POS from the impurities formed during the subcritical water hydrolysis stage, using an ultrafiltration process in diafiltration mode. For this purpose, a 50 kDa tubular membrane was firstly used (Tami Industries, active layer of TiO_2 and 132 cm² of effective area). The fouling mechanism, hydraulic resistance and the purification extent were studied. Important differences in the permeate flux (J) were observed as a function of the subcritical water hydrolysate composition. The permeate flux obtained when filtering the 115 °C hydrolysate decreased dramatically at the beginning of the experiment to achieve a constant value, whereas the hydrolysates obtained at 125 and 135 °C exhibited a different behaviour: an initial fast decline of the permeate flux followed by a slower continuous decrease. This result for 125 and 135 °C hydrolysates can be justified due to the effects of the membrane fouling (fouling mechanism was cake layer formation, according to Hermia's model). Using this 50 kDa membrane, the POS recovery was 76 % (115 °C hydrolysate), 58 % for the 125 °C hydrolysate and 56% for the 135 °C hydrolysate. In all the cases, a complete removal of the impurities was achieved after the dilution factor of 3.5.

To complete the purification experiments, the effect of the removal of the colloidal matter (by centrifugation) present in the 125 °C hydrolysate was studied using two different membranes (50 and 5 kDa). In the hydrolysate, it was observed the formation of a black precipitate that was responsible for the membrane fouling, hindering the filtration process. The removal of this colloidal matter, which did not affect the POS fraction, was responsible for the reduction of the colour of the hydrolysate by 60 % and the promotion of the filtration process (a faster removal of the impurities was achieved) without loss of the POS fraction. Finally, when a 5 kDa membrane was used, the retention of the POS fraction was higher than 80 % in comparison to the 60 % obtained for the 50 kDa membrane.

Keywords: subcritical water, oligosaccharide fractionation, ultrafiltration, diafiltration, onion skin waste, biorefinery.

1.- INTRODUCCIÓN

En el sistema económico lineal, la mayoría de los residuos o subproductos suelen desecharse, lo que supone un problema para la sostenibilidad ambiental del planeta. La integración de los residuos industriales y agrarios como materia prima de otros procesos industriales constituye el pilar fundamental del concepto de economía circular para alcanzar el objetivo de residuo cero. En este sentido nace el concepto de biorrefinería como una estructura que integra los procesos de transformación de los residuos en materias primas para producir combustibles, energía y/o productos químicos [1].

Los residuos de pieles de cebolla, no se pueden destinar a alimentación animal y son actualmente desechados en vertederos con valores de vertido altos, que rondan las 450.000 toneladas al año en Europa [2]. En la bibliografía, se dispone de varios estudios de valorización destinados a su reutilización para la obtención de compuestos flavonoides, más concretamente quercetinas [3,4]. Sin embargo, estos residuos pueden presentar gran potencial de reutilización como materia prima para la producción de pecto-oligosacáridos debido a la presencia de pectina [5]. Esta reutilización, también está avalada por la elevada demanda de pectina y de sus derivados (40000 t/año), estimándose un crecimiento anual de alrededor del 5 %. Según la Global Industry Analysts (GIA, [http:// www.marketresearch.com/Global-IndustryAnalysts-v1039/](http://www.marketresearch.com/Global-IndustryAnalysts-v1039/)) el ejercicio del mercado mundial en 2022 fue de 5.400 millones de dólares para este tipo de productos químicos y se estima que para 2030 alcance cerca de los 12.000 millones de dólares.

La pectina es un componente estructural especialmente abundante en las pieles de cebolla y se define químicamente como un heteropolisacárido aniónico rico en ácido D-galacturónico [6]. Convencionalmente, las pectinas comerciales se obtienen por extracción ácida a partir de pulpa de manzana o pieles de cítricos, y suele ser productos formados por mezclas de varias familias de polímeros ácidos y neutros, ramificados y/o lineales. De forma general, este complejo polisacárido presenta en su estructura molecular con cuatro dominios principales (homogalacturonanos, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II y xilo-galacturano) [7,8]:

1. Homogalacturonano (GH): son dominios lineales formados por ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces α -(1-4). Puede comprender más del 65 % de la pectina.
2. Ramnogalacturano I (RG-I): este dominio en su estructura presenta una columna vertebral que contiene repeticiones del disacárido 1,2- α -L-ramnosa-1,4- α -D-galacturónico. Además, presenta ramificaciones en las moléculas de ramnosa a la cual se enlazan cadenas laterales de azúcares neutros. Puede comprender hasta un 25 % de la pectina.
3. Ramnogalacturano II (RG-II): está formada por ácido galacturónico, ramnosa, galactosa y en las cadenas laterales residuos de azúcares neutros (ácido acérico). Representa el 10 % de la pectina.
4. Xilo-galacturano (XGA): es un tipo de homogalacturano (HG), en la cual se ha sustituido una sola unidad de la cadena lateral de β -D-Xilosa-(1 \rightarrow 3). Este tipo es característico de tejidos de almacenamiento como la cebolla.

Los pecto-oligosacáridos (POS), oligómeros de pectina de bajo peso molecular y alta ramificación, han sido propuestos como una nueva clase de prebióticos debido a su capacidad para regular la microbiota en el intestino humano [8], sus propiedades antioxidantes en comparación con otros oligosacáridos comerciales [9] o sus efectos antiinflamatorios y antiobesidad [10]. La creciente demanda de POS comerciales como aditivos funcionales con fines farmacéuticos y alimentarios requiere de nuevas fuentes y, en este sentido, los residuos de piel de cebolla pueden ofrecer un gran potencial [5]. Estos oligosacáridos se obtienen por hidrólisis parcial ácida y/o enzimática a partir de pectina [11]. El principal inconveniente en la primera técnica es la falta de selectividad y en la segunda el aumento del coste de producción por el uso de enzimas. Además, con ambas técnicas, el grado de hidrólisis de la pectina es elevado, resultando difícil la obtención de POS que mantengan en su estructura química el dominio RG-I, el cual ha sido citado en diversos estudios como importante en la funcionalidad de este tipo de oligosacáridos [5,12,13].

La extracción con agua subcrítica se presenta como una interesante alternativa para la obtención de POS a partir de residuos de piel de cebolla, ya que en un solo paso consigue la extracción e hidrólisis de la pectina. Esta tecnología está englobada dentro de las tecnologías respetuosas con el medioambiente por utilizar agua como disolvente, sin generación de residuos orgánicos tóxicos. Se ha utilizado con muy buenos resultados para el tratamiento de

distintas biomásas naturales tales como salvados, residuos agrarios, macroalgas, pieles de limón y remolacha, entre otras [14–16]. El agua subcrítica se define como agua a temperaturas entre 100 y 374 °C que se presuriza para mantenerse en fase líquida. En estas condiciones, el agua presenta muy buenas propiedades como agente disolvente y de hidrólisis debido a que presenta una disminución considerable del momento dipolar, de la viscosidad y del producto iónico [17].

Por otra parte, los hidrolizados de agua subcrítica de residuos de piel de cebolla son mezclas multicomponente complejas, que incluyen en su composición POS, monosacáridos libres, ácidos orgánicos, furfural, hidroximetilfurfural, sales minerales, restos de lignina, compuestos fenólicos, entre otros. Un reto importante, es encontrar una técnica de separación adecuada que permita recuperar, aislar y concentrar esta fracción oligosacárida. En este trabajo se propone el estudio de los procesos de separación con membranas y en concreto **la ultrafiltración (UF)**, que se destaca como una alternativa sostenible y rentable debido a que puede conseguir el fraccionamiento de la mezcla sin necesidad de utilizar disolventes orgánicos, emplea equipos sencillos y modulares, son procesos fáciles de automatizar para su escalado industrial y de bajo coste energético por operar a presiones transmembrana suaves y generalmente a temperatura ambiente [18]. De hecho, se dispone en bibliografía de varios estudios de UF para distintos caldos de pectinas y de POS con buenos resultados en términos del grado de purificación alcanzado [7,19–22].

La UF es un proceso de filtración que utiliza membranas ultraporosas como medio de separación permeo-selectivo, y comercializadas generalmente con tamaños medios de poro comprendidos entre 1 kDa y 300 kDa. La fuerza impulsora del transporte de materia a través de la membrana es debida a la aplicación de una diferencia de presión transmembrana, que permite la separación del hidrolizado del agua subcrítica en dos corrientes: el permeado y el retenido. En general, se puede considerar que el transporte a través de las membranas ultraporosas se basa principalmente en el tamaño molecular, y en menor medida en la forma, carga y/o hidrofobicidad de las moléculas en disolución [23]. Es decir, la elección del diámetro de poro de membrana es un factor limitante para conseguir una buena separación y purificación de los POS (500-1 kg/mol), que deben permanecer en la corriente de retenido, mientras que los compuestos de bajo peso molecular como el furfural, hidroximetilfurfural, monosacáridos libres y ácidos orgánicos son eliminados en el permeado [24].

El principal inconveniente de estos procesos de UF son los fenómenos de ensuciamiento, ocasionado por la acumulación de solutos sobre la superficie externa y/o en los poros de la membrana. Este hecho, es el responsable de una disminución progresiva del flujo de permeado durante la UF, siendo necesario incluir paradas para ciclos de limpieza química, largas y frecuentes, con la consiguiente reducción de la vida útil de la membrana. Evitarlo suele ser difícil, incluso utilizando flujo tangencial y requiere de un estudio de optimización para reducir su efecto [23,25,26]. Echavarría *et al.* [27] observaron que la pectina fue la responsable del ensuciamiento de membranas multicanal de 100 y 300 kDa durante la filtración de zumos de manzana con un 12 % de sólidos solubles. Saf *et al.* [28] observaron que se formaba una capa de suciedad compuesta por materia en suspensión, gel de pectinas y hemicelulosas, con polifenoles atrapados en esta capa de suciedad durante la UF de aguas residuales de almazara con una membrana de 150 kDa. Así, de acuerdo con esta información, los hidrolizados de residuos de piel de cebolla tienen un elevado potencial de ensuciamiento y se requiere estudiar su impacto sobre la densidad de flujo de permeado para la UF con distintos tamaños de poro de membrana [24].

Con lo expuesto anteriormente, en este trabajo se ha estudiado el efecto combinado de la temperatura y del tiempo de residencia en el proceso de extracción. Además de la identificación de los principales compuestos presentes en el hidrolizado y la viabilidad de la ultrafiltración de alimentación continua como proceso de separación y refinado de la fracción de oligosacáridos para su posible aplicación con fines farmacéuticos o alimentarios.

2.- OBJECTIVES

The main aim of this work has been to study the purification by ultrafiltration using tubular ceramic membranes of pectic oligosaccharides (POS) extracted from onion skin wastes (OSW) with subcritical water treatment. The following specific objectives have also been performed in order to achieve this purpose:

1. To study the extraction of POS using subcritical water under different combinations of temperature and extraction time. The simultaneous effect of both process variables on POS extraction yield and degradation products formed, was evaluated using the "severity factor".
2. Identification and characterisation of different subcritical water hydrolysates. Determine the composition of the subcritical water hydrolysate obtained in all the experimental conditions tried: content and molecular weight distribution of POS, and concentration of impurities by HPLC.
3. To evaluate the separation efficiency between POS and the impurities using a 50 kDa tubular ceramic membrane. Determine the fouling mechanism, hydraulic resistance and the purification extent of the ultrafiltration process in diafiltration mode.
4. To study the effect of the removal of the colloidal matter present in the hydrolysates on the ultrafiltration process performance, using two different membranes (50 and 5 kDa).

3.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1.-PRODUCTOS QUÍMICOS Y MATERIALES

El residuo de piel de cebolla (*Allium cepa*) utilizado en este trabajo como materia prima ha sido proporcionado por Embutidos Cardeña (Burgos, España).

