



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química

TESIS DOCTORAL

FÁTIMA VARGAS
GONZÁLEZ

Mayo 2017



BIORREFINERÍA

DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA
AGROALIMENTARIA. VALORIZACIÓN
DE PAJA DE CEREALES.



BIOREFINERY

OF AGRI-FOOD INDUSTRY RESIDUES.
CEREALS STRAW VALORIZATION.

TITULO: *Biorrefinería de residuos de la industria agroalimentaria. Valorización de paja de cereales*

AUTOR: *Fátima Vargas González*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

**BIORREFINERÍA DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA.
VALORIZACIÓN DE PAJA DE CEREALES.**

Los directores,



Fdo. Alejandro Rodríguez Pascual.
Profesor Titular del Departamento de
Química Inorgánica e Ingeniería Química de la
Universidad de Córdoba.



Fdo. Gil Garrote Velasco.
Profesor Titular del Departamento de
Ingeniería Química de la Universidad de Vigo.



Fdo. Orlando J. Rojas.
Profesor en Forest Products Technology Department
de la Universidad de Aalto (Finlandia)

**Trabajo presentado para aspirar
al grado de Doctor en Ciencias**

LA DOCTORANDA,



Fdo. **Fátima Vargas González**
Licenciada en Ciencias Ambientales
por la Universidad de Córdoba.



TÍTULO DE LA TESIS: “Biorrefinería de residuos de la industria agroalimentaria. Valorización de paja de cereales”.

DOCTORANDA: FÁTIMA VARGAS GONZÁLEZ

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

El objetivo de la Tesis es el aprovechamiento integral, siguiendo un esquema de biorrefinería, de paja de cereales para la producción de pastas celulósicas, oligosacáridos, bioetanol de segunda generación y nanofibras de celulosa.

La doctoranda Fátima Vargas González comenzó la tesis con el estudio de la viabilidad del uso de diversas pajas de cereales para la obtención de celulosa que pudiera ser destinada bien a celulosa moldeada o bien a reforzar como fibra virgen la industria papelera y de cartón. Fruto de estas investigaciones se publicaron dos artículos: *Cellulosic pulps of cereal straws as raw material for the manufacture of ecological packaging, BioResources, 7(3), 4161-4170* y *Barley straw (Hordeum vulgare) as a supplementary raw material for Eucalyptus camaldulensis and Pinus sylvestris Kraft pulp in the paper industry, BioResources, 10 (2), 3682-3693.*

Posteriormente realizó una estancia en el Departamento de Ingeniería Química (campus de Ourense) de la Universidad de Vigo (marzo-diciembre 2012) donde estudió el aprovechamiento de estos residuos (paja de avena y cebada) para la obtención de bioetanol de segunda generación y diversos oligómeros de amplio espectro de aplicación industrial. Consecuencia de esta estancia se han publicado dos artículos científicos: *Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production, Bioresource Technology, 191, 263-270* y *Biorefinery scheme for residual biomass using autohydrolysis and organosolv stages for oligomers and bioethanol production, Energy & Fuels, 30, 8236-8245.* Además, hay otro artículo enviado y se está redactando un cuarto.

De mayo a diciembre de 2013 la doctoranda realizó una estancia en el *Forest Biomaterials Department* en *North Carolina State University, NCSU* (EEUU), sufragada mediante la beca obtenida del Idep de la Universidad de Córdoba para la obtención de la mención internacional, y la contratación con cargo a un proyecto en ese mismo departamento, dando lugar a un artículo presentado en la memoria. Posteriormente, realizó la estancia en el Laboratorio Nacional de Ciencia y Tecnología del Bioetanol (CTBE) situado en Campinas (Sao Paolo), Brasil, disfrutando de una beca del Campus de Excelencia Internacional CeIA3.

Puede, por tanto, concluirse que el aprovechamiento del tiempo de formación por parte de la doctoranda ha sido óptimo, así como el trabajo experimental realizado, que ha conducido a la tesis que se presenta.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 10 de marzo de 2017

Firma de los directores,



Fdo.: Alejandro Rodríguez Pascual.



Fdo.: Gil Garrote Velasco.



Fdo.: Orlando J Rojas.

FINANCIACIÓN Y AYUDAS PARA EL DESARROLLO DE LA TESIS DOCTORAL

La presente Memoria de Tesis de Doctorado, realizada en la línea de investigación denominada “Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos” perteneciente al Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química de la Universidad de Córdoba, se ha llevado a cabo gracias a la financiación conseguida en el Proyecto de Investigación **“CTQ2010-19844-C02-01. Biorrefinería de materiales lignocelulósicos. Fraccionamiento mediante operaciones de autohidrólisis y pasteado”**, liderado por el Profesor Dr. Alejandro Rodríguez Pascual así como por las becas obtenidas por la doctoranda para la realización de estancias internacionales: **“Ayuda para la realización de estancias para la obtención de la mención internacional en el título de doctor”**, concedida por la Universidad de Córdoba; y **“Ayuda para la movilidad internacional de doctorandos y doctores a centros extranjeros de prestigio”** concedida por el Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3), y por un contrato de investigación en la prestigiosa *North Carolina State University* gracias a la financiación concedida por el Profesor Dr. Orlando J. Rojas.

AGRADECIMIENTOS

Ilusión, es la emoción que me invadió cuando, unos años atrás, me encontré de frente con este nuevo reto: la realización de mi propia Tesis Doctoral. No iba a ser un camino fácil (nadie dijo que lo fuera), ni tampoco hubiese imaginado que, a pesar de ello, al final del camino, iba a poder calificar todos estos años invertidos como de los mejores de mi vida, no sólo por todo el conocimiento y la experiencia adquirida sino por todas las oportunidades que han ido surgiendo a lo largo de este largo camino.

*La primera oportunidad, como no, he de agradecerla a mis profesores, los **Doctores Luis Jiménez Alcaide y Alejandro Rodríguez Pascual**, por haber puesto su confianza en mí para llevar a cabo este importante proyecto, proporcionándome los medios necesarios para ello y conduciéndome hasta mi gran segunda oportunidad, mi estancia en el Departamento de Ingeniería Química del Campus de Ourense de la Universidad de Vigo. En esta estancia tuve la suerte de trabajar bajo la dirección del **Dr. Gil Garrote Velasco** y su magnífico equipo. Gracias Gil por haberme acogido casi un año en tu grupo de investigación y haberme enseñado tanto; la tercera gran oportunidad vino de la mano del reconocido profesor **Dr. Orlando J. Rojas**. Gracias Dr. Rojas por hacer posible mi sueño de realizar investigación en una universidad norteamericana y, en concreto, en la prestigiosa North Carolina State University (NCSU) en el Forest Biomaterials Department y, por supuesto, gracias por la financiación recibida. Por último, y no por ello menos importante, me gustaría agradecer a la **Dra. Sarita Candida Rabelo** por darme la oportunidad de trabajar bajo su supervisión en uno de los centros de investigación más importantes de Brasil, el Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPq), y en concreto en el Laboratorio Nacional de Ciencia y Tecnologia del Bioetanol (CTBE) situado en Campinas, Sao Paulo. Muchas gracias Sarita por todo el apoyo recibido durante el tiempo que permanecí en Brasil.*

Merecen especial atención y agradecimiento...

Pedro Márquez y Jesús Fernández, dos grandes y maravillosos amigos, quienes, sin tener relación con el mundo de la investigación, no dudaron en ayudarme en el arduo trabajo de recolección de la materia prima.

Carlos Vila, gran persona, excelente amigo y mejor compañero a quien tuve la oportunidad y suerte de conocer durante mi estancia en Ourense. Gracias por estar siempre ahí.

Elenita Domínguez, estupenda compañera y amiga. Gracias.

Estefanía Rodríguez, mi mejor amiga. Gracias por tu apoyo en todo momento.

Joaquín Cruz, mi primo. Gracias por tu ayuda. Maravilloso diseñador gráfico.

Agradecida a todas las personas de diversas nacionalidades (brasileñas, americanas, chinas, japonesas, finlandesas, españolas...) con las que he tenido la suerte de cruzarme durante este camino lleno de oportunidades y de quienes guardo un gran recuerdo.

MI HERMANO. Gracias Jesús, gracias por estar siempre ahí, gracias porque siempre recibo un sí cuando necesito tu ayuda. Gracias por tu eterna paciencia y apoyo incondicional.

