



Universidad de Jaén
Centro de Estudios de Postgrado

PROPUESTA DE BIORREFINERÍA BASADA EN LOS RESIDUOS DE LA VID

Alumno/a: Flores Rodríguez, Rubén

Tutor/a: Prof. D. Eulogio Castro Galiano
D. Juan Carlos López Linares

Dpto: Ingeniería Química, Ambiental y de los
Materiales

Diciembre, 2021

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Energías renovables	6
1.2. La biomasa: una fuente de energía	11
1.3. Biocarburantes.....	15
1.4. Bioetanol como combustible	20
1.4.1. Bioetanol de primera generación	23
1.4.1.1. Procesos de obtención	23
1.4.2. Bioetanol de segunda generación	24
1.4.2.1. Composición de la biomasa lignocelulósica.....	24
1.4.2.2. Procesos de obtención	28
1.4.2.3. Pretratamiento.....	29
1.4.2.4. Hidrólisis	31
1.4.2.5. Fermentación	33
1.4.2.6. Configuración de procesos.....	33
1.5. El viñedo como fuente de biomasa	33
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.1. Materia Prima.....	37
2.2 Extracción acuosa en Autoclave	38
2.3 Pretratamiento con ácido sulfúrico diluido en condiciones suaves de proceso.....	39
2.4 Pretratamiento en reactor agitado de alta presión a condiciones severas de proceso.....	43
2.5 Ensayos de hidrólisis enzimática.....	46
2.6 Determinaciones analíticas	49
2.6.1 Caracterización de la materia prima y de los materiales pretratados	49
2.6.2 Caracterización de los prehidrolizados	51
2.6.2.1 Azúcares	51
2.6.2.2 Ácido acético y productos de degradación de azúcares	53
2.7 Definición de variables	55
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
3.1. Composición de la materia prima (sarmientos de vid) y extracción con agua.....	58
3.2. Pretratamiento 1ª etapa: autoclave bajo condiciones suaves de proceso.....	59
3.2.1. Composición de los sólidos pretratados.....	60
3.2.2. Composición de los prehidrolizados	61
3.2.3. Hidrólisis enzimática	64
3.3. Pretratamiento 2ª etapa: reactor alta presión bajo condiciones severas de proceso.....	67
3.3.1. Composición de los sólidos pretratados.....	67
3.3.2. Composición de los prehidrolizados	68
3.3.3. Hidrólisis enzimática.....	69
4. CONCLUSIONES.....	72
5. BIBLIOGRAFÍA.....	74
6. ANEXO	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de los consumos de energía primaria por fuente de energía durante el año 1998 en España (IDAE, 1999).....	7
Figura 2. Cuota de energía procedente de fuentes renovables por países europeos relacionando valor de 2019 y valor objetivo (APPA, 2021).	9
Figura 3. Gráfica de consumo de energía primaria por tipo de energía en Europa en el año 2018 (APPA, 2021).	10
Figura 5. Producción mundial de biocarburantes 2010-2019 en Mtep (Mega toneladas equivalentes de petróleo) comparada con el consumo en el Escenario de Desarrollo Sostenible (IEA, 2021).	14
Figura 6. Mandatos de consumo de biocombustible en España medidos con porcentajes en términos de energía (extraída directamente del informe del USDA FAS) (Biorrefiería.blogspot, 2017).	18
Figura 7. Capacidad instalada de biocombustibles líquidos (IRENA, 2021).	19
Figura 8. Capacidad instalada de biocombustibles líquidos (Comisión Nacional de los Mercados y la Competencia (CNMC) y APPA, 2021).	20
Figura 9. Obtención de bioetanol a partir de biomasa amilácea (trigo) (Bulkan G y col., 2021).	23
Figura 10. Componentes de la biomasa lignocelulósica.	25
Figura 11. Monosacáridos componentes de las hemicelulosas.	27
Figura 12. Monómeros de alcohol precursores de la lignina.	28
Figura 13. Estructura esquemática de la lignocelulosa (Baruah, 2018).	29
Figura 14. Representación del proceso químico que tiene lugar en el pretratamiento en materiales lignocelulósicos (DOE, 2006).	30
Figura 15. Proceso esquematizado del proceso de hidrólisis enzimática.....	32
Figura 16. Materia prima: Sarmiento de vid (elaboración propia).	37
Figura 17. Molino de cuchillas tipo Retsch (SM 100, Haan, Alemania) (elaboración propia).....	38
Figura 18. Reactor Autoclave Trade Raypa (elaboración propia).	39
Figura 19. Baño de hielo mezclado con agua (elaboración propia).	41
Figura 20. Sistema de filtración a vacío (elaboración propia).	42
Figura 21. Prehidrolizado o fracción líquida (FL) (elaboración propia).	42
Figura 22. Secado de residuos sólidos (RSI) en estufa (marca Memmert) (elaboración propia).	43
Figura 23. Residuos sólidos conservados para los siguientes procesos (elaboración propia).	43

Figura 24. Reactor a presión Parr (elaboración propia).....	44
Figura 25. Perfil de temperatura obtenido para la etapa 2 (170°C, 5 min, 0,5% H ₂ SO ₄) (elaboración propia, Excel).	46
Figura 26. Perfil de temperatura obtenido para la etapa 2 (190°C, 5 min, 0,5% H ₂ SO ₄) (elaboración propia, Excel).	46
Figura 27. Matrices Erlenmeyer con tampón cítrico-citrato (elaboración propia).....	47
Figura 28. Agitador orbital (elaboración propia).....	48
Figura 29. Centrífuga Sigma 1-14 (elaboración propia).	49
Figura 30. Procedimiento de análisis llevado a cabo para la caracterización de la materia prima.	50
Figura 31. Procedimiento de análisis llevado a cabo para la caracterización de los materiales pretratados.....	51
Figura 32. Cromatógrafo de líquido HPLC, mod. 2695, Waters (Mildford, MA, EEUU) (elaboración propia).....	52
Figura 33. Acondicionamiento de muestras para HPLC, con resina de intercambio iónico (elaboración propia).....	52
Figura 34. Filtración con membranas de Nylon de 0,45 µm para acondicionamiento de muestras para HPLC (elaboración propia).	53
Figura 35. Cromatógrafo de líquido HPLC, modelo 1200 Infinity Series (Alemania) (elaboración propia).	54
Figura 36. Concentración de glucosa (g/L) obtenidos en el proceso de hidrólisis enzimática (72 h) usando los diferentes sólidos pretratados obtenidos en la 1ª etapa de pretratamiento.....	65
Figura 37. Digestibilidad enzimática (gramos de glucosa obtenidos por hidrólisis enzimática/100 g glucosa en sólido pretratado) obtenidos en el proceso de hidrólisis enzimática (72 h) usando los diferentes sólidos pretratados obtenidos en la 1ª etapa de pretratamiento.....	66
Figura 38. Recuperación global de azúcares (g azúcares obtenidos en los hidrolizados enzimáticos y prehidrolizados/100 g azúcares totales en sarmiento de vid original) obtenidos en los diferentes experimentos de 1ª etapa de pretratamiento llevados a cabo.....	67
Figura 39. Concentración de glucosa producida a lo largo del proceso de hidrólisis enzimática con sólidos pretratados obtenidos en la primera y segunda etapa de pretratamiento.	69
Figura 40. Digestibilidad enzimática (g glucosa obtenidos por hidrólisis enzimática/100 g glucosa en sólido pretratado) y Recuperación global de azúcares (g azúcares obtenidos en los hidrolizados enzimáticos y prehidrolizados obtenidos en la primera y segunda etapa de pretratamiento/100 g azúcares totales en sarmiento de vid original) obtenidos en los diferentes experimentos de 2ª etapa de pretratamiento llevados a cabo.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Consumo de energía primaria en toneladas equivalentes de petróleo (ktep) respecto a porcentajes del total durante el periodo de 1998 en España (IDAE, 1999).	7
Tabla 2. Clasificación de principales grupos de biomasa (Gebremariam y col., 2018).	12
Tabla 3. Comparación de producción de bioetanol en países de Europa en millones de litros en 2019 y 2020 (Eurobserv'ER, 2021).	21
Tabla 4. Consumo de bioetanol utilizado para transporte en Europa en 2020 en ktep (toneladas equivalentes de petróleo) (Eurobserv'ER, 2021).....	22
Tabla 5. Análisis provincial de superficie total por producción (hectáreas) y según clases de cultivos de viñedo en España (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino (MARM), 2017).	35
Tabla 6. Plan de experimentación para el estudio de las variables de pretratamiento del sarmiento de vid (elaboración propia).....	40
Tabla 7. Composición del sarmiento de vid original y con previa extracción acuosa en autoclave (g/100 g biomasa).	58
Tabla 8. Recuperación de sólidos (%) y composición de los sólidos pretratados (g/100 g sólido pretratado) obtenidos en los diferentes ensayos de pretratamiento llevados a cabo. Recuperación (%) de glucosa (RG _s) y azúcares hemicelulósicos (RAH _s) en los sólidos pretratados.	60
Tabla 9. Composición de azúcares (g/L) y azúcares oligoméricos (%) en los prehidrolizados o fracciones líquidas obtenidos en los diferentes ensayos de pretratamiento llevados a cabo. Recuperación (%) de glucosa (RG _L) y azúcares hemicelulósicos (RAH _L) en los prehidrolizados o fracciones líquidas.	62
Tabla 10. Composición de compuestos inhibidores (g/L) en los prehidrolizados o fracciones líquidas obtenidas en los diferentes ensayos de pretratamiento llevados a cabo.	63

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Energías renovables

Sobre el medio ambiente recae un gran impacto negativo derivado de la generación, uso y transporte de energía procedente de combustibles fósiles, el cual es un circuito necesario para las actividades diarias que realiza el ser humano.

El Protocolo de Kioto es una de las estrategias para hacer frente a la necesidad de disminuir la cantidad de gases de efecto invernadero (GEI) que se emiten al medio ambiente como consecuencia de la generación, uso y transporte de la energía por medio de los combustibles fósiles altamente contaminantes. Tras la aprobación de este protocolo en 1997 y su entrada en vigor en 2005, se fijaron objetivos para la disminución de estos GEI durante el periodo 2008-2012 en un 5% respecto a niveles de 1990.

Gracias a la Enmienda de Doha en 2012, se propuso para el periodo de 2013-2020, continuar con ese descenso de emisiones hasta alcanzar un 18% respecto a dichos niveles de 1990 (Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, CMNUCC, 2021).

Tras décadas de investigación y desarrollo, las energías renovables se han convertido en la mejor forma de generación energética. En un par de décadas, se ha pasado de la apuesta a la realidad, de la promesa a la generación de riqueza y empleo, como indica la APPA (Asociación de Empresas de Energías Renovables) (APPA, 2021).

El Acuerdo de París de 2015 también es un tratado internacional importante, siendo jurídicamente vinculante en el marco de las CMNUCC, donde se pretende frenar el calentamiento global por debajo de 1,5°C en relación con los niveles preindustriales para poder hacer frente a los desafíos climáticos (CMNUCC, 2021).

Desde la Comisión Europea, siempre se ha mostrado la posición de apoyo a la difusión de las tecnologías hipocarbónicas como la solar, la eólica, la captura y almacenamiento de carbono y las tecnologías de almacenamiento de energía, al igual que coordina labores para alcanzar los objetivos nacionales que se ajustan a la Directiva sobre la energía renovable (Comisión Europea, 2021).

De esta manera, en España, se fueron tomando medidas legislativas, comenzando en 1999. El Consejo de Ministros, en su reunión del día 30 de diciembre de 1999, tomó el Acuerdo por el que se aprueba el Plan de Fomento de las Energías Renovables para el periodo 2000-2010 (IDAE, 2021).

En el año 1998, la aportación de las energías renovables al balance energético nacional, en términos de energía primaria, fue del 6,3% (Figura 1). La distribución de la energía primaria en 1998, estaba marcada con un 54,1% por el petróleo con un aporte tan solo del 6,3% de energías renovables, separando el aporte de hidráulica aparte del 2,3% (Tabla 1).

Distribución de los consumos de energía primaria, en 1998*

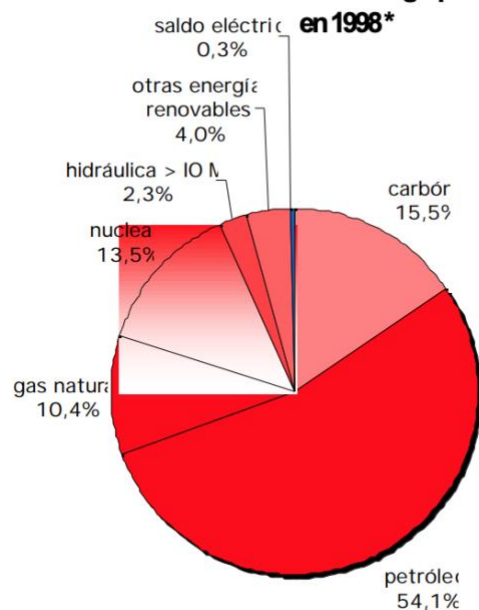


Figura 1. Distribución de los consumos de energía primaria por fuente de energía durante el año 1998 en España (IDAE, 1999).

Tabla 1. Consumo de energía primaria en toneladas equivalentes de petróleo (ktep) respecto a porcentajes del total durante el periodo de 1998 en España (IDAE, 1999).

FUENTE	ktep	%
Petróleo	61.670	54,1
Carbón	17.659	15,5
Nuclear	15.376	13,5
Gas	11.816	10,4
Energías Renov.	7.173	6,3
Saldo Eléctrico	292	0,2
TOTAL	113.986	100,0

Posteriormente se presentó El Plan de Energías Renovables en España (PER) 2005-2010, que constituyó la revisión del Plan de Fomento de las Energías Renovables en España 2000-2010. Con esta revisión, se trató de mantener el compromiso de cubrir con fuentes renovables al menos el 12% del consumo total de energía en 2010, objetivo que informa las políticas de fomento de las energías renovables en la Unión Europea desde la aprobación del Libro Blanco en 1997 (Comisión Europea, 1997), y que en España fue establecido por la Ley del Sector Eléctrico y dio lugar al mencionado Plan de Fomento.

Así mismo, este PER 2005-2010 incorpora otros dos objetivos para el año 2010, uno es alcanzar el 29,4% de generación eléctrica con energías renovables y el otro es

alcanzar un 5,75% de uso de biocarburantes en transporte adoptados con posterioridad al anterior plan (Plan de Energías Renovables (PER), 2005-2010) (IDAE, 2015).

Tras los diferentes métodos de control y seguimiento para considerar si se estaban siguiendo los objetivos indicados anteriormente, se acabó el año 2010 con un porcentaje de 11,1% de representación de energías renovables como consumo eléctrico, sin llegar al 12% marcado.

Una vez finalizado el PER, se empezó a elaborar el siguiente documento denominado PANER (Plan de Acción Nacional de Energías Renovables de España, 2011-2020), el cual iba a incluir otras tecnologías renovables emergentes, con el objetivo de conseguir la descarbonización del sistema eléctrico.

En este plan se propuso aumentar los porcentajes de consumo de energía bruta por la población, hasta alcanzar un 20% de dependencia de energías renovables, incluyendo un porcentaje del 10% al transporte.

Como indica APPA, la sequía a finales de esta década ha conllevado a una menor generación de energía hidráulica durante este periodo. El porcentaje de consumo de energía en torno a 18% en 2019, a pocos años del límite temporal fijado por la Comisión Europea, sumado a la crisis de la pandemia de la COVID-19, parecía indicar que no se iba a alcanzar dicho objetivo del 20%. A pesar de todo, gracias a la recuperación del sector hidráulico, de la continua inversión y fomento en energías renovables, junto con el periodo de pandemia, se consiguió superar el objetivo marcado por el PANER, alcanzando un 21,4% de energías renovables usadas para consumo.

Respecto al año 2020, fecha marcada como límite del cumplimiento de los objetivos, en el 2019, España estaba a punto de superar el objetivo 2020, al contrario que países escandinavos (Finlandia, Noruega y Suecia) o Islandia, que ya habían cumplido dichos objetivos que se convertían en grandes ejemplos para Europa con los mayores niveles de cuotas de energía procedente de renovables (Figura 2).

Cuota de energía procedente de fuentes renovables

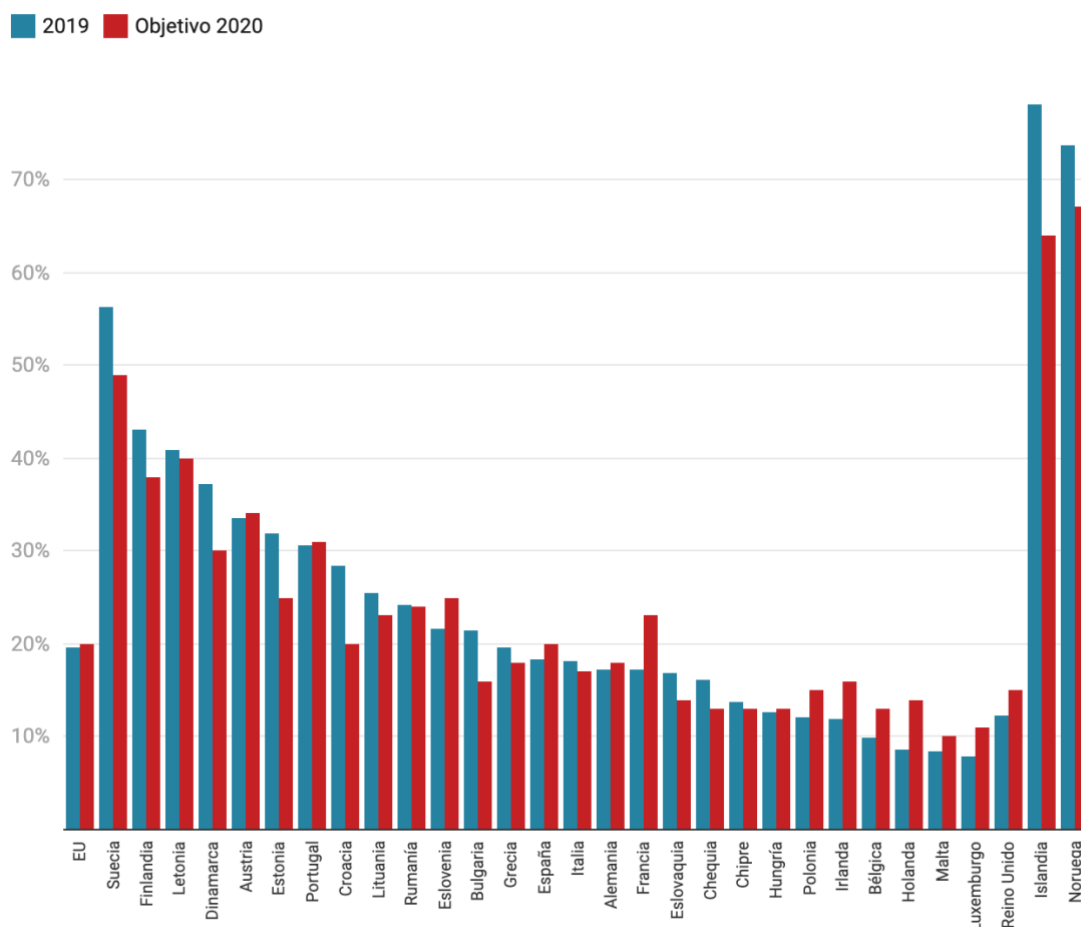


Gráfico: NIUSDIARIO • Fuente: Eurostat • Creado con [Datawrapper](#)

Figura 2. Cuota de energía procedente de fuentes renovables por países europeos relacionando valor de 2019 y valor objetivo (APPA, 2021).

En las líneas de los objetivos del Programa Marco de Investigación Horizonte 2020, ya extinguido, se investigó y se propuso entre muchas estrategias, las energías renovables como método para una mejora de calidad de nuestro planeta, marcado por el ya extinguido PANER.

Esto se acabará logrando junto con el nuevo Horizonte Europa (Programa Marco de Investigación e Innovación, 2021-2027), que sigue apostando por una transición energética a estas energías, marcado esta vez por la nueva Directiva de la Comisión Europea 2018/2001 (11 Diciembre de 2018) relativa al fomento del uso de energías procedente de fuentes renovables.

Finalmente, comenzó el proceso de elaboración del nuevo plan para hacer frente al objetivo europeo marcado para cada uno de los países miembro, entregado por España y aceptado el 20 de Enero de 2020. Este nuevo documento para el periodo de 2021-2030 se llamará PNIEC (Plan Nacional Integrado de Energía y Clima 2021-2030) y entrará en vigor durante 2021, contando con la entrega de informes para seguimiento de objetivos y una actualización del Plan por si es necesaria a los 5 años.

Sus objetivos principales son: la disminución en un 40% de la emisión de gases de efecto invernadero con respecto al año 1990, un 32% de renovables en el consumo total de la energía, mejorar la eficiencia energética hasta alcanzar un 32,5%, y conseguir un aumento hasta al menos 15% de interconexión eléctrica entre los países miembros.

En el proceso de descarbonización del modelo energético mundial se tienen datos de APPA, donde en 2018 se aprecia un aumento significativo del consumo de energía primaria de energías renovables en los últimos años. Aun así, se sigue situando como cuarta fuente de energía, con un 10,8%, y, aunque el petróleo siga disminuyendo poco a poco su uso, aún se mantiene con un 33,6% como primera fuente de energía. También se observa que el porcentaje de dependencia de combustibles fósiles es bastante elevado, con un 84,7%.

A nivel europeo, se cuenta con un 15,5% de participación de renovables (Figura 3), un valor algo más elevado que a nivel mundial (10,8%), mientras que el porcentaje de representación de combustibles fósiles con un 74,2%, resulta también menor, comparado con el 84,7% a nivel mundial (Figura 4).

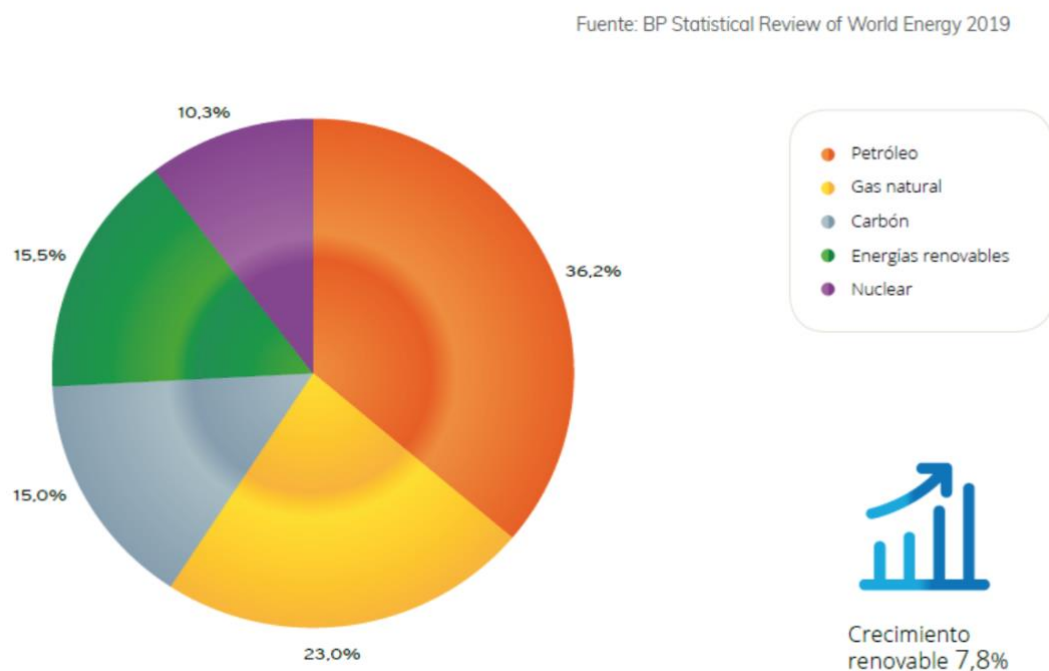


Figura 3. Gráfica de consumo de energía primaria por tipo de energía en Europa en el año 2018 (APPA, 2021).

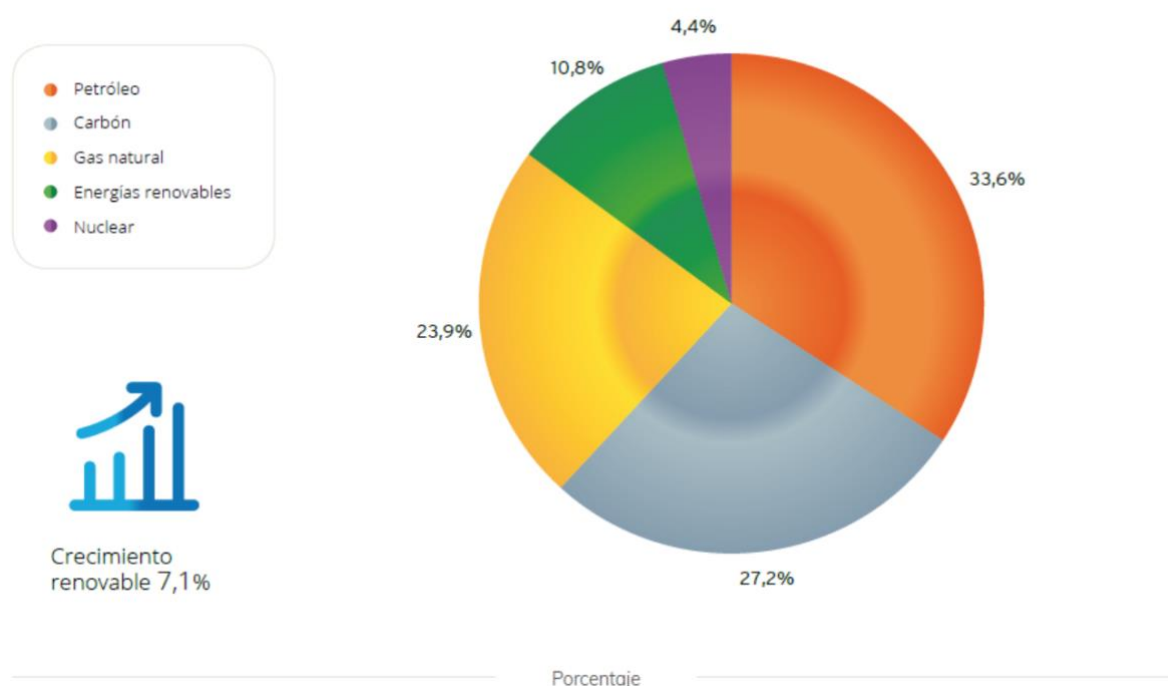


Figura 4. Gráfica de consumo de energía mundial de energía primaria por tipo de energía en el año 2018 (APPA, 2021).