Los productos químicos utilizados en los procedimientos son: Glucosa (glu, 99,5 %), galactosa (gal, 99 %), arabinosa (ara, 99 %), ramnosa (rha, 99 %), xilosa (xyl, 99 %), furfural (F, 99 %) y gálico ácido (98 %) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (EE. UU.). El 5-hidroximetilfurfural (HMF, 97 %) fue proporcionado por Biosynth Ltd. (Reino Unido); Monohidrato de ácido D-galacturónico (GA, pureza >97 %) de Alfa Aesar (EE. UU.) y ácido glucurónico de Glenthams Life Sciences Ltd. (Reino Unido). El ácido fórmico (FA, 98 %) y el ácido acético glacial (AcA, 99,7 %) fueron adquiridos de Panreac (España); ácido ortofosfórico (76 %) e hidróxido de sodio (99 %) de Cofarcas S.A. (España) y carbonato de sodio (99,5 %) de Honeywell Fluka (EE. UU.). El ácido sulfúrico utilizado para la hidrólisis de la muestra fue del 96 % de pureza y fue proporcionado por Labbox (España), mientras que el utilizado para la preparación de la fase móvil por HPLC fue Suprapur al 96 % proporcionado por Merck (Alemania). Todos los químicos fueron usados sin purificación adicional.

Las membranas cerámicas de 50 kDa y de 5 kDa han sido suministradas por TAMI Industries (Francia). Consiste en una membrana de TiO₂ tubular (longitud de 25 cm) multicanal, con siete canales internos, y un área efectiva de membrana de 132 cm². Este tipo de membrana tiene carga positiva a valores de pH inferiores 4,5-4, y carga negativa a valores superiores [29].

3.2.- PREPARACIÓN DEL SUBPRODUCTO DE PIEL DE CEBOLLA

Los residuos de cebolla se seleccionaron para separar las pieles marrones externas y se secaron a temperatura ambiente. Una vez secas se molieron en un molino SM100 Retsch con un tamiz de 1 mm y se almacenó a 4 °C para su posterior extracción. Sobre esta materia prima se realizó una extracción con una mezcla etanol/agua (70/30, v/v) a 37 °C durante 1 h, a fin de recuperar los flavonoides presentes en ella [30]. Tras la extracción, la piel de cebolla se secó y se ha utilizado como subproducto o materia prima para la extracción de POS.

3.3.-PROCESO DE EXTRACCIÓN CON AGUA SUBCRÍTICA

El proceso de extracción con agua subcrítica (Subcritical Water Extraction-SWE) se realiza en el sistema discontinuo (diseño y montaje propio del grupo de Investigación BIOIND) que se muestra en la Figura 1. El equipo de extracción está formado por un reactor con un volumen de 0,5 L, un manómetro, una resistencia eléctrica (2000 W) para el calentamiento controlado por un sistema de control PID, una válvula de entrada para la presurización con nitrógeno, válvula de despresurización, válvula de toma de muestra y una placa agitadora. Las especificaciones máximas del equipo son 70 bar y 250 °C.



Figura 1. Fotografía del equipo de extracción con agua subcrítica utilizado en este trabajo.

Para llevar a cabo la extracción, se mezclaron 15 g del subproducto de piel de cebolla triturada con 0,35 L de agua destilada. Las condiciones de extracción seleccionadas fueron: 115 °C durante 180 min, 125 °C durante 150 min y 135 °C durante 90 min, siendo 25 bar la presión en todos los casos. Los tiempos de extracción a cada temperatura fueron seleccionados a partir de los datos experimentales de las cinéticas de extracción realizados previamente en el laboratorio y que no componen una parte experimental de mi Trabajo Fin de Grado.

Pasado el tiempo de extracción se dejó enfriar el reactor y se hizo una separación sólido-líquido con ayuda de una tela filtrante para obtener el hidrolizado líquido y el residuo sólido. El hidrolizado líquido se almacenó a una temperatura de -20 °C, para evitar su degradación. Las extracciones se hicieron por duplicado a fin de obtener suficiente cantidad de hidrolizado para llevar a cabo los estudios posteriores de purificación de los POS por ultrafiltración.

Dado que se emplearon diferentes combinaciones de tiempo y temperatura para llevar a cabo las extracciones y poder comparar la composición de los hidrolizados obtenidos se empleó el factor de severidad (R_0) que se calcula con la Ec.1 [31] y que tiene en cuenta el efecto combinado del tiempo y la temperatura de operación.

$$R_0 = \int_{t_i=0}^{t_f} e^{\left(\frac{T_i-100}{T_i^2 \cdot R}\right) \cdot \frac{1}{E_a}} \cdot dt \quad (1)$$

donde, t es el tiempo de extracción, T es la temperatura, E_a es la energía de activación aparente de la pectina, R es la constante universal de los gases y los subíndices i y f hacen referencia a la condición inicial y final, respectivamente.

Sin embargo, en un proceso de extracción en discontinuo se pueden distinguir tres etapas: calentamiento (tiempo que se tarda en alcanzar la temperatura de trabajo desde la temperatura ambiente, 4 °C/min), extracción isoterma (tiempo durante en el cual mantiene la temperatura de extracción deseada) y enfriamiento (tiempo que transcurre desde que termina

la fase isoterma hasta que se abre el extractor, una vez que la temperatura es suficientemente baja para poder abrirlo con seguridad, 1 °C/min). El factor de severidad presentado en la Ec. 2 tiene en cuenta el efecto de cada una de las tres etapas (calentamiento, tratamiento isoterma y enfriamiento), que permite calcular de forma más exacta la intensidad del proceso de extracción, dado que durante las 3 etapas se puede producir la hidrólisis del producto.

$$\log R_0 = (R_{0 \text{ Calefacción}}) + (R_{0 \text{ Isoterma}}) + (R_{0 \text{ Enfriamiento}}) \quad (2)$$

Combinando las Ecs. 1 y 2 e integrado, se obtiene la expresión para calcular el factor de severidad total (Ec. 3) durante todo el tratamiento con agua subcrítica.

$$\log R_0 = \left[\sum_{i=1}^n t_c \cdot e^{\left(\frac{T_i - 100}{T_f^2 \cdot R} \right) \left(\frac{1}{E_a} \right)} \right] + \left[\sum_{i=1}^n t_i \cdot e^{\left(\frac{T_i - 100}{T_f^2 \cdot R} \right) \left(\frac{1}{E_a} \right)} \right] + \left[\sum_{i=1}^n t_e \cdot e^{\left(\frac{T_i - 100}{T_f^2 \cdot R} \right) \left(\frac{1}{E_a} \right)} \right] \quad (3)$$

En la Ec. 3, la variable t_c es el tiempo de calentamiento, t_i es el tiempo isoterma y t_e es el tiempo de enfriamiento.

Es importante destacar que, R_0 ha sido utilizado como parámetro de control de la operación de extracción con agua subcrítica [5], sin embargo, no se han encontrado estudios bibliográficos en los cuales se haya relacionado R_0 con el rendimiento máximo de recuperación de la fracción de pectina presente en la pared celular de la piel de cebolla, que será estudiado en este trabajo.

3.4.- EXPERIMENTOS DE ULTRAFILTRACIÓN

Los distintos hidrolizados, obtenidos en el proceso de extracción con agua subcrítica, se han ultrafiltrado con membranas cerámicas tubulares de 7 canales.

Todos los experimentos de UF se realizaron en modo diafiltración utilizando el dispositivo experimental mostrado en la Figura 2. El hidrolizado se vertió en el tanque de alimentación (Tanque 1) y se impulsó al módulo de membrana utilizando una bomba peristáltica Masterflex (HV-7220-57 con un cabezal Masterflex L/S EasyLoad II HV-77201-62). Para añadir agua de forma continua al tanque alimentación, se utilizó otra bomba peristáltica Masterflex (HV-7521-10 con un cabezal Masterflex L/S EasyLoad II HV-77200-50). Las tuberías instaladas en todo el dispositivo experimental fueron tubo de silicona (Masterflex L/S 15). Se colocaron dos manómetros (P) para medir la presión transmembrana (PTM) a la entrada y a la salida del módulo de membrana. Antes de iniciar el proceso de UF, la alimentación se recirculó por el sistema durante 5 minutos. A continuación, se ajustó la PTM y el caudal de alimentación al valor de trabajo deseado utilizando el regulador de velocidad de la bomba y una válvula situada aguas abajo del módulo de membrana.

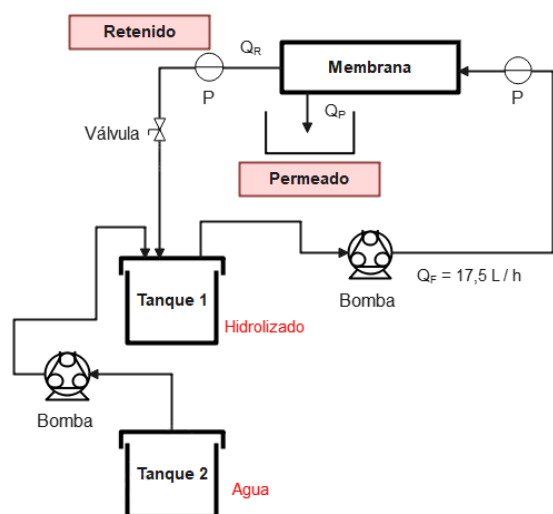
Todos los experimentos se realizaron a PTM constante de $1,05 \pm 0,05$ bar, con un caudal de alimentación de $17,5 \pm 0,2$ L/min y a 25 ± 1 °C, recirculando el retenido al Tanque 1 y eliminado continuamente el permeado. El permeado se recogió en el depósito de permeado, mientras que se añadió agua al Tanque 1 a un caudal igual al caudal de salida del permeado, con el fin de mantener constante el volumen en el Tanque 1 ($V_F = V_R$). El flujo de permeado se midió volumétricamente ($\pm 0,1$ mL) y gravimétricamente ($\pm 0,001$ g) hasta el final del experimento. La densidad de flujo de permeado a lo largo de la UF se calculó con la Ec. 4:

$$J = \frac{V_P}{A_m \cdot t} \quad (4)$$

y el factor de dilución (FD) con la Ec. 5:

$$FD = \frac{V_w}{V_F} \quad (5)$$

donde V_P es el volumen de permeado, V_F es el volumen de hidrolizado de alimentación añadido al Tanque 1 que es igual al volumen de retenido durante toda la UF, V_W es el volumen de agua añadido al Tanque 1 que es igual al volumen de permeado durante toda la UF, A_m es el área de membrana y t es el tiempo de operación.



(a)

(b)

Figura 2. Dispositivo experimental empleado en la ultrafiltración en modo diafiltración. (a) Diagrama de flujo del proceso. (b) Fotografía del equipo experimental.

Se midió experimentalmente la concentración de los distintos compuestos en la alimentación (C_F), en el permeado (C_P) y en el retenido (C_R) a lo largo de la UF. El grado de purificación, establecido como la velocidad de permeación de cada uno de los compuestos, se determinó como el cociente de C_P y C_F .

Después de cada UF, la membrana cerámica se sometió a un ciclo de limpieza. Primero, se pasa una disolución H_3PO_4 al 0,1 % durante 60 min a 25 °C y una presión transmembrana de 0,25 bar (se realiza en condiciones de recirculación total). Seguidamente se pasa una primera fracción de disolución de NaOH de 0,2 M a 50 °C y una presión de 0,5 bar. A continuación, se pasa otra fracción de la disolución anterior en condiciones de recirculación total durante 60 min. Finalmente, se alimenta con agua destilada tibia hasta que se recupera un pH neutro del flujo de agua. Finalmente, se mide el flujo de agua a 25 °C y a varias presiones para comprobar que la membrana tiene las mismas condiciones de operación que las indicadas por el fabricante.