Y por supuesto, gracias a MI MADRE, Ángela. Gracias mamá por ser el pilar fundamental de mi vida, mi referente. Gracias por ser mi ángel, aquel que me coge de la mano para llevarme a la superficie en los momentos en los que creo haber tocado fondo. Porque con tu apoyo, todo es más fácil. Gracias por tu apoyo continuo e incondicional.

Gracias a toda mi familia y a todos los que han contribuido a que aquella ilusión con la que comencé hace unos años, a pesar de todas las dificultades encontradas en el camino, se haya mantenido hasta alcanzar la cumbre.

GRACIAS.

*“Dream big and stay committed to
what you love”*

by The University of Queensland, Australia

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Resumen/Summary | 1 |
| Objetivos/Objectives | 13 |
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN | 21 |
| 1. BIORREFINERÍA: CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN | 25 |
| 1.1. El concepto de biorrefinería | 25 |
| 1.2. Clasificación de las biorrefinerías | 26 |
| 1.2.1. <i>Por grado de integración de los procesos</i> | 26 |
| 1.2.2. <i>Por tipo de biomasa empleada</i> | 27 |
| 1.3. Rutas de transformación empleadas en biorrefinería | 29 |
| 1.3.1. <i>Procesos mecánicos/físicos</i> | 31 |
| 1.3.2. <i>Procesos bioquímicos</i> | 31 |
| 1.3.3. <i>Procesos químicos</i> | 32 |
| 1.3.4. <i>Procesos termoquímicos</i> | 32 |
| 1.4. Productos obtenidos en una biorrefinería | 33 |
| 1.4.1. <i>Productos energéticos (biocombustibles)</i> | 33 |
| 1.5. Productos de base biológica | 48 |
| 1.6. Bibliografía | 50 |
| 2. ESTRUCTURA DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS | 55 |
| 2.1. Celulosa | 55 |
| 2.1.1. <i>Composición química</i> | 55 |
| 2.1.2. <i>Estructura de agregación</i> | 57 |
| 2.1.3. <i>Enlaces de hidrógeno</i> | 59 |
| 2.2. Hemicelulosas | 61 |
| 2.2.1. <i>Funcionalidad de las hemicelulosas</i> | 62 |
| 2.2.2. <i>Estructura química de las hemicelulosas</i> | 63 |
| 2.3. Lignina | 66 |
| 2.3.1. <i>Estructura de la lignina</i> | 66 |
| 2.3.2. <i>Propiedades química de la lignina</i> | 68 |
| 2.3.3. <i>Propiedades físicas de la lignina</i> | 70 |
| 2.4. Cenizas | 71 |
| 2.5. Pectina | 71 |
| 2.6. Pigmentos | 71 |
| 2.7. Proteínas | 72 |
| 2.8. Pared celular | 72 |
| 2.9. Bibliografía | 76 |
| 3. BIORREFINERÍA DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PASTAS CELULÓSICAS, PAPEL Y CELULOSA MOLDEADA | 81 |
| 3.1. Producción de pastas celulósicas | 81 |
| 3.1.1. <i>Pasteado kraft o al sulfato</i> | 83 |



| | |
|--|------------|
| 3.1.2. <i>Pasteado a la sosa-antraquinona</i> | 85 |
| 3.1.3. <i>Otros métodos de pasteado químicos destacados. Procesos de pasteado con disolventes orgánicos</i> | 88 |
| 3.2. Fabricación de papel y envases sostenibles | 93 |
| 3.2.1. <i>Aguas residuales en la industria del papel</i> | 101 |
| 3.2.2. <i>Emisiones a la atmósfera</i> | 102 |
| 3.3. Bibliografía | 103 |
| 4. BIORREFINERÍA DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS Y BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN | 109 |
| 4.1. Situación actual | 109 |
| 4.2. Normativa sobre bioenergía y biocombustibles | 111 |
| 4.2.1. <i>Normativa en EEUU</i> | 111 |
| 4.2.2. <i>Normativa comunitaria (Unión Europea)</i> | 112 |
| 4.2.3. <i>Normativa en España</i> | 113 |
| 4.3. Procesamiento de los materiales lignocelulósicos para la obtención de oligosacáridos y bioetanol 2G | 115 |
| 4.4. Factores clave para un pretratamiento efectivo de la biomasa lignocelulósica | 117 |
| 4.5. Pretratamiento mecánico: molienda | 118 |
| 4.6. Pretratamiento físico-químico: autohidrólisis de la biomasa lignocelulósica (BLC) | 119 |
| 4.6.1. <i>Variables operacionales del pretratamiento hidrotérmico</i> | 121 |
| 4.6.2. <i>Efectos del pretratamiento hidrotérmico sobre los componentes principales de los materiales lignocelulósicos</i> | 123 |
| 4.7. Pretratamiento químico: proceso organosolv | 125 |
| 4.7.1. <i>Reacciones de la lignina y los carbohidratos durante el proceso organosolv sin catalizadores</i> | 125 |
| 4.8. Aprovechamiento de la fracción sólida procedente de los pretratamientos para la obtención de bioetanol | 127 |
| 4.8.1. <i>Hidrólisis enzimática de la celulosa</i> | 127 |
| 4.8.2. <i>Hidrólisis enzimática de las hemicelulosas residuales en la fracción sólida</i> | 131 |
| 4.8.3. <i>Fermentación a etanol de la fracción sólida celulósica: proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF)</i> | 132 |
| 4.8.4. <i>Destilación de etanol</i> | 142 |
| 4.9. Aprovechamiento de la fracción líquida procedente de los pretratamientos para la obtención de oligosacáridos y azúcares hemicelulósicos fermentables | 143 |
| 4.9.1. <i>Inhibidores de los hidrolizados lignocelulósicos y detoxificación</i> | 144 |
| 4.9.2. <i>Separación y purificación de xilooligosacáridos para la obtención de productos de alto valor añadido</i> | 146 |
| 4.10. Bibliografía | 147 |

| | |
|---|------------|
| 5. BIORREFINERÍA DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE NANOFIBRAS DE CELULOSA O CELULOSA NANOFIBRILAR | 157 |
| 5.1. Clasificación de las estructuras de nanocelulosa | 157 |
| 5.1.1. <i>Nanocristales de celulosa (CNC)</i> | 157 |
| 5.1.2. <i>Celulosa nanofibrilada (CNF)</i> | 158 |
| 5.2. Producción de nanofibras de celulosa | 158 |
| 5.2.1. <i>Proceso mecánico de molienda o grinding</i> | 159 |
| 5.2.2. <i>Proceso mecánico de microfluidización</i> | 160 |
| 5.2.3. <i>Proceso de carboxilación vía oxidación tempo</i> | 161 |
| 5.3. Aplicaciones de las nanofibras de celulosa | 163 |
| 5.3.1. <i>Aplicación de nanocelulosa en biomedicina y cosméticos</i> | 164 |
| 5.3.2. <i>Aplicación de nanocelulosa en composites</i> | 164 |
| 5.3.3. <i>Aplicación de nanocelulosa en embalaje basado en papel</i> | 166 |
| 5.4. Reología | 168 |
| 5.4.1. <i>Clasificación de los fluidos</i> | 170 |
| 5.4.2. <i>Teoría de los experimentos oscilatorios</i> | 177 |
| 5.5. Bibliografía | 180 |
| | |
| CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS | 189 |
| 1. MATERIALES | 193 |
| 1.1. Materia prima | 193 |
| 1.2. Equipamiento para el acondicionamiento de la materia prima | 194 |
| 1.2.1. <i>Molino de materia prima</i> | 194 |
| 1.3. Caracterización química de la materia prima | 194 |
| 1.3.1. <i>Determinación de la humedad: TAPPI T257 cm-02 (2002)</i> | 194 |
| 1.3.2. <i>Extraíbles con etanol/contenido en extractos (CE): variante de TAPPI T204 cm-97 (1997)</i> | 195 |
| 1.3.3. <i>Solubilidad en sosa al 1%: TAPPI T212 om-98 (1998)</i> | 195 |
| 1.3.4. <i>Solubilidad en agua caliente: TAPPI T207 cm-99 (1999)</i> | 195 |
| 1.3.5. <i>Holocelulosa: T9M-54 (1998)/WISE et al., (1946)</i> | 196 |
| 1.3.6. <i>α-celulosa: TAPPI T203 cm-99 (1999)</i> | 196 |
| 1.3.7. <i>Cenizas: TAPPI T211 om-12 (2012)</i> | 197 |
| 1.3.8. <i>Hidrólisis ácida cuantitativa (HAC): TAPPI T249 cm-09 (2009)</i> | 197 |
| 1.3.9. <i>Lignina Klason (lignina insoluble en ácido): TAPPI T222 om-98 (1998)</i> | 198 |
| | |
| 2. PRODUCCIÓN DE PASTAS CELULÓSICAS Y PAPEL | 200 |
| 2.1. Equipamiento | 200 |
| 2.1.1. <i>Digestor para la obtención de pastas</i> | 200 |
| 2.1.2. <i>Refinador-desintegrador</i> | 200 |
| 2.1.3. <i>Separador de fibras e incocidos</i> | 201 |
| 2.1.4. <i>Separador de fibras y agua</i> | 201 |
| 2.1.5. <i>Centrífuga para la eliminación de exceso de humedad</i> | 202 |