Invertir en estas energías, a largo plazo, supondrá muchos más beneficios que perjuicios a corto plazo.

La posición negativa a la gestión de este tipo de energías, se basa en los costes, pero hay que tener en cuenta que los combustibles tradicionales tienen externalidades que, si se tuviesen en cuenta junto con la cantidad de incentivos que se pueden obtener, se podría demostrar la rentabilidad y viabilidad de este tipo de tecnologías.

1.2. La biomasa: una fuente de energía

La definición elegida por la Directiva (UE) del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de Diciembre de 2018, relativa al fomento del uso energía procedente de fuentes renovables, para la “biomasa” es, “aquella fracción biodegradable de los productos, residuos y desechos de origen biológico procedentes de actividades agrarias incluidas las sustancias de origen vegetal y de origen animal, de la silvicultura y de las industrias conexas, incluidas la pesca y la acuicultura, así como la fracción biodegradable de los residuos, incluidos los residuos industriales y municipales de origen biológico (APPA, 2021).

Por otra parte, teniendo en cuenta la definición del Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE) que sigue teniendo en cuenta la Directiva 2009/28/CE relativa al fomento del uso de la energía procedente de fuentes renovables, define la biomasa como “la fracción biodegradable de los productos, desechos y residuos de origen biológico procedentes de actividades agrarias (incluidas las sustancias de origen

vegetal y de origen animal), de la silvicultura y de las industrias conexas, incluidas la pesca y la acuicultura, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y municipales”.

Dentro de las características definidas para este tipo de materia prima, se pueden clasificar según su proporción mayoritaria de componentes como (Tabla 2):

Tabla 2. Clasificación de principales grupos de biomasa (Gebremariam y col., 2018).

Tipos de biomasa	Ejemplos
Lignocelulósica	Maderas: Olivo, Eucalipto, Pino, Chopo, Álamo Residuos agrícolas y forestales: Pajas de cereales, Bagazo de caña de azúcar, Residuos chopo, álamo. Residuos de la industria forestal y de las prácticas silvícolas. Residuos procedentes de la industria del papel, de algunas alimentarias y de transformación de la madera Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos y de las aguas residuales Lodos de depuradoras
Azucarada	Mostos y jugos de diversas frutas. Remolacha y caña de azúcar. Sorgo azucarado. Mandioca. Algarroba.
Amilácea	Cereales: maíz, cebada, trigo, malta, avena, centeno, arroz. Tubérculos: patata, boniato, pataca.
Oleaginosa	Semillas de jatrofa, soja, colza, girasol, etc.

El uso de la bioenergía se divide en dos categorías principales: "tradicional" y "moderna". El tradicional se refiere a la combustión de biomasa en formas como la

madera, los residuos animales y el carbón vegetal tradicional. Las tecnologías bioenergéticas llamadas modernas incluyen los biocombustibles líquidos producidos partiendo del bagazo y otras plantas; las biorrefinerías; el biogás producido a través de la digestión anaeróbica de residuos; los sistemas de calefacción con pellets de madera; y otras tecnologías (IRENA, 2021).

Se parte de que la biomasa es una alternativa de generación de energía muy óptima debido a que se pueden conseguir una amplia variedad de productos siendo adaptable a todos los campos de utilización de los combustibles fósiles usados los últimos años.

La biomasa como recurso energético va a suponer una mejora general para el medioambiente ya que, a diferencia de los combustibles fósiles cuentan con un ciclo neutro de CO₂; no contribuyen al aumento del efecto invernadero; disminuyen las emisiones de azufre, de partículas, y de contaminantes como CO, HC y NO_x; reducen el mantenimiento y los peligros derivados del escape de gases tóxicos y combustibles de las casas; reducen los riesgos de incendios forestales y de plagas de insectos; aprovechan de residuos agrícolas, evitando su quema en el terreno, hacen posible la utilización de tierras de barbecho con cultivos energéticos; crean independencia de las fluctuaciones de los precios de los combustibles provenientes del exterior (no son combustibles importados); mejoran la situación socioeconómica de las áreas rurales, etc. Gracias a estas ventajas, se demuestra que la biomasa es un campo de empleo para el futuro, a parte de poder conseguir un equilibrio territorial, sobre todo en zonas rurales.

Las pocas emisiones por la que se caracterizan estas las biorrefinerías con la biomasa como recurso energético, hace ver el futuro de esta que presenta esta industria. La importante acción de integración de almacenajes de materia prima, y sus conversiones sostenibles, son revisadas en diversos estudios (Cherubini, 2010).

La bioenergía abarca cerca de tres cuartas partes del uso de energía renovable en todo el mundo, y alrededor de la mitad, se basa en el uso tradicional de la biomasa. En 2015, la bioenergía representó cerca del 10% del consumo total de energía final y el 1,9% de la generación mundial de electricidad.

La biomasa tiene un importante potencial para impulsar el suministro de energía en países poblados con una demanda creciente, como Brasil, India y China. Puede quemarse directamente para la calefacción o la generación de energía, o puede convertirse en sustitutos del petróleo o el gas. Los biocombustibles líquidos son un cómodo sustituto renovable de la gasolina, se utilizan sobre todo en el sector del transporte.

Brasil es el líder en biocombustibles líquidos y tiene la mayor flota de vehículos de combustible flexible, que pueden funcionar con bioetanol, un alcohol que se obtiene principalmente de la fermentación de los carbohidratos de los cultivos de azúcar o almidón, como el maíz, la caña de azúcar o el sorgo dulce (IRENA, 2021).

En 2018 hubo un aumento de 10.000 millones de litros y se alcanzó la cifra récord de 154.000 millones de litros de biocombustibles, duplicándose el crecimiento de 2017. Éste aumento del 7% respecto al año anterior, fue el más elevado en los últimos 5 años, con una previsión de aumento hasta del 25% para el 2025, debido a las mejores perspectivas de mercado en Estados Unidos, Brasil y sobre todo, China.

Todo esto muestra una visión optimista para la bioenergía en el ámbito de generación de electricidad. Ésta generación aumentó más del 5% en 2019, estando por debajo del 6% anual necesario hasta el año 2030 para el cumplimiento de los ODS (Objetivos de Desarrollo Sostenible) (Naciones Unidas, 2021).

Como muestra la Figura 5, se está aún lejos de alcanzar el objetivo para el año 2025, aproximadamente unos 300 Mtep (Mega toneladas equivalentes de petróleo) en cuanto a producción mundial de biocarburantes. Gracias a la tendencia a aumentar esta producción en los últimos 20 años, se puede afrontar este objetivo con optimismo.

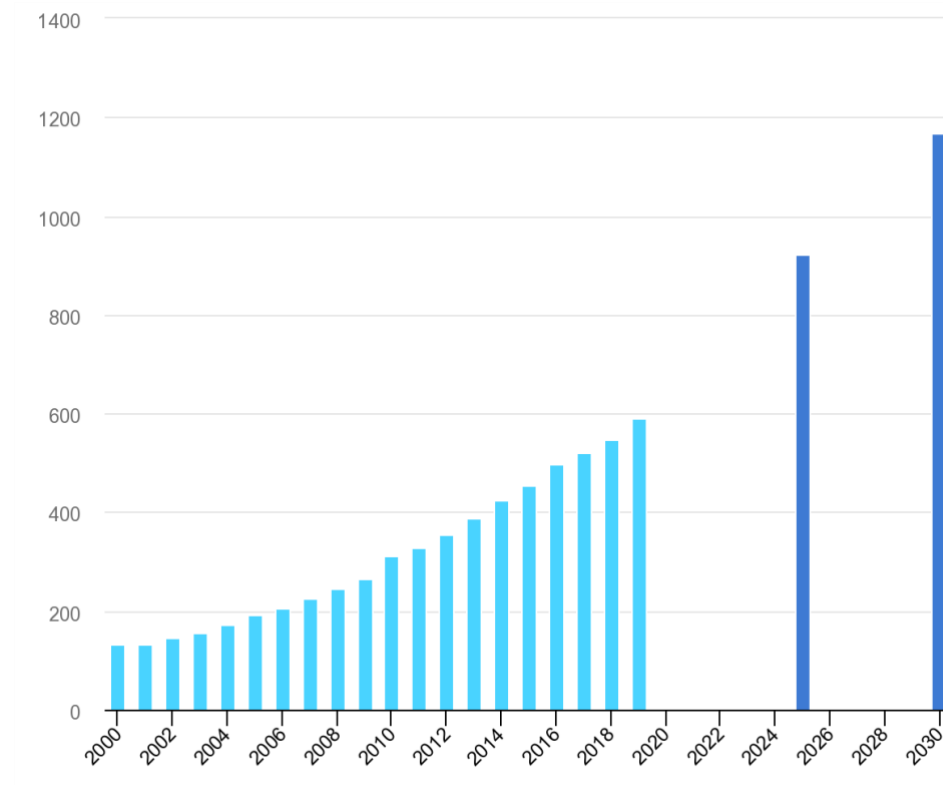


Figura 5. Producción mundial de biocarburantes 2010-2019 en Mtep (Mega toneladas equivalentes de petróleo) comparada con el consumo en el Escenario de Desarrollo Sostenible (IEA, 2021).

En resumen, la utilización de la biomasa se puede clasificar en:

- Producción térmica: tipos de usos que abarca desde calderas o estufas individuales para usos caseros; con las mismas adaptadas a complejos de hogares como edificios o bloques de viviendas, con similitudes a sistemas de calefacción y agua caliente por gasóleo C o gas natural; y acabando con calderas a mayor escala para consumo industrial.
- Producción de biocarburantes: se hablará más en profundidad a lo largo de esta memoria.

- Producción de electricidad: existe menos uso de la biomasa en este aspecto debido a las mayores inversiones necesarias en calderas para este uso, debido al poco poder calorífico de la biomasa, su alto porcentaje de humedad y su alto contenido en volátiles

1.3. Biocarburantes

Tomando en consideración el artículo 2 de la ORDEN ITC/2877/2008, de 9 de octubre, por la que se establece un mecanismo de fomento del uso de biocarburantes y otros combustibles renovables con fines de transporte, los biocarburantes son aquellos combustibles líquidos o gaseosos para transporte producidos a partir de la biomasa (IDAE, 2021).

Los biocarburantes más importantes a nivel mundial como a nivel nacional son, atendiendo a su desarrollo comercial:

- **Bioetanol**, definido como alcohol etílico producido a partir de productos agrícolas o de origen vegetal, ya se utilice como tal o previa modificación o transformación química. De este biocarburante se hablará más en profundidad más adelante.
- **Biodiesel**, esto es, éster metílico o etílico producido a partir de grasas de origen vegetal o animal. Suele producirse a partir de aceite vegetal puro, grasa animal, sebo, aceite vegetal no comestible y residuos de aceite de cocina. Su biodegradabilidad, su no toxicidad y su ausencia de azufre y aromáticos lo hacen más ventajoso que el gasóleo de gasolina convencional. El método más utilizado y más rentable a escala industrial para esta transformación se denomina transesterificación, dónde se hidrolizan los enlaces éster de los triglicéridos obteniéndose nuevos ésteres de los ácidos grasos que han sido liberados en la hidrólisis y un alcohol que se ha utilizado en exceso para la reacción (normalmente metanol o etanol. Este proceso se realiza a una temperatura determinada, alrededor de 60°C, sin superarse ya que puede ocasionar problemas de reacción si se alcanza el punto de ebullición del alcohol. También se utiliza un catalizador, sosa o potasa y se obtiene como subproducto glicerol, que puede llegar a aprovecharse para venderse como glicerina, debido a su uso en la industria cosmética, en la medicina o incluso en la alimentación, y poder hacer frente al coste elevado de las materias primas, y causa de uno de los inconvenientes de este biocarburante. De hecho está en investigación la revisión de maneras de obtención de materias primas más los residuos de aceite de cocina y las grasas animales económicas, basándose en biomasa oleaginosa no comestible. El inconveniente de todo esto, es que habrá que centrarse más en el pretratamiento y el uso de más compuestos químicos que consiga neutralizar todo el aumento de impurezas que ocasiona esta materia prima de peor calidad. El estudio sobre catalizadores y reactivos que se puedan recuperar y poder hacer este proceso más rentable resulta importante (Gebremariam y col., 2018) (IDAE, 2021).

Actualmente, existen muchas normativas vigentes a nivel nacional, europeo y mundial enfocadas a la transición energética, e incluso exclusivamente al uso de biocarburantes como medio de uso de una fuente de combustible renovable para abarcar el sector del transporte, ya que es uno de los sectores que más energía consume a nivel global. El futuro tiene que ir encaminado a una disminución del uso de petróleo, carbón o gas natural, y dejar estos recursos en su lugar de origen para lograr objetivos como los del Acuerdo de París en 2015 y disminuir considerablemente las emisiones de gases contaminantes y contribuir menos al cambio climático. Esto se debe conseguir con una coherencia entre la legislación internacional, derechos humanos e inversiones para no alterar el ciclo del carbono (van Asselt, 2021).

Con respecto a las emisiones de GEI, existe una gran incertidumbre sobre los efectos de una economía de biocombustibles a corto y medio plazo.

Partiendo de las anteriores limitaciones y conclusiones de la revisión bibliográfica, deberían considerarse más estudios científicos y teóricos en los que se aborden directamente los aspectos energéticos, de transporte y de sostenibilidad junto con la dinámica tecnológica y social de la transición de los biocarburantes.

Diferentes estudios del Análisis del Ciclo de Vida consideran reducciones de emisiones de GEI entre 30 y 50% con tecnologías de origen renovable respecto a las que provienen de combustibles fósiles, superándose el porcentaje hasta un 85% por aquellas producidas a partir de biomasa lignocelulósica.

Cabe destacar que existe un Anexo, Orden ITC/2877/2008, donde en su redacción dada por la Resolución de 27 de diciembre de 2013, de la Secretaría de Estado de Energía, establece los valores aplicables para el contenido energético y la densidad de los biocarburantes, la gasolina y el gasóleo de automoción (diésel).

En el caso del bioetanol, se puede llegar a usar en los mismos motores de combustión tradicionales sin llegar a modificar éste, añadiendo limitadas concentraciones de biocombustible. Sin embargo, con pequeñas modificaciones del motor de combustión interna, se puede llegar a sustituir completamente por este biocombustible, sin llegar a eliminar problemas de encendido de motor por debajo de 15°C.

El bioetanol puede dividirse según su aplicación en vehículo por:

- **Alcohol hidratado 96%:** utilizado como combustible único.
- **Alcohol puro 99,6%:** mezclado con gasolina.
- **ETBE:** aditivo a la gasolina.

Hay que destacar los beneficios que se consiguen al sustituir los combustibles fósiles por el uso de diferentes biocarburantes, destacando sectores energéticos, socioeconómicos o medioambientales, como:

- Se adquiere revalorización energética de residuos.
- Contribución a la seguridad alimentaria.
- La semejanza de las infraestructuras de generación de estos carburantes con los fósiles, hace que no se requiera más inversión económica.

- Se reduce la dependencia energética a una fuente de energía limitada y más contaminante debido a emisiones de óxidos de azufre, monóxido de carbono, hidrocarburos aromáticos, partículas e hidrocarburos sin quemar.
- Reducción de emisiones de CO₂ gracias a la recuperación de CO₂ en la fase de cultivo.
- Alta biodegradabilidad.
- Contribución a la conservación de los ecosistemas más valiosos.
- Aprovechamiento y desarrollo de recurso autóctono, reduciendo la dependencia de producto exterior y mejorando la competitividad internacional.
- Compatibilidad con los motores y los sistemas de distribución que utilizan carburantes líquidos derivados del petróleo.
- Fijación de la población, revitalización de zonas rurales y disminución del problema de la “España vaciada” con la creación de empleos por las nuevas actividades agrícolas e industriales.
- La diversificación del mercado y de los ingresos agrícolas, favoreciendo el desarrollo de cultivos energéticos (APPA, 2021).

Alcanzando su máxima en 2008, España siempre se ha caracterizado por su alta dependencia a los combustibles fósiles

En los últimos años se aprecia un mayor desarrollo de esta fuente de energía, aunque esto tiene que ir a la par con el desarrollo de los motores, para poder sacar el máximo rendimiento a la materia prima y la menor contaminación ambiental al planeta.

En el territorio español actualmente existen un gran número de plantas de biodiesel o de bioetanol bien repartidas, contando con muchas en construcción o como futuros proyectos, algunas paradas o en producción con proyectos de ampliación.

Como muestra la Figura 6, la tendencia desde 2016 es la de implantar cada vez más plantas de biocarburantes para poder aumentar la producción (Biorrefinería.blogspot, 2017).

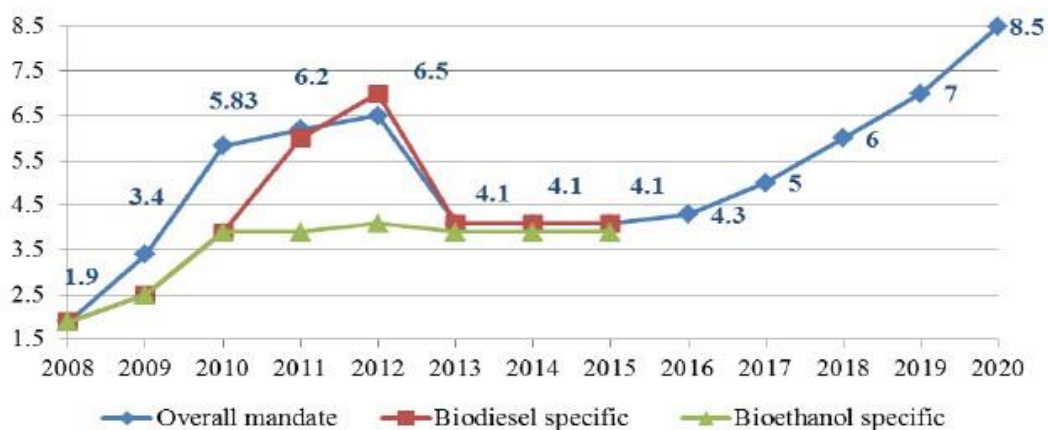


Figura 6. Mandatos de consumo de biocombustible en España medidos con porcentajes en términos de energía (extraída directamente del informe del USDA FAS) (Biorrefieria.blogspot, 2017).

En los últimos años la tendencia en el incremento de consumo de esta energía está presente. Tras alcanzar el mayor porcentaje de dependencia con los combustibles de origen fósil (81,3% en 2008), se empezó a reducir esta dependencia, en general, gracias al uso de todas las energías renovables.

A partir de 2012 y 2013, ya se reflejaba un 70,2% de dependencia, aumentando en los años siguientes hasta un 73%, y produciéndose en 2018, debido a la sequía un aumento hasta 73,4%, año donde la biomasa representaría un 2,3% del total de energía renovable producida (APPA, 2021).

Cabe destacar que, en 2008, hubo un incremento de consumo de biodiesel, cubriéndose con importaciones de EEUU y Argentina debido a legislaciones que les favorecía a estos países, pero hacía decrecer las instalaciones en España, solucionándose con medidas llamadas “Antidumping y antisubvención frente a esas importaciones de biodiesel de los Estados Unidos”.

A pesar de esta medida, en 2010 seguían las importaciones procedentes de países como Argentina, Malasia e Indonesia, y continuaban realizando negocios desleales a causa de sistemas de tasas diferenciales a la exportación que se aplicaban entre ambos países, y esto hizo que muchas empresas no llegasen a cifras de producción demasiado altas como para plantearse su supervivencia.

Debido a ello, el Ministerio de Industria, Comercio y Turismo (MITyC) aprobó un proyecto de Orden destinado a evitar estas importaciones desleales, informado y aceptado por la Comisión Nacional de Energía.

Como muestra la Figura 7, la tendencia de capacidad de instalación para biocombustibles líquidos permaneció estancada en los 3 últimos años en 6,412 MW, con una generación de electricidad de 12 GWh y 13 GWh en 2018 y 2019, respectivamente (IRENA, 2021).

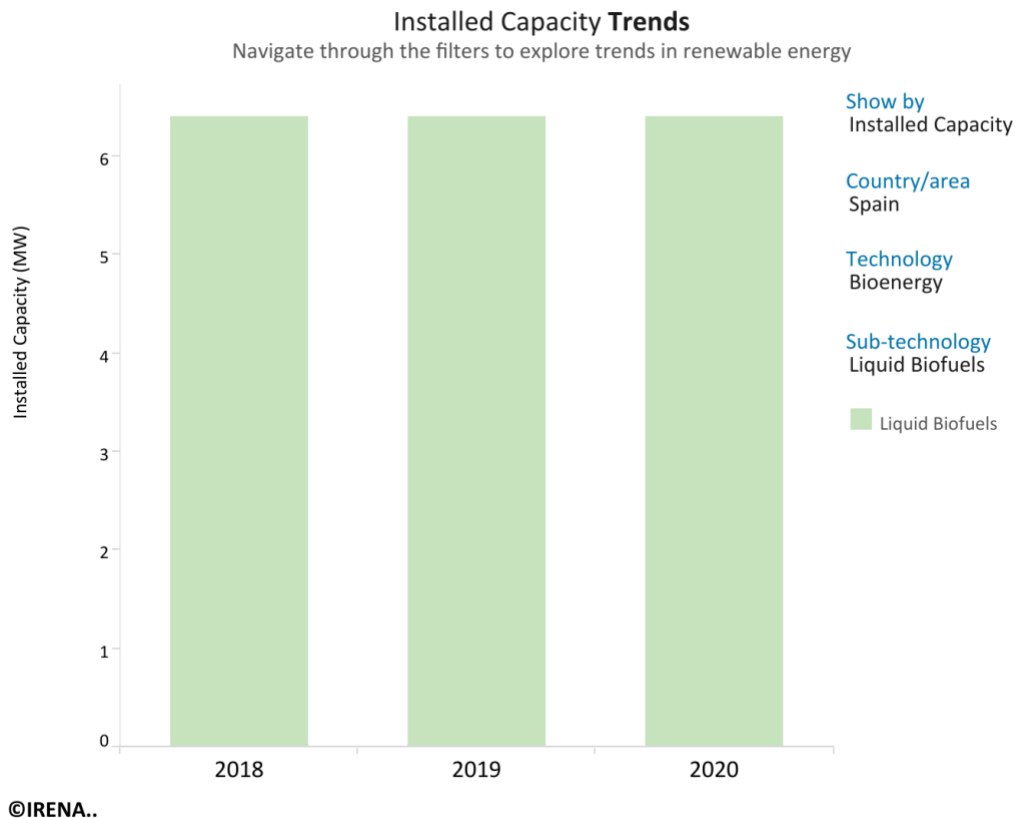


Figura 7. Capacidad instalada de biocombustibles líquidos (IRENA, 2021).

El consumo de biodiesel experimentó un incremento del 42,4% y el de bioetanol un 12,7% durante el año 2018.

En el año 2018 se llegó a alcanzar un 6,7% en consumo de biocarburantes en términos energéticos de cuota real de gasóleo (siendo un 5,6% derivado de biodiesel y un 1,1% derivado de hidrobiodiesel) aumentando hasta 1,4% respecto al año 2017. Y de cuota real de consumo de biocarburantes en gasolinas, llegó al 3,1% en 2018, aumentando 0,2% respecto a 2017 (Figura 8).

Fuente: CNMC y APPA Renovables (a partir de 2016)



Figura 8. Capacidad instalada de biocombustibles líquidos (Comisión Nacional de los Mercados y la Competencia (CNMC) y APPA, 2021).

Tras este resumen, cabe destacar que lo más importante para poder descubrir procesos más económicos a gran escala y viables para poder sustituir totalmente combustibles más contaminantes por estas fuentes de energía, es mantener un buen desarrollo de la investigación en este campo.

1.4. Bioetanol como combustible

El etanol es un compuesto químico que se obtiene a partir de la fermentación de azúcares encontrados en compuestos vegetales, así como remolacha, cereales, biomasa lignocelulósica o caña de azúcar. A su vez estos azúcares pueden estar combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa.

Echando un vistazo al panorama histórico de esta fuente de energía, sus orígenes se remontan al siglo XIX. En 1826, el norteamericano Samuel Morey construyó un motor

de combustión interna que podría funcionar con etanol y trementina. Más adelante, en el 1876, Nicolás Otto, un ingeniero alemán desarrollaría y perfeccionaría mejoraría dicho motor haciéndolo funcionar solo con etanol, a lo que 20 años más tarde, en 1896, de la mano de Harry Ford, se construiría el primer automóvil con motor de cuatro tiempos, alternativa al anterior denominado motor Otto, funcionando con etanol puro. A los 10 años de esta fabricación se desarrolló el modelo T, que podría alternar tanto gasolina como etanol, al igual que hacía posible su combinación (Solomon y col., 2007).

A consecuencia de esto, el uso del etanol quedó en segundo plano y la gasolina adquirió mucho más valor adquisitivo. Sin embargo, debido al continuo encarecimiento en los últimos años, al más que inevitable fin de este recurso y al peso ambiental que se le otorgó al uso del etanol debido a su sostenibilidad y a la reducción de emisiones en su uso en automóviles, actualmente ha vuelto a incentivarse su uso.

A nivel mundial, Estados Unidos y Brasil se siguen manteniendo como los máximos productores y consumidores de etanol, basándose en materias primas azucaradas (caña de azúcar y remolacha) o cereales (maíz, cebada y trigo). Sin embargo, durante los últimos años, se han añadido otros muchos más, revirtiendo la situación típica del año 2000 hacia delante.

En la Tabla 3 se van a mostrar los mayores países productores de bioetanol en Europa, todos a su vez producidos fundamentalmente por el grano de cereal, con Francia, Alemania, Hungría, Países Bajos y España a la cabeza. Pese a la bajada de producción respecto al año 2019 en todos los países, en mayor o menor medida, son cada vez más los países que aumentan sus producciones y alcanzan grandes capacidades de generación.

Tabla 3. Comparación de producción de bioetanol en países de Europa en millones de litros en 2019 y 2020 (Eurobserv'ER, 2021).

	2019	2020
Francia	1299,0	1049,0
Alemania	676,0	875,0
Hungría	689,0	630,0
Países Bajos	570,0	538,0
España	547,0	487,0
Bélgica	620,0	380,0
Polonia	286,0	277,0
Austria	254,0	241,0
Total	4941,0	4,486,0

Como muestra la Tabla 4, excepto en España y Hungría, los países más productores, también mantienen grandes valores de consumo del bioetanol producido, destacando países donde en 2020 se produjo un consumo nulo de esta bioenergía como en Chipre, Malta, Portugal o a penas en Croacia. En el caso de Portugal se produjo respecto al año anterior un descenso de alrededor de 8 millones de litros de consumo menos.