Una de las grandes desventajas del uso de membranas es el ensuciamiento de la membrana durante el proceso, para ello se hace el estudio del grado de ensuciamiento. Se utilizó el modelo de resistencia en serie (Ec. 6) para determinar las resistencias a la filtración [23]:

$$r_{T=} \frac{PTM}{\mu \cdot J} = r_m + r_f \quad (6)$$

donde PTM es la presión transmembrana calculada como el valor medio de las medidas del manómetro (P) colocado a la entrada y la salida de la membrana (P_a), μ es la viscosidad (Pa·s), r_T es la resistencia total a la filtración, r_f es la resistencia debida al ensuciamiento y r_m de la resistencia hidráulica que ofrece la membrana. La resistencia r_m se determinó como la pendiente del ajuste lineal de los datos experimentales de J_o vs. PTM ultrafiltrando agua destilada a distintas PTM desde 0,25 a 1,25 bar.

Para analizar los mecanismos de ensuciamiento de la membrana se utilizó el modelo de Hermia modificado para el flujo tangencial [32] que se muestra en la Ec. 7:

$$\frac{dJ}{dt} = -k \cdot (J - J^*) \cdot J^{(2-n)} \quad (7)$$

donde k es el índice de ensuciamiento, J^* es la densidad de flujo de permeado crítico que no debería superarse para evitar el ensuciamiento, y n indica el mecanismo de ensuciamiento. Cuando $n = 0$, el mecanismo de ensuciamiento es la formación de una capa de torta, mientras que un valor $n = 2$ indica un mecanismo de ensuciamiento debido al bloqueo de los poros de la membrana.

Los modelos de ensuciamiento de la membrana durante la UF mostrados en la Ecs. 8 y 9 se obtienen integrando la Ec. 7 para cada valor de n [33]. Cuando n se fija en 0 se obtiene la Ec. 8 que se corresponde con el modelo linealizado de ensuciamiento por formación de capa de torta, y cuando n se fija en 2 se obtiene la Ec. 9 que se corresponde con el modelo linealizado de ensuciamiento por bloqueo de poros:

$$\ln\left(\frac{J}{J - J^*}\right) - \frac{J^*}{J} = \left[\frac{J^*}{J_0} - \ln\left(\frac{J_0 - J^*}{J_0}\right)\right] + k_{ct} \cdot J^{*2} \cdot t \quad (8)$$

$$\ln(J - J^*) = \ln(J_0 - J^*) - k_p \cdot t \quad (9)$$

donde J_0 es la densidad de flujo de permeado del agua destilada y k_{ct} , k_p son los índices de ensuciamiento para formación de capa de torta ($m^{-2} s$) y de bloqueo de poro (s^{-1}), respectivamente.

Las Ecs. 8 y 9 se han utilizado para ajustar los datos experimentales de J y establecer el mecanismo limitante de ensuciamiento durante la UF del hidrolizado de agua subcrítica. La comparación del coeficiente de determinación (R^2) ha permitido determinar el mecanismo predominante de ensuciamiento [23,25].

Finalmente, el factor de retención (FR) y la transmisión (T) al final de la UF se calculó utilizando las siguientes expresiones:

$$FR (\%) = \frac{C_R \cdot V_R}{C_F \cdot V_F} \cdot 100 \quad (10)$$

$$T (\%) = \frac{C_P \cdot V_P}{C_F \cdot V_F} \cdot 100 \quad (11)$$

donde C_F , C_P y C_R son las concentraciones de los distintos compuestos en la alimentación, en el permeado y en el retenido, respectivamente.

3.5.- MÉTODOS ANALÍTICOS

Se llevó a cabo la caracterización química y física los tres hidrolizados de agua subcríticas y de los diferentes permeados y retenidos de los experimentos de ultrafiltración.

3.5.1. Determinación de POS y otros componentes estructurales

La identificación y cuantificación de azúcares, ácidos orgánicos y productos de degradación en las muestras se realizó siguiendo el protocolo NREL/TP-510-42623 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se utilizó un HPLC equipado con una columna Biorad Aminex HPX-87 H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad) acoplada a la columna de guarda Micro-Guards Cation H+ (BioRad), con un detector de longitud de onda variable (VWD) y un detector de índice de refracción (RID), utilizando ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvil (0,6 mL/min). La columna y los detectores se mantuvieron a 40 °C y el tiempo total de funcionamiento fue de 67 min por inyección. Los patrones para el análisis HPLC fueron: glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, 5-hidroximetilfurfural y furfural, y otros compuestos como ácido galacturónico, ácido acético y ácido fórmico. Se determinaron los monosacáridos libres, el ácido galacturónico libre y otros compuestos presentes en las muestras, tras centrifugación (4500 rpm, 15 min, 4 °C) y filtración a través de un filtro de jeringa

de 0,22 μm de tamaño de poro (Scharlab, España). Los azúcares totales y el ácido galacturónico total se determinaron tras la hidrólisis ácida de la muestra de acuerdo con el procedimiento analítico NREL/TP-510-42623 [34]. La cantidad de POS se calculó por diferencia entre el contenido total de ácido galacturónico y azúcares tras la hidrólisis ácida y el contenido de ácido galacturónico y monosacáridos libres presentes en el hidrolizado de piel de cebolla. El análisis del sólido de los hidrolizados se realizó mediante el procedimiento analítico NREL/TP-510-42618 [35].

3.5.2. Distribución del peso molecular de la fracción POS

Los pesos moleculares promedio en peso (M_w) y la polidispersidad del POS recuperado en el hidrolizado se determinaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alta presión acoplada a un detector de índice de refracción (HPSEC-RID). Brevemente, el sistema HPLC 1260 (Agilent Technologies, CA, EE. UU.) constaba de una precolumna PL Aquagel conectada en serie con columnas PL Aquagel-OH 30, PL Aquagel-OH 40 de Agilent Technologies (300 mm \times 7,5 mm, tamaño de partícula 8 μm) acoplado a un detector de índice de refracción (RID). La caracterización de las muestras de pectina obtenidas del proceso de diafiltración se realizó a 35 $^\circ\text{C}$, 20 μL de muestra, previamente filtrada a través de filtros de jeringa de 0,22 μL , se eluyeron en modo isocrático utilizando acetato de amonio 0,01 M a un caudal de 0,7 mL/min como fase móvil. Para la calibración se utilizó un conjunto de estándares de pululano en el rango de 0,32 a 200 kDa (PSS - Polymer Standards Service GmbH, Alemania). Los datos se analizaron con el software Agilent OpenLab Data Analysis 2.5.

3.5.3. Identificación individual de compuestos fenólicos

Cada muestra se caracterizó mediante cromatografía líquida de alta resolución utilizando un detector de matriz de diodos (HPLC-DAD, Agilent 1100, CA, EE. UU.) con una columna de bifenilo Kinetex[®] (250 \times 4,6 mm, tamaño de partícula 5 μm , tamaño de poro 100 Å) suministrada por Phenomenex (CA, EE. UU.). La fase móvil consistió en (A) acetato de amonio 5 mM con ácido acético (1 %, v/v) en agua y (B) acetato de amonio 5 mM con ácido acético (1 %, v/v) en acetonitrilo. El perfil de gradiente fue el siguiente: De 0 a 7 min, 2 % de solvente B (isocrático); de 7 a 20 min, de 2 % a 8 % de disolvente B; de 20 a 35 min, de 8 % a 10 % de solvente B y de 35 a 55 min, de 10 % a 18 % de solvente B; de 55 a 65 min, aumento de 18 % a 38 % de solvente B; de 65 a 75 min aumentar hasta 65 % de solvente B; de 75 a 80 min aumento al 80 % del disolvente B. El tiempo posterior fue de 10 min. El caudal se fijó en 0,8 mL/min y la temperatura de la columna fue de 25 $^\circ\text{C}$. Las muestras se filtraron (tamaño de poro de 0,45 μm) antes de la inyección. Se utilizaron simultáneamente tres longitudes de onda para la caracterización de la muestra: 280 nm, 330 nm y 370 nm. Se empleó el software OpenLab CDS para recopilar y analizar los datos cromatográficos entregados por el detector de matriz de diodos y la identificación de los diferentes compuestos fenólicos se realizó comparando los tiempos de retención y el espectro UV con los de los estándares. Los compuestos fenólicos totales se calcularon como la suma de los fenoles individuales y los flavonoides individuales detectados a 280 nm.

3.5.4. Otros métodos analíticos

Los sólidos totales (ST) se midieron secando las muestras (alimentación, permeado y retenido) a 105 $^\circ\text{C}$ para eliminar el agua, hasta peso constante. ST se estimó como la relación entre el peso residual de la muestra seca después de eliminar el agua por evaporación y el peso de la muestra húmeda.

La densidad de las muestras se midió con un densímetro DMA 5000 (Anton Paar).

El pH de las muestras se midió mediante un pH-metro (Crison GLP 22).

La diferencia de color entre muestras se midió por espectrometría UV-visible a una longitud de onda de $420 \pm 0,2$ nm usando un espectrofotómetro Hitachi U-2000 UV/Vis.

El potencial zeta (ξ) se midió con un Zetasizer Nano ZS (Marvel) se realizaron 3 réplicas de 5 medidas para cada muestra a 20 °C. El valor del potencial zeta se calculó con la ecuación de Henry y la aproximación de Smoluchowski [36].

3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento de extracción y de ultrafiltración se realizó al menos dos veces y todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como valor medio \pm la desviación estándar para poder evaluar el grado de dispersión de todos los experimentos que se han realizado bajo las mismas condiciones de operación. Para validar los resultados se aplicó el método de LSD de Fisher con un valor $p \leq 0,05$ para confirmar las diferencias significativas (Statgraphics Centurion 19, Statistical graph Co., Rockville, MD, EE. UU).

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

En el proceso de extracción se analizaros las extracciones a tres temperaturas para el estudio de optimización del rendimiento de los POS. Para poder comparar los resultados se tiene en cuenta el factor de severidad ya que todas las extracciones no tienen el mismo tiempo de residencia. Por tanto, mediante el factor de severidad podemos relacionar el tiempo y la temperatura de cada extracción. Es una forma novedosa de comparar los resultados ya que no se ha encontrado bibliografía que haga la discusión de la extracción de POS en función de R_o .

En la Tabla 1 se muestra el factor de severidad calculado de acuerdo con la Ec. 3 para cada una de las tres combinaciones de T y t usadas para obtener los hidrolizados de piel de cebolla. Obtenemos experimentalmente, que para 115 °C y $\log R_o$ es $2,879 \pm 0,005$, para 125 °C $\log R_o$ es $3,156 \pm 0,007$ y para 135 °C $\log R_o$ es $3,29 \pm 0,01$. Tal y como se muestra en la Tabla 1, la mayor contribución al factor de severidad se debe a la extracción isotérmica, seguido de la etapa de enfriamiento.

Tabla 1. Factor de severidad calculado para cada una de las tres extracciones realizadas con agua subcrítica.

FACTOR DE SEVERIDAD	H 135 °C	H 125 °C	H 115 °C
$R_{o\text{Isotérmico}}$	1718 \pm 56	1315 \pm 22	697 \pm 6
$R_{o\text{Calentamiento}}$	601 \pm 10	17,9 \pm 0,4	10 \pm 2
$R_{o\text{Enfriamiento}}$	158 \pm 13	98 \pm 10	50 \pm 4
$\log R_o$	3,29 \pm 0,01	3,156 \pm 0,007	2,879 \pm 0,005

En la Figura 3 (a) se presenta la composición de los hidrolizados de piel cebolla obtenidos en cada una de las condiciones de operación frente al factor de severidad ($\log R_o$). Observando los resultados obtenidos para la fracción de POS en los distintos hidrolizados se puede indicar que el hidrolizado a 125 °C contiene la mayor concentración de POS; por tanto, es la relación temperatura-tiempo con la que se ha obtenido el mejor rendimiento de extracción (aproximadamente 48 % de la pectina estructural que contenía el subproducto de piel de cebolla).