| | |
|---|------------|
| 2.1.6. <i>Desintegrador de pastas celulósicas</i> | 202 |
| 2.1.7. <i>Refinómetro Schopper-Riegler</i> | 203 |
| 2.1.8. <i>Formador de hojas</i> | 204 |
| 2.1.9. <i>Prensa para hojas</i> | 204 |
| 2.1.10. <i>Secador de hojas</i> | 205 |
| 2.2. Proceso de producción de pastas celulósicas y papel | 206 |
| 2.2.1. <i>Cocción o pasteado</i> | 206 |
| 2.2.2. <i>Formación de hojas de papel</i> | 206 |
| 2.3. Caracterización de las pastas celulósicas y papel | 206 |
| 2.3.1. <i>Caracterización físico-química de las pastas celulósicas</i> | 206 |
| 2.3.2. <i>Caracterización de las hojas de papel</i> | 208 |
| 3. OBTENCIÓN DE OLIGÓMEROS Y BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN | 213 |
| 3.1. Equipamiento empleado para la obtención de oligómeros y bioetanol de segunda generación | 213 |
| 3.1.1. <i>Reactores de alta presión para el fraccionamiento de la materia prima</i> | 213 |
| 3.1.2. <i>Autoclave</i> | 213 |
| 3.1.3. <i>Campana de flujo laminar y agitador orbital</i> | 214 |
| 3.1.4. <i>Centrífuga</i> | 215 |
| 3.1.5. <i>Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)</i> | 216 |
| 3.2. Proceso de producción de oligómeros y bioetanol de segunda generación | 217 |
| 3.2.1. <i>Autohidrólisis</i> | 217 |
| 3.2.2. <i>Deslignificación</i> | 219 |
| 3.2.3. <i>Hidrólisis enzimática</i> | 220 |
| 3.2.4. <i>Fermentación</i> | 220 |
| 3.3. Caracterización de las fracciones sólida y líquida obtenidas en el pretratamiento de autohidrólisis | 223 |
| 3.3.1. <i>Fracción sólida</i> | 223 |
| 3.3.2. <i>Fracción líquida</i> | 223 |
| 3.4. Caracterización de las fracciones sólida y líquida obtenidas en el tratamiento de deslignificación (organosolv) | 224 |
| 3.4.1. <i>Fracción sólida</i> | 224 |
| 3.4.2. <i>Fracción líquida</i> | 225 |
| 3.5. Cuantificación de los azúcares obtenidos en el proceso de hidrólisis enzimática del sólido autohidrolizado/autohidrolizado-deslignificado | 226 |
| 3.6. Cuantificación del bioetanol obtenido en la fermentación de la fracción sólida autohidrolizada/autohidrolizada-deslignificada | 227 |
| 4. NANOFIBRAS DE CELULOSA Y NANOPAPELES | 228 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA | 229 |

CAPÍTULO III. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS/RESEARCH ARTICLES 231

- **ARTÍCULO I/ARTICLE I.** Cellulosic pulps of cereal straws as raw material for the manufacture of ecological packaging. 233
- **ARTÍCULO II/ARTICLE II.** Barley straw (*Hordeum vulgare*) as a supplementary raw material for *Eucalyptus camaldulensis* and *Pinus sylvestris* kraft pulp in the paper industry. 245
- **ARTÍCULO III/ARTICLE III.** Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production. 259
- **ARTÍCULO IV/ARTICLE IV.** Biorefinery scheme for residual biomass using autohydrolysis and organosolv stages for oligomers and bioethanol production. 263
- **ARTÍCULO V/ARTICLE V.** Nanofibrillar cellulose from oat and barley straws: Rheological behavior and nanopapers reinforced with xylans. 267

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS 271

ANEXO I. Breve memoria de los resultados obtenidos en la estancia realizada en el Laboratorio Nacional de Ciencia y Tecnología del Bioetanol (CTBE) en Brasil 281

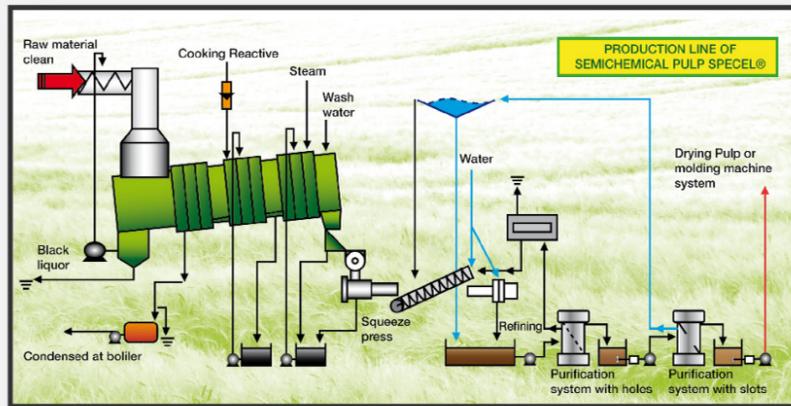
RESUMEN

SUMMARY



ESQUEMA/GRAPHICAL ABSTRACT

Proceso de pasteado a la sosa/sosa-antraquinona (AQ)
 Pulping process with soda/soda-anthraquinone (AQ)

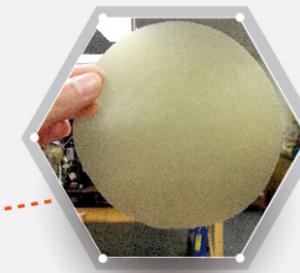


Pastas celulósicas
 Cellulosic pulps



Papel y envases
 Paper and packaging

Papel y envases ecológicos de celulosa termoformada
 Paper and Ecological packaging of thermoformed cellulose.

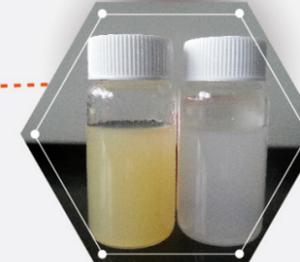


Refuerzo.
 Reinforcement.

Nanopapeles
 Nanopapers.



Producción de nanofibras de celulosa
 Cellulose nanofibers manufacturing.



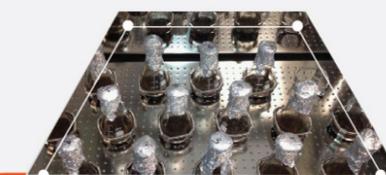
Suspensiones acuosas de nanofibras de celulosa.
 Aqueous suspensions of cellulose nanofibers.

Licores negros para una posterior obtención de lignina.
 Black liquors for further obtention of lignin.

Sólido-autohidrolizado designificado
 Autohydrolyzed-delignified solid.



Sólido autohidrolizado
 Autohydrolyzed solid



Hidrólisis enzimática
 Enzymatic Hydrolysis



Azúcares/Bioetanol.
 Sugars/Bioethanol.