Tabla 4. Consumo de bioetanol utilizado para transporte en Europa en 2020 en ktep (toneladas equivalentes de petróleo) (Eurobserv'ER, 2021).

País	Bioetanol (ktep)
Alemania	701,6
Francia	554,7
España	98,0
Italia	19,6
Suecia	66,9
Polonia	89,6
Bélgica	97,3
Países Bajos	226,4
Austria	49,1
Rumanía	97,8
Finlandia	92,5
República Checa	65,5
Portugal	0,0
Hungría	56,1
Dinamarca	44,1
Grecia	62,7
Irlanda	19,4
Eslovaquia	23,0
Bulgaria	26,5
Luxemburgo	4,0
Eslovenia	4,2
Lituania	15,8
Croacia	0,5
Letonia	12,8
Estonia	7,4
Chipre	0,0
Malta	0,0
Total EU 27	2445,7

A parte de las anteriormente mencionadas materias primas (biomasas azucaradas y cereales), el bioetanol también puede ser obtenido a través de “biomasa lignocelulósica”, englobada por el conjunto de residuos agrícolas y forestales, cultivos energéticos, residuos agroindustriales, etc.

Según el tipo de biomasa a utilizar se utilizarán diferentes procesos, remarcando que el bioetanol que ha sido producido por biomasa azucarada o amilácea recibe el nombre de “bioetanol de primera generación”, mientras que el producido a partir de la biomasa lignocelulósica se denomina “bioetanol de segunda generación”.

1.4.1. Bioetanol de primera generación

Este tipo de biocombustible se obtiene a partir de la biomasa azucarada, como es el caso de la amilácea (Tabla 2).

En el caso de la biomasa azucarada, es decir, aquellos vegetales que son ricos en azúcares, son fácilmente accesibles para el ataque de los microorganismos adecuados para la producción de etanol.

1.4.1.1. Procesos de obtención

Para proceder a la obtención del bioetanol de primera generación, se cuenta actualmente con tecnologías bastante desarrolladas y llevadas a cabo en fase de explotación industrial a gran escala para la biomasa amilácea como para la biomasa azucarada (Figura 9).

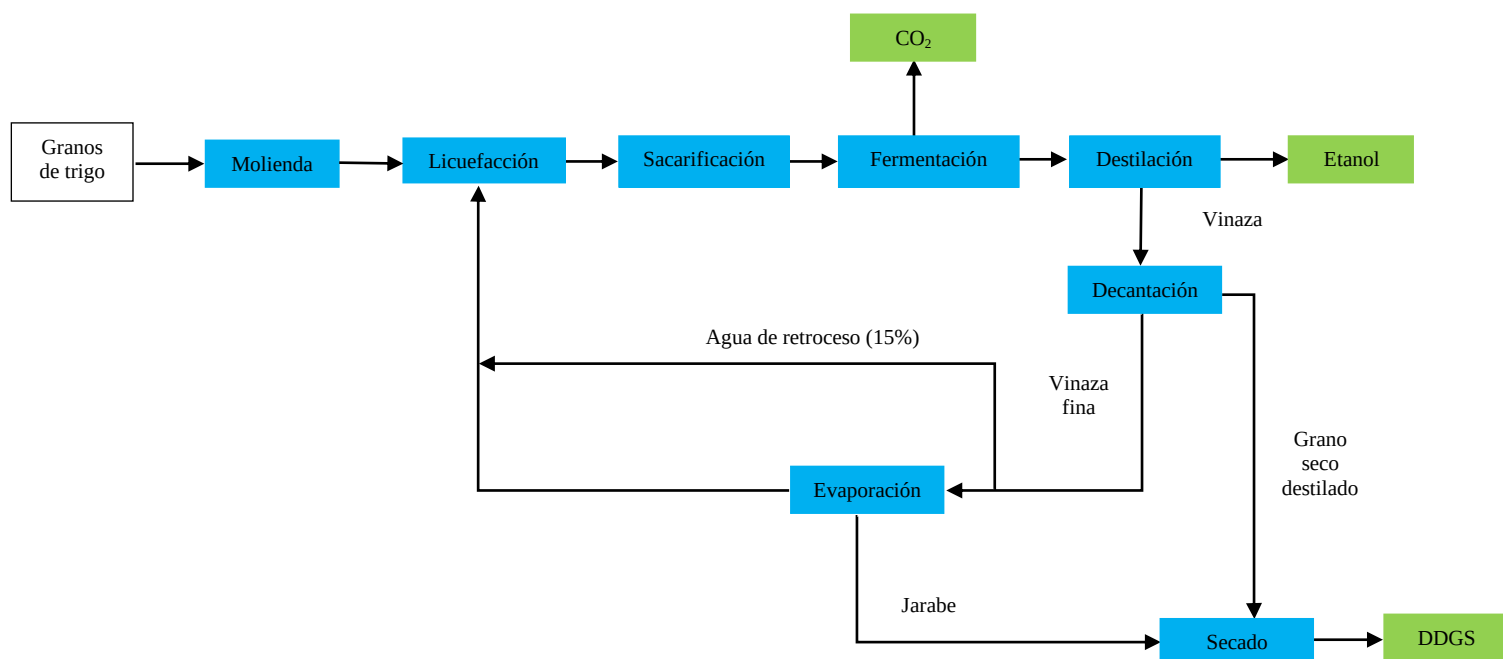


Figura 9. Obtención de bioetanol a partir de biomasa amilácea (trigo) (Bulkan G y col., 2021).

En el caso de la obtención de etanol a partir de cereal, Bulkan y col., (2021) investigaron la transformación de esta biomasa amilácea en etanol, usando para ello un proceso de molienda seca, licuefacción, sacarificación y fermentación.

1.4.2. Bioetanol de segunda generación

El denominado bioetanol de segunda generación es aquel procedente de materias primas no convencionales (como las lignocelulósicas) a través de procesos más complejos que a su vez emiten menos gases de efecto invernadero.

Esta mejora de sostenibilidad en la creación de biocombustible tiene cabida como nuevas estrategias de biorrefinerías. Así, por ejemplo, destaca el proyecto URBIOFIN, presentado en el CONAMA 2020 y llegando a ser financiado por programas europeos como el H₂O₂, debido a su gestión de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) ayudando a la valorización de estos a la vez que impulsa el concepto de biorrefinería convirtiéndolo en bioetanol o incluso en otros bioproductos como bioquímicos, biometano, bioplásticos y aditivos. Este proyecto pone de manifiesto mucho de los ODS que se pretenden conseguir en muchos campos, a parte de la sostenibilidad del proceso, y de ser una energía asequible y no contaminante (CONAMA, 2020).

Bajo este contexto y teniendo cada vez más en cuenta los biocombustibles de segunda generación (como el mencionado bioetanol de segunda generación) adquiere más importancia y puede resultar más favorable su aprovechamiento, ya que las biomásas usadas para su producción supondrían un problema de eliminación para el agricultor, y además, para el medio ambiente podría suponer hasta riesgos de incendios.

1.4.2.1. Composición de la biomasa lignocelulósica

Dentro del bioetanol de segunda generación, el principal tipo de biomasa utilizado es la biomasa lignocelulósica, de la cual forma parte materiales con alto contenido de celulosa que son generados como se ha mencionado anteriormente en actividades de sectores como el forestal, el agrícola o el industrial (Tabla 2).

Un punto en contra de esta materia prima, es la necesaria complejidad de transformación de estos materiales para conseguir azúcares monoméricos que puedan ser transformados de manera más eficiente a etanol. Al compararlos con las anteriores materias primas, en la caña de azúcar o la remolacha, dichos azúcares ya aparecen de manera monomérica, mientras que en los cereales se encuentran en forma de polisacáridos siendo fáciles de hidrolizar (almidón). En las citadas materias primas lignocelulósicas, los azúcares se encuentran en compuestos más difíciles de hidrolizar, como la celulosa y la hemicelulosa. Por lo tanto, aunque en proyectos de biorrefinerías esta biomasa resulte más atractiva por su aspecto más sostenible, hay que tener en cuenta los diferentes procesos más complejos por los que hay que pasar, y de la misma manera evaluarlos de manera tecno-económica para poder mejorar factores como el rendimiento en la hidrólisis enzimática (Galbe y col., 2019).

Estos materiales lignocelulósicos se dividen en dos tipos de componentes (Figura 10):

- **Componentes estructurales de la pared celular:** formados por celulosa, hemicelulosa y lignina. La lignina, contenida en menor proporción, entre 20-

30% del total de componentes, se trata de un polímero no polisacárido de unidades fenilpropano. El contenido mayoritario, entre un 60-80% está formado por celulosa y hemicelulosa que son polisacáridos con gran peso molecular. El contenido en proporción de estos componentes varía dependiendo de la materia prima.

- **Componentes no estructurales:** formados por compuestos extractivos y cenizas. Se tratan de componentes, que como su nombre indica, no forman parte de la pared celular y son minoritarios, pudiendo alterar significativamente procesos de conversión. Los compuestos extractivos son un grupo heterogéneo que representa en torno al 4-10% del peso seco y se componen de diferentes grasas, alcaloides, proteínas, terpenos, pectinas, fenoles, resinas, gomas, etc., pudiendo variar en composición según la edad, tipo de materia prima, estado de crecimiento o diferentes factores. Las **cenizas** por otro lado, se componen principalmente de K, Ca, Si y Mg, siendo compuestos inorgánicos que se siguen localizando después del incinerado del material (Fengel y Wegener, 1989).

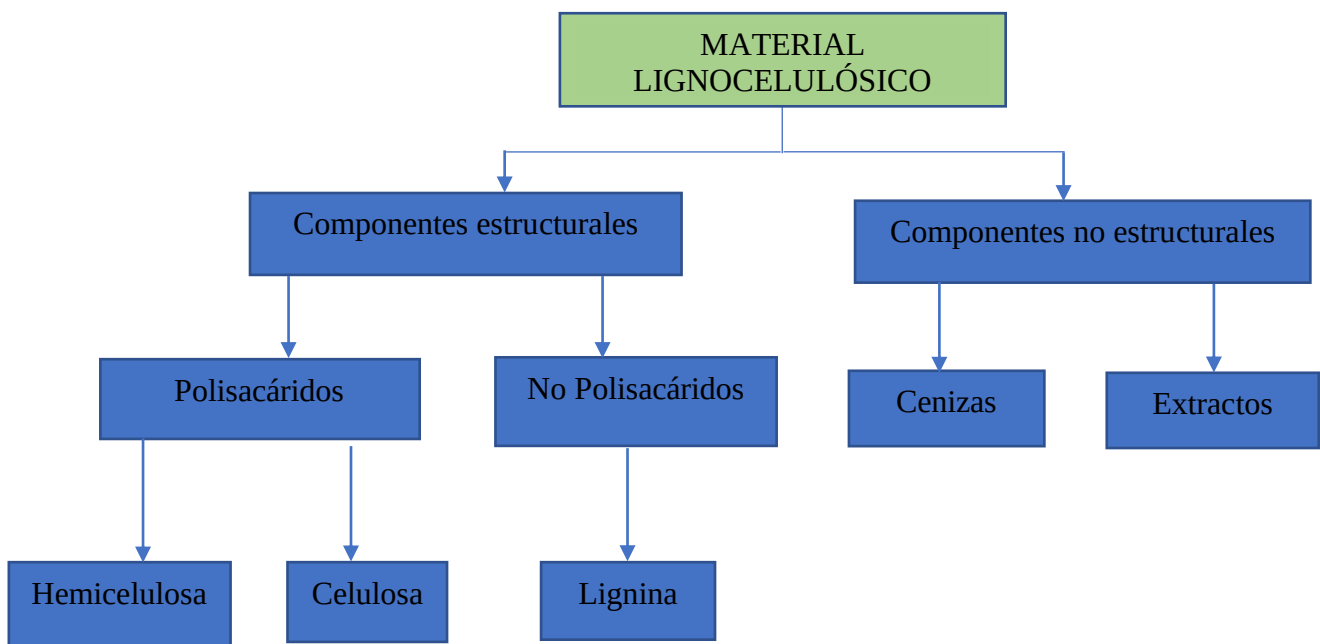


Figura 10. Componentes de la biomasa lignocelulósica.

▪ Celulosa

La celulosa se trata de la macromolécula más abundante del planeta Tierra con una producción anual de aproximadamente $26,5 \times 10^{10}$ toneladas. Su relevancia también se basa en ser la base estructural de las células vegetales siendo la sustancia natural producida por los seres vivos más importante (Brown, 2003).

Mencionada la capacidad de ser producida de manera natural, la celulosa también puede ser sintetizada por organismos como bacterias, cianobacterias, algas verdes u hongos, participando en la producción industrial (Nobles y col., 2001; Zogaj y col., 2001).

Parte de un compuesto estructuralmente en forma de polímero homogéneo lineal, de elevado peso molecular y como base estructural, uniones de largas cadenas de D-glucosa en forma piranosa unidas mediante el enlace beta-1-4-glucosídico, siendo la celobiasa, con longitud de 1,3 mm, la unidad repetida en más ocasiones. La unión de celulosas, formán moléculas más largas llamadas protofibrillas, y la unión de éstas a su vez, componen complejos mayores llamadas microfibrillas. El grupo OH en el carbono 1 y 4 de la configuración de la celulosa, tienen propiedades diferentes, el primero contará con propiedades reductoras al ser un grupo aldehído, y el segundo no será reductor al ser un grupo hidroxilo (Fengel y Wegener, 1989).

Los grupos hidroxilo, pueden llegar a interaccionar entre sí, con diferentes átomos de nitrógeno, azufre u oxígeno, creando puentes de hidrógeno, que son los encargados de dotar a la celulosa de una óptima rigidez, y aportando una propiedad a la celulosa hidrofílica.

- **Hemicelulosas**

La hemicelulosa forma, junto a la celulosa, la pared celular de los organismos vegetales. Son heteropolisacáridos formados por diferentes tipos de monosacáridos, como hexosas (glucosa), pentosas (xilosa) o ácidos hexurónicos (ácido glucurónico), siendo unidas entre ellas por enlaces glucosídicos creando estructuras ramificadas y generalmente amorfas (Figura 11). Como función principal tiene la de dar unión entre la lignina y la celulosa (Sun y col., 1998).

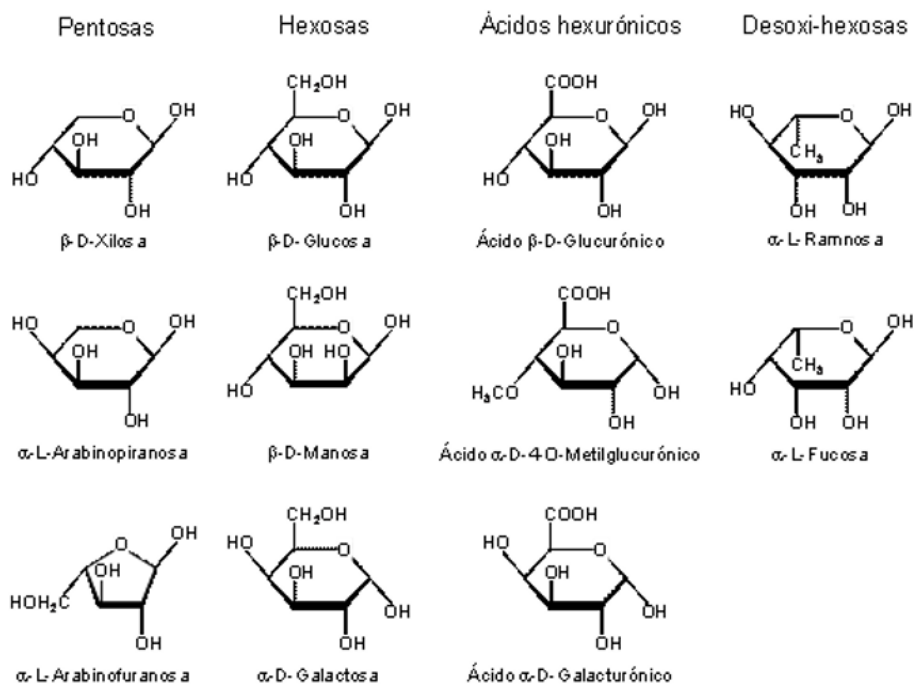


Figura 11. Monosacáridos componentes de las hemicelulosas.

Las características por las que la hemicelulosas se diferencian de la celulosa, es en la composición del monómero principal de la cadena, donde se puede dar formaciones de monómeros con azúcares iguales, como el xilano; o de uno o dos azúcares como el glucomanano. Otra característica sería la longitud de dichas cadenas, y la posibilidad de establecer ramificaciones a través de enlaces covalentes. Una ramificación muy presente en biomasa lignocelulósica sería la presencia del grupo acetilo, aunque también se pueden encontrar compuestos sin ramificaciones.

Teniendo en cuenta estas características se pueden distinguir tres grupos de azúcares hemicelulósicos: los mananos, los xilanos y los glucanos (Brett y Waldrom, 1996).

▪ Lignina

La lignina resulta ser el tercer polímero natural más abundante en la naturaleza, importante componente de los los materiales lignocelulósicos, y el tercer compuesto mayoritario tras los anteriores, celulosa y hemicelulosas. Esté polímero tridimensional amorfo está formado por monómeros básicos, llamados alcoholes cinamílicos, como el alcohó p-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico (Figura 12), siendo precursores de la lignina (Duque, 2021).

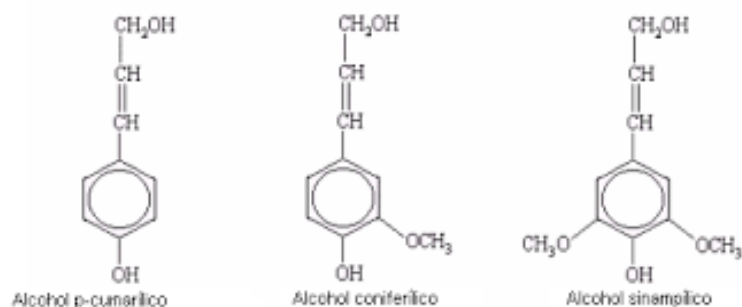


Figura 12. Monómeros de alcohol precursores de la lignina.

Estos monómeros hidroxicinamínicos acaban polimerizándose para la formación de la pared celular en dos etapas: enzimática y química.

Tras las funciones principales de la lignina destacan la de actuar como transportador interno de moléculas de agua, otros nutrientes y metabolitos esenciales para la planta. Y la otra función más característica es la de dotar de una estructura consistente a la planta, siendo resistente a golpes gracias a fortalecer y sostener las fibras de los polisacáridos. A su vez, estos compuestos de lignina, pueden llegar a evitar el ataque de numerosas enzimas destructivas para la pared celular.

Este material, resulta interesante para la producción de materiales como fibras de carbono, pudiendo sustituir al poliacrilonitrilo (PAN) utilizado durante todos estos años que deriva del petróleo, por lo que continuaría con la dependencia de los combustibles fósiles. Además, en sus reacciones de producción a escala industrial, libera compuestos tóxicos, por lo que esta variable de producción ayudaría a un desarrollo sostenible (Qu y col., 2021).

1.4.2.2. Procesos de obtención

Para obtener bioetanol procedente del recurso lignocelulósico son necesarias las siguientes etapas: el pretratamiento de la materia prima, la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, la fermentación de los azúcares y la recuperación del producto primario. Existen diferentes características de proceso, destacando en la fase de hidrólisis, donde se generan los azúcares monoméricos provenientes de celulosa y hemicelulosa, que puede ser por vía enzimática o ácida.

Los componentes de la lignocelulosa crean entre sí una fuerte cohesión, lo que dificulta la degradación enzimática y hace que muchas investigaciones se enfoquen en pasos previos químicos o físicos destinados a deslignificar la materia para obtener mayores rendimientos de hidrólisis (Hassan y col., 2018).

Los siguientes factores, sin depender de la vía de hidrólisis o de cualquier otro proceso utilizado, harán que el producto del bioetanol obtenido lo haga en unas buenas condiciones:

- Buen rendimiento de la fermentación de los hidrolizados, que están formados por diferentes pentosas, hexosas y compuesto inhibidores de la fermentación.
- Buen rendimiento de la depolimerización de celulosa y hemicelulosa hasta azúcares solubles.
- Buen aprovechamiento de la lignina.
- Buena integración del proceso incluyendo todas las etapas, para poder minimizar la demanda de energía.

1.4.2.3. Pretratamiento

La etapa de pretratamiento es necesaria debido a la complejidad de la estructura de la lignocelulosa (Figura 13), siendo necesario conseguir una facilidad de adhesión de catalizadores enzimáticos a la materia para el proceso de hidrólisis de la celulosa y así favorecer el ataque enzimático (Figura 14). Esto significa que sin la etapa de pretratamiento, se obtendrían rendimientos de hidrólisis enzimáticas menores debido a factores derivados de las características estructurales de esta materia (Cheah y col., 2020).

Estas características son:

- Superficie accesible de la celulosa.
- Barrera de protección de la lignina y la hemicelulosa con la celulosa.
- Grupos acetilo contenidos en la hemicelulosa.
- Grado de polimerización de la celulosa
- Nivel de cristalinidad de la celulosa (Wyman, 1996).

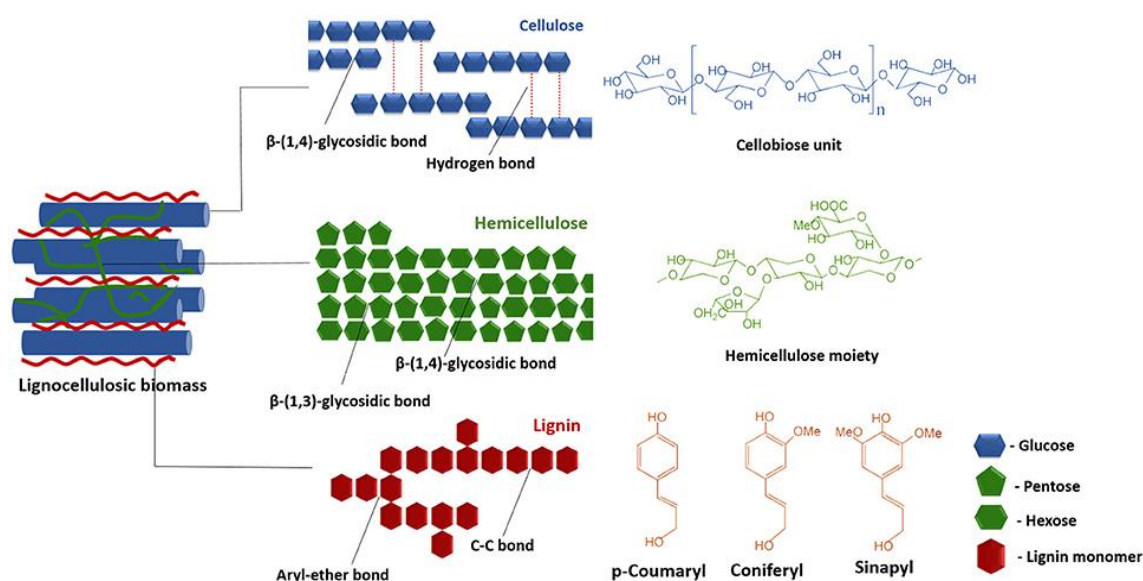


Figura 13. Estructura esquemática de la lignocelulosa (Baruah, 2018).

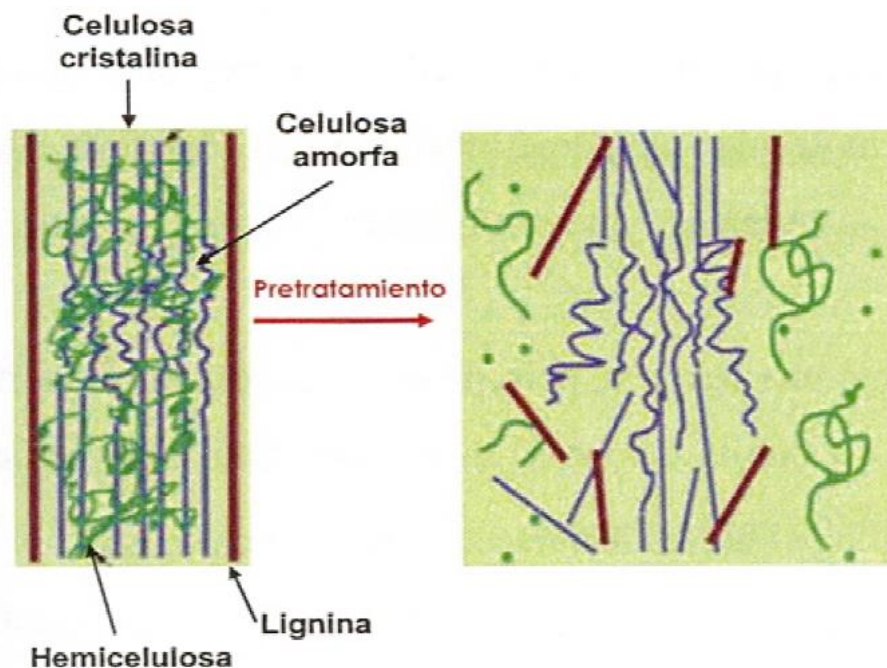


Figura 14. Representación del proceso químico que tiene lugar en el pretratamiento en materiales lignocelulósicos (DOE, 2006).

A continuación se van a exponer los diferentes tipos de pretratamientos según su clasificación indicando antes que, es necesario valorar cada uno el traspasarlos a escala industrial, siendo así más rentable factores como bajo consumo energético, bajos costes de inversión, utilización de reactivos económicos y con una recuperación sencilla y con posible aplicación a más sustratos: (Ravindran y col., 2016)

▪ **Pretratamientos físico-químicos**

Los llamados pretratamientos físico-químicos en general son los más efectivos y los que están siendo estudiados por un mayor número de grupos de investigación. Aquellos que mejores resultados obtienen a la hora de que el ataque enzimático se produzca en la celulosa son:

- Explosión por vapor (“Steam explosión”).
- Agua caliente en fase líquida (“Liquid Hot Water”).
- Pretratamiento con amoníaco.
- Oxidación húmeda.

▪ **Pretratamientos químicos**

Los pretratamientos de tipo químico son aquellos que solamente utilizan compuestos químicos para solubilizar los azúcares y modificar la estructura de la materia lignocelulósica. Este tipo de pretratamiento se utiliza en menor medida debido a que

necesita de un proceso previo de neutralización para acondicionar la materia para la fermentación. Otro inconveniente es que se crean compuestos que dificultan los procesos de hidrólisis y fermentación.

Los procesos más importantes son:

- Pretratamientos ácidos.
- Pretratamientos básicos.
- Tratamientos con organosolventes
- Pretratamientos con sales metálicas (Robak y col., 2020).