En cuanto a los compuestos residuales de la hidrólisis (FH y AcH), en la Figura 3 (a) se observa que su concentración aumenta al aumentar el factor de severidad. Este resultado es debido a que la reacción de hidrólisis se ha producido durante mayor tiempo. Los productos de degradación de los azúcares (F y HMF) también siguen una tendencia creciente a medida que aumenta el factor de severidad. Finalmente, analizando el ácido galacturónico monomérico y los monosacáridos libres en la Figura 3 (b) se puede observar que su concentración aumenta al aumentar el factor de severidad, esto es debido al aumento del grado de hidrólisis de la pectina estructural y de los POS presentes en el hidrolizado. Con estos resultados, se puede indicar que al aumentar el factor de severidad de 2,88 a 3,29 en el tratamiento con agua subcrítica se produce un aumento de la cantidad de compuestos

residuales o impurezas en los hidrolizados. En este sentido, Pińkowska *et al* [37] realizó extracciones con agua subcrítica de pectinas de pulpa de remolacha azucarera obteniendo también un aumento del contenido en impurezas (ácidos fórmico, láctico, levulínico y oxálico, HMF y furfural) al aumentar la temperatura y el tiempo de extracción.

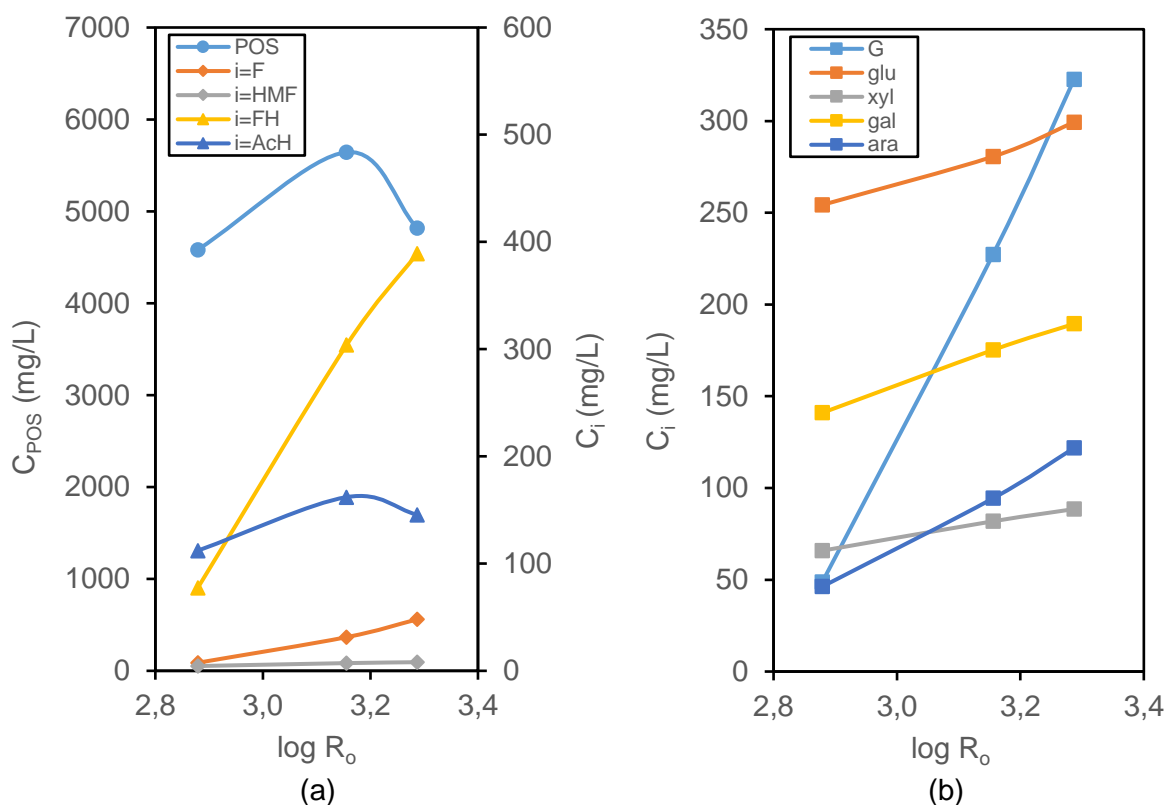


Figura 3. Resultados de la extracción con agua subcrítica utilizando distinto factor de severidad ($\log R_o$). Efecto del factor de severidad (a) en la concentración de pectooligosacáridos (POS), ácido acético (AcH), ácido fórmico (FH), hidroximetilfurfural (HMF) y furfural (F) y en la concentración (b) de ácido galacturónico libre (G), glucosa (glu), xilosa (xil), galactosa (gal) y arabinosa (ara).

En la Tabla 2 se presenta la composición de cada hidrolizado. En el hidrolizado obtenido a 125 °C-150 min se ha obtenido un 15 % más de fracción POS que en el de 135 °C-90 min y un 19 % respecto al de 115 °C-180 min. Se concluye que la temperatura óptima de extracción es 125 °C ya que se obtiene el mejor rendimiento de POS. Además, se han analizado los compuestos fenólicos obteniendo entre 355 ± 3 y 178 ± 13 mg/L de los cuales entre un 20 % y un 50 % son compuestos de flavonoides. Es importante recordar que el subproducto de piel de cebolla utilizado en este trabajo como materia prima de POS, es el residuo sólido que se recupera después de un proceso extracción de compuestos fenólicos. Aunque este subproducto haya sido sometido a una extracción previa de compuesto fenólicos, se obtiene que sigue presentando en su composición ciertos compuestos fenólicos residuales, que están fuertemente ligados a los componentes estructurales de la piel de la cebolla y sólo se liberan cuando se produce la hidrólisis de estos compuestos estructurales.

Finalmente, se realizó el estudio de los pesos moleculares de los hidrolizados obtenidos por extracción con agua subcrítica. En la Figura 4 se puede observar los cromatogramas obtenidos en los diferentes hidrolizados. Podemos indicar, que a mayor temperatura de extracción se obtienen pesos moleculares de POS más bajos. Esto es debido, a que a mayor temperatura la hidrólisis de los POS es mayor, obteniendo diferentes familias de POS [38]. En el hidrolizado a 115 °C la fracción más abundante tiene un peso molecular medio en peso (M_w) de 126 kg/mol con una polidispersidad de 1,41; para 125 °C un valor de 78 kg/mol con una polidispersidad de 1,25 y finalmente para la de 135 °C se obtiene 70 kg/mol con una

polidispersidad de 1,14. Se concluye que el factor de la temperatura de extracción afecta significativamente al peso molecular de los POS ya que la estructura sufre mayor fraccionamiento produciéndose diferentes familias de POS.

Tabla 2. Composición de los diferentes hidrolizados obtenidos en la extracción con agua subcrítica. Los hidrolizados obtenidos con una extracción a 115 °C-180 min (H 115 °C), a 125 °C-150 min (H 125 °C) y a 135 °C-90 min (H 135 °C).

	H 135 °C	H 125 °C	H 115 °C
Sólidos totales (ST, g/L)	10,6±0,1	11±1	9,0±0,8
Pecto-oligosacáridos (POS, mg/L)	4818±80	5642±84	4582±77
Ácido galacturónico (GAO, mg/L)	3699±54	4575±41	3603±48
Galactosa (mg/L)	432±4	398±18	345±15
Glucosa (mg/L)	254±12	252±6	251±9
Xilosa (mg/L)	56±4	51±10	47±4
Ramnosa (mg/L)	377±6	365±7	345±3
Arabinosa (mg/L)	n.d.	n.d.	36±1
Ácido galacturónico libre (G, mg/L)	332±12	227±19	49±3
Monosacáridos libres (ML, mg/L)	699±21	538±15	507±6
Galactosa libre (gal, mg/L)	189±4	175±2	141±2
Glucosa libre (glu, mg/L)	299±8	281±7	254±2
Xilosa libre (xyl, mg/L)	89±2	82±1	66±1
Ramnosa libre (rh, mg/L)	n.d.	n.d.	n.d.
Arabinosa libre (ara, mg/L)	122±7	94±5	46±1
Ácido fórmico (FH, mg/L)	389±17	304±22	77±4
Ácido acético (AcH, mg/L)	146±7	162±3	112±1
Hidroximetilfurfural (HMF, mg/L)	8±1	7,2±0,6	4,5±0,1
Furfural (F, mg/L)	48±5	31±4	7,6±0,5
Compuestos fenólicos (CF, mg /L)	355±3	279±3	178±13
Lignina	359±18	500±30	737±37
Cenizas	-	275±6	-
Potencial zeta (ξ , mV)	-12,3±0,8	-12,8±0,6	-12,6±0,4
Conductividad (mS/cm)	1,39±0,06	1,29±0,03	1,08±0,03
pH	3,57±0,04	3,44±0,06	3,47±0,05

Se concluye que a medida que se incrementa la intensidad de la extracción (mayor factor de severidad) se incrementa el peso de las fracciones de menor peso molecular, y además en la Tabla 2 se ve que se incrementa la concentración de los monosacáridos libre y productos de degradación. El aumento de la temperatura favorece que se disuelvan los POS, pero a su vez provoca que se degraden con mayor rapidez, produciendo mayor cantidad de impurezas que se deben separar de los POS. Los resultados obtenidos por Klinchongkon *et al.* [39] en la extracción de pectina con agua subcrítica a partir de la fruta de la pasión indican que el aumento de la temperatura de extracción provoca un descenso del peso molecular y la polidispersidad. Además, indica que se produce hidrólisis de la pectina y los pesos moleculares que obtuvieron se encuentran entre 18 y 259 kDa utilizando unas condiciones de temperatura entre 120 y 140 °C.

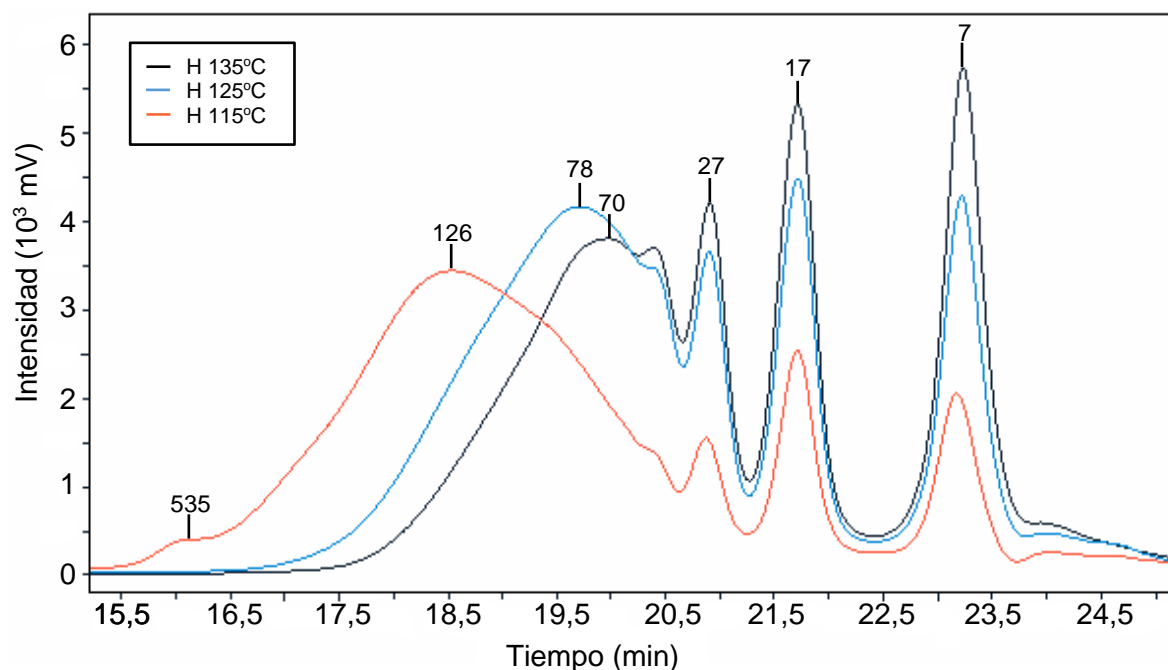


Figura 4. Cromatograma de peso molecular de la fracción de pecto-oligosacáridos (POS) de los hidrolizados de subproductos de piel de cebolla obtenidos mediante extracción con agua subcrítica. Las etiquetas situadas en los picos del cromatograma están expresadas en unidades de kg/mol.