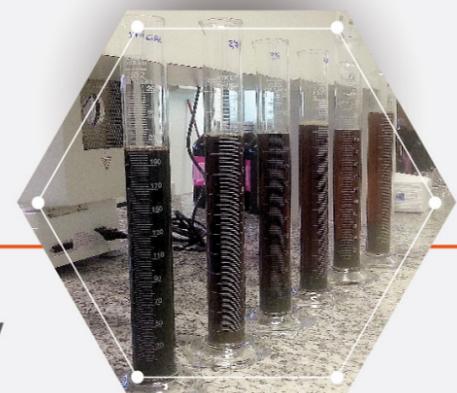
Paja de Cereales
 Cereals Straw

Proceso Organosolv
 Organosolv process

Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF)
 Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)



Pretratamiento de autohidrólisis (AH)
 AH pretreatment



Hidrolizado procedente de AH
 AH hydrolysate

Hidrólisis ácida
 Acid hydrolysis

Oligómeros (xilooligosacáridos)
 Oligomers (xylooligosaccharides)

Azúcares C5 (Xilosa) para posterior fermentación
 C5 sugars (Xylose) for further fermentation

Acid hydrolysis



Licores Negros
 Black liquors

Licor negro procedente del proceso Organosolv para una posterior obtención de lignina
 Organosolv process black liquors for further obtention of lignin.

El concepto de economía sostenible se aplica cada vez más en todos los ámbitos sociales e industriales, reflejándose, como no podía ser de otra manera, en las nuevas necesidades de mercado, donde el compromiso ecológico es cada vez más fuerte. Así, la sociedad está cada día más concienciada y convencida de la necesidad de consumir productos que se hayan obtenido a través de procesos respetuosos con el medio ambiente. En este punto, la obtención de bioproductos es un mercado en constante expansión con aplicaciones en diversas industrias como la química, papelera, farmacéutica y alimentaria. Íntimamente ligado a esto se encuentra el concepto de biorrefinería, definido por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables de EEUU (NREL) como, “aquella instalación que integra procesos de transformación de biomasa y equipos adecuados para producir combustibles, energía y químicos a partir de la biomasa”, optimizando el procesamiento de la biomasa, aumentando su eficiencia y minimizando sus impactos ambientales frente a las refinerías de petróleo (PER 2011-2020). Las biorrefinerías de segunda generación se centran en el fraccionamiento de los materiales lignocelulósicos en sus principales componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina, permitiendo obtener una gran variedad de productos industriales; biocombustibles, biomateriales, pastas celulósicas y nanofibras de celulosa, lignina y sus derivados, etc.

Un ejemplo de material lignocelulósico susceptible de ser valorizado y aprovechado se puede encontrar en la paja de cereales, que por su composición y abundancia suponen una materia prima idónea para la producción de pastas celulósicas para la obtención de papel y celulosa moldeada, así como para la producción de otros compuestos de valor añadido como oligosacáridos, bioetanol de segunda generación y nanofibras de celulosa.

Según la FAO, la producción mundial total de cereales en 2014 ascendió a 2.818 millones de toneladas. De entre todos los cereales, la producción total en el mundo de maíz, trigo, cebada, colza y avena fue 1.037 Mt, 792 Mt, 144 Mt, 73,8 Mt y 22,7 Mt, respectivamente; generándose en Europa el 64,81% y el 64,40% del total de la producción de cebada y avena, suponiendo el 38,98%, 31,48% y 12,42% la colza, el trigo y el maíz, respectivamente. Considerando que por cada kilogramo de cereales se generan entre 0,53 y 1,3 kg de residuo (paja), ésta actividad agrícola genera al año una elevada cantidad de residuos, que en la actualidad son utilizados, en el mejor de los casos y en cantidades pequeñas, como enmienda agrícola y alimento para el ganado, siendo en su mayoría quemados directamente en el campo, lo que provoca contaminación y riesgo de incendios. Según los datos emitidos por la FAO, en el año 2014 se quemaron 379,4 Mt de residuos agrícolas provocando unas emisiones de 29.746 Gg de equivalentes de dióxido de carbono

procedentes de la producción de metano y óxido nitroso durante la quema de residuos de maíz, arroz, caña de azúcar y trigo.

El uso de la paja de cereal y otros materiales lignocelulósicos no madereros presenta una serie de ventajas con respecto a las especies madereras, como son:

- ✚ Permite sustituir las especies madereras, más útiles para otros usos más nobles, disminuyendo las deforestaciones y las replantaciones incontroladas.
- ✚ Se disminuyen las importaciones de madera en países con déficit de materias primas madereras, lo que supondría un beneficio para su economía.
- ✚ Permite incrementar la rentabilidad de la producción de productos agroalimentarios, ya que no sólo se obtendría beneficio del principal producto, sino que los residuos podrían aprovecharse para obtener productos de alto valor añadido, lo que podría resultar atractivo para las empresas agrícolas.

Por tanto, es importante investigar el aprovechamiento integral de este tipo de materiales lignocelulósicos.

Por una parte, los residuos agrícolas (paja de cereal) se pueden someter a un proceso de pasteado semiquímico con diferentes reactivos. En este trabajo, sosa con o sin adición de antraquinona (este último, proceso Specel®) para el fraccionamiento de la biomasa, obteniendo, por un lado un sólido, rico en celulosa y hemicelulosas, a partir del cual se producirán pastas celulósicas; y por otro lado un licor negro con alto contenido en lignina, pudiéndose separar esta lignina para una posterior obtención de productos de valor añadido. Dichas pastas celulósicas se pueden emplear directamente en la producción de papel o para dar lugar a envases ecológicos de diversos usos.

Por otra parte, mediante los tratamientos hidrotérmicos o de autohidrólisis, consistentes en tratar la materia prima con agua a elevada temperatura, se puede solubilizar el mayor porcentaje posible de hemicelulosas, que están constituidas principalmente por unidades de xilosa. De esta manera se obtienen dos fracciones: una sólida, compuesta principalmente por celulosa y lignina, y otra líquida o hidrolizado, formada por una mezcla de oligómeros (xilooligómeros), monosacáridos (principalmente xilosa), productos de descomposición de azúcares (furfural o hidroximetilfurfural) y ácido acético. Este último se genera a partir de los grupos acetilos presentes en la hemicelulosa, actuando como catalizador

de la reacción de autohidrólisis. Los xilooligosacáridos obtenidos en este tratamiento pueden tener diversas aplicaciones, como aditivos alimentarios y fármacos y como sustrato para la producción de azúcares tras una hidrólisis adecuada. Por otro lado, los monosacáridos (glucosa, xilosa, etc.) pueden fermentarse obteniéndose productos con un elevado valor añadido, como es el xilitol.

A la fracción sólida obtenida del proceso de autohidrólisis se le puede aplicar un tratamiento de pasteado con distintos reactivos y/o disolventes, con la finalidad de separar la celulosa y la lignina, obteniéndose dos nuevas fracciones: una sólida rica en celulosa (pasta celulósica) y otra líquida de color oscuro (lejía negra), que contiene productos de degradación de la lignina y de la celulosa, sales de ácidos orgánicos complejos y lignofenolatos.

Estos procesos hidrotérmicos y de pasteado son también adecuados como tratamientos previos a la obtención de bioetanol mediante la hidrólisis de polisacáridos y la fermentación de los azúcares resultantes. En la mayoría de los casos, la etapa de hidrólisis es catalizada por enzimas, mientras que la fermentación puede llevarse a cabo ya sea durante o después de la etapa de hidrólisis enzimática; el primer enfoque se conoce como "hidrólisis y fermentación simultáneas".

Por último, toma cada vez más importancia la producción de nanofibras de celulosa o celulosa nanofibrilar (CNF/LCNF de sus siglas en inglés) a partir de celulosa obtenida en procesos clásicos de pasteado. Así, las pastas celulósicas obtenidas por el pasteado a la sosa, se pueden someter a un proceso de fricción ultrafina, seguido por un proceso de microfluidización para obtener nanofibras de celulosa con elevado contenido en lignina (LCNF, también llamadas NFLC). Las CNF/LCNF tienen propiedades y funcionalidades únicas comparadas con las macrofibras, además de poder considerarlas como una alternativa a los materiales derivados del petróleo y de las fuentes no renovables. Las CNF/LCNF, debido a su abundancia, biodegradabilidad, naturaleza renovable y estructura única, tienen múltiples aplicaciones como agente de refuerzo en la fabricación de papel, envases y composites, revestimientos, membranas, embalajes, pudiéndose combinar con polielectrolitos en el procesado de fibras. Otras aplicaciones destacables son los excelentes geles que forman en dispersiones acuosas a bajos contenidos de sólidos, aerogeles resistentes, espumas, emulsiones y dispersiones estabilizantes. Los films preparados a partir de nanocelulosa, denominados nanopapeles presentan propiedades mecánicas extraordinarias.