▪ **Pretratamientos biológicos**

Los pretratamientos biológicos son aquellos en los que existen diferentes microorganismos que son capaces de generar enzimas las cuales degradarán los polímeros de la materia lignocelulósica. Los microorganismos más efectivos dentro de este grupo son los hongos de la podredumbre blanca y blanda, los cuales se centran en atacar a la celulosa y la lignina por medio de celulasas y hemicelulasas; y los hongos de podredumbre marrón, que atacan a la lignina por medio de enzimas degradativas de la lignina (Cardona y Sánchez, 2007).

Principalmente, este pretratamiento cuenta con las ventajas de necesitar un bajo aporte energético y las condiciones ambientales suaves en las cuales se puede desarrollar este proceso. Las desventajas serían aquellas derivadas de los microorganismos, como su actividad celulolítica o el elevado tiempo dedicado al proceso de hidrólisis (Kumar y col., 2020).

1.4.2.4. Hidrólisis

Una vez la biomasa ha sido pretratada, se consigue un producto constituido principalmente por celulosa y lignina, denominado material insoluble, y un producto en forma líquida donde parte de los azúcares hemicelulósicos han quedado disueltos en este también denominado prehidrolizado. El objetivo en este proceso será el de producir monómeros y oligómeros por medio de ácidos o enzimas. El Departamento de Energía de los Estados Unidos, está enfocado en la hidrólisis enzimática ya que la hidrólisis por medio de ácidos ya ha alcanzado el límite de desarrollo, mientras que la enzimática aún tiene margen de mejora y se puede seguir disminuyendo costes (DOE, 2006).

▪ **Hidrólisis ácida**

Este tipo de hidrólisis es conocido desde 1819 y utilizado de manera extendida en el ámbito industrial. El proceso más conocido es el Bergius, que manejaba HCL al 40% durante la Segunda Guerra Mundial en Alemania.

Esta hidrólisis ácida se trata de una reacción química donde intervienen catalizadores ácidos cuyo objetivo es transformar las cadenas de polisacáridos contenidos en la biomasa en sus monómeros básicos. Para esta reacción se pueden usar ácidos como el sulfúrico, el fosfórico o el nítrico entre otros, pudiendo encontrarse de manera concentrada o diluida. En la reacción, primero se parte de celulosa, tras la primera reacción se obtiene glucosa, y en la última se obtienen los productos de degradación.

▪ **Hidrólisis enzimática**

La hidrólisis enzimática de la celulosa de la materia lignocelulósica está basada en la capacidad de algunos microorganismos, principalmente bacterias y hongos, de producir conjuntos de enzimas extracelulares con la capacidad de acceder a los distintos polisacáridos que componen la lignocelulosa.

Las enzimas mencionadas son las celulasas y las hemicelulasas, encargadas de romper los polisacáridos de celulosa y hemicelulosa en los azúcares monoméricos correspondientes (Figura 15).

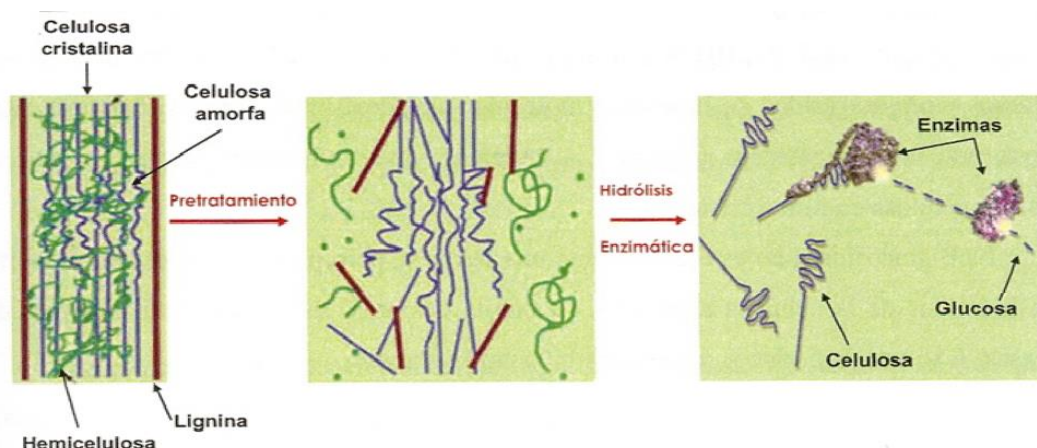


Figura 15. Proceso esquematizado del proceso de hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática se convierte en una de las etapas más importantes de este proceso siendo una de las etapas limitantes del proceso global de biomasa lignocelulósica convertida en etanol. Esto es debido a una de las propiedades de las enzimas, su baja actividad específica, lo que hará que se necesiten una mayor inversión económica en su obtención, lo que baja la rentabilidad del proceso global. Otro aspecto negativo, es por la propia característica estructural de la biomasa lignocelulósica mencionada anteriormente, que hace indispensable un buen proceso de pretratamiento (Hassan y col., 2018).

1.4.2.5. Fermentación

La fermentación alcohólica, para la producción de bebidas alcohólicas, es uno de los procesos con este fin que más se han realizado en los últimos años para conseguir vino o cerveza.

Dentro de la producción de etanol a partir del recurso de biomasa lignocelulósica, la fermentación se trata de la última etapa antes de poder proceder a la destilación final del producto, transformándose de manera estequiométrica los azúcares monoméricos a través de microorganismos (bacterias y levaduras). La principal levadura que destaca los últimos años es *Saccharomyces cerevisiae*.

Aproximadamente se obtienen 0,50 g de etanol por 1 g de azúcares que se introducen en la reacción, pero realmente los rendimientos de reacciones acaban siendo algo menores debido al uso de dichos azúcares en consumo del metabolismo celular de las levaduras, para su crecimiento, o en la producción de productos minoritarios como ácido acético, ácido láctico, etc. (Satari y col., 2019; Naik y col., 2010).

1.4.2.6. Configuración de procesos

Los procesos de obtención de etanol dentro de la vía enzimática ha dado lugar a diferentes configuraciones en las que cambiarán las maneras de poner en marcha las etapas de hidrólisis y fermentación. Principalmente existen tres que se citarán a continuación:

- Sacarificación y fermentación por separado (HFS): ambas reacciones lugares diferentes
- Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS): ambas reacciones en el mismo reactor al mismo tiempo, pudiendo en otro proceso similar, fermentar pentosas y hexosas (SCFSS).
- Bioprocesos Consolidados (BPC): donde se efectúa la producción de celulosa, la hidrólisis y la fermentación en la misma etapa.

Cada configuración tendrá sus ventajas y desventajas, por ejemplo, al realizar la configuración HFS, se pueden garantizar temperaturas óptimas para los microorganismos que serán diferentes de las más idóneas para las reacciones de sacarificación. Pero la configuración SFS, puede conseguir beneficios económicos, de tiempo de producción y de espacio, al realizarlo todo en un mismo reactor (Cardona y Sánchez, 2007).

1.5. El viñedo como fuente de biomasa

La práctica agrícola del cultivo de la vid es una actividad económica importante a nivel mundial que genera grandes cantidades de residuos agrícolas, como los sarmientos de vid, objeto de estudio en este trabajo de investigación. Por tanto, esto hace que por

ejemplo en 2019 se llegaron a cultivar hasta 6,9, 3,2 y 0,9 millones de hectáreas de cultivo de vid en el mundo, la Unión Europea y España, respectivamente (FAOSTAT, 2021). Autores como Nabais y col. (2010), confirman que por cada hectárea de cultivo se generan entre 2 y 4 toneladas de estos residuos durante la tarea agrícola de la poda de la vid.

A nivel europeo, destacan como principales productores de vino Francia, España e Italia, habiendo descendido sus niveles de producción en torno a un 12% en los últimos años. Este descenso ha sido debido a diferentes políticas estratégicas que han impulsado la desaparición de viñedos. En el caso de España, que cuenta con la mayor extensión de terreno para esta actividad, ha conseguido compensar esta pérdida de terreno con un ligero aumento de productividad. EuroPruning, como proyecto que fomenta el desarrollo y la implementación de la biomasa, cofinanciado por el 7º Programa Marco de Investigación e Innovación Tecnológica de la Comisión Europea, van a promover el aumento de las superficies anuales de viñedos para así poder recuperar la primera posición a nivel mundial de productor de vino (EuroPruning, 2014).

España actualmente cuenta con una superficie total de terreno de viñedos de secano de 681.591 hectáreas y 257.692 de hectáreas de regadío con un total de 939.283 hectáreas de viñedos, repartidas en mayor parte en Castilla-La Mancha con 444.356 hectáreas (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis provincial de superficie total por producción (hectáreas) y según clases de cultivos de viñedo en España (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino (MARM), 2017).

Provincias y Comunidades Autónomas	Superficie total			Viñedo de uva de mesa	Viñedo de uva para vinificación	Viñedo de uva para pasificación	Viveros de viñedo
	Secano	Regadío	Total				
A Coruña	2.390	—	2.390	—	2.390	—	—
Lugo	1.930	—	1.930	—	1.930	—	—
Ourense	8.237	—	8.237	—	8.237	—	—
Pontevedra	12.098	—	12.098	—	12.098	—	—
GALICIA	24.655	—	24.655	—	24.655	—	—
P. DE ASTURIAS	59	—	59	—	59	—	—
CANTABRIA	117	—	117	—	117	—	—
Alava	12.136	1.348	13.484	—	13.484	—	—
Guipúzcoa	431	—	431	—	431	—	—
Vizcaya	403	—	403	—	403	—	—
PAÍS VASCO	12.970	1.348	14.318	—	14.318	—	—
NAVARRA	7.734	11.090	18.824	—	18.133	—	691
LA RIOJA	32.769	14.112	46.881	5	46.876	—	—
Huesca	3.406	1.752	5.158	40	5.118	—	—
Teruel	1.982	38	2.020	3	2.017	—	—
Zaragoza	20.268	8.175	28.443	173	28.270	—	—
ARAGÓN	25.656	9.965	35.621	216	35.405	—	—
Barcelona	22.040	99	22.139	—	22.112	—	27
Girona	2.105	65	2.170	—	2.163	—	7
Lleida	2.265	2.253	4.518	22	4.488	—	8
Tarragona	26.008	822	26.830	1	26.796	—	33
CATALUÑA	52.418	3.239	55.657	23	55.559	—	75
BALEARES	1.062	1.180	2.242	50	2.192	—	—
Ávila	4.189	25	4.214	2	4.212	—	—
Burgos	17.203	540	17.743	—	17.743	—	—
León	11.557	46	11.603	—	11.603	—	—
Palencia	493	16	509	—	509	—	—
Salamanca	2.701	9	2.710	2	2.708	—	—
Segovia	1.607	242	1.849	—	1.848	1	—
Soria	1.290	97	1.387	—	1.387	—	—
Valladolid	21.054	4.025	25.079	2	25.077	—	—
Zamora	12.002	215	12.217	—	12.217	—	—
CASTILLA Y LEÓN	72.096	5.215	77.311	6	77.304	1	—
MADRID	5.053	3.262	8.315	—	8.315	—	—
Albacete	54.923	31.458	86.381	30	86.351	—	—
Ciudad Real	86.418	75.516	161.934	—	161.934	—	—
Cuenca	65.332	17.147	82.479	2	82.477	—	—
Guadalajara	1.741	70	1.811	—	1.811	—	—
Toledo	85.119	26.632	111.751	38	111.713	—	—
CASTILLA-LA MANCHA	293.533	150.823	444.356	70	444.286	—	—
Alicante	4.742	11.321	16.063	5.287	10.770	6	—
Castellón	802	69	871	98	773	—	—
Valencia	35.922	11.551	47.473	104	46.796	—	573
C. VALENCIANA	41.466	22.941	64.407	5.489	58.339	6	573
R. DE MURCIA	17.524	12.296	29.820	6.507	23.313	—	—
Badajoz	59.589	17.595	77.184	269	76.915	—	—
Cáceres	2.836	207	3.043	2	3.041	—	—
EXTREMADURA	62.425	17.802	80.227	271	79.956	—	—
Almería	1.016	233	1.249	129	1.120	—	—
Cádiz	9.398	538	9.936	246	9.690	—	—
Córdoba	5.800	440	6.240	55	6.182	3	—
Granada	2.772	736	3.508	73	3.248	—	187
Huelva	3.426	99	3.525	115	3.410	—	—
Jaén	325	35	360	22	338	—	—
Málaga	4.024	120	4.144	505	1.950	1.689	—
Sevilla	673	406	1.079	521	558	—	—
ANDALUCÍA	27.434	2.607	30.041	1.666	26.496	1.692	187
Las Palmas	1.831	306	2.137	90	2.047	—	—
S.C. de Tenerife	2.789	1.506	4.295	23	4.272	—	—
CANARIAS	4.620	1.812	6.432	113	6.319	—	—
ESPAÑA	681.591	257.692	939.283	14.416	921.642	1.699	1.526

Tras el análisis de diferentes residuos agrarios, el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente describe una posibilidad de transformar en papel y cartón como otra forma de valorizar restos vegetales. Esta idea entra dentro de una manera sostenible de deshacerse de los recursos, e incluso sustituirse por algunos envases de plásticos. Los buenos resultados de materias primas como el sarmiento de vid a la hora de la conversión en las pastas para fabricar el papel, dieron lugar a fábricas de producción de papel usando residuos vegetales como materia prima, por ejemplo, en Sevilla (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2012).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia Prima

Para este trabajo se ha seleccionado como materia prima el material lignocelulósico del **sarmiento de vid**. También se analizó su humedad original, después de secarse a temperatura ambiente en el laboratorio, resultando ésta en 11,54%. Por medio de la molienda, como pretratamiento físico, el sarmiento de vid se redujo hasta un tamaño de 1 cm (Figura 16), utilizando un molino de cuchillas tipo Retsch (SM 100, Haan, Alemania) (Figura 17). A continuación, se almacenó en pequeñas bolsas para su siguiente uso.



Figura 16. Materia prima: Sarmiento de vid (elaboración propia).



Figura 17. Molino de cuchillas tipo Retsch (SM 100, Haan, Alemania) (elaboración propia).

2.2 Extracción acuosa en Autoclave

Condiciones de pretratamiento

En el reactor autoclave, en condiciones de 120°C durante 60 minutos con agua, se llevó a cabo la extracción de la materia prima (sarmiento de vid), siendo la carga sólido/líquido usada de 15% p/V.

Procedimiento

Se introdujeron 1.750 g secos de materia prima en 5.000 ml de agua en garrafas de 10 litros, obteniéndose un sarmiento extraído con una humedad de 4,18%.

2.3 Pretratamiento con ácido sulfúrico diluido en condiciones suaves de proceso

El pretratamiento de la materia prima (sarmiento de vid, sin y con previa extracción con agua) se realizó con H_2SO_4 , en el laboratorio de la Universidad de Jaén, en un reactor **autoclave** (Trade Raypa, Tarrasa, Spain) (Figura 12).



Figura 18. Reactor Autoclave Trade Raypa (elaboración propia).

Condiciones de pretratamiento

En esta parte del trabajo, se estudiaron como factores del pretratamiento la concentración de H_2SO_4 y la temperatura a la que fueron sometidas las muestras.

En cuanto a la temperatura, se decidió someter las muestras a diferentes valores, 120°C y 130°C, siendo el tiempo de pretratamiento fijado de 15 minutos. Las concentraciones de H_2SO_4 usadas fueron 0%, 0,5%, 1% y 2% (p/V) (Tabla 6). Estas condiciones se eligieron acorde a las experiencias previas del grupo de investigación en el que se ha basado este proyecto.

La carga sólido/líquido utilizada fue del 20% (p/V). Se usa una carga elevada para que el proceso sea lo más eficiente posible para fines económicos.

De este modo, el sarmiento de vid se trató con 16 condiciones experimentales diferentes.

Tabla 6. Plan de experimentación para el estudio de las variables de pretratamiento del sarmiento de vid (elaboración propia).

Experimento	Materia prima	Temperatura (°C)	Conc. H ₂ SO ₄ (%, p/V)
1	Sarmiento original	120	0
2		120	0,5
3		120	1
4		120	2
5		130	0
6		130	0,5
7		130	1
8		130	2
9	Sarmiento extraído	120	0
10		120	0,5
11		120	1
12		120	2
13		130	0
14		130	0,5
15		130	1
16		130	2

Procedimiento

Puesto que la carga de sólido usada fue del 20% (p/V), se pesaron 50 g de materia prima (sarmiento de vid original y sarmiento de vid extraído), y se añadieron 250 mL de la disolución de ácido sulfúrico correspondiente en cada experimento, utilizando para ello botes ISO de 500 mL de capacidad.

Como se comentó anteriormente, el pretratamiento tuvo lugar en un reactor autoclave en las condiciones de pretratamiento mostradas en la Tabla 6. Una vez que el proceso finalizó, se enfriaron los botes en un baño de hielo mezclado con agua (Figura 19) para su posterior filtración a vacío.



Figura 19. Baño de hielo mezclado con agua (elaboración propia).

A continuación, mediante un proceso denominado filtración a vacío (Figura 20), llevada a cabo en un embudo Büchner, se consiguió separar las dos fracciones formadas: el sólido pretratado o residuo sólido insoluble (RSI) y la fracción líquida o prehidrolizado (FL) (Figura 23 y 21). Para finalizar esta parte del proceso, se midió el volumen final y el pH de los prehidrolizados obtenidos en cada experimento. Además, a estos prehidrolizados se les midió su contenido en azúcares (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa) e inhibidores (como el ácido fórmico, ácido acético, hidroximetilfurfural o el furfural). Por otra parte, antes de acabar esta etapa de filtración, se lavó la fracción sólida con agua destilada para eliminar restos de prehidrolizado en el residuo sólido.

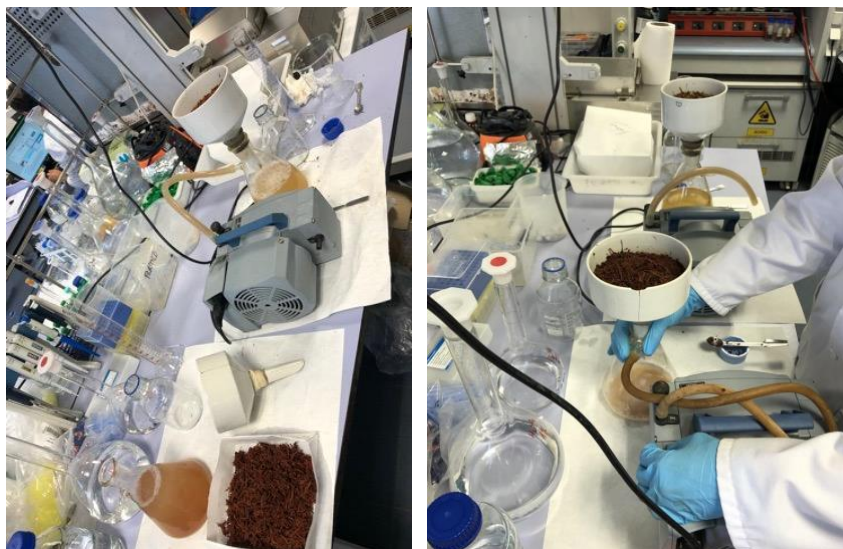


Figura 20. Sistema de filtración a vacío (elaboración propia).

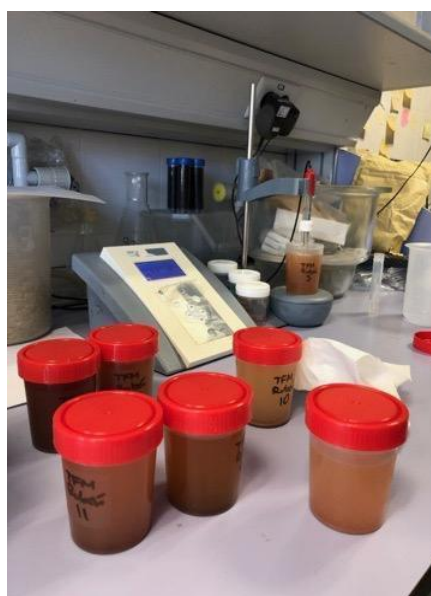


Figura 21. Prehidrolizado o fracción líquida (FL) (elaboración propia).

Posteriormente, se añadió el residuo sólido obtenido en una bandeja de papel (previamente pesada) y se dejó secar en la estufa a 40°C aproximadamente (Figura 22). De este modo, se determinó la “Recuperación de Sólido” conseguida en cada pretratamiento. Estos residuos sólidos se conservaron para su posterior caracterización (azúcares y lignina, entre otros) y proceso de hidrólisis enzimática (Figura 23).



Figura 22. Secado de residuos sólidos (RSI) en estufa (marca Memmert) (elaboración propia).



Figura 23. Residuos sólidos conservados para los siguientes procesos (elaboración propia).

2.4 Pretratamiento en reactor agitado de alta presión a condiciones severas de proceso

El sólido pretratado obtenido en las mejores condiciones de pretratamiento (Tabla 6) se sometió a una segunda etapa de pretratamiento ácido en un reactor con agitación de alta presión (Parr Instrument Company, USA (PARR 4843)) (Figura 24), siendo éste un reactor a escala de laboratorio con una capacidad máxima de volumen de 1 litro.

Este reactor cuenta con los siguientes componentes:

- 1) Una manta eléctrica calefactor.
- 2) Un agitador mecánico.
- 3) Un termopar para controlar la temperatura, tanto de la manta calefactora como en el interior del reactor.

- 4) Una válvula de escape para controlar la sobrepresión del reactor.
- 5) Un sistema de control de presión.
- 6) Un serpentín por donde circula agua fría para controlar la temperatura final del proceso.
- 7) Un controlador digital para controlar la agitación y la temperatura del interior del reactor.



Figura 24. Reactor a presión Parr (elaboración propia).

Condiciones de pretratamiento

Esta segunda etapa de pretratamiento se llevó a cabo a dos temperaturas diferentes, 170°C y 190°C. La concentración de H_2SO_4 utilizada fue de 0,5% (p/V), y el tiempo de mantenimiento de 5 minutos.

Se seleccionó 20% (p/V) como la carga de sustrato usada en el reactor, ya que la prioridad siempre será aprovechar económicamente al máximo cada reacción.

Este porcentaje de carga de sustrato se ha podido seleccionar gracias a que es de los pocos materiales lignocelulósicos con los que se puede superar el 10% de carga sólido/líquido con una buena homogeneización dentro del reactor (Liu y col., 2009).

Procedimiento

En primer lugar, se introdujo la materia prima con la correspondiente disolución de H_2SO_4 , que en este caso será de 0,5% para ambos pretratamientos, en el reactor con una relación sólido-líquido del 20% (100 g de sarmiento de vid en base seca y 500 mL de disolución H_2SO_4).

Posteriormente, se cerró de manera hermética el dispositivo, atornillando la tapa para mayor seguridad, y se cubrió el reactor con la manta calefactora.

Antes de empezar el proceso, en la pantalla se seleccionaron las variables de operación y velocidad de agitación hasta alcanzar la temperatura prefijada.

Cuando empezó a aumentar la temperatura, es decir, desde el tiempo 0, se llevó un control de la misma, anotando para cada minuto la temperatura indicada por el reactor, hasta llegar a 170°C y 190°C, respectivamente, para cada experimento. Al alcanzar dicho valor de temperatura se mantuvo el tiempo de residencia (de 5 minutos en este caso), anotando antes, el valor de presión alcanzado.

Después de mantener el tiempo de residencia de 5 minutos a la temperatura prefijada, se procedió al enfriamiento, donde se anotó de la misma manera la temperatura a cada minuto, hasta alcanzar la temperatura aproximada de 35°C. Este procedimiento se llevó a cabo después de apagar la manta calefactora y separarla del vaso reactor para poder enfriar éste con la ayuda de un vaso de teflón relleno de agua con hielo.

De este modo, se construyeron las curvas de calentamiento y enfriamiento para cada reactor llevado a cabo (Figura 25 y 26).

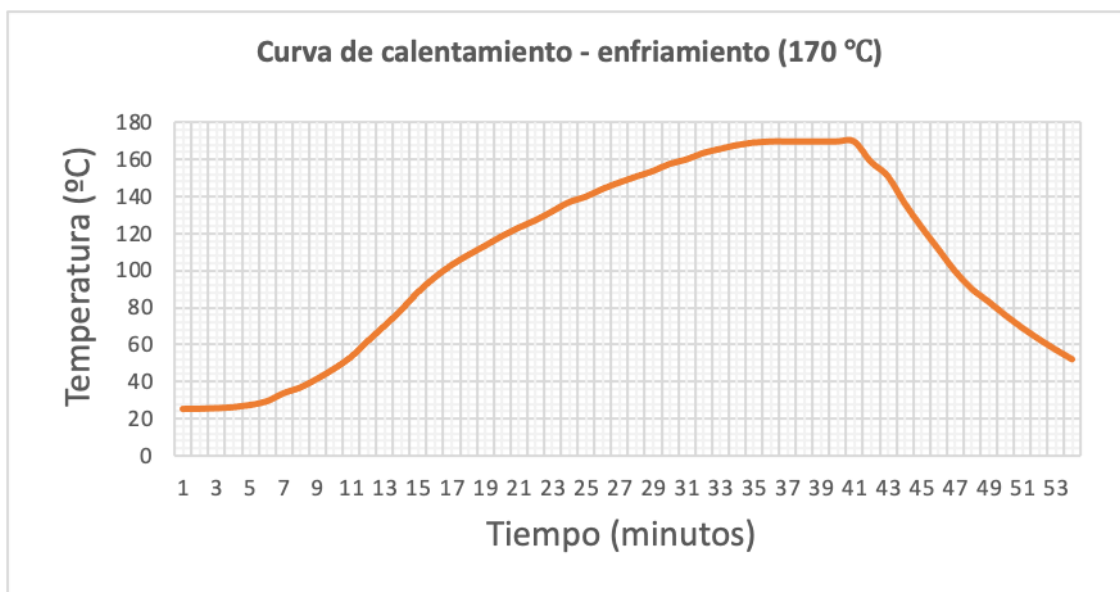


Figura 25. Perfil de temperatura obtenido para la etapa 2 (170°C, 5 min, 0,5% H₂SO₄) (elaboración propia, Excel).