Con lo expuesto, se puede considerar que los hidrolizados obtenidos a partir de residuos de piel de cebolla, con distinta temperatura y tiempo de extracción, son mezclas multicomponente complejas con alto contenido en POS y sin grandes diferencias en composición; sin embargo, la fracción de oligosacáridos recuperada ha resultado ser muy distintas en cuanto a su distribución de peso molecular. Este hecho hace que se seleccionen los 3 hidrolizados como alimentación para realizar el estudio comparativo del fraccionamiento por UF de los oligosacáridos y las impurezas.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL PROCESO DE ULTRAFILTRACIÓN

En esta sección, se presentan los resultados obtenidos en el estudio de separación por UF de los diferentes compuestos que forman los hidrolizados y los POS. En estos experimentos se analiza el rendimiento de la operación en función de la densidad de flujo de permeado, el ensuciamiento de la membrana y el grado de separación/purificación.

En el apartado 5.1 se recogen los resultados obtenidos al ultrafiltrar con una membrana de 50 kDa los 3 hidrolizados: el hidrolizado de la extracción a 115 °C-180 min (H 115 °C), el hidrolizado de la extracción a 125 °C-150 min (H 125 °C) y el hidrolizado de la extracción a 135 °C-90 min (H 135 °C). Estos experimentos han permitido analizar el efecto de la

composición del hidrolizado en el rendimiento global del proceso, incluyendo una discusión comparativa de la retención de la membrana en función de hidrólisis alcanzada en la etapa de extracción y peso molecular de la fracción POS presente en cada tipo de hidrolizado.

Posteriormente, en el apartado 5.2, se discuten los resultados obtenidos en los experimentos de UF con membranas de 50 y 5 kDa para el hidrolizado H 125 °C (óptimo de extracción) y para el hidrolizado H 125 °C centrifugado. El objetivo principal de esta parte del estudio ha sido evaluar el efecto del tamaño de poro de la membrana en la retención y purificación de la fracción POS para el hidrolizado seleccionado como óptimo en la etapa de extracción.

5.1.- ULTRAFILTRACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS CON UNA MEMBRANA DE 50 kDa

Los resultados de los experimentos de UF para los hidrolizados H 135 °C, H 125 °C y H 115 °C con una membrana de 50 kDa a 25 °C, con una PTM de 1 bar y un flujo de alimentación a la membrana de 17,5 L/h que se presentan en las Figuras 5 y 6 y en las Tablas 3 y 4.

5.1.1. Densidad de flujo de permeado y ensuciamiento

En la Figura 5 (a) se muestran los resultados del perfil de la densidad de flujo de permeado (J , Ec. 4) en función del factor de dilución (FD , Ec. 5) para la UF de los distintos hidrolizados utilizados como alimentación.

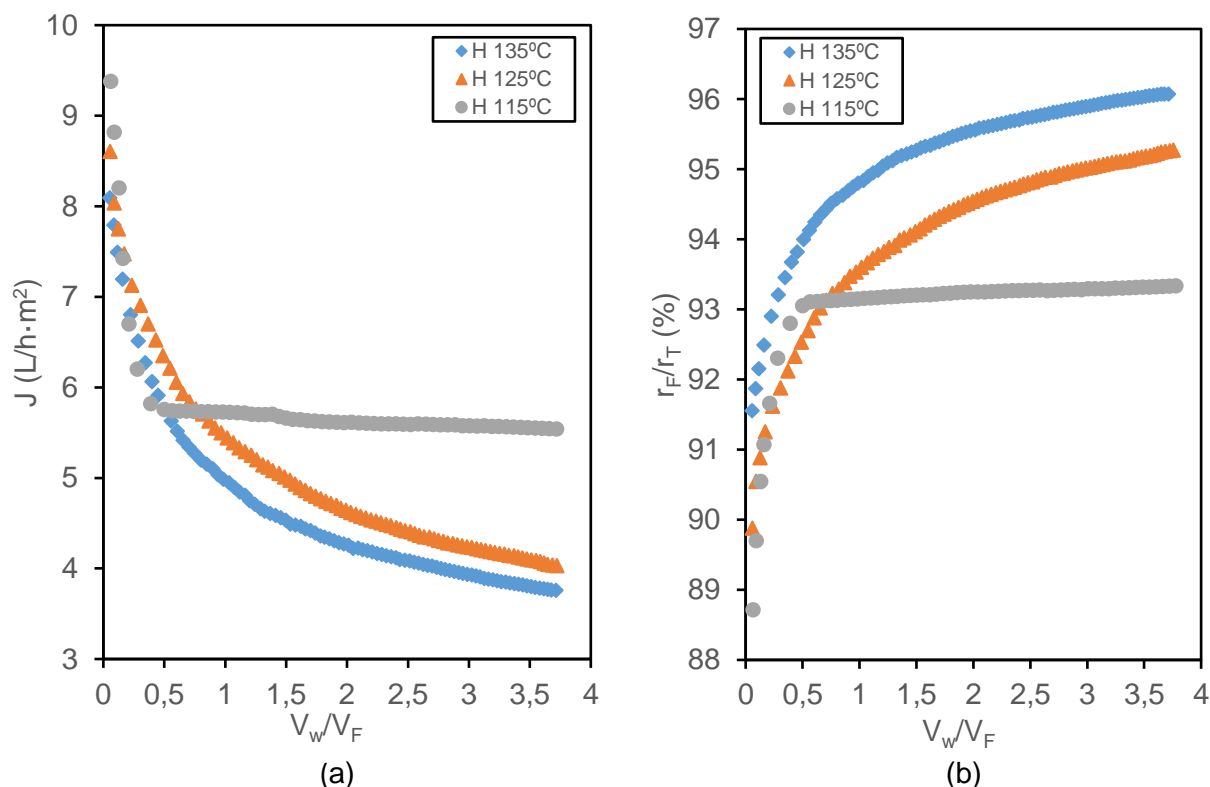


Figura 5. Resultados de la UF de los hidrolizados utilizados en este trabajo. Variación (a) de la densidad de flujo de permeado, J , y (b) de la contribución de la resistencia de ensuciamiento a la resistencia total a la filtración en función del factor de dilución, V_w/V_F . Condiciones de la UF: membrana de 50 kDa, 25 °C, PTM= 1 bar, 17,5 L/min de flujo de alimentación.

Analizando los resultados de la Figura 5 (a), se observa que el perfil de J ha sido muy distinto según el hidrolizado ultrafiltrado. El valor de J desciende rápidamente al comienzo y después permanece prácticamente constante para el hidrolizado H 115 °C, mientras que, para el resto de hidrolizados J desciende rápidamente al principio y no deja de descender durante toda la UF. Este resultado de descenso de J y las diferencias en el perfil de J al ultrafiltrar los distintos hidrolizados se pueden justificar analizando el ensuciamiento de la membrana. En este

sentido, primeramente, se realiza el estudio de las resistencias a la filtración (r_T , r_m y r_F , Ec. 6). Como se observa en la Tabla 3, la resistencia total a la filtración (r_T) aumentó considerablemente durante la UF para los tres hidrolizados, y fue mucho mayor al de la UF del H 135 °C que en la UF del H 115 °C. En todos los casos, se observa que la resistencia que ofrece la membrana (r_m) es mucho menor que la resistencia debida al ensuciamiento (r_F), siendo por tanto r_F la resistencia que contribuye en mayor medida al valor final de r_T y al descenso de J durante la UF para estos tres hidrolizados estudiados.

En la Figura 5 (b) se puede observar que la contribución de r_F ha sido muy elevada (89-96 %), que justifica el elevado potencial de ensuciamiento de estos hidrolizados. Este elevado ensuciamiento de la membrana puede deberse al efecto combinado de la presencia de materia coloidal y de la fracción oligosacárida, ambos encontrados como compuestos con elevada capacidad de ensuciamiento en los procesos de UF [23,40]. Además, dependiendo de los hidrolizados la contribución de r_F ha resultado muy diferente, alcanzando un valor próximo al 93 % en la UF para el H 115 °C, pero superiores al 95 % para H 125 °C y H 135 °C, lo que indica que las diferencias en composición de los hidrolizados afectan al grado de ensuciamiento de la membrana y al perfil de la densidad de flujo de permeado.

Por otra parte, el mecanismo predominante de ensuciamiento de la membrana se evaluó utilizando los modelos de Hermia (Ecs. 8 y 9). En la Tabla 3 se observa que para los tres hidrolizados, el valor de R^2 es superior para el ajuste con el modelo de formación de torta, indicando que la formación de una capa de torta sobre la superficie de la membrana es el mecanismo de ensuciamiento que más contribuye en el aumento de r_F durante la UF y por tanto con mayor efecto en la disminución de J .

Tabla 3. Resultados de los modelos de ensuciamiento para los experimentos de la Figura 5. Parámetros: r_T , r_m y r_F son, respectivamente, la resistencia total a la filtración, la de la membrana y la debida al ensuciamiento, k_{cl} es el índice de ensuciamiento por formación de torta, k_p es el índice de ensuciamiento por bloqueo de poros, y R^2 es el coeficiente de determinación.

PARÁMETROS	H 135 °C	H 125 °C	H 115 °C
r_T (m^{-1} , Ec. 6)	$5,2 \cdot 10^{13}$ - $1,1 \cdot 10^{14}$	$4,8 \cdot 10^{13}$ - $1,0 \cdot 10^{14}$	$4,4 \cdot 10^{13}$ - $7,5 \cdot 10^{13}$
r_m (m^{-1} , Ec. 6)	$4,90 \cdot 10^{12}$	$4,90 \cdot 10^{12}$	$4,90 \cdot 10^{12}$
r_F (m^{-1} , Ec. 6)	$4,7 \cdot 10^{13}$ - $1,1 \cdot 10^{14}$	$4,4 \cdot 10^{13}$ - $9,9 \cdot 10^{13}$	$3,9 \cdot 10^{13}$ - $7,0 \cdot 10^{13}$
k_{cl} (10^7 , $m^2 \cdot s$, Ec. 8)	6,79	5,85	7,2
R^2 (Ec.8)	0,994	0,994	0,927
k_p (s^{-1} , Ec .9)	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$7,42 \cdot 10^7$
R^2 (Ec. 9)	0,979	0,987	0,897

5.1.2. Perfil de transporte de las impurezas a través de la membrana

Con el fin de evaluar las diferencias entre compuestos y entre tipos de hidrolizados, los resultados cinéticos del transporte a través de la membrana se han expresado como la relación entre la concentración en el permeado de cada compuesto (C_P) a lo largo de la UF con respecto a su concentración inicial en la alimentación (C_F). En la Figura 6 se representan el perfil de C_P/C_F en función del factor de dilución (FD) obtenidos durante la UF de los distintos hidrolizados utilizados como alimentación.

Las Figuras 6 (a) y 6 (b) muestran que la velocidad de transporte a través de la membrana para todos los compuestos de peso molecular menor tales como monosacáridos libres (ML), ácido galacturónico libre (G), ácidos carboxílicos totales (ACT), HMF y furfural, ha resultado

significativamente igual e independiente de la composición química del hidrolizado utilizado como alimentación. En todos los casos, se elimina en el permeado más del 90-95% de estas impurezas con factores de dilución entre 2 y 2,5, estableciéndose como el factor de dilución mínimo para la purificación de este tipo de hidrolizados.