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la valorización de residuos de la industria agroalimentaria. En concreto, paja de distintos cereales: maíz, colza, cebada y avena; habiendo sido estos dos últimos materiales los más ampliamente estudiados para la producción de pastas celulósicas y papel, oligosacáridos y bioetanol de segunda generación y nanofibras de celulosa siguiendo el esquema de biorrefinería de materiales lignocelulósicos.

The concept of sustainable economy is being increasingly applied in all social and industrial aspects leading, of course, to new market needs, where the ecological commitment is a very important factor. Thus, society is becoming aware and convinced of the need to consume products which have been obtained through environmentally respectful processes. At this point, the production of bio-based products is a constantly expanding market with applications in several industries as the chemical, paper, pharmaceutical and food ones. Closely associated with this, the biorefinery concept, which has been defined by the National Renewable Energy Laboratory (NREL) of the United States as “a facility that integrates biomass conversion processes and equipment to produce fuels, power, and chemicals from biomass”, comes up. Furthermore, the modern biorefineries improves the biomass processing, increasing its efficiency and minimizing the environmental impacts against the oil refineries (Spanish Renewable Energy Plan, PER 2011-2020). Second generation biorefineries are focused on the fractionation of lignocellulosic materials in their main components: cellulose, hemicellulose and lignin. Because of this, a wide variety of industrial products are allowed to be produced: biofuels, biomaterials, cellulosic pulps and cellulosic nanofibers, lignin and its derivatives, etc.

Cereals straw is an example of lignocellulosic material susceptible of being valorized and harnessed, which due to its composition and abundance constitutes a suitable raw material for the production of cellulosic pulps to obtain paper and molded cellulose, as well as for the production of other high added values compounds such as oligosaccharides, second generation bioethanol and cellulose nanofibers.

According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), total world cereal production in 2014 amounted to 2,818 million tons. The total world production of maize, wheat, barley, rapeseed and oat was 1,037 Mt, 792 Mt, 144 Mt, 73,8 Mt and 22,7 Mt, respectively; the 64.81% and the 64.40% of the total production of barley and oat were produced in Europe, accounting for the 38.98%, 31.48% and 12.42%, rapeseed, wheat and maize, respectively. Considering that to obtain one kilogram of grains between 0.53 and 1.3 kg of residue (straw) is generated, this agricultural activity creates a large quantity of residues per year. Nowadays, at best and in small quantities, these residues are used as organic amendment and food for cattle, but mostly are burned directly in the field, which causes pollution and fire risks.

According to data released by FAO, in the year 2014, 379.4 Mt of agricultural residues were burned causing emissions of 26,746 Gg of carbon dioxide equivalents from methane and nitrous oxide produced during the burning of maize, rice, sugarcane and wheat crop residues.

The use of cereals straw and other non-wood lignocellulosic materials in the biorefinery industry has several advantages compared to wood species:

- ✚ It enables the substitution of wood species, which are more useful for other purposes, reducing the uncontrolled deforestations.
- ✚ Wood importations in countries with deficits of wood species are reduced, which would benefit their economy.
- ✚ The profitability of the agri-food products manufacture could be increased since a benefit of the residue might be obtained apart from the profit generated by the main product. In addition, this byproduct could be used to get high added value compounds. This alternative could be an attractive plan for agricultural businesses.

Hence, researching the integral use of this kind of lignocellulosic materials becomes important.

On the one hand, crop residues (cereals straw) can be subjected to a semi-chemical pulping process with several reagents. In this work, sodium hydroxide with or without addition of anthraquinone (the latter called Specel® process) is used in order to carry out the fractionation of the biomass, getting by one side a solid rich in cellulose and hemicelluloses, from which cellulose pulps will be produced and, on the other side, a high lignin content black liquor. This lignin could be separated for a further production of high added value compounds. Such cellulosic pulps can be directly used for the manufacture of paper or ecological packaging of different applications.

On the other hand, through hydrothermal or autohydrolysis treatments, consisting of treating the raw material with water at high temperatures, the largest possible percentage of hemicelluloses can get solubilized, which are mainly constituted of xylose units. Thus, two fractions are obtained: a solid one mainly composed by cellulose and lignin, and a liquid one or hydrolysate, consisting of a mixture of oligomers (xylooligomers), monosaccharides (primarily

xylose), sugars decomposition products (furfural or hydroxymethylfurfural) and acetic acid. The latter is generated from the acetyl groups which are present in the hemicellulose, working as catalysts in the autohydrolysis reaction. The obtained xylooligosaccharides in this treatment may have several applications as food additives and drugs as well as a substrate for the production of sugars after a proper enzymatic hydrolysis. Moreover, monosaccharides (glucose, xylose, etc.) can be fermented to obtain products of high added value, such as xylitol.

The solid fraction from the autohydrolysis process can be subjected to a pulping treatment with different reagents and/or solvents in order to separate cellulose and lignin. In this way, two new fractions are obtained: a solid one, rich in cellulose (cellulosic pulp) and a dark liquid one (black liquor), which contains lignin and cellulose degradation products, salts of complex organic acids and lignophenolates.

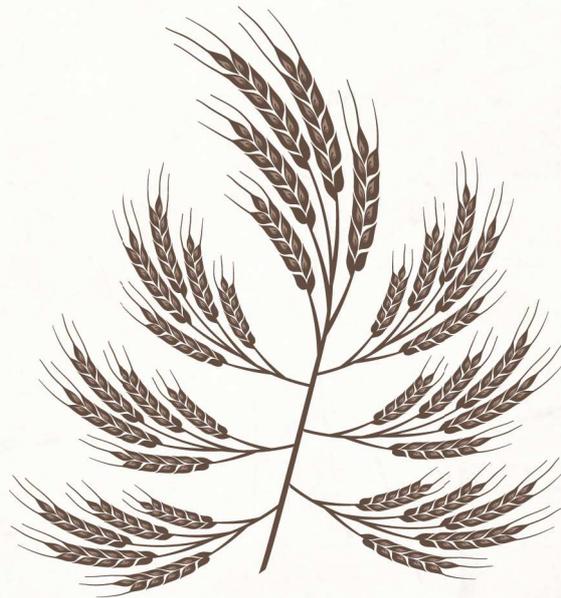
These hydrothermal and pulping processes are also suitable as previous treatments to the productions of bioethanol through the hydrolysis of polysaccharides and fermentation of the resulting sugars. In the majority of cases, the hydrolysis stage is catalyzed by enzymes, while the fermentation can be carried out both, during or after the enzymatic hydrolysis stage; the first approach is known as “Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)”.

Last but not least, the production of cellulose nanofibers (CNF) (also called nanofibrillar cellulose, NFC), from the cellulose obtained in the classic pulping processes, is becoming increasingly more relevant. Thus, the cellulosic pulps produced through the soda pulping process can be subjected to an ultra-fine friction process, followed by a microfluidization process in order to get high lignin content cellulose nanofibers (LCNF, also called NFLC). NFC/NFLC have unique properties and features compared to macrofibers, as well as being considered as an alternative to petroleum-derived materials and to non-renewable sources. Due to their abundance, biodegradability, renewable nature and unique structure, the NFC/NFLC present many applications as a reinforcing agent in the manufacture of paper, packaging and composites, coating, membranes, and can be combined with polyelectrolytes in the fiber processing. Other outstanding applications are the excellent gels that NFC/NFLC form in aqueous suspensions at low solids contents, resistant aerogels, foams, emulsions and stabilizing dispersions. The films prepared from nanocellulose, called nanopapers, present extraordinary mechanical properties.

In this Doctoral Thesis, the valorization of agri-food industry residues has been performed. In particular, different cereals straws have been used: maize, rapeseed, barley and oat. The two latter materials have been widely studied for the production of cellulosic pulps and paper, oligosaccharides and second generation bioethanol as well as cellulose nanofibers, following the lignocellulosic materials biorefinery scheme.

OBJETIVOS

OBJECTIVES



El objetivo de la presente Tesis Doctoral es el aprovechamiento integral, siguiendo un esquema de biorrefinería, de residuos procedentes de la industria agroalimentaria. Concretamente, la valorización de pajas de cereales para la producción de pastas celulósicas, oligosacáridos, bioetanol de segunda generación y nanofibras de celulosa.