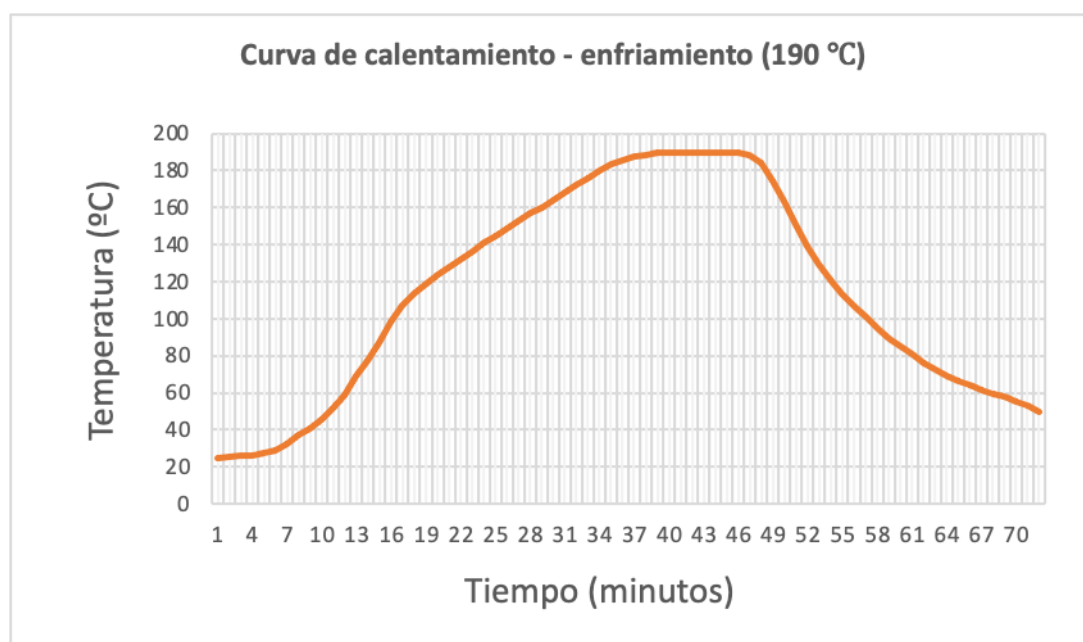


Figura 26. Perfil de temperatura obtenido para la etapa 2 (190°C, 5 min, 0,5% H₂SO₄) (elaboración propia, Excel).

2.5 Ensayos de hidrólisis enzimática

Los experimentos realizados de hidrólisis enzimática con los sólidos pretratados obtenidos en las diferentes condiciones de pretratamiento ensayadas, ayudarán a poder

evaluar la eficacia de los diferentes pretratamientos, calculando las eficiencias o rendimientos de hidrólisis enzimática.

Cada experimento se lleva a cabo en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, donde se introduce como sustrato el material sólido insoluble o sólido pretratado (con el tamaño original) obtenido en los diferentes pretratamientos.

Para este proceso, se necesita preparar un tampón cítrico-citrato 0,05 M (pH 4,8), preparado a partir de dos disoluciones de ácido cítrico 0,1 M y de citrato sódico 0,1 M (Figura 27).



Figura 27. Matraces Erlenmeyer con tampón cítrico-citrato (elaboración propia).

Se usó un 5% (p/V) de carga de sólido, es decir, 1,25 g de sólido pretratado por cada 25 mL de disolución enzimática, usándose matraces de 100 mL de capacidad. Posteriormente, los matraces se llevaron a un agitador orbital (Figura 28) en las condiciones de 50°C y 150 r.p.m. durante 72 horas.

La enzima empleada en el proceso fue Cellic CTec2, la cual cuenta con una actividad enzimática de 90 FPU (Unidades de Papel de Filtro)/mL. La carga enzimática usada en el proceso fue 15 FPU/gramo de sustrato, siendo combinado con un 10% de enzima β -glucosidasa.



Figura 28. Agitador orbital (elaboración propia).

A través de este proceso de hidrólisis enzimática, se obtuvo glucosa en forma monomérica, la cual puede ser transformada en etanol mediante un proceso de fermentación.

Se empleó también un matraz “blanco”, el cual llevó solo disolución enzimática sin biomasa. De esta forma, se determinó la concentración de glucosa que produce la enzima por sí sola, la cual posteriormente se “restará” a la glucosa obtenida a partir de los diferentes sólidos pretratados.

El procedimiento se realizó por triplicado, con el objetivo de poder obtener un resultado más representativo. Para poder observar el desarrollo de la hidrólisis enzimática, se procedió a tomar una muestra de cada Erlenmeyer cada 24 horas, es decir a las 24, 48 y 72 horas. La desviación estándar no llegó a superar nunca el 1%.

Cada muestra se centrifugó en la Centrífuga Sigma 1-14 (Figura 29) en condiciones de 11.500 r.p.m. durante 10 minutos, siendo posteriormente determinado su contenido en glucosa mediante HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia, en inglés “High Performance Liquid Chromatography”), tras filtrar el sobrenadante.



Figura 29. Centrífuga Sigma 1-14 (elaboración propia).

2.6 Determinaciones analíticas

Se va a proceder a comentar los procedimientos y los métodos utilizados para caracterizar la materia prima y sólidos pretratados, al igual que el análisis de los líquidos prehidrolizados, para determinar su composición, y el contenido de glucosa en los hidrolizados enzimáticos.

2.6.1 Caracterización de la materia prima y de los materiales pretratados

La caracterización de la materia prima y de los materiales pretratados se llevó a cabo según el protocolo de procedimientos del NREL (National Renewable Energy Laboratory) especificados en el apartado de Anexos de este TFM y siguiendo los esquemas de la Figura 30 y Figura 31.

En el caso de la caracterización de la materia prima, previamente se realizó una extracción secuencial acuosa y etanólica en Soxhlet, antes de proceder a la determinación de azúcares, con objeto de eliminar los extractivos que puedan afectar a interferencias en otros procesos de análisis. Los componentes llamados extractivos son las ceras, grasas, taninos, azúcares, resinas, colorantes, etc. Tras acabar este procedimiento se realizó una corrección a la biomasa sin extraer.

El objetivo de todo este proceso es analizar la materia prima para conocer su contenido original en carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa), lignina ácido insoluble, lignina ácido soluble, extractivos, grupos aceto (**“Determinación de Carbohidratos en la Biomasa mediante HPLC”**, **“Determinación de Lignina Ácido Insoluble en Biomasa”**, **“Determinación de Lignina Ácido Soluble”**, **“Determinación de extractivos en la biomasa”**, y **“Determinación de Grupos**

Acetilo en Biomasa mediante HPLC”, en apartado Anexos) y cenizas (“Determinación de Cenizas en la Biomasa”, en apartado Anexos).

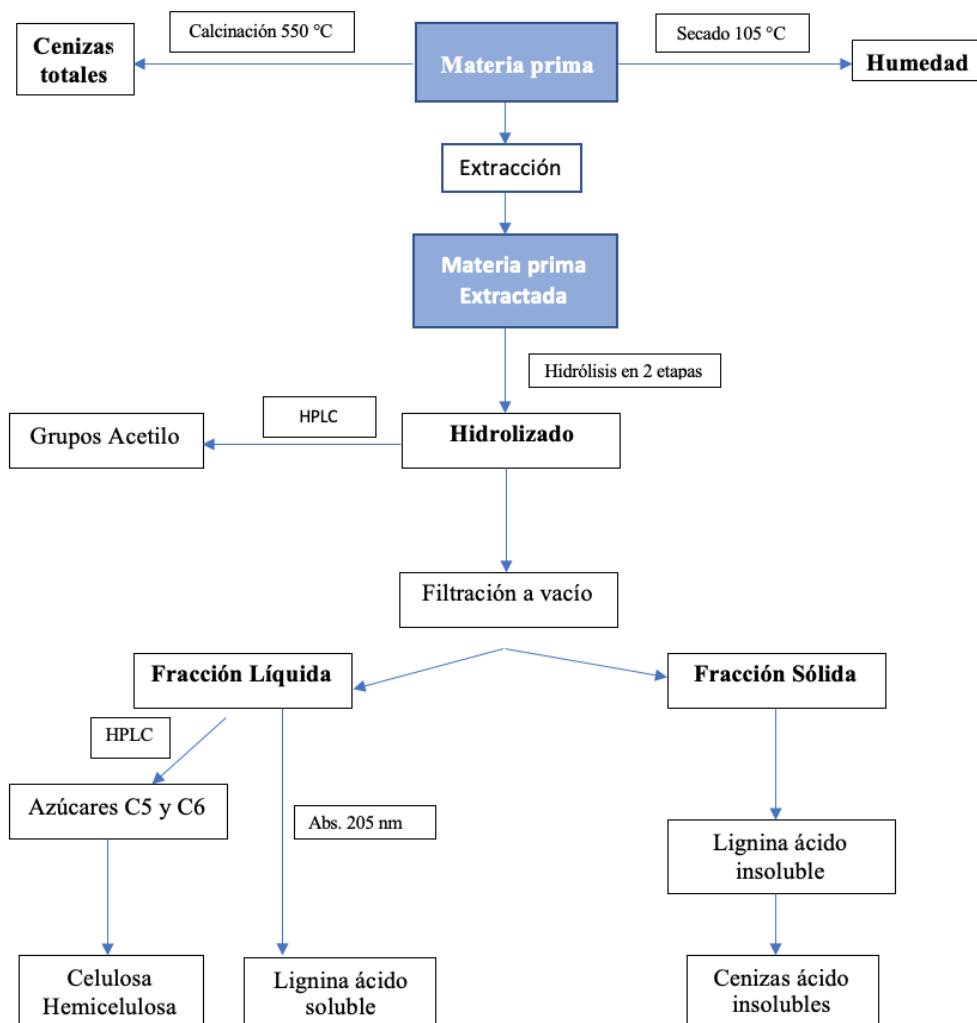


Figura 30. Procedimiento de análisis llevado a cabo para la caracterización de la materia prima.

Para la caracterización de los materiales pretratados se siguió el protocolo de métodos del NREL (ver Anexos), pero sin tener que realizar el proceso previo de extracción, determinando su contenido en carbohidratos, lignina y cenizas.

Por otra parte, se determinó también su contenido en humedad (“**Determinación de Sólidos Totales en la Biomasa**”, en apartado Anexos), tanto para la materia prima como para los materiales pretratados, con objeto de expresar todos los resultados en base a peso seco.

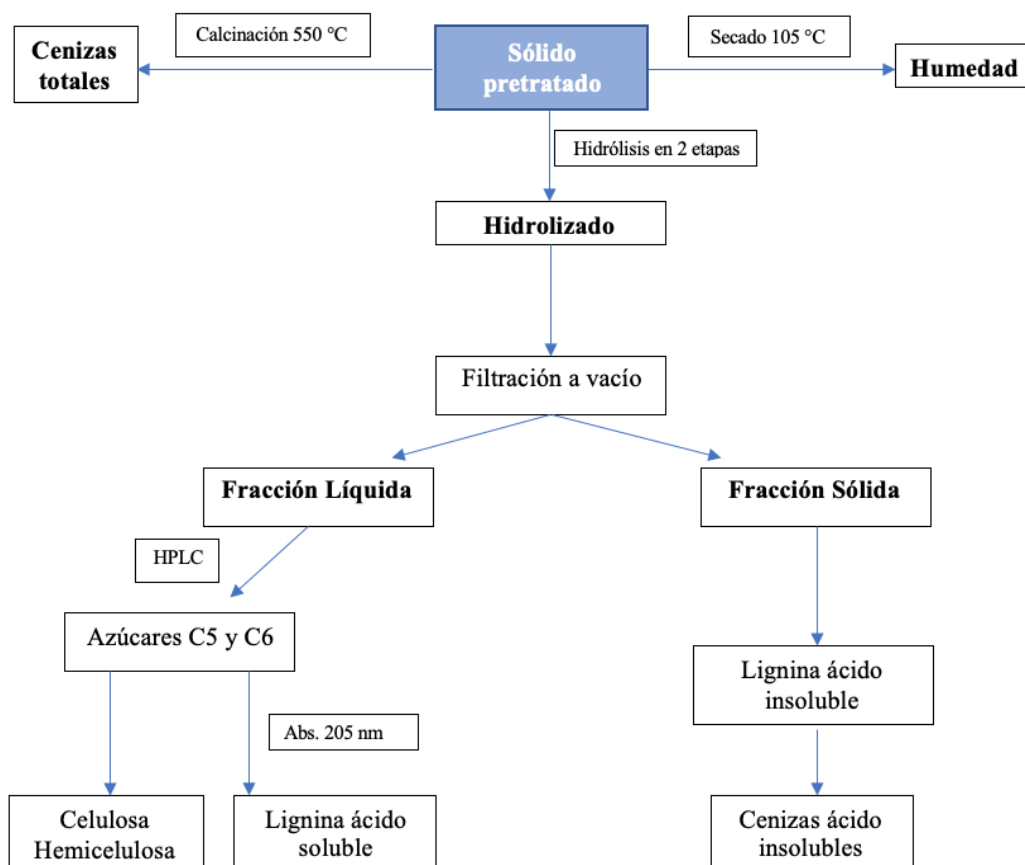


Figura 31. Procedimiento de análisis llevado a cabo para la caracterización de los materiales pretratados.

2.6.2 Caracterización de los prehidrolizados

Los azúcares (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa) e inhibidores (ácido acético, ácido fórmico, hidroximetilfurfural (HMF) y furfural) son los principales compuestos analizados en la fracción líquida o prehidrolizado tras el proceso de pretratamiento.

2.6.2.1 Azúcares

Los azúcares se analizaron mediante un cromatógrafo de líquido HPLC (High Performance Liquid Chromatography), modelo 2695 de Waters (Mildford, MA, EEUU) (Figura 32), incorporando un detector de índice de refracción (Waters 2414) y una columna cromatográfica Carbosep CHO-782, resina en forma iónica de plomo de 300

mm x 7,8 mm de diámetro interno, de la firma comercial Transgenomic (Omaha, NE, EEUU).

Se trabajó a una temperatura de 70°C y como fase móvil se utilizó agua de calidad reactiva Millipore (Billerica, MA, EEUU), a un flujo de 0,6 mL/min.

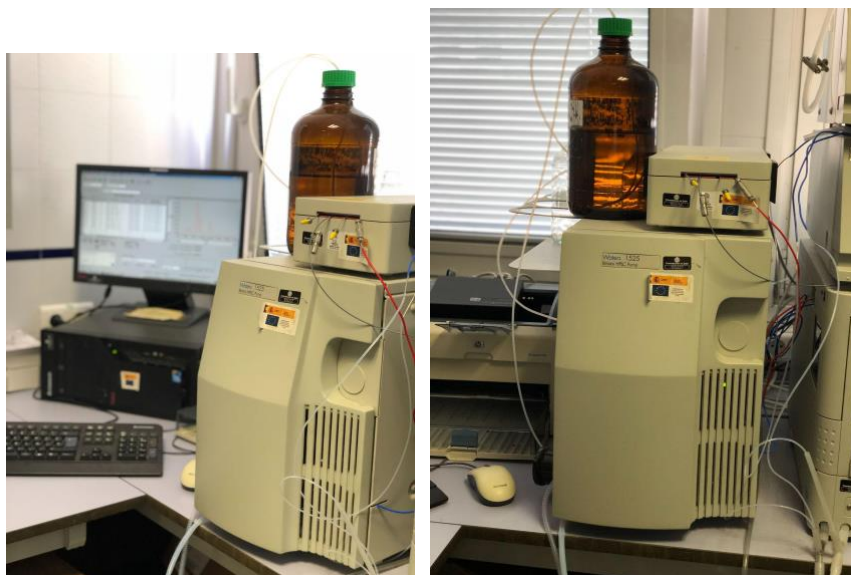


Figura 32. Cromatógrafo de líquido HPLC, mod. 2695, Waters (Mildford, MA, EEUU) (elaboración propia).

Antes de someter a las muestras a este análisis de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, se procedió a acondicionar nuestras muestras (usando una corriente de helio) pasándolas por resina de intercambio iónico, mientras que en el caso de los licores ácidos fue necesario pasarlas a su vez por carbonato cálcico para neutralizar su acidez (Figura 33).



Figura 33. Acondicionamiento de muestras para HPLC, con resina de intercambio iónico (elaboración propia).

El siguiente paso fue filtrar las muestras por las membranas de Nylon, con un tamaño de poro de 0,45 μm , y diámetro de 13 mm, para eliminar cualquier posible impureza (Figura 34). Dichas muestras, tras ser acondicionadas, se traspasaron a viales de vidrio para el análisis en el equipo de laboratorio de HPLC.



Figura 34. Filtración con membranas de Nylon de 0,45 μm para acondicionamiento de muestras para HPLC (elaboración propia).

Por otra parte, en el caso de aquellos licores que contenían azúcares oligoméricos, fue necesario llevar a cabo previamente un tratamiento denominado posthidrólisis. Este proceso se realizó con ácido sulfúrico de concentración 4% (p/V), a 121°C durante 30 minutos en el reactor autoclave, consiguiendo reducir a forma monomérica los azúcares oligoméricos.

Tras esta serie de pretratamientos, se consiguió analizar los azúcares (glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa) mientras que en el procedimiento de hidrólisis enzimática solamente se determinó glucosa.

2.6.2.2 Ácido acético y productos de degradación de azúcares

La caracterización analítica del ácido acético, al igual que la de los productos de degradación: ácido fórmico, hidroximetilfurfural (HMF) y furfural, se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de líquido HPLC (High Performance Liquid Chromatography), del fabricante Agilent Technologies, modelo 1200 Infinity Series (Alemania), incorporando un detector de índice de refracción y una columna cromatográfica BIO-RAD HPX-87H (AGILENT TECHNOLOGIES) (Figura 35).

Se trabajó a una temperatura de 65°C y de fase móvil se utilizó ácido sulfúrico 5 M, a un flujo de 0,6 mL/min.



Figura 35. Cromatógrafo de líquido HPLC, modelo 1200 Infinity Series (Alemania)
(elaboración propia).

Antes de proceder a la caracterización en el equipo, se filtraron los prehidrolizados a través de membranas de Nylon, con un tamaño de poro de 0,45 μm , y diámetro de 13 mm recogiendo el filtrado en viales de vidrio, para que pueda ser sometido a la lectura del HPLC de manera correcta (Figura 34).

2.7 Definición de variables

Para esta sección, se van a exponer las diferentes variables que se van a calcular y comparar para analizar la efectividad de los pretratamientos que se han utilizado en nuestra materia prima de sarmiento de vid.

Hay que tener en cuenta que para los cálculos correspondientes se van a utilizar valores en base al peso seco, es decir, todos los datos de materiales sólidos incluidos en las fórmulas.

- Porcentaje de Recuperación de Sólidos (% RS)

Se define como la cantidad de material sólido o residuo insoluble (RSI) obtenido después del proceso de pretratamiento, en comparación con la cantidad de materia prima que se introduce en el reactor:

$$\% \text{ RS} = \frac{\text{g sólido pretratado (g RSI)}}{\text{g materia prima seca introducida}}$$

- Concentración de un componente en el residuo sólido insoluble (RSI)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la caracterización de los materiales pretratados, se expresa el porcentaje en base al peso seco del material pretratado de cada componente del Residuo Sólido Insoluble.

$$\% \text{ componente} = \frac{\text{g componente en RSI}}{100 \text{ g RSI}}$$

- Recuperación de componentes de la materia prima tras el pretratamiento

Esta variable expresa la cantidad recuperada de cada componente sea en la fracción sólida o en la fracción líquida, respecto a su contenido en la materia prima. El porcentaje resultante, mostrará información sobre la recuperación después del pretratamiento.

➤ En la **fracción sólida**, el cálculo será:

$$\% \text{ Recuperación de componente} = \frac{\text{g componente en el RSI} \times \% \text{ RS}}{\text{g componente en la materia prima}}$$

- En la **fracción líquida**, el cálculo será:

$$\% \text{ Recuperación de componente} = \frac{\text{g componente en la FL}}{\text{g componente en la materia prima}} \times 100$$

- **Índices de degradación**

Esta variable expresa la cantidad de glucosa y azúcares hemicelulósicos que se degradan como consecuencia del pretratamiento, por lo que no estarían disponibles en el siguiente proceso de hidrólisis enzimática, ni solubilizados en el prehidrolizado.

➤ **Degradación de glucosa (DG)**

$$DG = 100 - \frac{\text{g glucosa en RSI} + \text{g glucosa en FL}}{100 \text{ g glucosa en materia prima}}$$

➤ **Degradación de azúcares hemicelulósicos (DAH)**

$$DAH = 100 - \frac{\text{g AH en RSI} + \text{g AH en FL}}{100 \text{ g AH en materia prima}}$$

- **Índices de Hidrólisis Enzimática**

Esta variable expresa la cantidad de glucosa liberada en el transcurso de este proceso en base a la cantidad de glucosa potencial en el material pretratado o materia prima.

Los siguientes índices representan la información sobre la susceptibilidad del RSI a la actividad enzimática, por lo que representa una variable importante a la hora de ver la efectividad del tratamiento.

Los índices mencionados son:

➤ **Eficacia de sacarificación (ES)**

Este índice expresa el rendimiento del proceso de hidrólisis enzimática en relación al contenido en glucosa máximo a extraer del RSI.

$$\% ES = \frac{\text{g glucosa obtenido en HE}}{\text{g glucosa en RSI}} \times 100$$

➤ Rendimiento de hidrólisis enzimática (RHE)

Este índice expresa también el rendimiento del proceso de hidrólisis enzimática en relación al contenido en glucosa potencialmente extraíble de la materia prima.

$$\% \text{ RHE} = \frac{\frac{\text{g glucosa obtenido en HE}}{\text{g RSI}} \times \% \text{ RS}}{\text{g glucosa en materia prima}}$$

- Rendimiento global de azúcares

Esta variable expresa la cantidad de azúcar de la materia prima que se convirtió en forma monomérica, es decir, aquella composición en la que podrá ser fermentado en un siguiente proceso de obtención de etanol tras la hidrólisis y el pretratamiento.

Será la suma de la cantidad de azúcar en la fracción líquida más el generado en la HE, todo en base al contenido de azúcar en la materia prima.

$$\% \text{ RGA} = \frac{\left(\frac{\text{g azúcar en HE}}{\text{g RSI}} \times \frac{\% \text{ RS}}{100} \right) + \frac{\text{g azúcar en la FL}}{\text{g materia prima}}}{\text{g azúcar en la materia prima}}$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue evaluar el potencial de transformación, tras los correspondientes procesos de fraccionamiento de sus componentes (celulosa, hemicelulosa y lignina), del residuo agrícola sarmiento de vid. Para ello, fue estudiado un proceso de pretratamiento en dos etapas a diferentes condiciones de trabajo.

Esto marca, como objetivo principal, aprovechar el sarmiento de la vid como una posible estrategia de biorrefinería, ofreciendo así una alternativa económicamente viable frente a la eliminación de este residuo agrícola (Liu y col., 2009).

De este modo, la determinación de las condiciones óptimas de pretratamiento, hizo posible la obtención de considerables rendimientos globales de azúcares en las fracciones líquidas y sólidas.

A continuación, se van a detallar los resultados obtenidos en los diferentes experimentos y en las diferentes etapas para poder evaluar el potencial de las fracciones de celulosa y hemicelulosa del sarmiento de vid para su conversión bioquímica final a etanol.

3.1. Composición de la materia prima (sarmientos de vid) y extracción con agua

La composición del sarmiento de vid inicial u original y del sarmiento de vid extraído con agua se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición del sarmiento de vid original y con previa extracción acuosa en autoclave (g/100 g biomasa).

	Sarmiento vid	Sarmiento vid extraído
Glucosa	42,18	41,60
Xilosa	19,49	18,46
Galactosa	2,17	2,15
Arabinosa	0,71	0,35
Manosa	1,10	n.d
Lignina ácido insoluble (LAI)	20,40	25,80
Lignina ácido soluble (LAS)	1,67	1,72
Grupos acetilos	2,67	n.d.
Extractos	12,52	n.d.
Cenizas	2,79	1,96

n.d: no detectado

Se puede observar que el contenido en carbohidratos (celulosa, como glucosa) y hemicelulosa (xilosa, galactosa, arabinosa y manosa) es mayor en el sarmiento inicial, es decir, antes de la previa extracción con agua en el reactor autoclave.

Dicho contenido, llega a superar el 65% del peso seco, y hace que el sarmiento de vid sea un residuo lignocelulósico muy interesante para la transformación a bioetanol.

Como puede observarse, el componente mayoritario en el sarmiento de vid es la celulosa, representando el 64,2% del total de carbohidratos presentes en esta materia prima. Por otra parte, el principal compuesto hemicelulósico en nuestra materia prima (antes y después de la previa extracción acuosa en el autoclave) es la xilosa, llegando a representar aproximadamente un 83% del contenido total en azúcares hemicelulósicos, siendo el contenido en el resto de azúcares (galactosa, arabinosa y manosa) minoritarios.

Sin embargo, la lignina ácido insoluble y soluble resulta ser mayor en el sarmiento de vid extraído debido probablemente a la pérdida de la fracción de extractos. Por tanto, usando el sarmiento de vid previamente extraído en agua conlleva la obtención de un mayor residuo de lignina después del proceso de hidrólisis enzimática.

En cuanto a los extractos o extractivos, es decir, aquellos grupos heterogéneos que constituyen entre el 4% y el 10% del peso seco, y que están formados por diferentes grasas, terpenos, alcaloides, proteínas, fenoles, pectinas gomas, resinas, etc., son grupos que actúan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o como parte del sistema de defensa frente a ataques microbianos.

Como puede observarse en la Tabla 7, el sarmiento de vid original consta de un 12,52% de extractos, que puede resultar bajo en comparación con otros tipos de residuos lignocelulósicos como la poda de olivo, con valor de 25,6% (Martínez Patiño y col., 2015), paja de colza con un 14,6% (Castro y col., 2011), paja de trigo con un valor de 14,7% (Pérez y col., 2007); o siendo ligeramente superior como en el caso de los tallos de girasol con un valor de 6,9% (Ruiz y col., 2006).

Por ello, el objetivo de este proceso previo de extracción acuosa en autoclave fue la retirada de esta fracción de extractos, ya que podrían influir negativamente en posteriores procesos de pretratamiento e hidrólisis enzimática (Martínez-Patiño y col., 2015).

3.2. Pretratamiento 1ª etapa: autoclave bajo condiciones suaves de proceso

Como se ha mencionado anteriormente, el pretratamiento llevado a cabo en esta investigación fue un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido en dos etapas. Así, en una primera etapa, el sarmiento de vid (original y extraído en agua) fue pretratado bajo condiciones de pretratamiento suaves en un reactor autoclave, siendo usadas diferentes concentraciones de ácido sulfúrico (0%, 0,5%, 1% y 2% p/V) y temperaturas (120°C y 130°C).