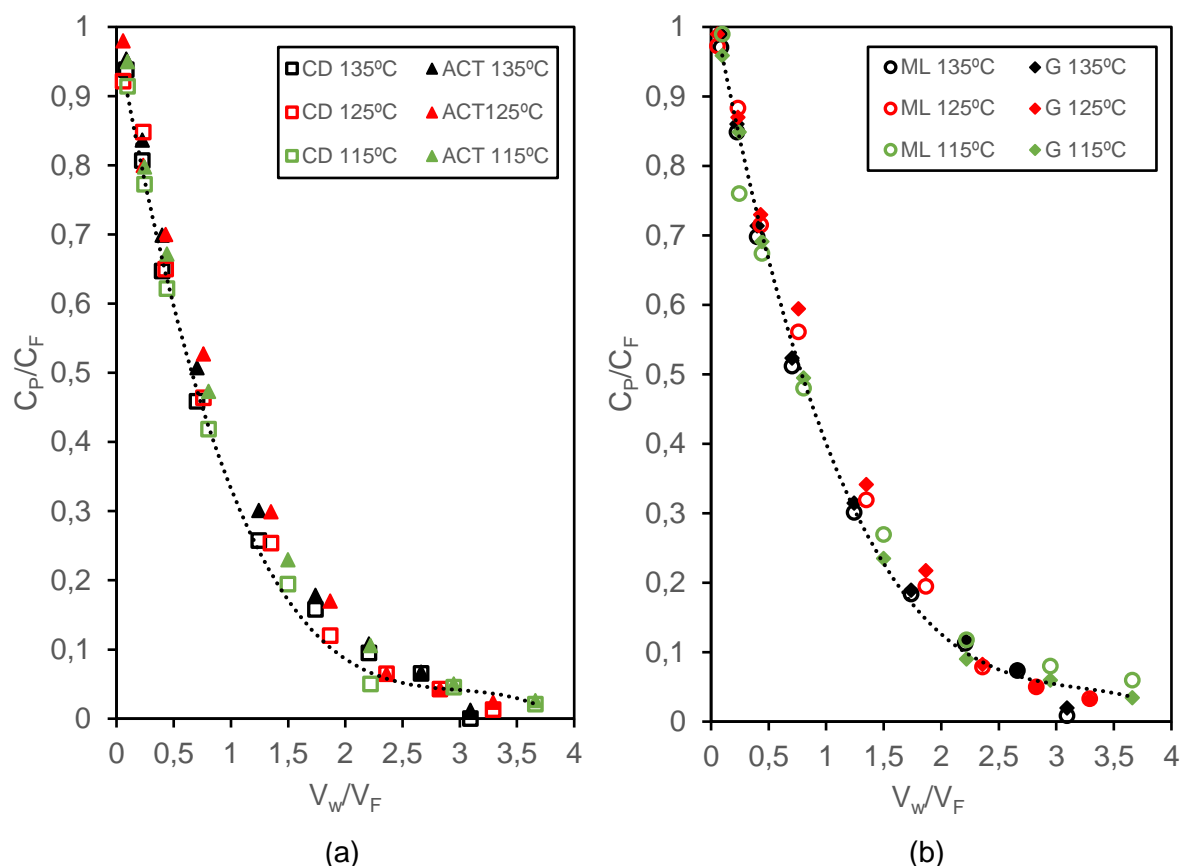


Figura 6. Resultados de la variación la concentración en el permeado (C_P/C_F) en función del factor de dilución para los distintos compuestos del hidrolizado. (a) Compuestos de degradación totales (CD, suma de HMF y furfural) y ácidos carboxílicos totales (ACT, suma de ácido acético y ácido fórmico). (b) Monosacáridos libres (ML) y ácido galacturónico libre (G). Condiciones de la UF: membrana de 50 kDa, 25 °C, PTM= 1 bar, 17,5 L/min de flujo de alimentación.

En la Tabla 4 se recogen los resultados de la transmisión total (T, Ec.11) que se ha alcanzado para estos tres hidrolizados al final de la UF utilizando un factor de dilución de 3,5. Es importante indicar que la transmisión final de monosacáridos libres, ácido galacturónico monomérico, HMF, furfural, y ácidos carboxílicos con una membrana de 50 kDa ha sido elevada superior al 97 % y ha resultado casi igual para los tres hidrolizados estudiados. Además, la mayoría de estos compuestos de bajo peso molecular no han sido detectados en los análisis realizados a los retenidos finales obtenidos después de la UF.

Con estos resultados, se puede concluir que la UF en modo diafiltración a 25 °C con una membrana de 50 kDa, una PTM = 1 bar y con FD > 3 proporciona retenidos con escasa presencia de las impurezas de bajo peso molecular que típicamente conforman los hidrolizados de agua subcrítica obtenidos a partir de residuos de piel de cebolla. Sin embargo, la materia coloidal e impurezas como ligninas y la mayoría de los compuestos coloreados, no han sido eliminadas en el permeado y se mantienen como impurezas en el retenido final. Este resultado lleva a sugerir la necesidad de incluir una etapa anterior a la UF para su retirada previa y mejorar el grado de purificación de la fracción POS.

Tabla 4. Resultados de la transmisión total (T, Ec. 11) al final de la UF con un factor de dilución de 3,5 para los experimentos de la Figura 6.

COMPUESTOS	H 135 °C	H 125 °C	H 115 °C
Monosacáridos libres (mg/L)	97,3±0,3	97,0±0,2	98,9±0,6
Ácidos carboxílicos totales (mg/L)	100,0±0,1	100,0±0,1	100,0±0,2
HMF (mg/L)	97,4±0,4	97,6±0,3	98,2±0,4
Furfural (mg/L)	98,8±0,1	97,1±0,3	97,7±0,2
Ácido galacturónico libre (mg/L)	97,8±0,4	98,5±0,4	100,0±0,1

5.1.3. Evaluación de la composición POS del retenido final

En la Figura 7 (a) se presentan los resultados del factor de retención (Ec. 11) de los POS en el retenido final obtenido después de la UF de los distintos hidrolizados con un factor de dilución de 3,5. Se ha obtenido un resultado del $82 \pm 1 \%$ para el H 115 °C, pero ha resultado muy bajo del $58 \pm 1 \%$ y del $56 \pm 1 \%$ para los hidrolizados H 125 °C y H 135 °C, respectivamente. Este resultado indica que una membrana de 50 kDa tiene un diámetro de poro excesivamente grande para las características de la fracción POS presente en el hidrolizado H 125 °C establecido como óptimo en la etapa de extracción. Este resultado se confirma con el análisis de distribución de M_w mostrado en la Figura 7 (b). Se puede observar que una membrana de 50 kDa solo ha sido capaz de retener los POS de M_w mayor de 50 kg/mol, que en el caso del hidrolizado H 115 °C representa el 80-82 % de toda la fracción oligomérica. Sin embargo, para los hidrolizados H 125 °C y H 135 °C, el grado de hidrólisis de la fracción POS durante la etapa de extracción fue mucho más elevado (distribución de M_w de los POS = 86-7 kDa), y solo ha permanecido en el retenido la fracción POS con M_w mayor de 74-86 kg/mol que tan solo representa alrededor del 50 % de los POS iniciales.

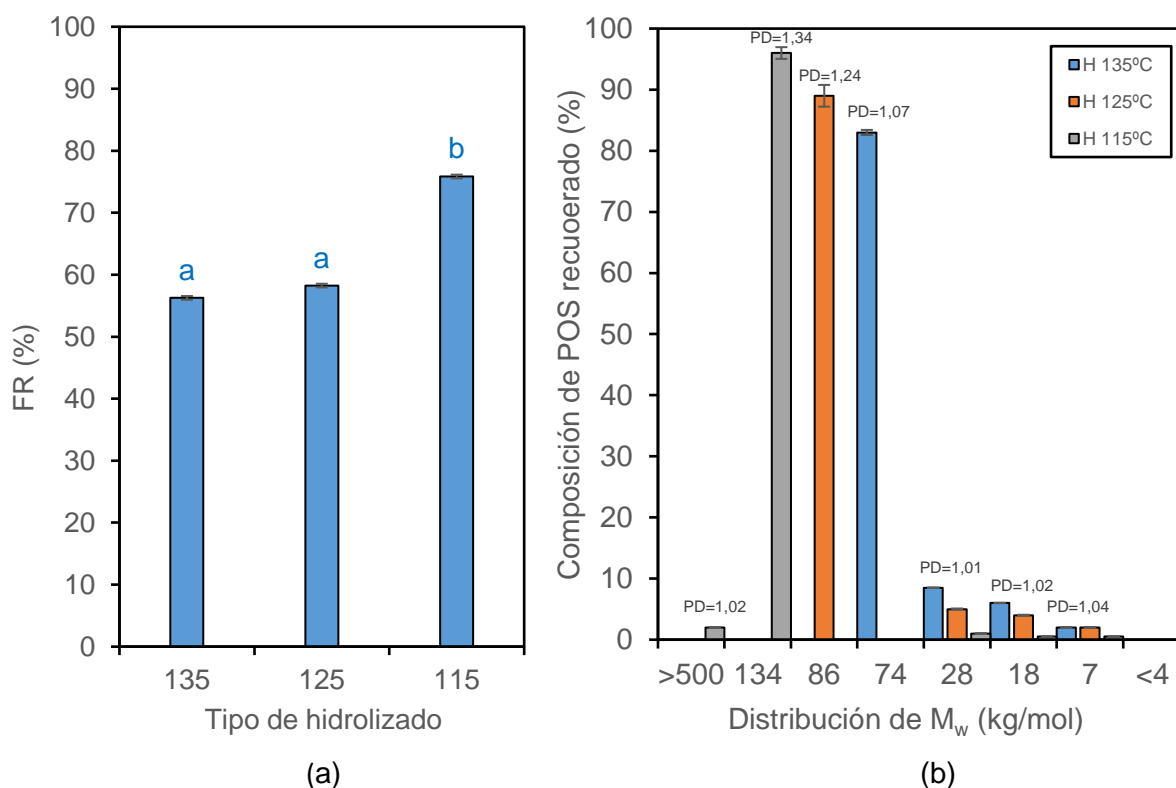


Figura 7. Resultados de la fracción POS en el retenido final de la UF de los diferentes hidrolizados. (a) Factor de retención (FR, Ec. 10). (b) Distribución de peso molecular. Los valores con distintas letras para el componente indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y PD el valor de polidispersidad.

Por otra parte, en la Figura 7 (b) se puede observar que, para todos los hidrolizados, no se han detectados compuestos de peso molecular inferior a 4 kg/mol. Considerando estos resultados, se requiere disminuir el diámetro de poro de la membrana a un valor inferior a 7 kDa y superior a 4 kDa para conseguir aumentar el rendimiento de retención de la fracción POS de hidrolizado H 125 °C establecido como óptimo en la etapa de extracción.

5.2.- ESTUDIO DE LA ULTRAFILTRACIÓN DEL HIDROLIZADO OBTENIDO EN LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN

En primer lugar, se presentan los resultados del estudio de pretratamiento del hidrolizado H 125 °C que se ha llevado a cabo para evaluar la posibilidad de eliminar la materia coloidal y ligninas utilizando un proceso de centrifugación. Los resultados experimentales se recogen en la Tabla 5.

Seguidamente, en los apartados 5.2.2 y 5.2.3 se recogen los resultados de los experimentos de UF para el hidrolizado H 125 °C y del H 125 °C centrifugado utilizando membranas de 50 y 5 kDa a 25 °C, con una PTM de 1 bar y un flujo de alimentación a la membrana de 17,5 L/h. Los resultados experimentales de esta parte del estudio se presentan en las Figuras 8 y 9 y en la Tabla 6.

5.2.1. Pretratamiento del hidrolizado antes de la ultrafiltración

En los hidrolizados se aprecia materia coloidal de color oscuro, esto es debido a las propiedades del agua subcrítica. Por tanto, esta materia coloidal es eliminada mediante una centrifugación y posteriormente se realiza el mismo estudio para la UF. En la Tabla 5 se observa la caracterización del hidrolizado al eliminar la materia coloidal. Hay que destacar que la concentración de los POS no varía, esto nos indica que la materia coloidal no contiene oligosacárido pectídicos. Además, se reduce el color del hidrolizado en un 60 %, la concentración de lignina en el hidrolizado ya no es detectada y la concentración de los residuos de degradación y ácidos carboxílicos también descienden. Mediante la centrifugación se ha conseguido purificar el hidrolizado sin que perdamos rendimiento de los POS. La eliminación de esta materia coloidal también ayuda a que el ensuciamiento de la membrana sea menor ya que la lignina se queda retenida en los poros de la membrana. Hay estudios en los que concluyen que la lignina produce un gran ensuciamiento en las membranas [41].