Los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1) Caracterización físico-química de diversos tipos de paja de cereales (cebada, avena, maíz, trigo y colza) determinando los contenidos de extractos en etanol, solubilidad en sosa al 1%, α -celulosa, hemicelulosa, lignina, cenizas.

Artículo I

- 2) Obtención de pastas celulósicas a partir de paja de cereales (cebada, avena, maíz y colza) empleando como reactivo químico hidróxido sódico bajo las condiciones de temperatura, tiempo, concentración de reactivo y relación líquido/sólido marcadas por el proceso industrial Specel®.

Artículo I

- 3) Caracterización química de las pastas celulósicas resultantes, determinando el rendimiento, grado de refino, número Kappa y viscosidad.

Artículo I

- 4) Formación y caracterización física de las hojas de papel obtenidas a partir de dichas pastas, determinando el índice de tracción, de estallido y de desgarro, el alargamiento y el grado de blancura.

Artículo I

- 5) Estudio de la influencia de las variables de operación (temperatura, tiempo, concentración de sosa-antraquinona) sobre las características físico-químicas de las pastas celulósicas y de las hojas de papel obtenidas a partir de ellas (rendimiento, viscosidad, número Kappa, índice de tracción, de estallido, de desgarro, alargamiento y grado de blancura).

Artículo II

- 6) Estudio de la influencia de las variables de operación del tratamiento hidrotérmico (temperatura y tiempo) de la paja de cebada sobre la composición de las fracciones sólidas obtenidas (rendimiento en sólido, contenido de compuestos no volátiles, contenido de glucano, xilano, arabinano, grupos acetilo, lignina klason y otros) y sobre la composición de las fracciones líquidas resultantes (concentración de azúcares, oligómeros, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural).

Artículo III

- 7) Estudio de la influencia de las condiciones de operación y optimización de estas en el tratamiento hidrotérmico sobre la susceptibilidad del sólido resultante a la hidrólisis enzimática (considerando las siguientes variables de operación en dicha hidrólisis enzimática: relación líquido/sólido, relación celulasa/sustrato y tiempo).

Artículo III

- 8) Estudio de la producción de bioetanol mediante sacarificación y fermentación simultáneas en modo fed-batch (FBSSF) a partir de los óptimos encontrados en los objetivos 6 y 7. Estudio de la influencia de las variables de operación de la SSF (concentración de biomasa, relación líquido/sólido, relación celulasa/sustrato y tiempo) sobre la conversión a bioetanol y sobre la concentración de bioetanol.

Artículo III

- 9) Estudio de la influencia de las condiciones de operación (temperatura, tiempo, concentración de etanol, relación líquido/sólido) en la deslignificación organosolv con etanol de la fracción sólida resultante del tratamiento hidrotérmico, sobre el grado de fraccionamiento obtenido y la composición de las fracciones sólida y líquida resultantes.

Artículo IV

- 10) Estudio de la influencia de las variables de operación (relación líquido/sólido, carga enzimática, concentración de sólidos, tiempo) sobre producción de bioetanol mediante sacarificación y fermentación simultáneas en modo fed-batch (FBSSF) de los sólidos autohidrolizados-deslignificados, obtenidos en la etapa 9, sobre la conversión a bioetanol y la concentración de bioetanol.

Artículo IV

- 11) Producción de nanofibras de celulosa con contenido en lignina (LCNF ó NFLC) mediante tratamientos mecánicos, a partir de las pastas celulósicas obtenidas del pasteado de la paja de cebada y de avena bajo las condiciones de operación del proceso Specel®.

Artículo V

- 12) Caracterización de las nanofibras de celulosa mediante técnicas de microscopía, espectroscopía y termogravimetría.

Artículo V

- 13) Fabricación de nanopapeles mediante filtración y *casting*, empleando sólo LCNF o LCNF con hemicelulosas añadidas (xilanos añadidos) determinando sus propiedades mecánicas y comportamiento frente al agua, a través de la medición del ángulo de contacto (WCA).

Artículo V

- 14) Estudio del comportamiento reológico de las suspensiones acuosas de nanofibras de celulosa (de cebada y avena) preparadas a diferentes concentraciones así como de la influencia de la lignina en dicho comportamiento.

Artículo V

- 15) Estudio el comportamiento reológico de las suspensiones de NFLC con adición de electrolitos (NaCl y CaCl₂) y con hemicelulosas (xilanos).

Artículo V

The main objective of this Doctoral Thesis is the integral use, following the biorefinery scheme, of the residues from agri-food industry, more precisely, the valorization of different cereals straws for the production of cellulosic pulps, oligosaccharides and second generation bioethanol as well as cellulose nanofibers.

The specific goals of this Doctoral Thesis are the following:

- 1) Physico-chemical characterization of different kinds of cereals straws (barley, oat, maize, wheat and rapeseed), by determining the alcohol extractives, 1% NaOH solubles, α -cellulose, hemicellulose and lignin content.

Article I

- 2) Production of cellulose pulps from cereals straws (barley, oat, maize and rapeseed) using sodium hydroxide as chemical reagent under the conditions of temperature, time, reagent concentration and liquid-to-solid ratio fixed by the Specel© industrial process.

Article I

- 3) Chemical characterization of the resulting cellulosic pulps, by determining yield, beating degree, Kappa number and viscosity.

Article I

- 4) Formation and physical characterization of paper sheets from the above mentioned pulps, measuring the tensile, burst, tear and stretch indexes, as well as brightness.

Article I

- 5) Study of the influence of the operation variables (temperature, time, soda-anthraquinone concentration) on the physico-chemical characteristics of the cellulosic pulps and the respective paper sheets (yield, viscosity, Kappa number, tensile, burst, tear and stretch indexes and brightness).

Article II

- 6) Study of the influence of the operation variables of the barley straw hydrothermal treatment (temperature and time) on the composition of the obtained solid fractions (solid yield, non-volatile compounds content, glucan, xylan, arabinan, acetyl groups and Klason lignin contents, and others) and on composition of the resulting liquid fractions (sugars, oligomers, acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural concentrations).

Article III

- 7) Study of the influence of the operation conditions and optimization of the ones in the hydrothermal treatment on the susceptibility to the enzymatic hydrolysis of the resulting solid (considering the following operation variables in the mentioned enzymatic hydrolysis: liquid-to-solid ratio, cellulase-to-substrate ratio and time).

Article III

- 8) Study of the production of bioethanol through simultaneous saccharification and fermentation in fed-batch mode (FBSSF) from the optimal results found in the previous aims, 6 and 7. Study of the influence of the FBSSF operation variables (biomass concentration, liquid-to-solid ratio, cellulase-to-substrate ratio and time) on the conversion to bioethanol and on the bioethanol concentration.

Article III

- 9) Study of the influence of the operation variables (temperature, time, ethanol concentration and liquid-to-solid ratio) on the ethanol organosolv delignification of the obtained solid fraction from the hydrothermal treatment, on the fractionation degree and on the resulting solid and liquid fractions composition.

Article IV

- 10) Study of the influence of the operation variables (liquid-to-solid ratio, enzymatic loading, solids concentration and time) on the bioethanol production through the FBSSF of the autohydrolyzed-delignified solids, obtained in the 9 stage, and on the conversion to bioethanol and bioethanol concentration.

Article IV

- 11) Production of cellulose nanofibers with lignin content (NFLC), through mechanical treatments, from the cellulosic pulps obtained from the Specel® pulping process of barley and oat straw.

Article V

- 12) Characterization of cellulose nanofibers using microscopic, spectroscopic and thermogravimetric techniques.

Article V

- 13) Nanopapers production through filtration and casting techniques, using pure NFLC or NFLC with added/extra hemicelluloses (xylans), and determination of their mechanical properties and behavior against water by measuring the water contact angle (WCA).

Article V

- 14) Study of the rheological behavior of the NFLC aqueous suspensions at different concentrations (from barley and oat cellulosic pulps) as well as the role of lignin on the rheological behavior.