Una vez llevado a cabo el pretratamiento con sarmientos de vid, se obtendrán dos fracciones: una fracción líquida o prehidrolizado, y una fracción sólida o sólido pretratado, cuyas composiciones serán analizadas a continuación. Además, se realizaron test de hidrólisis enzimática usando los diferentes sólidos pretratados obtenidos, siendo sus resultados mostrados también en los siguientes subapartados.

3.2.1. Composición de los sólidos pretratados

En este apartado se analizarán los sólidos pretratados obtenidos tras el proceso de pretratamiento, siendo mostrados los resultados en la Tabla 8.

Tabla 8. Recuperación de sólidos (%) y composición de los sólidos pretratados (g/100 g sólido pretratado) obtenidos en los diferentes ensayos de pretratamiento llevados a cabo. Recuperación (%) de glucosa (RGs) y azúcares hemicelulósicos (RAHs) en los sólidos pretratados.

Experimento	RS (%)	Glucosa (g/100 g)	Xilosa (g/100 g)	Galactosa (g/100 g)	Arabinosa (g/100 g)	Manosa (g/100 g)	RGs (%)	RAHs (%)
1ª etapa: reactor autoclave								
1	95,51	40,96	18,68	1,88	0,14	n.d.	92,75	84,22
2	90,83	40,74	19,08	1,79	n.d.	n.d.	87,73	80,80
3	87,36	37,29	18,96	1,72	n.d.	n.d.	77,24	76,97
4	75,87	40,84	15,63	0,91	n.d.	1,10	73,46	57,07
5	92,56	42,14	19,19	1,94	0,22	n.d.	92,48	84,20
6	88,44	37,86	17,75	1,46	n.d.	n.d.	79,39	72,39
7	82,09	40,76	18,35	1,36	n.d.	n.d.	79,32	68,93
8	60,78	46,97	13,15	0,78	n.d.	1,08	67,68	38,89
9	98,12	45,86	18,78	2,00	0,26	n.d.	96,82	79,83
10	90,38	44,35	19,43	1,84	n.d.	n.d.	86,24	74,35
11	83,73	41,26	15,77	0,91	n.d.	n.d.	74,33	54,02
12	75,90	40,31	7,98	0,23	n.d.	n.d.	65,83	24,09
13	97,27	42,98	20,11	1,95	0,35	n.d.	89,94	84,27
14	86,46	40,23	20,72	1,50	n.d.	n.d.	74,83	74,28
15	79,96	42,81	17,38	0,92	n.d.	n.d.	73,65	56,58
16	69,54	48,80	11,81	0,27	n.d.	n.d.	73,01	32,50
2ª etapa: reactor agitado de alta presión								
170°C	84,09	55,94	2,87	n.d.	n.d.	n.d.	65,20	6,01
190°C	72,67	47,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	48,12	n.d.

RS (%): recuperación de sólido pretratado (g sólido pretratado/100 g sarmiento de vid original)

RGs (recuperación de glucosa en sólidos pretratados): g glucosa en sólidos pretratados/100 g glucosa en sarmiento de vid original

RAHs (recuperación de azúcares hemicelulósicos en sólidos pretratados): g azúcares hemicelulósicos en sólidos pretratados/100 g azúcares hemicelulósicos en sarmiento de vid original

n.d.: no detectado

Tras la solubilización de algunos componentes como extractivos y azúcares hemicelulósicos durante el pretratamiento, se observa un notable aumento del contenido en glucosa proveniente de celulosa en los sólidos pretratados obtenidos en algunos experimentos, llegándose a alcanzar hasta un valor de 48,80 g glucosa/100 g sólido pretratado ($RG_s = 73,01\%$) (experimento 16) usando sarmiento previamente extraído, y 46,97 g glucosa/100 g sólido pretratado ($RG_s = 67,68\%$) (experimento 8) partiendo del sarmiento original. Si se compara con la cantidad de glucosa referida a sarmientos de vid, 41,60 g/100 g en el sarmiento de vid extraído y 42,18 g/100 g en el sarmiento original (Tabla 7), se aprecia solamente un aumento en ambos de 5 g/100 g aproximadamente, siendo más elevado en el pretratamiento con la previa extracción acuosa. Siendo ambas obtenidas con la concentración más elevada de H_2SO_4 , 2% (p/V).

Respecto a los azúcares hemicelulósicos (siendo la xilosa el azúcar mayoritario en ambos tipos de materiales, y el resto minoritarios), se puede apreciar en general un descenso en este tipo de azúcares al aumentar la severidad del pretratamiento (temperatura y concentración de ácido sulfúrico) (Tabla 8). Así, el contenido más bajo de xilosa se ha obtenido en los experimentos donde se han usado mayores temperaturas y concentraciones de ácido ($130^\circ C$ y 2% H_2SO_4): 13,15 g xilosa/100 g sólido pretratado para el sarmiento original ($RAH_s = 38,89$) (experimento 8), y 7,98 g xilosa/100 g sólido pretratado en el caso del sarmiento extraído ($RAH_s = 24,09$) (experimento 12). Por tanto, es bajo las condiciones de pretratamiento más severas (mayor concentración de ácido y/o temperatura) cuando tiene lugar una mayor solubilización de los azúcares hemicelulósicos.

3.2.2. Composición de los prehidrolizados

A continuación, se van a analizar los resultados del contenido de la otra fracción (la fracción líquida o “prehidrolizado”) obtenida tras el pretratamiento de nuestra materia prima, a diferentes concentraciones de ácido sulfúrico y temperaturas (Tabla 9).

Dicha fracción líquida, separada de la fracción sólida, contendrá azúcares solubilizados provenientes de los extractos, y de la fracción hemicelulósica y celulósica (aunque de esta última en menor medida y solo para las condiciones más severas de pretratamiento), al igual que diferentes compuestos de degradación de la materia prima y de los mismos azúcares (Castro y col., 2009).

Los llamados prehidrolizados, pueden también ser aprovechados para la posterior producción de etanol utilizando los microorganismos correspondientes y así, contribuir a un mayor aprovechamiento de toda la materia prima para el proceso total de transformación, el cual no es el objetivo de este trabajo de investigación.

Tabla 9. Composición de azúcares (g/L) y azúcares oligoméricos (%) en los prehidrolizados o fracciones líquidas obtenidos en los diferentes ensayos de pretratamiento llevados a cabo. Recuperación (%) de glucosa (RG_L) y azúcares hemicelulósicos (RAH_L) en los prehidrolizados o fracciones líquidas.

Exp.	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Galactosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	Manosa (g/L)	Oligómeros (%)	RG _L (%)	RAH _L (%)
1ª etapa: reactor autoclave								
1	6,59	0,10	0,62	0,05	n.d.	57,20	7,81	1,64
2	12,32	0,52	1,47	1,50	n.d.	73,28	14,60	7,25
3	18,15	1,36	2,11	1,91	n.d.	74,13	21,52	10,43
4	21,16	6,96	3,11	2,48	n.d.	28,56	28,35	27,27
5	10,17	0,31	0,91	0,34	n.d.	71,12	12,05	3,32
6	17,25	0,80	2,30	2,18	0,07	77,97	20,44	9,76
7	22,39	3,53	3,54	2,70	0,27	71,06	26,54	18,65
8	18,93	16,39	4,59	2,02	0,63	10,32	25,36	53,27
9	1,17	n.d.	0,08	0,09	n.d.	87,00	1,26	0,34
10	11,84	0,58	1,56	1,87	n.d.	89,63	12,74	7,16
11	16,42	5,18	2,95	2,31	0,24	70,77	17,66	19,20
12	16,72	13,22	4,69	3,18	0,57	38,09	17,98	38,75
13	2,09	0,00	0,24	0,31	n.d.	93,09	2,25	1,07
14	18,62	3,83	2,73	2,22	0,31	84,41	20,03	16,30
15	18,45	12,30	4,33	2,88	0,55	50,73	19,85	36,22
16	17,69	23,43	7,04	5,54	1,38	4,60	19,03	60,23
2ª etapa: reactor agitado de alta presión								
170°C	21,45	2,10	0,32	n.d.	0,59	3,54	14,87	3,74
190°C	9,68	9,48	0,63	n.d.	0,99	10,65	6,71	13,82

RG_L (recuperación de glucosa en fracciones líquidas o prehidrolizados): g glucosa en prehidrolizados o fracciones líquidas/100 g glucosa en sarmiento de vid original

RAH_L (recuperación de azúcares hemicelulósicos en fracciones líquidas o prehidrolizados): g azúcares hemicelulósicos en fracciones líquidas o prehidrolizados/100 g azúcares hemicelulósicos en sarmiento de vid original

n.d.: no detectado

Respecto al contenido en compuestos oligoméricos (Tabla 9), se observa un porcentaje notablemente menor en los experimentos 4, 8, 12 y 16, donde se realiza un pretratamiento con mayor concentración de H₂SO₄ (2% p/V), obteniéndose el valor más bajo (4,60 %) en el pretratamiento con sarmiento extraído, a 130°C. Estos compuestos oligoméricos resultan de calcular el total de azúcares antes y después de la reacción de hidrólisis ácida.

Por otra parte, se observa un contenido considerable de glucosa en la mayoría de los prehidrolizados obtenidos, el cual podría provenir de los extractos presentes en la materia prima (12,52% en el sarmiento de vid original), glucosa no estructural o celulosa no amorfa, entre otras.

En cuanto al resto de los azúcares (xilosa, galactosa, arabinosa y manosa), con ambas materias primas se obtiene las concentraciones más bajas en las condiciones más

suaves, es decir, 120°C y 0% p/V de H₂SO₄ (7,36 g/L de azúcares totales (experimento 1) y 1,34 g/L de azúcares totales (experimento 9)), encontrándose la concentración más elevada de azúcares totales en el experimento 8, con un 42,56 g/L de composición total de azúcares, siendo éste aquel con condiciones más severas en cuanto a la temperatura (130°C) y concentración de H₂SO₄ (2% p/V). En cuanto a la xilosa, su contenido se incrementa también con la concentración de ácido obteniéndose hasta 16,39 g/L (experimento 8), siendo ésta la concentración de xilosa más elevada de todos los experimentos realizados con sarmiento de vid original.

Por último, para finalizar la discusión de la Tabla 9, al igual que ocurre con el sarmiento de vid original, para el caso del sarmiento de vid extraído, es para el experimento 16 (el más severo a condiciones de temperatura y concentración de H₂SO₄), para el que se obtiene el más alto contenido en azúcares totales (56,46 g/L), superando incluso la concentración de xilosa obtenida a la de glucosa con un 23,43 g/L frente a un 17,69 g/L.

Por otra parte, es necesario también analizar el contenido en productos de degradación de los prehidrolizados obtenidos en las diferentes condiciones de pretratamiento, los cuales se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Composición de compuestos inhibidores (g/L) en los prehidrolizados o fracciones líquidas obtenidas en los diferentes ensayos de pretratamiento llevados a cabo.

Experimento	Ácido Fórmico (g/L)	Ácido Acético (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)
1ª etapa: reactor autoclave				
1	0,23	0,15	0,01	0,02
2	0,25	0,17	0,02	0,02
3	0,20	0,50	0,06	0,02
4	0,11	2,74	0,15	0,03
5	0,36	0,31	0,01	0,02
6	0,27	0,24	0,05	0,02
7	0,22	0,74	0,13	0,03
8	0,13	3,64	0,46	n.d.
9	0,05	0,11	0,01	0,02
10	0,05	0,32	0,01	0,02
11	0,06	1,65	0,02	0,03
12	0,07	4,27	0,04	0,03
13	0,08	0,18	0,01	0,02
14	0,07	0,71	0,02	0,03
15	0,07	2,96	0,04	0,03
16	0,11	6,82	0,10	0,11
2ª etapa: reactor agitado de alta presión				
170°C	0,82	1,44	0,16	0,88
190°C	1,17	1,82	2,30	2,78

Así, en general, se puede observar que el ácido acético es el compuesto inhibidor que se encuentra en una mayor concentración (0,11-6,82 g/L), aumentando su concentración de manera notable a medida que las condiciones de pretratamiento son más severas, obteniéndose por tanto las mayores concentraciones cuando se usó la concentración de ácido sulfúrico más alta (2% p/V). Con el sarmiento extraído, lo que sucede es que tanto el ácido fórmico, como el hidroximetilfurfural y el furfural, mantienen en general unas concentraciones muy bajas, por debajo de 0,11 g/L. Sin embargo, el ácido acético mantiene un comportamiento parecido a cuando se usó sarmientos de vid original, aumentando su concentración según aumenta la severidad del pretratamiento, con un máximo de 6,82 g/L en el experimento 16, siendo esta concentración mayor a la obtenida usando sarmiento original (6,82 g/L vs 3,64 g/L).

Así, en resumen, salvo para el ácido acético, la concentración de compuestos inhibidores obtenida fue baja en todos los experimentos llevados a cabo. Hay que considerar que, para nuestro objetivo, nos interesa la menor concentración posible de estos compuestos llamados inhibidores, ya que dificultan el proceso de fermentación a los microorganismos que participan en el subsiguiente proceso de producción de etanol, aunque este no sea el objetivo de este trabajo.

3.2.3. Hidrólisis enzimática

El objetivo de este trabajo de investigación es el de asegurar un pretratamiento lo más eficiente posible para conseguir que la celulosa quede perfectamente accesible al ataque enzimático, consiguiendo así glucosa en forma monomérica que pueda ser fácilmente transformada en etanol en la subsiguiente etapa de fermentación.

Con esta finalidad, se van a someter a los sólidos pretratados obtenidos en el anterior proceso de pretratamiento (a diferentes temperaturas y concentraciones de H_2SO_4), a dicho ataque enzimático, de forma que se romperán las cadenas de glucosa contenidas en la celulosa desestructurada anteriormente, por medio de la enzima Cellic CTec2, y siendo combinado con un 10% de enzima β -glucosidasa para romper los enlaces de los disacáridos que puedan quedar.

A cada sólido pretratado, se le realizó el siguiente experimento por triplicado, de manera que se consiguieron unos valores más representativos, como se indica en el apartado de Materiales y Métodos del presente TFM, teniendo en cuenta, y anotando cada 24 horas, hasta las 72 horas, la concentración de glucosa conseguida, como se analizarán con las siguientes Figura 1 y Figura 2.

La Figura 36 muestra las concentraciones de glucosa obtenidas después de 72 h de hidrólisis enzimática, usándose los sólidos pretratados obtenidos en las diferentes condiciones de pretratamiento ensayadas. Así, se puede observar que para la mayor concentración de H_2SO_4 usada (2% p/V), para cada temperatura y ambos tipos de sarmiento, disminuye la concentración de glucosa debido a la alta severidad del pretratamiento, obteniendo menores valores en los experimentos 4 y 12 (120°C y 2% H_2SO_4), tanto usando sarmiento original como extraído.

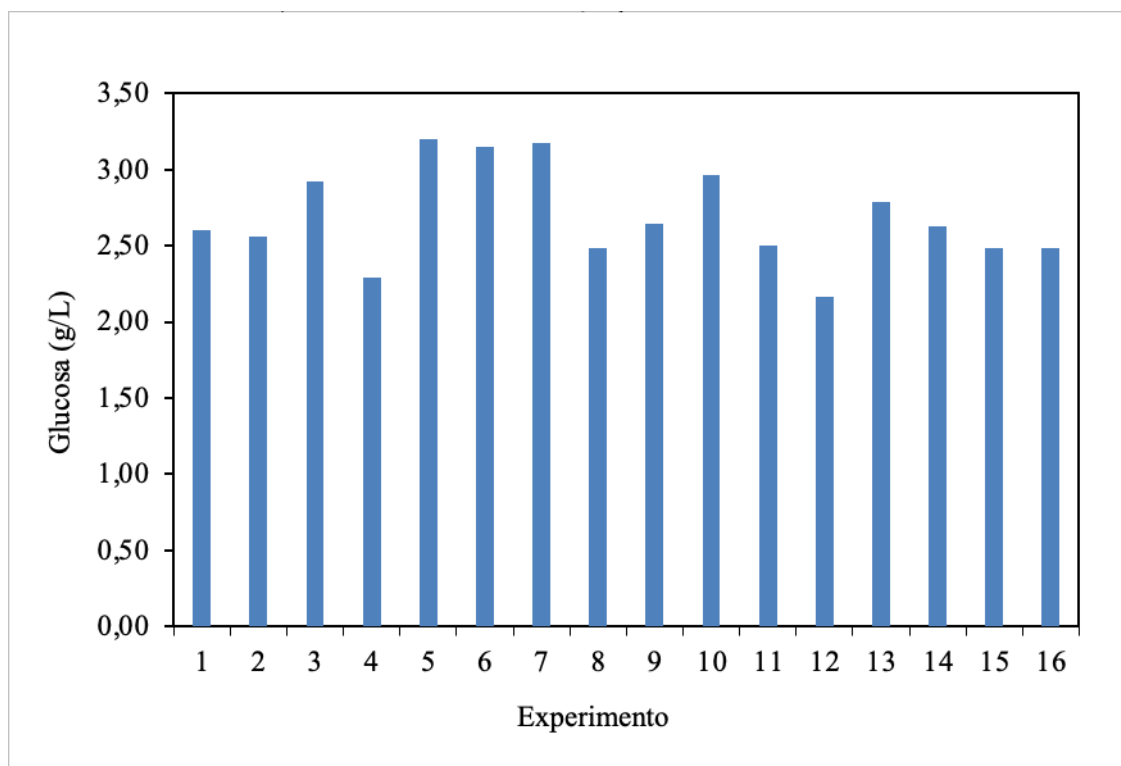


Figura 36. Concentración de glucosa (g/L) obtenidos en el proceso de hidrólisis enzimática (72 h) usando los diferentes sólidos pretratados obtenidos en la 1ª etapa de pretratamiento.

Por otra parte, los resultados más elevados se han obtenido en los experimentos 5, 6 y 7 (aproximadamente 3,20 g/L) para el sarmiento original, siendo todos estos experimentos realizados a 130°C; mientras que para el sarmiento extraído la mayor concentración de glucosa (2,96 g/L) se consiguió en uno de los experimentos menos severos, experimento 10 (120°C y 1% H₂SO₄). Así, se puede observar que las concentraciones de glucosa obtenidas han sido muy similares independientemente del uso de sarmiento original o extraído.

Por otra parte, la Figura 37 representa la digestibilidad enzimática obtenida en las diferentes condiciones de pretratamiento llevados a cabo, representando esta respuesta los gramos de glucosa obtenidos por hidrólisis enzimática/100 g glucosa contenida en el sólido pretratado. Así, se observa que esta respuesta, que varía entre 10 y 17%, es menor en las condiciones más severas de concentración de ácido (experimento 4, 8, 12 y 16). En general, y salvo para el caso de los experimentos llevados a cabo con sarmiento original a 120°C, la concentración de H₂SO₄ que consigue mejores resultados de digestibilidad enzimática es 0,5% p/V, variando poco entre condiciones de 120°C y 130°C, como demuestran por ejemplo los experimentos 10 y 14, respecto al sarmiento de vid extraído.

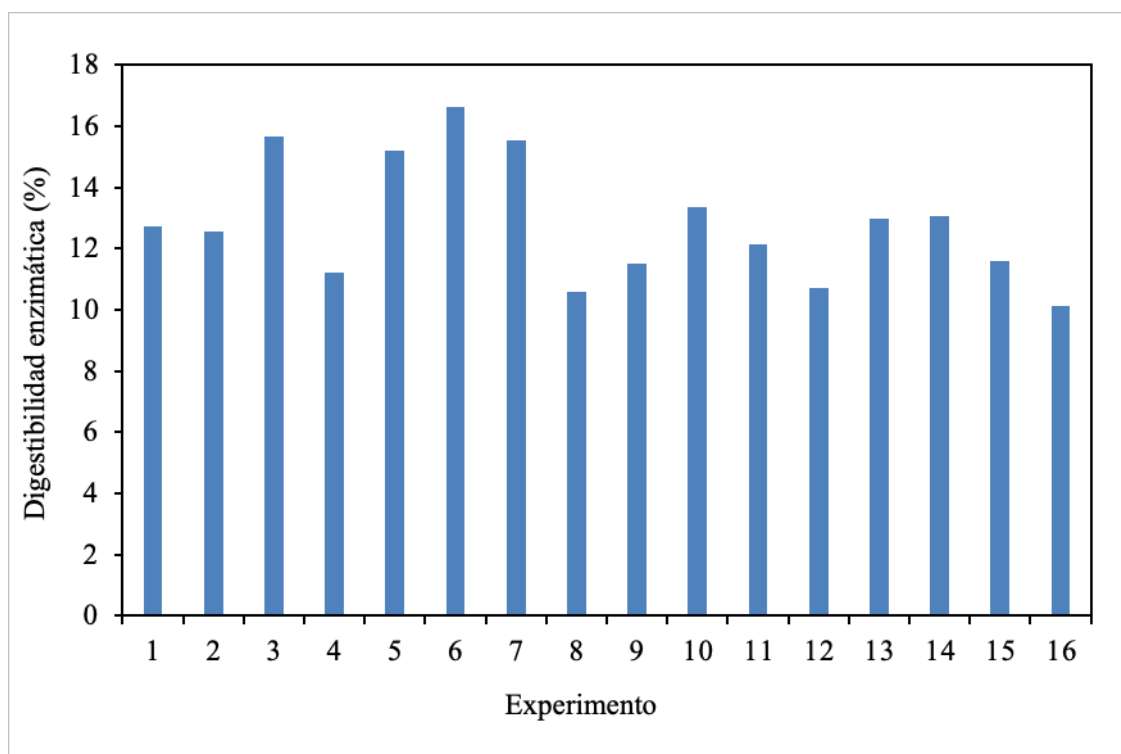


Figura 37. Digestibilidad enzimática (gramos de glucosa obtenidos por hidrólisis enzimática/100 g glucosa en sólido pretratado) obtenidos en el proceso de hidrólisis enzimática (72 h) usando los diferentes sólidos pretratados obtenidos en la 1ª etapa de pretratamiento.

Cabe destacar que, cuanto mayor sea la digestibilidad enzimática, más glucosa se obtendrá y, por tanto, mayores concentraciones de etanol se podrán conseguir en un subsiguiente proceso de fermentación.

Finalmente, la Figura 38 representa los porcentajes de Recuperación global de azúcares obtenidos en los diferentes pretratamientos realizados con ambas materias primas.

Así, los mayores valores de azúcares (44,4%) que posteriormente podrían ser utilizados en el proceso de fermentación para la conversión a etanol fueron alcanzados en las condiciones de pretratamiento más severas (experimento 16: 130°C y 2% H₂SO₄, usando sarmiento de vid extraído). Sin embargo, la menor recuperación global de azúcares (9,8%) se obtuvo en las condiciones más suaves de pretratamiento (experimento 9: 120°C y 0% H₂SO₄), también usando sarmiento de vid extraído.

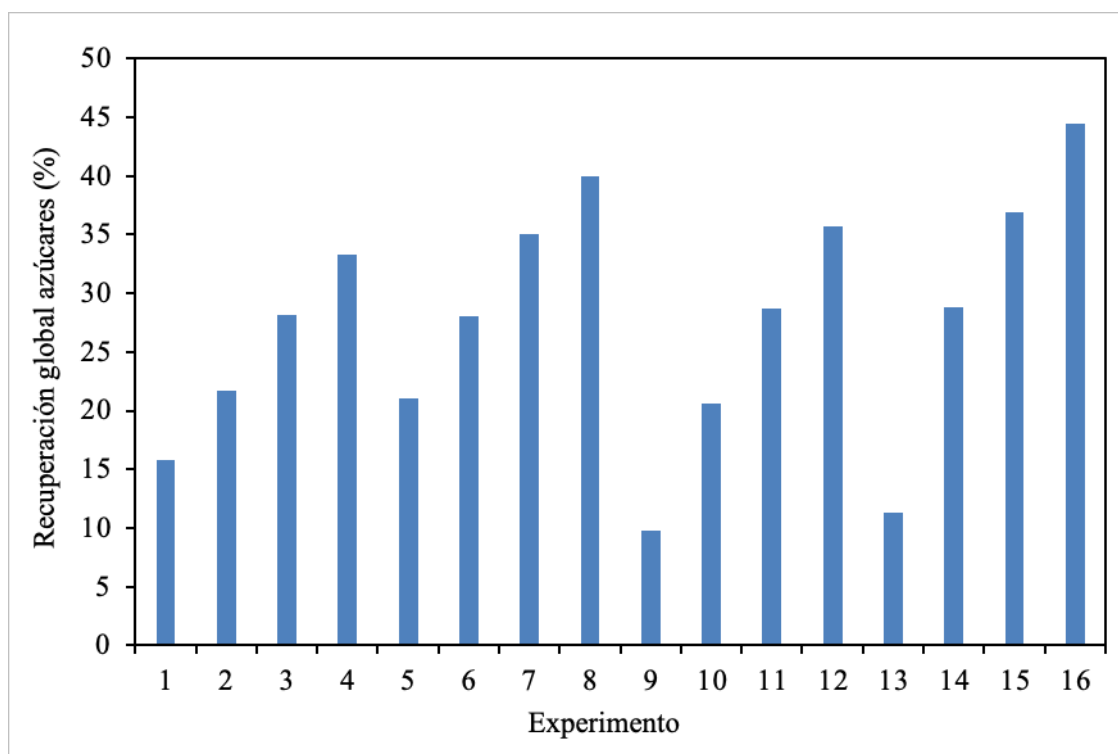


Figura 38. Recuperación global de azúcares (g azúcares obtenidos en los hidrolizados enzimáticos y prehidrolizados/100 g azúcares totales en sarmiento de vid original) obtenidos en los diferentes experimentos de 1ª etapa de pretratamiento llevados a cabo.

Por tanto, el experimento 16 (130°C y 2% H₂SO₄, usando sarmiento de vid extraído) fue seleccionado como el mejor de los pretratamientos llevados a cabo en esta 1ª etapa de pretratamientos en autoclave bajo condiciones suaves de proceso.

3.3. Pretratamiento 2ª etapa: reactor alta presión bajo condiciones severas de proceso

En esta 2ª etapa de proceso, el sólido pretratado obtenido en las condiciones seleccionadas como mejores en la 1ª etapa de pretratamiento (experimento 16) y que han sido mencionadas anteriormente, se sometieron a dos diferentes pretratamientos en un reactor agitado de alta presión y bajo condiciones severas de proceso (170°C y 190°C, 0,5 % H₂SO₄, 5 min).

3.3.1. Composición de los sólidos pretratados

La Tabla 8 muestra también la composición de los sólidos pretratados obtenidos en esta 2ª etapa de pretratamiento. Así, se aprecia en ambos pretratamientos la presencia de altos contenidos de glucosa (procedente de la fracción de celulosa) en los sólidos pretratados, alcanzándose el valor más elevado a 170°C, con 55,94 g glucosa/100 g

sólido pretratado ($RG_s = 65,20\%$) respecto a los 47,77 g/100 gramos ($RG_s = 48,12\%$) del mismo proceso pero a 190°C.