Tabla 5. Resultados analíticos de composición para el hidrolizado H 125 °C y para el hidrolizado H 125 °C después de una etapa de centrifugación.

COMPUESTOS	H 125°C	H 125°C Cent.
Sólidos totales (ST, g/L)	11±1	9,47±0,07
Pecto-oligosacáridos (POS, mg/L)	5254±84	5236±74
Monómeros libres (ML, mg/L)	859±33	820±31
Ácido fórmico (FH, mg/L))	389±17	239±15
Ácido acético (AcH, mg/L)	146±7	139±7
Hidroximetilfurfural (HMF, mg/L)	8±1	6±1
Furfural (F, mg/L)	48±5	24±3
Compuestos fenólicos (CF, mg /L)	279±3	279±3
Lignina (mg /L)	500±30	n.d.
Absorbancia a 420 nm	2,218±0,002	1,325±0,001

5.2.2. Perfil de transporte de las impurezas a través de una membrana de 50 kDa y de 5 kDa

Para evaluar las diferencias entre compuestos y el uso de membranas de diferente tamaño de poro para el H 125 °C y H 125 °C centrifugado, los resultados cinéticos del transporte a través de la membrana se han expresado como la relación entre la concentración en el permeado de cada compuesto (C_P) a lo largo de la UF con respecto a su concentración inicial en la alimentación (C_F). En la Figura 8 se representan el perfil de C_P/C_F en función del factor de dilución (FD) obtenidos durante la UF usando diferentes tamaños de poro de membrana.

Las Figuras 8 (a) y 8 (b) muestran que la velocidad de transporte a través de la membrana para todos los compuestos de peso molecular menor tales como monosacáridos libres (ML), ácido galacturónico libre (G), ácidos carboxílicos totales (ACT), HMF y furfural. Para los compuestos de degradación y los ácidos carboxílicos ha resultado significativamente igual e independiente de la composición química del hidrolizado con materia coloidal, además independiente del uso de membranas de 50 o 5 kDa. En el caso de los monosacáridos libres y el ácido galacturónico libre, la velocidad de transporte es mayor al eliminar la materia coloidal del hidrolizado. En el caso de la membrana de 50 kDa, se elimina en el permeado más del 90-95 % de estas impurezas al alcanzar factores de dilución entre 2 y 2,5, estableciéndose como el factor de dilución mínimo para la purificación. En cambio, para la membrana de 5 kDa se ha eliminado en el permeado casi un 90 % de las impurezas al alcanzar un factor de dilución de 2, por tanto, se necesitará un factor de dilución superior para alcanzar 97 % de pureza.

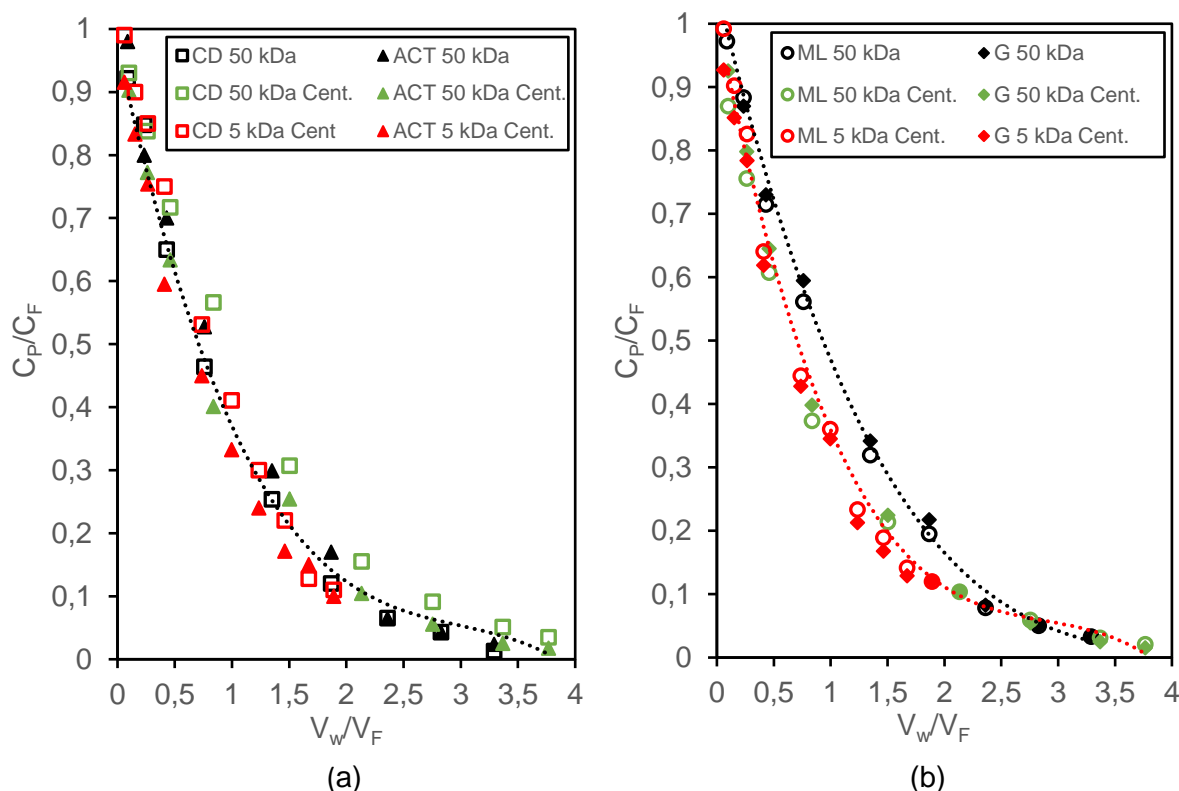


Figura 8. Resultados de la variación la concentración en el permeado (C_P/C_F) en función del factor de dilución para los distintos compuestos del hidrolizado en la UF. (a) Compuestos de degradación totales (CD, suma de HMF y furfural) y ácidos carboxílicos totales (ACT, suma de ácido acético y ácido fórmico). (b) Monosacáridos libres (ML) y ácido galacturónico libre (G). Condiciones de la UF: membranas de 50 y 5 kDa, 25 °C, PTM= 1 bar, 17,5 L/min de flujo de alimentación.

En la Tabla 6 se recogen los resultados de la transmisión total (T, Ec.11) que se ha alcanzado para H 125 °C centrifugado usando membranas de 50 y 5 kDa. La transmisión final de las impurezas con una membrana de 50 kDa ha sido elevada, superior al 97% usando un factor de dilución de 3,5. En el caso del uso de una membrana de 5 kDa no se alcanzan valores

superiores al 90 % usando un factor de dilución de 2. Con lo expuesto, se puede concluir que la UF en modo diafiltración a 25 °C con una membrana de 50 kDa, una PTM=1 bar y con FD > 3 no presenta cambios al eliminar la materia coloidal de la alimentación. En el caso del uso de membranas de 5 kDa hay que aumentar el factor de dilución para poder alcanzar un grado de purificación del 97 %.

Tabla 6. Resultados de la transmisión total (T , Ec. 11) al final de la UF para los experimentos de la Figura 7.

COMPUESTOS	FD=3,5		FD=2
	H 125°C (50 kDa)	H 125°C Cent. (50 kDa)	H 125°C Cent. (5 kDa)
Monosacáridos libres (mg/L)	97,0±0,2	97,8±0,3	98,5±0,3
Ácidos carboxílicos totales (mg/L)	100,0±0,1	99,5±0,3	93,9±0,3
HMF (mg/L)	97,6±0,3	98,6±0,3	90,6±0,3
Furfural (mg/L)	97,1±0,3	97,4±0,4	86,7±0,3
Ácido galacturónico libre (mg/L)	98,5±0,4	99,4±0,3	100,0±0,1

5.2.3. Evaluación de la composición POS del retenido final

En la Figura 9 (a) se presentan los resultados del factor de retención (Ec. 11) de los POS en el retenido final obtenido después de la UF con membranas de 50 y 5 kDa con un factor de dilución de 3,5 y 2 respectivamente.

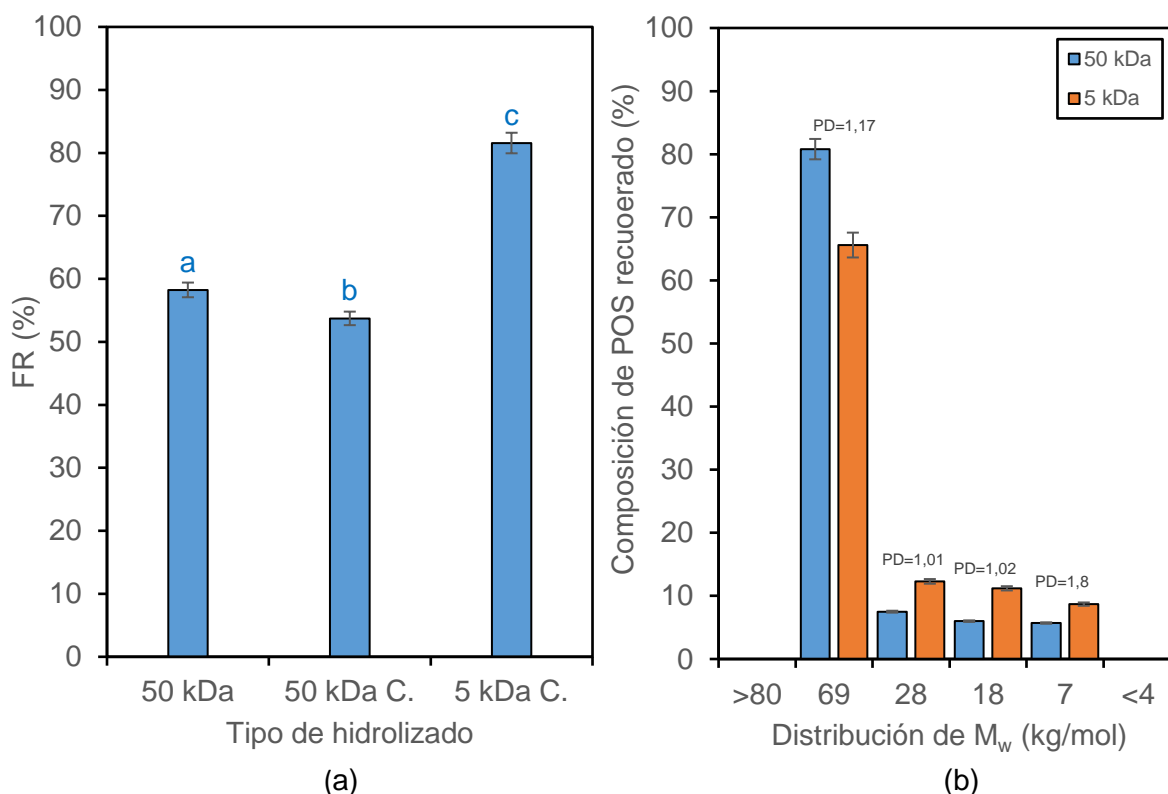


Figura 9. Resultados de la fracción POS en el retenido final de la UF con membranas de 5 y 50 kDa para H 125 °C y H 125 °C centrifugado (C). (a) Factor de retención (FR, Ec. 10). (b) Distribución de peso molecular. Los valores con distintas letras para el componente indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y PD el valor de polidispersidad.

Los resultados de la Figura 9 (a) muestran para el H 125 °C centrifugado, un factor de retención de los POS del $54 \pm 1\%$ para la UF con 50 kDa y del $85 \pm 1\%$ para la UF con 5 kDa. Este resultado indica que con una membrana de 50 kDa atraviesa la fracción de POS que tienen un tamaño molecular inferior a 50 kDa. En cambio, con la membrana de 5 kDa se consigue retener toda la fracción POS con tamaños moleculares superiores a 4 kDa. La diferencia entre el porcentaje retenido de la alimentación centrifugada y la no centrifugada es debido a los oligosacáridos coloidales que se han eliminado con la centrifugación, confirmado con el análisis de distribución de M_w mostrado en la Figura 9 (b).