Article V

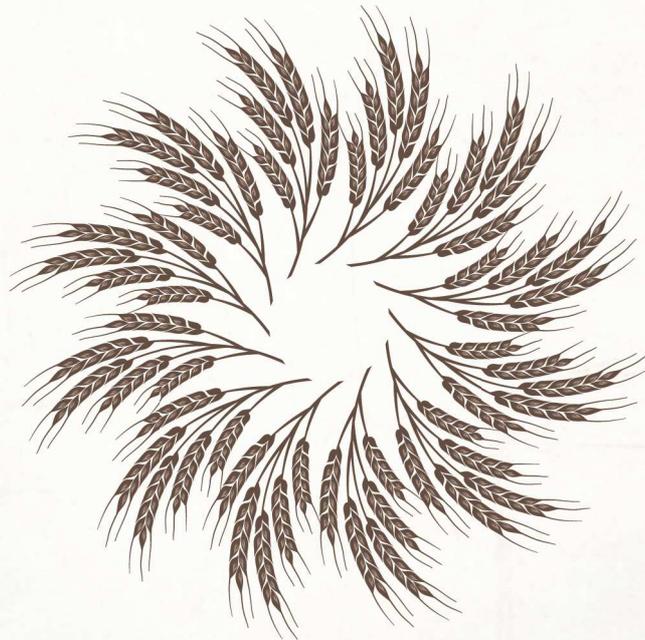
- 15) Study of the rheological behavior of NFLC suspensions with added electrolytes (NaCl and CaCl₂) and hemicelluloses (xylans).

Article V

Capítulo

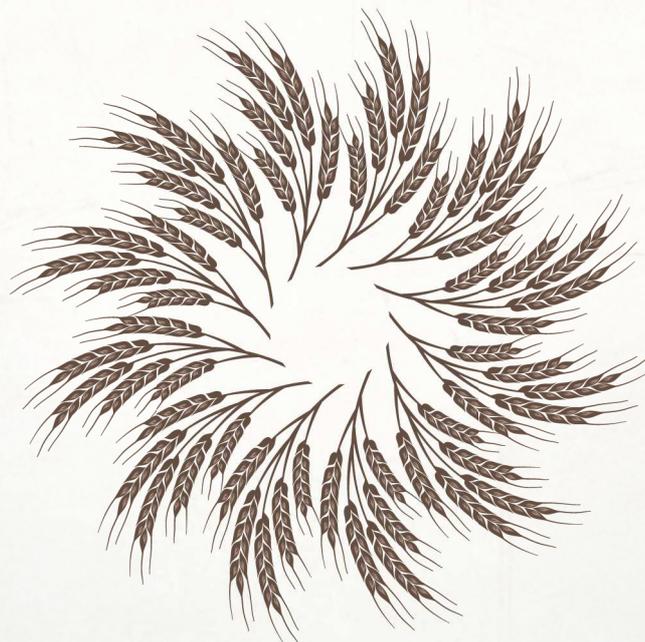
I

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

- Sección 1. Biorrefinería: Concepto y clasificación
- Sección 2. Estructura de los materiales lignocelulósicos
- Sección 3. Biorrefinería de materiales lignocelulósicos para la producción de pastas celulósicas, papel y celulosa moldeada.
- Sección 4. Biorrefinería de materiales lignocelulósicos para la producción de oligosacáridos y bioetanol de segunda generación
- Sección 5. Biorrefinería de materiales lignocelulósicos para la producción de nanofibras de celulosa o celulosa nanofibrilar



1. BIORREFINERÍA: CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

1.1. EL CONCEPTO DE BIORREFINERÍA

La madera fue la principal fuente de energía hasta el siglo XIX, sin embargo, el uso de este material como combustible fue menguando progresivamente con la revolución industrial comenzando la era de los combustibles fósiles. Hoy en día, el aumento del precio, los problemas medioambientales ocasionados por su uso así como las reservas limitadas de estos combustibles fósiles, hace necesario el desarrollo de actividades económicas más sostenibles, en las que la biomasa vegetal adquiere de nuevo importancia.

La obtención de bioproductos es un mercado en constante expansión con aplicaciones en diversas industrias como la farmacéutica, química, papelera y alimentaria.

Íntimamente ligado a este mercado se encuentra el concepto de biorrefinería, término que engloba la integración de procesos y tecnologías para un uso eficaz de las materias primas, logrando así instalaciones que operan de una manera sostenible con el medio ambiente (Bioenarea). Este concepto de biorrefinería se ha ido desarrollando, por analogía con las refinerías de petróleo, para aludir a una amplia variedad de estructuras productivas integradas con el fin de optimizar el procesamiento de la biomasa, hacerlas más eficientes y minimizar sus impactos ambientales (PER 2011-2020). Se trata, por tanto, de instalaciones productivas en las que, al igual que las refinerías actuales más avanzadas, se produzcan combustibles, energía y diferentes líneas de productos químicos, utilizando en el proceso biomasa vegetal en lugar de petróleo.

En los últimos años son numerosas las definiciones que se encuentran del concepto de biorrefinería:

- ✚ **International Energy Agency (IEA)** ha resumido el concepto de biorrefinería como *“el procesamiento sostenible de biomasa en un espectro de productos para el mercado y la producción de energía” (IEA Bioenergy Task 42 on Biorefineries).*
- ✚ **National Renewable Energy Laboratory (NREL)** define el concepto como *“aquella instalación que integra procesos de transformación de biomasa y equipos adecuados para producir combustibles, energía y químicos a partir de la biomasa”.*

 **Otras definiciones encontradas en la bibliografía:**

- ❖ *“Industrias integradas de productos de base biológica, que utilizan diversas tecnologías para producir sustancias químicas, biocombustibles y bioenergía, productos alimentarios y biomateriales empleando como materia prima la biomasa” (EU Biorefinery Euroview, 2007).*
- ❖ *“Es la combinación óptima de procesos biológicos, termoquímicos y químicos para la obtención de una variada gama de productos, que posibilita el empleo de numerosas materias primas gracias a las sinergias establecidas entre las tecnologías” (Bioenarea).*

1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS BIORREFINERÍAS

1.2.1. POR GRADO DE INTEGRACIÓN DE LOS PROCESOS

El grado de integración de los procesos es precisamente la base de la clasificación más extendida de las biorrefinerías, que las divide en primera, segunda y tercera generación, siendo estas últimas las más integradas y con mayor flexibilidad, permitiendo generar a partir de la biomasa un amplio abanico de productos con un bajo nivel de residuos.

1.2.1.1. Biorrefinerías de primera generación

Se caracterizan por la utilización de fuentes de biomasa tales como la caña de azúcar, maíz, soja, etc., a partir de los cuales se consiguen fácilmente disoluciones de azúcares fermentables, principalmente a bioetanol, o aceites para la producción de biodiésel. Son las menos sofisticadas en términos de aprovechamiento ya que precisan de materias primas concentradas en una sustancia y plantean amenazas tales como el consumo de cultivos para alimentos, deterioro del suelo y consecuente uso de fertilizantes, así como problemas derivados de monocultivos extensos. Además, requieren un uso del capital moderadamente intensivo.

1.2.1.2. Biorrefinerías de segunda generación

Se centran en la lignocelulosa como materia prima y, por tanto, en tres componentes para ser aprovechados: celulosa, hemicelulosa y lignina. La diversificación de los productos es mayor pero también lo es el problema que crea para fraccionar la lignocelulosa en sus tres componentes principales. Sus principales ventajas son, la abundancia de lignocelulosa (es la fuente más abundante de carbono renovable en el planeta) y el uso de cultivos no

alimenticios. Como desventaja, la dificultad para fraccionar la lignocelulosa en sus tres componentes a un coste asumible. No obstante, este tipo de biorrefinerías mejora la utilización de energía y el reciclado de residuos (Villar, 2013).

1.2.1.3. Biorrefinerías de tercera generación

También llamadas biorrefinerías integradas se encuentran aún en fase de desarrollo. Producirían, mediante un conjunto de tecnologías múltiples, líneas de productos (biocombustibles, productos químicos, plásticos, etc.) partiendo de biomasa de diverso origen. Son las más ambiciosas porque se extienden a una mayor diversidad de residuos procedentes de la agricultura, ganadería, residuos sólidos urbanos (RSU), petroquímicas, papeleras, etc., ampliando, consecuentemente, la gama de productos a obtener, como etanol, combustibles, productos agroquímicos y plásticos. Las ventajas de este tipo de biorrefinería son la posibilidad de utilizar casi cualquier residuo orgánico, la no competencia con las formas anteriores de biorrefinería, y la producción de una forma limpia de energía. Las previsiones coinciden en que, con ellas, será posible aprovechar todas las posibilidades que ofrece la biomasa, reduciendo la generación de residuos y haciendo más sostenible la utilización de esta (Martín, 2009; Villar, 2013).