En cuanto a los azúcares hemicelulósicos, en esta 2ª etapa, casi no se observa su presencia en ambas temperaturas, detectándose solo 2,87 g de xilosa/100 g sólido pretratado en el pretratamiento a 170°C ($RAH_s = 6,01\%$), y sin ser detectado nada a 190°C.

Por tanto, una muy considerable solubilización de azúcares hemicelulósicos tuvo lugar en esta 2ª etapa de pretratamiento bajo las condiciones de proceso ensayadas.

3.3.2. Composición de los prehidrolizados

La composición en azúcares y compuestos inhibidores de los prehidrolizados obtenidos en la 2ª etapa de pretratamiento son mostrados también en las Tablas 9 y 10.

En primer lugar, respecto al contenido en azúcares (Tabla 9), se observa un bajo contenido en azúcares oligoméricos, por debajo de 11 %, en comparación con los obtenidos en general para la 1ª etapa de pretratamiento. Por tanto, la mayor parte de los azúcares serán encontrados como monómeros en los prehidrolizados obtenidos en la 2ª etapa de pretratamiento.

En cuanto a la cantidad de glucosa (Tabla 9), cabe destacar que, aunque se parte del sarmiento extraído, el cual contiene menos extractos, en el pretratamiento a 170°C se obtiene más glucosa (21,45 g/L) que en todos los experimentos de la 1ª etapa (salvo el experimento 7, donde se obtenían 22,39 g/L glucosa en el prehidrolizado). Por otra parte, comparando los dos pretratamientos llevados a cabo en la 2ª etapa, se observa un menor contenido de glucosa (9,68 g/L) en el prehidrolizado resultante del pretratamiento a 190°C ($RG_L = 6.71$ vs 14,87%), lo cual puede ser debido a reacciones de degradación de este azúcar bajo condiciones más severas de proceso. Este hecho está de acuerdo con la obtención de un mayor contenido de HMF a 190°C (2,30 vs 0,16 g/L), habiendo sido demostrado que el HMF se origina como consecuencia de la degradación de hexosas, en este caso principalmente glucosa (Martínez Patiño, 2015).

Considerando los azúcares hemicelulósicos (Tabla 9), el azúcar hemicelulósico mayoritario ha sido la xilosa en ambos pretratamientos (2,10 g/L vs 9,48 g/L, a 170°C y 190°C, respectivamente) con una concentración de azúcares totales a 170°C de 24,46 g/L y 20,78 g/L a 190°C. Estos valores son comparables a los obtenidos en el pretratamiento de la materia prima bagazo de cerveza usando también ácido sulfúrico diluido asistido por microondas en condiciones severas (33,2 g/L, a 145°C y 1 % H_2SO_4) (Rojas-Chamorro y col., 2020).

Por otra parte, referente al contenido en productos de degradación en los prehidrolizados obtenidos en la 2ª etapa (Tabla 10), se muestran valores similares de ácido fórmico (0,82 vs 1,17, a 170°C y 190°C, respectivamente) y ácido acético (1,44 vs 1,82, a 170°C y 190°C, respectivamente), diferenciándose solamente de forma considerable en el contenido en HMF (0,16 g/L vs 2,30 g/L, a 170°C y 190°C, respectivamente) y furfural (0,88 g/L vs 2,78 g/L, a 170°C y 190°C, respectivamente).

Este hecho es debido a la degradación de glucosa que genera HMF, y de azúcares hemicelulósicos (como xilosa y arabinosa) que originan furfural (Martínez Patiño, 2015). Comparando con el estudio anterior comentado de bagazo de cerveza (Rojas-Chamorro y col., 2020), en ese caso se obtuvieron valores menores para el caso del ácido acético (<0,3 g/L) e HMF (<0,6 g/L), al igual que para el ácido fórmico. Sin embargo, para el caso del furfural, se llegaron a alcanzar mayores valores que los obtenidos en este trabajo (hasta 3,5 g/L) en las condiciones más severas de pretratamiento ensayadas (Rojas-Chamorro y col., 2020). Estos resultados también se pueden comparar con otro pretratamiento del bagazo de cerveza en el que también se usó ácido sulfúrico, donde en el experimento con las condiciones óptimas para la recuperación de carbohidratos (130°C con 1% H₂SO₄) se obtuvieron 1,17 g/L de ácido acético, 0,31 g/L de furfural, no detectándose en ese caso ni HMF ni ácido fórmico (Rojas-Chamorro y col., 2020).

3.3.3. Hidrólisis enzimática

La Figura 39 muestra los resultados de hidrólisis enzimática (concentración de glucosa, en g/L) obtenidos con los sólidos pretratados resultantes del experimento seleccionado como mejor en la 1ª etapa de proceso así como en la 2ª etapa de pretratamiento. Así, en general se observa una mejora de la concentración de glucosa en la 2ª etapa de pretratamiento, siendo más efectivo el pretratamiento realizado a mayor temperatura (190°C), donde se llegan a alcanzar hasta 9 g/L glucosa a las 72 h de hidrólisis enzimática (en comparación con 6,56 y 2,42 g/L glucosa obtenidos a 170°C y en el experimento 16, respectivamente).

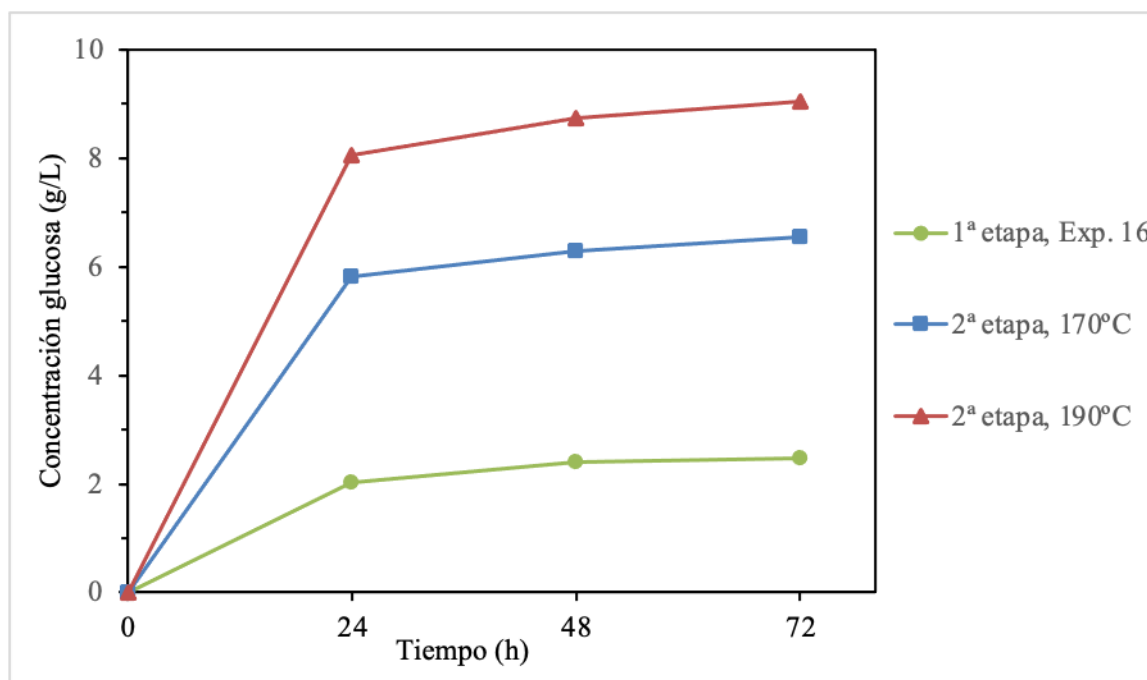


Figura 39. Concentración de glucosa producida a lo largo del proceso de hidrólisis enzimática con sólidos pretratados obtenidos en la primera y segunda etapa de pretratamiento.

Por otra parte, se puede destacar que para los tres casos de hidrólisis enzimática comparados en la Figura 4, el mayor progreso en el nivel de concentración de glucosa se da en las primeras 24 horas de hidrólisis enzimática, siendo más pronunciado en la etapa a 190°C, manteniéndose más leve el incremento entre las 24 y 48 h, y siendo mínimo en las últimas 24 horas. Este hecho ha sido también observado por otros autores en la hidrólisis enzimática de la paja de colza pretratada con ácido sulfúrico diluido en diseños de experimentación muy similares a los empleados en este TFM (López-Linares y col., 2014).

Siguiendo con la comparación entre los dos pretratamientos realizados en la 2ª etapa, la Figura 40 muestra los valores de digestibilidad enzimática obtenidos, expresados como los gramos de glucosa obtenidos por hidrólisis enzimática/100 gramos de glucosa en sólido pretratado. De esta forma, al igual que había sido mostrado para la concentración de glucosa obtenida en la hidrólisis enzimática (Figura 39), la digestibilidad enzimática es claramente más notable a 190°C, con 37,84% frente a 23,46% obtenido a 170°C.

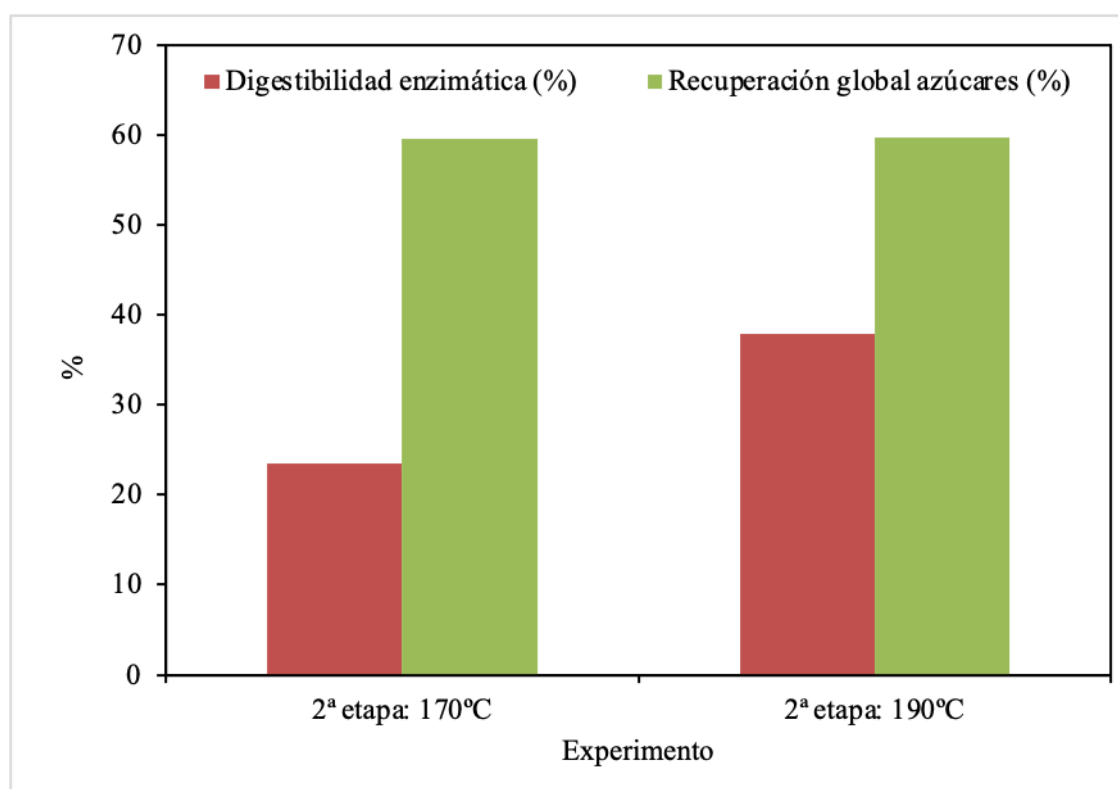


Figura 40. Digestibilidad enzimática (g glucosa obtenidos por hidrólisis enzimática/100 g glucosa en sólido pretratado) y Recuperación global de azúcares (g azúcares obtenidos en los hidrolizados enzimáticos y prehidrolizados obtenidos en la primera y segunda etapa de pretratamiento/100 g azúcares totales en sarmiento de vid original) obtenidos en los diferentes experimentos de 2ª etapa de pretratamiento llevados a cabo.

Comparado con ensayos de hidrólisis enzimática de otros estudios, los resultados obtenidos en este trabajo son mejores que los obtenidos por Garita-Cambronero y col.

(2021), quienes usando la misma materia prima (sarmiento de vid) pretratada con H_2SO_4 (1,72% de H_2SO_4 , 134 °C, 17 min y 10% de carga de sólido), consiguieron una digestibilidad enzimática del 28,25%.

Finalmente, en cuanto a la recuperación global de azúcares, expresada como g azúcares obtenidos en los hidrolizados enzimáticos y prehidrolizados resultantes en la primera y segunda etapa de pretratamiento/100 g azúcares totales en sarmiento de vid original), la cual es mostrada también en la Figura 5, se observan valores muy similares para ambos pretratamientos realizados en la 2ª etapa (aprox. 59,6%). Estos resultados son mejores que los obtenidos en el estudio antes mencionado de sarmiento de vid pretratado con H_2SO_4 (1,72% de H_2SO_4 , 134 °C, 17 min y 10% de carga de sólido) (recuperación global de azúcares = 44,46%) (Garita-Cambronero y col., 2021).

4. CONCLUSIONES

Para finalizar este trabajo de investigación se van a exponer una serie de conclusiones elaboradas gracias al análisis de los resultados obtenidos en los experimentos:

El sarmiento de vid ha resultado ser una materia prima muy interesante para la producción de etanol de una manera sostenible, debido a su alto contenido en celulosa y hemicelulosas, y su cantidad baja de extractivos, lo cuales dificultan dicha transformación en las diferentes etapas de pretratamientos, hidrólisis y fermentación.

La comparación entre diferentes pretratamientos ha servido para valorar que la extracción acuosa previa de la materia prima en autoclave mejora la disponibilidad de ésta para los siguientes procesos, debido a la eliminación de extractivos, aunque pueda suponer una pequeña pérdida de azúcares.

El pretratamiento en reactor autoclave con ácido sulfúrico diluido en condiciones suaves (1ª etapa) y a continuación en condiciones más severas en un reactor a presión (2ª etapa), en este caso utilizando el mejor resultado obtenido en la primera etapa, ha resultado ser un proceso idóneo para el pretratamiento del sarmiento de vid, como residuo lignocelulósico para obtener bioetanol.

Respecto a la primera etapa de pretratamiento, con el sarmiento original se han conseguido recuperaciones de glucosa en el sólido pretratado alrededor del 92% en las condiciones donde no se emplea ácido, aunque la recuperación de glucosa más alta (96,82%) se ha obtenido en las condiciones más suaves (120°C y 0% de H₂SO₄) usando sarmiento extraído. Tras la segunda etapa, la recuperación de glucosa desciende tanto a 170°C como a 190°C con 65,20% y 48,12%, respectivamente.

Por otra parte, se obtienen mayores solubilizaciones de los azúcares hemicelulósicos en las condiciones más severas de temperatura y concentración de H₂SO₄. Es necesario destacar que el aprovechamiento del prehidrolizado para la conversión a etanol puede resultar crucial para aportar más valor a este proceso.

El mayor contenido en azúcares totales (56,46 g/L) en la primera etapa se obtiene usando sarmiento de vid extraído en las condiciones más severas de temperatura y concentración de ácido (130°C y 2 % de H₂SO₄), con 23,43 g/L de xilosa y 17,69 g/L de glucosa. Sin embargo, en la segunda etapa de pretratamiento, a 170°C con 21,45 g/L de glucosa y a 190°C con 9,68 g/L de glucosa, se concluye que un aumento de las severidades en temperatura genera una degradación de estos azúcares. Este hecho a su vez puede ser perjudicial, ya que puede llegar a generar mayor cantidad de inhibidores como el HMF.

Por otra parte, considerando los valores de recuperación global de azúcares, en la primera etapa de pretratamiento se obtiene el mejor resultado en aquellos pretratamientos realizados en las condiciones de 130°C con un 2% de H₂SO₄, y usando sarmiento de vid extraído, con un 44,43% de azúcares recuperados, que luego serán utilizados en el proceso de fermentación. Le sigue de cerca el 39,94% de azúcares recuperados utilizando el sarmiento de vid sin extraer. Aquí se observa un efecto positivo gradual de la temperatura con la concentración de H₂SO₄.

Tras compararse el mejor resultado de la primera etapa y los dos experimentos de la segunda etapa, se observa que, a más alta temperatura, mayores valores de concentraciones de glucosa se alcanzan tras la hidrólisis enzimática: 9,04, 6,56 y 2,48 g/L (190°C, 170°C y 130°C, respectivamente). Bajo las condiciones de segunda etapa a 190°C se obtienen los mejores resultados con una digestibilidad enzimática de 37,83%, entendiendo el resultado como g de glucosa obtenidos por hidrólisis enzimática/100 g de glucosa en sólido pretratado, siendo la recuperación global de azúcares del 59,63% (entendidos como g azúcares obtenidos en los hidrolizados enzimáticos y prehidrolizados obtenidos en la primera y segunda etapa de pretratamiento/100 g azúcares totales en sarmiento de vid original).

En España, el transporte es uno de los sectores donde más energía se consume, por lo tanto, sería importante priorizar los biocarburantes, ya que a parte de fomentar una energía más limpia que contamina menos al medio ambiente, ahorraría al ser humano problemas de salud.

Como última conclusión general, se ha demostrado que este residuo lignocelulósico cuenta con unas características intrínsecas bastante interesantes en cuanto a contenido en celulosa para su transformación a bioetanol final. Se parte de una fuente de energía que no compite con la alimentación, al formar parte del bioetanol de segunda generación, es decir, producido de manera sostenible, y que forma parte de una economía agrícola de la que se puede aprovechar y desarrollar más su potencial. De manera intrínseca, esta propuesta para biorrefinería promueve el cumplimiento de muchos de los ODS, y al ser una materia prima de la que actualmente no hay mucha bibliografía, se pueden investigar las diferentes condiciones de proceso que permitan conseguir un mayor rendimiento de pretratamiento y una mayor concentración de azúcares, así como el aprovechamiento de todas sus fracciones, lo cual podría derivar en la producción de una mayor cantidad de bioetanol.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Zogaj., Nimtz M., Rohde M., Bokranz W., Romling U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39, 1452-1463.
- Cheah, W., Sankaran, R., Show, P., Tg. Ibrahim, T., Chew, K., Culaba, A., Chang, J. (2020). Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: current advances, challenges and future prospects. *Biofuel Research Journal*, 7(1), 1115-1127.
- Sun, R., Fang, J. M., Rowlands, P., Bolton, J. (1998). Physicochemical and thermal characterization of wheat straw hemicelluloses and cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2804–2809.
- Fengel, D., Wegener, G. (n.d.). *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*.
- Brett, C. T., Waldron, K., Waldon, K. (1990). *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. Kluwer Academic.
- IRENA, 2021. <https://www.irena.org/> (último acceso 24-11-21).
- Ravindran, R., Jaiswal, S., Abu-Ghannam, N., Jaiswal, A. K. (2018). A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. *Bioresource Technology*, 248(Pt A), 272-279.
- Rojas-Chamorro, J. A., Romero, I., López-Linares, J. C., Castro, E. (2020). Brewer's spent grain as a source of renewable fuel through optimized dilute acid pretreatment. *Renewable Energy*, 148, 81–90.
- Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino (MARM), 2017. Superficie y producciones de cultivos. Viñedo.

- Bulkan, G., Ferreira, J. A., Taherzadeh, M. J. (2021). Retrofitting analysis of a biorefinery: Integration of 1st and 2nd generation ethanol through organosolv pretreatment of oat husks and fungal cultivation. *Bioresource Technology Reports*, 15(100762), 1
- Martínez-Patiño, J. C., Romero-García, J. M., Ruiz, E., Oliva, J. M., Álvarez, C., Romero, I., Negro, M. J., Castro, E. (2015). High solids loading pretreatment of Olive tree pruning with dilute phosphoric acid for bioethanol production by *Escherichia coli*. *Energy & Fuels: An American Chemical Society Journal*, 29(3), 1735–1742. doi : [10.1021/ef502541r](https://doi.org/10.1021/ef502541r).
- Satari, B., Karimi, K., Kumar, R. (2019). Cellulose solvent-based pretreatment for enhanced second-generation biofuel production: a review. *Sustainable Energy & Fuels*, 3(1), 11–62.
- Qu, W., Yang, J., Sun, X., Bai, X., Jin, H., Zhang, M. (2021). Towards producing high-quality lignin-based carbon fibers: A review of crucial factors affecting lignin properties and conversion techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*
- NREL, (National Renewable Energy Laboratory). Biomass Compositional Analysis Laboratory Procedures. “**Determinación de los sólidos totales en Biomasa**” (2008), “**Determinación de Carbohidratos en la Biomasa mediante HPLC**”. (2008), “**Determinación de Lignina Ácido Insoluble en Biomasa**” (2008), “**Determinación de Lignina Ácido Soluble**” (2008), “**Determinación de Cenizas en la Biomasa**” (2008), “**Determinación de Extractivos en la Biomasa**” (2008) and “**Determinación de grupos acetilo en biomasa mediante HPLC**” (2006). NREL, Golden, CO, EEUU. <https://www.nrel.gov/bioenergy/biomass-compositional-analysis.html> (último acceso 20-11-21).
- Hassan, S. S., Williams, G. A., Jaiswal, A. K. (2018). Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 262, 310–318.
- Garita-Cambronero, J., Paniagua-García, A. I., Hijosa-Valsero, M., Díez-Antolínez, R. (2021). Biobutanol production from pruned vine shoots. *Renewable Energy*, 177, 124–133.

- Duque, A., Álvarez, C., Doménech, P., Manzanares, P., Moreno, A. D. (2021). Advanced bioethanol production: From novel raw materials to integrated biorefineries. *Processes (Basel, Switzerland)*, 9(2), 206.
- Agencia Internacional de la Energía (2021). <http://www.iea.org/> <https://www.iea.org/fuels-and-technologies/bioenergy> (último acceso 29-11-21).
- APPA, Asociación de Productores de Energías Renovables (2021). <https://www.appa.es/> (último acceso 21-11-21).
- APPA, Renovables en España y en Europa, 2021. <https://www.appa.es/energias-renovables/renovables-en-espana/>; <https://www.appa.es/energias-renovables/renovables-en-el-mundo-y-en-europa/> (último acceso 21-11-21).
- APPA, 2019. Balances del mercado español. Los biocarburantes en España en 2019. <https://www.appa.es/appa-biocarburantes/balances-del-mercado-espanol/> (último acceso 29-11-21).
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V., Verma, P. (2020). Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology*, 199(106244), 106244.
- Solomon, B. D., Barnes, J. R., Halvorsen, K. E. (2007). Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass & Bioenergy*, 31(6), 416–425.
- Gebremariam, S. N., Marchetti, J. M. (2018). Economics of biodiesel production: Review. *Energy Conversion and Management*, 168, 74–84.
- Galbe, M., Wallberg, O. (2019). Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 294.
- Lemos, P., Mesquita, F. C. (2016). Future of global bioethanol: An appraisal of results, risk and uncertainties. In *Global Bioethanol* (pp. 221–237). Elsevier.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 578–597.

- Nabais, J. M. V., Laginhas, C., Carrott, P. J. M., Carrott, M. M. L. R. (2010). Thermal conversion of a novel biomass agricultural residue (vine shoots) into activated carbon using activation with CO₂. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 87(1), 8-13.
- Robak, K., & Balcerek, M. (2020). Current state-of-the-art in ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Microbiological Research*, 240(126534), 126534.
- Liu, L., Sun, J., Cai, C., Wang, S., Pei, H., & Zhang, J. (2009). Corn stover pretreatment by inorganic salts and its effects on hemicellulose and cellulose degradation. *Bioresource Technology*, 100(23), 5865–5871.
- Nobles, D. R., Romanovicz, D. K., & Brown, R. M., Jr (2001). Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase?. *Plant physiology*, 127(2), 529–542.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., Zacchi, G. (2006). Bioethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12), 549–556.
- Biorrefinería.blogspot, 2017.
<https://biorrefineria.blogspot.com/2017/09/el-sector-del-etanol-en-espana-segun-el-USA-FAS.html> (último acceso 29-11-21).
- Cardona, C. A., Sánchez, O. J. (2007). Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98(12), 2415–2457.
- Castro E., Díaz M.J., Cara C., Ruiz E., Romero I., Moya M. (2011). Dilute acid pretreatment of rapeseed Straw for fermentable sugar generation. *Bioresour Technol* 102, 1270-1276.
- Castro E., Ruiz E., Moya M., Romero I., Cara C., Díaz M.J. (2009). La poda del olivar: avances hacia el Desarrollo de una biorrefinería. *Residuos* 110, 38-44.
- López-Linares, J. C., Romero, I., Cara, C., Ruiz, E., Moya, M., Castro, E. (2014). Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. *Fuel (London, England)*, 122, 112–118.
- CMNUCC, Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (2021).
https://unfccc.int/es/kyoto_protocol (último acceso 27-11-21).

- Baruah, J., Nath, B. K., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D. C., Kalita, E. (2018). Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Frontiers in Energy Research*, 6.
- Wyman, C. E. (1996). *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. CRC Press.
- Comisión Europea (1997), Libro Blanco de la Comisión Europea. Enseñar y aprender: hacia la sociedad del conocimiento. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/es/IP_97_457 (último acceso 11-11-21).
- Comisión Europea (2017), Libro Blanco sobre el futuro de Europa. https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/libro_blanco_sobre_el_futuro_de_europa_es.pdf (último acceso 23-11-2021).
- Comisión Europea (2021). https://ec.europa.eu/info/policies/energy_es#policies ; https://ec.europa.eu/info/policies/energy_es (último acceso en 29-11-21).
- APPA, 2017. Research and Innovation perspective of the mid – and long-term Potential for Advanced Biofuels in Europe. <https://www.appa.es/appa-biocarburantes/documentos-biocarburantes/> (ultimo acceso 15-11-21).
- CONAMA 2020, 2021. <http://www.conama2020.org/web/generico.php?idpaginas=&lang=es&menu=257&id=599&op=view> (último acceso 1-12-2021).
- DOE (2006). U.S. Department of Energy. Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol. A Joint Research Agenda. A research roadmap resulting from the biomass to biofuels workshop DOE/SC-0095.
- Castro, E., Díaz, M. J., Cara, C., Ruiz, E., Romero, I., Moya, M. (2011). Dilute acid pretreatment of rapeseed straw for fermentable sugar generation. *Bioresource Technology*, 102(2), 1270–1276.
- Eurobserv'ER (2021). Renewable Energy in transport barometer 2021. <https://www.eurobserv-er.org/category/all-biofuels-barometers/> (último acceso 30-11-21).
- FAOSTAT, 2021. <http://faostat.fao.org> (último acceso 21-11-21).

Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421.

van Asselt, H. (2021). Governing fossil fuel production in the age of climate disruption: Towards an international law of ‘leaving it in the ground’. *Earth System Governance*, 9(100118), 100118.

IDAE (2019). Memoria IDAE 2019. <https://www.idae.es/publicaciones/memoria-anual-idae-2019> (último acceso 29-11-21).

IDAE, Instituto para la diversificación y Ahorro de la Energía. <https://www.idae.es/> (último acceso 29-11-21).

IDAE, 1999. PLAN DE FOMENTO DE LAS ENERGÍAS RENOVABLES (2000-2010). https://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_4044_PFER2000-10_1999_1cd4b316.pdf (último acceso 29-11-21).

DIRECTIVA (UE) 2018/2001 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 11 de diciembre de 2018 relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables

MITECO (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico), 2020. PLAN NACIONAL INTEGRADO DE ENERGÍA Y CLIMA (PNIEC), 2021,2030. <https://www.miteco.gob.es/es/prensa/pniec.aspx> (último acceso 29-11-21).

Naciones Unidas, 2021. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/> (último acceso 29-11-21).

Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO), 2010. PLAN DE ACCIÓN NACIONAL DE ENERGÍAS RENOVABLES DE ESPAÑA (PANER), 2011-2020. <https://energia.gob.es/desarrollo/EnergiaRenovable/Paginas/paner.aspx> (último acceso 29-11-21).

IDAE, 2005. PLAN DE ENERGÍAS RENOVABLES (PER), 2005-2010. [https://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_PER_2005-2010_8_de_gosto-2005_Completo.\(modificacionpag_63\)_Copia_2_301254a0.pdf](https://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_PER_2005-2010_8_de_gosto-2005_Completo.(modificacionpag_63)_Copia_2_301254a0.pdf) (último acceso 29-11-21).

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2012. Producción y consumo sostenible y residuos agrarios.

Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 199, 92–102.

APPA, 2017. Research and Innovation perspective of the mid - and long-term Potential for Advanced Biofuels in Europe. <https://www.appa.es/appa-biocarburantes/documentos-biocarburantes/> (último acceso 30-11-21).

EurooPruning, 2014. Mapping and analysis of the pruning biomass potention in Europe.

6. ANEXO

ANEXO “PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS DE BIOMASA DEL LABORATORIO NACIONAL DE ENERGÍAS RENOVABLES DE EEUU (NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY)”

Determinación de Sólidos Totales en la Biomasa

Esto es la determinación de la cantidad de sólidos que permanecen después de eliminar toda la materia volátil por medio del calentamiento de muestra a 105°C hasta peso constante. El contenido en humedad de la muestra se calcula con la cantidad de agua y de otros compuestos volatilizados a 150°C presentes en la muestra.

Los resultados de los análisis químicos de las muestras de biomasa normalmente se expresan sobre la base de peso seco a 105°C. El contenido en sólidos totales de las muestras se usa para convertir los resultados analíticos obtenidos a otra base distinta que la del peso seco.

Equipos a utilizar

- Balanza de precisión (0,1 mg)
- Desecador
- Platillo de aluminio

Procedimiento

1. Presecar los crisoles a 105°C y pesarlos. Apuntar el peso.
2. Mezclar bien la muestra y pesar en el crisol 0,3 g aproximadamente. Apuntar el peso. Se necesitará hacerlo por triplicado.
3. Poner un blanco. Un crisol sin muestra y seguir todos los pasos. La diferencia en peso debe ser menor a un 0,5% de error.
4. Poner la muestra en el horno a 105°C $\pm$ 3°C y secar hasta peso constante. Normalmente una noche es suficiente.
5. Sacar la muestra del horno y enfriar en un desecador a una temperatura ambiente (Aprox. 10 min.).

6. Pesar el crisol que contiene la muestra y anotar el peso.

Cálculos

$$\% \text{ Sólidos totales} = \frac{\text{Peso de la muestra seca más el crisol} - \text{peso del crisol}}{\text{Peso de muestra antes del secado}} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = [1 - \text{sólidos totales}] \times 100$$

Determinación de Carbohidratos en la Biomasa mediante HPLC

Procedimiento

1. Este método es válido para muestras secadas al aire, liofilizadas, muestras de biomasa extractada, sólidos pretratados y muestras secadas a temperaturas máximas de 45°C.

No secar a mayor temperatura. El contenido en sólidos totales de la muestra inicial (% T_{sinpre}) se determinará usando el método específico (LAP 001). Si la muestra se ha sometido a un proceso de preparación (liofilización, secado al aire, o en algunos casos, extracción) también se debe conocer el contenido en sólidos totales de la muestra en estas condiciones (quiere decir durante el proceso de preparación) y será el % T_{pre} .

2. Determinar el contenido en sólidos totales de la muestra una vez preparada (% T_{final}). La muestra para la determinación de sólidos totales tiene que ser pesada al mismo tiempo que la muestra para la determinación de carbohidratos para disminuir la probabilidad de error.
3. Realizar por triplicado. Pesar $0,3 \pm 0,01$ g de la muestra libre de extractivos y poner en un tubo de ensayo. Será el " w_1 ".
4. Añadir $3,00 \pm 0,01$ mL ($4,92 \pm 0,01$ g) de H_2SO_4 al 72%, y agitarlo con una varilla durante 1 minuto hasta que esté completamente impregnado.
5. Poner el tubo en un baño a $30 \pm 1^\circ C$ y mantenerlo durante 1 hora.
6. Agitar la muestra cada 15 min para asegurar una mezcla completa.
7. Realizar por triplicado. Pesar $\pm 0,01$ g de glucosa de alta pureza (secada a 45°C) y ponerlo en un tubo de ensayo. Añadir ácido y proceder como se ha descrito anteriormente. Esta muestra (estándar de recuperación de azúcares) será el patrón y se hará en paralelo con el resto de las muestras. Los resultados de recuperación de azúcares de esta muestra se utilizarán para corregir las pérdidas por degradación de azúcares durante la hidrólisis.
8. Tras la hora de hidrólisis, transferir los hidrolizados a una botella y diluir a 4% la concentración de ácido añadiendo $84,00 \pm 0,04$ ml de agua destilada. Hay que tener cuidado de transferir todo el residuo sólido con el líquido de hidrólisis. El peso total añadido a la botella tarada es 89,22 g (0,3 g de muestra, 4,92 g de H_2SO_4 al 72%, y 84,00 g de agua destilada). Puesto que la densidad de la solución de 4% de ácido es de 1,0250 g/ml, el volumen total de la solución (V_f) es de 87,0 mL.

9. Cerrar cada una de las botellas e introducirlas en el autoclave.
 10. Meter en autoclave las muestras en las botellas cerradas durante 1 hora a $121^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.
 11. Después de que acabe el autoclave, dejar enfriar las botellas 20 minutos a temperatura ambiente antes de abrirlas.
 12. Filtrar a vacío la solución de hidrólisis (mediante un filtro de $0,45\ \mu\text{m}$ previamente desecado y pesado) a través de crisoles de filtración previamente metidos en la mufla y pesados (hasta una precisión de $0,1\ \text{mg}$).
- Nota:** una alícuota de este hidrolizado se usa para la determinación de lignina ácido soluble y grupos O-acilo en paralelo con la determinación de carbohidratos (“**Determinación de Lignina Ácido Soluble**” y LAP-017).
13. Pasar una alícuota del hidrolizado a través de una columna de pre-cromatografía compuesta de carbonato cálcico y resina de intercambio iónico.
 14. Filtrar el líquido neutralizado utilizando una jeringa con un filtro de $0,2\ \mu\text{m}$. Filtrar directamente sobre un vial. Analizar mediante HPLC.

Cálculos

1. Crear una curva de calibración mediante análisis de correlación lineal para cada azúcar a cuantificar. A partir de estas curvas, determinar la concentración en mg/mL de los azúcares presentes en cada solución analizada por HPLC.
2. Calcular la cantidad de azúcares recuperado de cada estándar de recuperación de azúcares (ver punto 7 del procedimiento) a lo largo de las dos etapas de hidrólisis. Este valor será una estimación de la cantidad de cada azúcar individual destruido durante el procedimiento de hidrólisis:

$$\% R = \frac{C_2}{C_1} \times 100$$

Donde:

% R = % de recuperación del estándar de recuperación de azúcares.

C_1 = concentración conocida del estándar de recuperación de azúcares antes de la hidrólisis, en mg/mL.

C_2 = concentración del estándar de recuperación de azúcares detectada por HPLC después de la hidrólisis, en mg/mL.

3. Corregir los valores de concentración de azúcares (mg/mL) obtenidos por HPLC para cada azúcar, determinados en la muestra hidrolizada:

$$C_{\text{corr.}} = \frac{C_{\text{HPCL}}}{\frac{\% R}{100}}$$

Donde:

C_{corr} = concentración de azúcar corregida en la muestra hidrolizada.

C_{HPLC} = concentración de azúcar por HPLC.

$\% R$ = es el determinado en el punto 2.

4. Para una muestra liofilizada, secada al aire, en estufa, o muestras que no requieran preparación, calcular el % de cada azúcar en base al peso seco de la muestra inicial de la siguiente manera:

$$\% \text{ azúcar} = \frac{C_{\text{corr}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times V_F}{W_1 \times \% \text{ Sólidos Totales}} \times 100$$

Donde:

W_1 = peso de la muestra en gramos.

V_F = volumen de filtrado, 87 mL.

$C_{\text{corr.}}$ = concentración de azúcares corregida en la muestra hidrolizada.

% Sólidos Totales = % de contenido de sólidos totales de la muestra en base a peso seco a 105°C, determinado según el procedimiento **“Determinación de sólidos totales en la biomasa”**.

5. Si la biomasa ha sido preparada según el procedimiento descrito en **“Determinación de extractivos en la biomasa”**, primero calcular el porcentaje de cada azúcar presente en base al peso seco a 105°C libre de extractivos, y a continuación corregir este valor en base al peso seco de la muestra inicial a 105°C.

➤ Calcular el porcentaje de cada azúcar en base libre de extractivos.

$$\% \text{ azúcar}_{\text{libre de extractivos}} = \frac{C_{\text{corr}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times V_F}{W_1 \times \% \text{ Sólidos Totales}} \times 100$$

➤ Corregir el % de azúcares en base libre de extractivos, calculando antes, a una base de peso seco inicial (sin extracción) a 105°C.

$$\begin{array}{l} \% \text{ azúcar en muestra inicial} \\ = \% \text{ azúcar}_{\text{libre de extractivos}} \times \frac{100 - \% \text{ de extractivos}}{100} \end{array}$$

Determinación de Lignina Ácido Insoluble en Biomasa

Para la determinación de la lignina ácida insoluble se utiliza un método que continuaría a partir del punto 12 del procedimiento “**Determinación de Carbohidratos en la Biomasa mediante HPLC**”.

Procedimiento

1. Una vez filtrado todo el prehidrolizado y tomadas las alícuotas para la determinación de carbohidratos y lignina soluble en ácido, continuar la filtración utilizando agua desionizada para arrastrar cualquier partícula pegada a la botella y para lavar el residuo filtrado exento de ácido, mediante filtración a vacío.
2. Secar el crisol de filtración y su contenido a 105°C $\pm 3^\circ\text{C}$ durante 2 horas, o hasta peso constante.
3. Enfriar en desecador y anotar el peso (W_2) del crisol, lignina insoluble, y cenizas ácido insolubles, con una precisión de 0,1 mg.
4. Poner el crisol y su contenido en una mufla y calentar a 575 $\pm 25^\circ\text{C}$ durante un mínimo de 3 horas, o hasta que se haya eliminado el carbono. Calentar lentamente ($10^\circ\text{C}/\text{min}$), para evitar la aparición de llamas.
5. Secar en desecador y anotar el peso (W_3) del crisol y las cenizas ácido insolubles, con precisión de 0,1 mg.

Nota: la cantidad de cenizas ácidos insolubles que permanecen en el crisol no es igual al contenido de cenizas totales de la muestra (este sería otro procedimiento, “**Determinación de Cenizas en la Biomasa**”).

Cálculos

- Para muestras liofilizadas, secadas al aire, secadas en estufa o que no requieran preparación, calcular el % de lignina ácido insoluble en base al peso seco a 105°C de la muestra inicial de la forma siguiente:

$$\% \text{ de lignina insoluble} = \frac{W_2 - W_3}{W_1 \times \% \text{ Sólidos Totales}} \times 100$$

Donde:

W_1 = peso inicial de muestra, en gramos.

W_2 = peso de crisol, lignina ácido insoluble y cenizas ácido insolubles.

W_3 = peso de crisol y cenizas ácido insolubles.

- Para una muestra extractada, puede ser necesario dar los resultados en base a peso seco a 105°C, exento de extractivos, o en base a peso seco a 10 °C de la muestra original (sin extraer), o a ambos.
 - Para el cálculo del % de residuo insoluble en base al peso libre de extractivos ($RAI_{\text{libre de extractivos}}$):

$$\% \text{residuo sólido insoluble}_{\text{libre de extractivos}} = \frac{W_2 - W_3}{W_1 \times \% \text{Recuperación de sólidos}} \times 100$$

Donde:

W_1 = peso inicial de muestra extraída.

W_2 = peso de crisol, residuo ácido insoluble y cenizas ácido insolubles.

W_3 = peso de crisol y cenizas ácido insolubles.

% Recuperación de sólidos = % de sólidos totales de la muestra extraída determinado a 105°C, según se describe en el procedimiento “**Determinación de sólidos totales en la biomasa**”.

- Para corregir el residuo ácido insoluble calculado antes en base libre de extractivos, a una base de peso seco a 105°C de la muestra original sin extraer:

$$\% \text{residuo sólido insoluble}_{\text{muestra original sin extraer}} = \% RAI_{\text{libre de extractivos}} \frac{100 - \% \text{extractivos}}{100}$$

Determinación de Lignina Ácido Soluble

La lignina ácido soluble es la pequeña fracción de lignina que se solubiliza durante el procedimiento de hidrólisis para la obtención de lignina ácido-insoluble. Se denomina ASL (del inglés, “acid soluble lignin”), y se puede cuantificar por espectroscopía ultravioleta.

El procedimiento describe un método para determinar ASL, que utiliza el hidrolizado generado en el procedimiento “**Determinación de Carbohidratos en la Biomasa mediante HPLC**”.

Procedimiento

1. Medir la absorbancia del hidrolizado a 205 nm, utilizando una solución de ácido sulfúrico al 4% (preparada diluyendo 3 ml de ácido sulfúrico al 72% p/p con 84 ml de agua destilada) como blanco.
2. Si la lectura de absorbancia es mayor de 0,7, la muestra se debe diluir, de forma que la absorbancia medida esté entre 0,2 y 0,7. Diluir el blanco de ácido sulfúrico al 4% de la misma forma que la muestra.
3. Analizar las muestras por duplicado.

Cálculos

1. Se utiliza un coeficiente de extinción de 110 l/g-cm, para calcular la cantidad de lignina ácido soluble en el hidrolizado. Los coeficientes a 205 nm para la mayoría de las maderas están entre 88 y 113 l/g-cm. El valor de 110 utilizado aquí está de acuerdo con el valor utilizado en el procedimiento TAPPI, y representa una medida de valores de diferentes maderas y pulpas.
2. Para una muestra de biomasa sólida, el % de ASL en base al peso seco a 105°C, o en base libre de extractivos se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ ASL} = \frac{\frac{A}{b \times a} \times df \times V \times \frac{L}{1000 \text{ ml}}}{\frac{W \times \% \text{ Sólidos Totales}}{100}} \times 100$$

Donde:

A = absorbancia a 205 nm.

df = factor de dilución.

b = longitud de paso de luz de la cubeta del espectrofotómetro, 1 cm.

a = coeficiente de extinción = 110 l/g-cm.

V = volumen de filtrado. Este volumen será 87 ml.

W = peso de muestra inicial en gramos (de “**Determinación de Carbohidratos en la Biomasa mediante HPLC**”).

% Sólidos totales = % de contenido en sólidos totales de la muestra (inicial, o después de la extracción), en base a peso seco a 105°C, determinado en el análisis del procedimiento “**Determinación de Carbohidratos en la Biomasa mediante HPLC**”.

3. Para una muestra de biomasa extraída, el % de ASL, calculado anteriormente, se puede convertir en base al peso seco de la muestra inicial a 105°C.

$$\% \text{ ASL}_{\text{muestra inicial}} = \% \text{ ASL}_{\text{libre de extractivos}} \times \frac{100 - \% \text{ de extractivos}}{100}$$

Donde:

% ASL_{libre de extractivos} = % de lignina soluble en ácido, en base al peso seco a 105°C o en base libre de extractivos, según se determinó en la etapa anterior.

% de extractivos = % de extractivos en la muestra extraída determinado según el procedimiento “**Determinación de extractivos en la biomasa**”.

Determinación de Cenizas en la Biomasa

Este método abarca la determinación de cenizas, expresada como el porcentaje de residuo que permanece después de una oxidación seca (oxidación a 550-600°C), de maderas duras y blandas, materiales herbáceos, etc. Todos los resultados se dan relativos al peso de la muestra secada en estufa a 105°C.

Las muestras se deben haber secado a 105°C según el procedimiento **“Determinación de Sólidos Totales en la Biomasa”**, antes del ensayo de cenizas. También se puede utilizar material secado al aire, pero en este caso se debe corregir su contenido en humedad antes de calcular el contenido en cenizas. Las muestras de ensayo deben pesar de 0,5 a 1,0 g y su tamaño debe ser menor de 1 mm de diámetro.

Procedimiento

1. Determinar la tara del crisol, introduciendo el crisol vacío en la mufla a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ hasta peso constante. Enfriar el crisol a temperatura ambiente en un desecador y pesar con precisión de 0,1 mg. Si se utiliza un crisol de porcelana es recomendable calentar el crisol durante al menos tres horas, enfriar, pesar y volver a calentar durante otra hora más, o hasta que el peso de la tara varíe menos de 0,3 mg.
2. Pesar de 0,5 a 1,0 g de muestra y anotar el peso de muestra descontando la tara del crisol (**P₁**). Introducir el crisol en la mufla a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ durante un mínimo de tres horas, o hasta que el carbono se haya eliminado. Calentar lentamente y evitar sobrepasar la temperatura. Si la muestra tiende a encenderse, cubrir parcialmente el crisol.
3. Enfriar el crisol a temperatura ambiente en un desecador y pesar con precisión de 0,1 mg. Repetir el proceso de calentamiento hasta que el peso sea constante (variación menor de 0,3 mg). Anotar como **P₂**.

Cálculos

1. Para muestras secadas a 105°C:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{P_1}{P_2} \times 100$$

2. Para muestras secadas al aire:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{P_1}{P_2 \times \frac{T}{100}} \times 100$$

Donde:

T = % de sólido de la muestra, en base al peso seco a 105°C (“**Determinación de sólidos totales en la biomasa**”).

Determinación de extractivos en la biomasa

Introducción

En muchos tipos de materiales biomásicos es necesario separar los extractivos antes del análisis con el fin de evitar interferencias que pudieran falsear los resultados. Tradicionalmente se ha empleado una extracción con etanol/benceno (para eliminar ceras, grasas, resinas, etc.) y posteriormente con agua (para extraer taninos, azúcares, etc.), y posteriormente con etanol al 95% (para extraer ceras, grasas, resinas, etc.).

Procedimiento

1. Se parte de entre 4-8 g de muestra molida. Si la muestra requiere molienda antes de la extracción, pasar la muestra a través de una malla de 40 mesh. Si la muestra es una muestra húmeda, secar al aire antes de moler.
2. Secar el dedal de extracción de Soxhlet a 105°C hasta peso constante. Secar a temperatura ambiente en un desecador y pesar con precisión de 0,1 mg.
3. Añadir cuidadosamente la muestra al dedal, procurando no llenar el dedal hasta el borde (dejar aprox. 1 cm). Poner un tapón de lana de vidrio para evitar pérdidas de la muestra durante la extracción.
4. Pesar el matraz o recipiente de recogida de muestra, con una precisión de 0,1 mg.
5. Montar el aparato Soxhlet utilizando al menos 160 mL de agua destilada. Insertar el dedal y calentar a reflujo durante 24 horas. Periódicamente chequear la velocidad de reflujo y ajustar la velocidad de calentamiento para que se produzcan de 4 a 5 cambios de disolvente por hora.
6. Una vez completado el tiempo de extracción, retirar el dedal y transferir la muestra con cuidado a un embudo Buchner. Retirar el disolvente residual mediante filtración a vacío y lavar la muestra con agua, recogiendo todo el filtrado. Dejar secar al aire la biomasa en el embudo Buchner mientras todavía está unido el sistema de vacío.
7. Combinar el filtrado con el disolvente en un matraz de 250 ml y poner en el rotavapor para retirar el disolvente. Utilizar un baño con agua a 45°C para calentar el matraz durante la evaporación.
8. Después de que todo el disolvente se ha eliminado, colocar el matraz en una estufa a 40°C durante 24 horas. Después, dejar enfriar el matraz a temperatura ambiente en un desecador. Pesar el matraz con una precisión de 0,1 mg.

9. Para la extracción y el cálculo de los extractivos en etanol, el procedimiento es el mismo a partir del punto 5 (inclusive), pero sustituyendo el agua desionizada por etanol al 95 %.

Cálculos

1. Calcular el **peso seco de la muestra**, utilizando el dato del contenido en sólidos medio según el método “**Determinación de sólidos totales en la biomasa**”:

$$\text{Peso seco (PS)} = \frac{(\text{Peso dedal, muestra y lana vidrio} - \text{peso dedal y lana de vidrio}) \times \% \text{sólidos totales}}{100}$$

2. Determinar el **porcentaje de extractivos en agua y etanol** para la muestra objeto de estudio

$$\% \text{ de extractivos (etanol)} = \frac{\text{Peso matraz de recogida más residuo} - \text{peso del matraz}}{\text{PS}} \times 100$$

$$\% \text{ de extractivos (agua)} = \frac{\text{Peso matraz de recogida más residuo} - \text{peso del matraz}}{\text{PS}} \times 100$$

3. Determinar el **porcentaje de extractivos total** para la muestra:

$\% \text{ de extractivos Total} = \% \text{ extractivos (etanol)} + \% \text{ extractivos (agua)}$

Determinación de grupos acetilo en biomasa mediante HPLC

Introducción

Los grupos alifáticos presentes en maderas y materiales herbáceos son **grupos acetilo** y **fórmico** que se pueden combinar como **grupos O-acilo** con la parte polisacáridica. Este método emplea una hidrólisis ácida diluida para separar los grupos O-acilo de los polisacáridos. A continuación, se cuantifican los ácidos acético y fórmico mediante HPLC.

El protocolo de este método utiliza el hidrolizado generado en el procedimiento **“Determinación de Carbohidratos en la Biomasa mediante HPLC”** en el punto 12. Se debe tener especial cuidado en las etapas posteriores al autoclave en el procedimiento **“Determinación de Carbohidratos en la Biomasa mediante HPLC”**, para asegurar que no se pierden componentes volátiles. Todos los resultados se expresan relativos al peso seco a 105°C de la muestra; si son materiales donde se ha hecho una extracción, los resultados se pueden dar también en base al peso libre de extractivos.

Procedimiento

1. Una vez sacadas las muestras hidrolizadas del autoclave (como parte del procedimiento **“Determinación de Carbohidratos en la Biomasa mediante HPLC”**), dejar enfriar los contenidos de las botellas durante 20 minutos a temperatura ambiente. Agitar vigorosamente el contenido de las botellas y dejar enfriar más, hasta que el contenido de éstas, así como los sólidos depositados en el fondo, estén a temperatura ambiente.
2. Abrir las botellas, y con una jeringa desechable, tomar inmediatamente 1,5 ml de muestra teniendo cuidado nuevamente de no remover los sólidos depositados en el fondo. Filtrar esta muestra rápidamente a través de un filtro de 0,2 µm en un vial y cerrar inmediatamente.
3. Preparar una serie de estándares de calibración con agua destilada para hacer una curva de calibración de cada compuesto de interés. Un esquema sugerido para una columna HPX-87H es preparar una serie de estándares multicomponentes que contengan ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico, en el intervalo de 0,02 a 0,5 mg/ml.
4. Preparar un estándar de verificación de la calibración (CVS) independiente, utilizando productos químicos de diferente procedencia que los utilizados en los estándares de calibración. Este estándar debe contener cantidades precisas de cada componente contenido en los estándares de calibración, en una concentración intermedia del rango validado de la curva de calibración. Se debe medir después de cada curva de calibración y a intervalos regulares en la

secuencia de HPLC. Este estándar se utiliza para verificar la calidad de la curva de calibración a lo largo del experimento de HPLC.

5. Analizar las muestras utilizando una columna HPX-87H de BioRad y las siguientes condiciones instrumentales:

- Volumen de muestra: 50 µm.
- Eluyente: ácido sulfúrico 0,01 N filtrado por un filtro de 0,2 µm.
- Velocidad de flujo: 0,6 ml/min.
- Tª de la columna: 55°C.
- Detector: Índice de refracción.
- Tiempo de ensayo: 20 minutos.

Nota: tener en cuenta que puede haber pequeñas cantidades de furfural e hidroximetilfurfural y estos picos pueden interferir en los cromatogramas.

Cálculos

- 1.** Crear una curva de calibración mediante análisis de regresión lineal para cada componente a cuantificar. A partir de estas curvas, determinar la concentración en mg/mL de los ácidos orgánicos presentes en cada solución analizada por HPLC.
- 2.** Para muestras liofilizadas, secadas al aire, o muestras secadas en estufa, o para muestras que no requieren preparación, calcular el porcentaje de cada ácido orgánico presente en la muestra en base al peso inicial a 105°C:

$$\% \text{ analito} = \frac{C \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times V_F}{P_1 \times \% \text{ Sólidos totales}} \times 100$$

Donde:

P₁ = peso de la muestra en gramos.

V_F = volumen de filtrado, 87 ml

C = concentración del componente en la muestra hidrolizada en mg/mL.

% Sólidos Totales = % de contenido de sólidos totales de la muestra en base a peso seco a 105°C, determinado según el procedimiento **“Determinación de sólidos totales en la biomasa”**.

Nota: si la muestra se ha preparado según el procedimiento **“Determinación de Extractivos en la Biomasa”**, primero calcular el % del analito en base libre de extractivos, y luego corregir en base a peso seco a 105°C de la muestra inicial.