Se puede concluir con estos resultados, que una UF en modo diafiltración a 25 °C requiere de una membrana de 5 kDa para conseguir aumentar el rendimiento de retención de la fracción POS hasta un valor superior al 80 % para el hidrolizado H 125 °C centrifugado establecido como óptimo en la etapa de extracción.

6.- CONCLUSIONES

Los resultados de extracción muestran que el subproducto de piel de cebolla se presenta como una materia prima renovable con gran potencial para la obtención de pecto-oligosacáridos.

El factor de severidad (2,9-3,3) afectó al rendimiento de extracción y modificó la composición de los extractos finales, resultado el óptimo de 3,2 que proporcionó un extracto final con una concentración de pecto-oligosacárido de 4,6 g/L y con un peso molecular medio de 78 kg/mol. Sin embargo, este extracto resultó ser una mezcla multicomponente compleja que requiere de un tratamiento de fraccionamiento para separar los oligosacáridos de las impurezas. Se ha demostrado que para evitar el ensuciamiento de la membrana durante la ultrafiltración del extracto es necesario incluir una etapa de pretratamiento por centrifugación, que ha permitido eliminar más del 60 % del color inicial y el 100 % de las ligninas, sin apenas tener repercusión en la concentración de pecto-oligosacáridos ($< 0,7\%$). La ultrafiltración en modo diafiltración del extracto con una membrana tubular de 5 kDa, a una temperatura de 25 °C, con una presión transmembrana de 1 bar y con un caudal de alimentación de 17,5 L/min ha proporcionado un retenido con más del 80% de los pecto-oligosacáridos iniciales que estaban presentes en el extracto, con escasa presencia de pecto-oligosacáridos de peso molecular menor de 4 kg/mol y de las impurezas estudiadas en este trabajo.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Melgosa, M.T. Sanz, S. Beltrán, Supercritical CO₂ processing of omega-3 polyunsaturated fatty acids – Towards a biorefinery for fish waste valorization. *J Supercrit Fluids*. (2021), 169, 105121.
- [2] M. Ramos-Andrés, B. Aguilera-Torre, J. García-Serna, Production of purified hemicellulose-pectin fractions of different molecular weight from discarded carrots by hydrothermal treatment followed by multistep ultrafiltration/diafiltration, *J Clean Prod*. (2021), 321,128923.
- [3] Ó. Benito-Román, B. Blanco, M.T. Sanz, S. Beltrán, Subcritical water extraction of phenolic compounds from onion skin wastes (*Allium cepa* cv. horcal): Effect of temperature and solvent properties, *Antioxidants*. (2020), 9, 1–20.
- [4] I.S. Choi, E.J. Cho, J.H. Moon, H.J. Bae, Onion skin waste as a valorization resource for the by-products quercetin and biosugar, *Food Chem*. (2015), 188, 537–542.
- [5] O. Benito-Román, P. Alonso-Riaño, E. Díaz De Cerio, M.T. Sanz, S. Beltrán, Semi-continuous hydrolysis of onion skin wastes with subcritical water: Pectin recovery and oligomers identification, *J Environ Chem Eng*. (2022), 10, 107439.

-
- [6] W.J. Li, Z.G. Fan, Y.Y. Wu, Z.G. Jiang, R.C. Shi, Eco-friendly extraction and physicochemical properties of pectin from jackfruit peel waste with subcritical water, *J Sci Food Agric.* (2019), 99, 5283–5292.
- [7] F. Dranca, M. Oroian, Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications, *Food Research International.* (2018), 113, 327–350.
- [8] N. Babbar, W. Dejonghe, M. Gatti, S. Sforza, K. Elst, Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits, *Crit Rev Biotechnol.* (2016), 36, 594–606.
- [9] A. R. Adetunji, A. Adekunle, V. Orsat, V. Raghavan, Advances in the Pectin Production Process Using Novel Extraction Techniques, *Food Hydrocoll.* (2017), 62, 239–250.
- [10] L. N. Gerschenson, The Production of Galacturonic Acid Enriched Fractions and Their Functionality, *Food Hydrocolloids.* (2017), 68, 23-30.
- [11] B. Gullón, B. Gómez, M. Martínez-Sabajanes, R. Yáñez, J.C. Parajó, J.L. Alonso, Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties, *Trends Food Sci Technol.* 30 (2013), 30, 153–161.
- [12] L.R. Adetunji, A. Adekunle, V. Orsat, V. Raghavan, Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review, *Food Hydrocoll.* (2017), 62, 239–250.
- [13] L.N. Gerschenson, The production of galacturonic acid enriched fractions and their functionality, *Food Hydrocoll.* (2017), 68, 23–30.
- [14] P. Alonso-Riaño, M.T. Sanz, O. Benito-Román, S. Beltrán, E. Trigueros, Subcritical water as hydrolytic medium to recover and fractionate the protein fraction and phenolic compounds from craft brewer's spent grain, *Food Chem.* (2021), 351, 129264.
- [15] E. Trigueros, P. Alonso-Riaño, C. Ramos, C.I.K. Diop, S. Beltrán, M.T. Sanz, Kinetic study of the semi-continuous extraction/hydrolysis of the protein and polysaccharide fraction of the industrial solid residue from red macroalgae by subcritical water, *J Environ Chem Eng.* (2021), 9, 106768.
- [16] J. Zhang, C. Wen, H. Zhang, Y. Duan, H. Ma, Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review, *Trends Food Sci Technol.* (2020), 95, 183–195.
- [17] J.M. Prado, D. Lachos-Perez, T. Forster-Carneiro, M.A. Rostagno, Sub- A nd supercritical water hydrolysis of agricultural and food industry residues for the production of fermentable sugars: A review, *Food and Bioproducts Processing.* (2016), 98, 95–123.
- [18] N. Muñoz-Almagro, M. Vendrell-Calatayud, P. Méndez-Albiñana, R. Moreno, M.P. Cano, M. Villamiel, Extraction optimization and structural characterization of pectin from persimmon fruit (*Diospyros kaki* Thunb. var. Rojo brillante), *Carbohydr Polym.* (2021), 272, 118411.
- [19] M. Moresi, I. Sebastiani, Pectin recovery from model solutions using a laboratory-scale ceramic tubular UF membrane module, *J Memb Sci.* (2008), 322, 349–359.
- [20] J. Kang, X. Hua, R. Yang, Y. Chen, H. Yang, Characterization of natural low-methoxyl pectin from sunflower head extracted by sodium citrate and purified by ultrafiltration, *Food Chem.* (2015), 180, 98–105.

-
- [21] B. Gómez, B. Gullón, R. Yáñez, J.C. Parajó, J.L. Alonso, Pectic oligosaccharides from lemon peel wastes: Production, purification, and chemical characterization, *J Agric Food Chem.* (2013), 61, 10043–10053.
- [22] L. Jin, F. Zuo, Y. Gao, S. Sui, D. Zhang, Purification of pectin by ultrafiltration in combination with sodium citrate, *J Food Eng.* (2022), 335, 111158.
- [23] E. Trigueros, M.T. Sanz, S. Beltrán, M.O. Ruiz, Filtration of subcritical water hydrolysates from red macroalgae byproducts with ultraporous ceramic membranes for oligosaccharide and peptide fractionation, *J Memb Sci.* (2022), 660, 120822.
- [24] S. Yammine, R. Rabagliato, X. Vitrac, M.M. Peuchot, R. Ghidossi, Selecting ultrafiltration membranes for fractionation of high added value compounds from grape pomace extracts, *Oeno One.* (2019), 53, 487–497.
- [25] T. Qi, X. Chen, W. Shi, T. Wang, M. Qiu, X. Da, J. Wen, Y. Fan, Fouling behavior of nanoporous ceramic membranes in the filtration of oligosaccharides at different temperatures, *Sep Purif Technol.* (2022), 278, 119589.
- [26] C. Vera, L.; González, E.; Díaz, O.; Bohorque, R.A.; Sánchez, R.D. Ultrafiltración, T. De Efluentes, S. Análisis, D.E. De, L.A. Membrana, Ultrafiltración tangencial de efluentes secundarios. Análisis del ensuciamiento de la membrana. *Avances en Ciencias e Ingeniería.* (2014), 5, 17–29.
- [27] A. Echavarria, J. Pagán, A. Ibarz, Effect of previous enzymatic recirculation treatment through a tubular ceramic membrane on ultrafiltration of model solution and apple juice, *J Food Eng.* (2011), 102, 334–339.
- [28] C. Saf, M. Villain-Gambier, M. Belaqziz, I. Ziegler-Devin, D. Trebouet, N. Ouazzani, Fouling control investigation by pH optimization during olive mill wastewater ultrafiltration, *Process Safety and Environmental Protection.* (2022), 164, 119–128.
- [29] T. Qi, X. Chen, W. Shi, T. Wang, M. Qiu, X. Da, J. Wen, Y. Fan, Fouling behavior of nanoporous ceramic membranes in the filtration of oligosaccharides at different temperatures, *Sep Purif Technol.* (2022), 278, 119589.
- [30] Benito-Román, B. Blanco, M.T. Sanz, S. Beltrán, Freeze-dried extract from onion (*Allium cepa* cv. Horcal) skin wastes: Extraction intensification and flavonoids identification, *Food and Bioproducts Processing.* (2021), 130, 92–105.
- [31] H.A. Ruiz, M. Galbe, G. Garrote, D.M. Ramirez-Gutierrez, E. Ximenes, S.N. Sun, D. Lachos-Perez, R.M. Rodríguez-Jasso, R.C. Sun, B. Yang, M.R. Ladisch, Severity factor kinetic model as a strategic parameter of hydrothermal processing (steam explosion and liquid hot water) for biomass fractionation under biorefinery concept, *Bioresour Technol.* (2021), 342, 125961.
- [32] R.W. Field, D. Wu, J.A. Howell, B.B. Gupta, Critical flux concept for microfiltration fouling. *J. Membrane Science.* (1995), 100, 259–272
- [33] T. Qi, X. Chen, W. Shi, T. Wang, M. Qiu, X. Da, J. Wen, Y. Fan, Fouling behavior of nanoporous ceramic membranes in the filtration of oligosaccharides at different temperatures, *Sep Purif Technol.* (2022), 278, 119589.
- [34] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples: Laboratory Analytical Procedure, *Natl. Renew. Energy Lab.* (2006), 1-11.
- [35] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure *Natl. Renew. Energy Lab.* (2008), 3-5.
-

- [36] M. Kaszuba, J. Corbett, F.M.N. Watson, A. Jones, High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques, in: *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, Royal Society, (2010), 368, 4439–4451.
- [37] H. Piñkowska, P. Wolak, M. Krzywonos, A. Złocińska, Comprehensive Study of Hydrothermal Extraction of Pectin From Sugar Beet Pulp, *Waste Biomass Valorization*. (2021), 12, 4587–4598.
- [38] E. Rincón, E. Espinosa, M.T. García-Domínguez, A.M. Balu, F. Vilaplana, L. Serrano, A. Jiménez-Quero, Bioactive pectic polysaccharides from bay tree pruning waste: Sequential subcritical water extraction and application in active food packaging, *Carbohydr Polym.* (2021), 272, 118477.
- [39] K. Klinchongkon, P. Khuwijitjaru, S. Adachi, Degradation kinetics of passion fruit pectin in subcritical water, *Biosci Biotechnol Biochem.* (2017), 81, 712–717.
- [40] T. Qi, X. Chen, W. Shi, T. Wang, M. Qiu, X. Da, J. Wen, Y. Fan, Fouling behavior of nanoporous ceramic membranes in the filtration of oligosaccharides at different temperatures, *Sep Purif Technol.* (2022), 278, 119589.
- [41] P. Singh, N.A. Manikandan, M. Purnima, K. Pakshirajan, G. Pugazhenthii, Recovery of lignin from water and methanol using low-cost kaolin based tubular ceramic membrane, *Journal of Water Process Engineering.* (2020), 38, 101615.