1.2.2. POR TIPO DE BIOMASA EMPLEADA

1.2.2.1. Biorrefinería de materiales lignocelulósicos

Donde el punto de partida es el fraccionamiento de la biomasa en celulosa, hemicelulosa y lignina. Permite la obtención de una gran variedad de productos industriales a partir de la celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y forestales, pudiéndose integrar los procesos de gasificación, pirólisis y fermentación para dar lugar a bioetanol, biomateriales, productos alimenticios y productos químicos, tales como adhesivos, dispersantes, pinturas, fármacos, textiles, etc. (Bioenarea) (Figura 1.1). Es este tipo de biorrefinería la que nos ocupa en el presente trabajo.

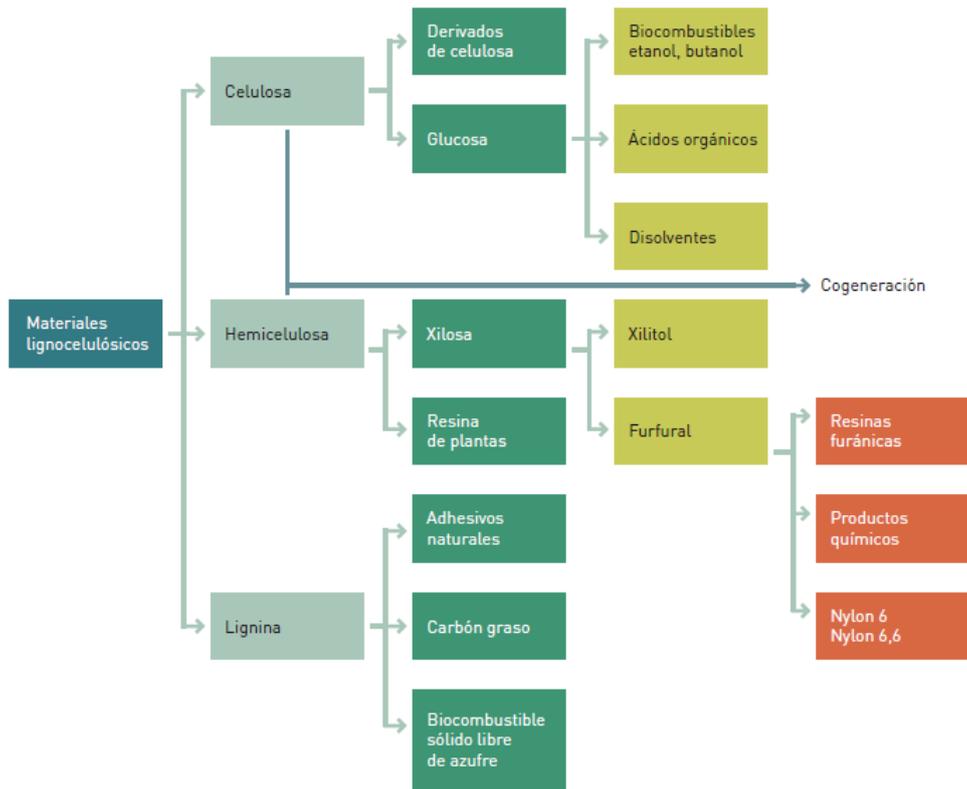


Figura 1.1: Esquema de los productos que pueden obtenerse a partir de las diferentes fracciones de la biomasa lignocelulósica.

Fuente: Kamm and Kamm (2004).

1.2.2.2. Biorrefinería de material cereal o cultivo completo

Este concepto se corresponde con las plantas de etanol que utilizan materias primas con alto contenido en almidón como son el maíz, la cebada y el trigo. Dichas plantas generan una serie de subproductos que pueden ser aprovechados con diversos fines, entre los que se encuentran los granos de destilería secos, que son empleados por sus características como complemento alimenticio para el ganado. Asimismo otros coproductos que pueden obtenerse son: harinas, jarabe de maíz, almidón, dextrosa, etc.

1.2.2.3. Biorrefinería de semillas oleaginosas

Estas instalaciones se corresponden con las plantas de biodiésel que utilizan como materias primas cultivos con alto contenido en aceite como la colza, girasol y soja. Como coproductos se obtienen la glicerina, así como otros componentes con alto contenido en proteína que se emplean para fines alimentarios. Por su parte, la glicerina puede utilizarse en los sectores farmacéutico, cosmético y químico para la fabricación de emulsiones, humectantes, jabones, plastificantes, resinas, lubricantes, etc.

1.2.2.4. Biorrefinería verde

Este tipo de biorrefinerías se basa en la presurización de biomasa húmeda, tales como pastos y cultivos verdes (trébol, alfalfa), lo que resulta en un prensado rico en fibras y en un jugo rico en nutrientes. La diferencia con otros tipos de biorrefinerías consiste en que se utiliza biomasa vegetal fresca, lo cual implica un rápido procesamiento primario o, de no ser esto posible, el uso de métodos de ensilaje que impidan su degradación. Un beneficio de este tipo de refinerías es el rendimiento por hectárea relativamente alto, una vinculación potencialmente directa con los productores agrícolas y costos de insumos de biomasa bajos.

1.2.2.5. Biorrefinería de Plataforma Syngas

Este tipo de biorrefinería es similar a las denominadas Biorrefinerías de Concepto de Dos Plataformas. Las dos plataformas aluden a la conversión a partir de azúcares (plataforma bioquímica) y a partir de gas de síntesis (plataforma *Syngas*). En la primera se lleva a cabo un proceso de conversión enzimática o de fermentación del azúcar y, en la segunda, un proceso de conversión termoquímico. La ventaja de este sistema es la producción de energía, combustibles y productos a partir de procesos simples de sacarificación y del gas de síntesis. A partir del gas de síntesis es posible llegar a producir gasolinas mediante catalizadores *Fischer-Tropsch*.

1.3. RUTAS DE TRANSFORMACIÓN EMPLEADAS EN BIORREFINERÍA

Una biorrefinería, de manera análoga a lo que ocurre en una petro-refinería, debería basarse en procesos de mejora continua en la utilización de la materia prima. Esto significa separar la totalidad de los componentes de la biomasa, conduciendo a través de una cadena de diversos procesos, a una elevada concentración de especies químicas puras, como por ejemplo el bioetanol, o una alta concentración de moléculas que tengan funciones similares bien identificadas. Como consecuencia de ello, una materia prima no puede ser directamente quemada sin ningún tratamiento previo, ya que el objetivo de una biorrefinería es incrementar el valor de los diferentes componentes de la biomasa como fuente de material y energía. Así, la opción más deseable sería enviar a la combustión para la producción de calor y electricidad, solamente los residuos y sobrantes de tratamientos tecnológicos y procesos de conversión previos. Por tanto, una biorrefinería debería producir al menos un químico de alto valor añadido o producto material, además de productos de bajo grado y elevado volumen (como alimento animal y fertilizantes); asimismo, una biorrefinería debería producir al menos un producto energético además de calor y electricidad. Por tanto, para poderse considerar

biorrefinería se requiere la producción de al menos un biocombustible ya sea en su forma líquida, sólida o gaseosa.

Una planta de biorrefinería debe también ser capaz de abastecerse de manera sostenible: todos los requerimientos energéticos de los diversos procesos de conversión de biomasa deberían poder abastecerse internamente por la producción de calor y electricidad procedente de la combustión de residuos. De manera similar, los residuos sólidos, líquidos y gaseosos se deberían minimizar, pudiéndose conseguir de dos maneras: empleando todos los componentes de la biomasa para producir un amplio espectro de múltiples productos en un solo lugar, o fijando los llamados “*bio-clusters*” o “*complejos de biorrefinería*” donde los intercambios de flujo de materia entre diferentes plantas son promovidos con el fin de transformar un residuo “*downstream*” de una planta en materia prima “*up-stream*” para otra planta (Cherubini *et al.*, 2009; Cherubini, 2010).

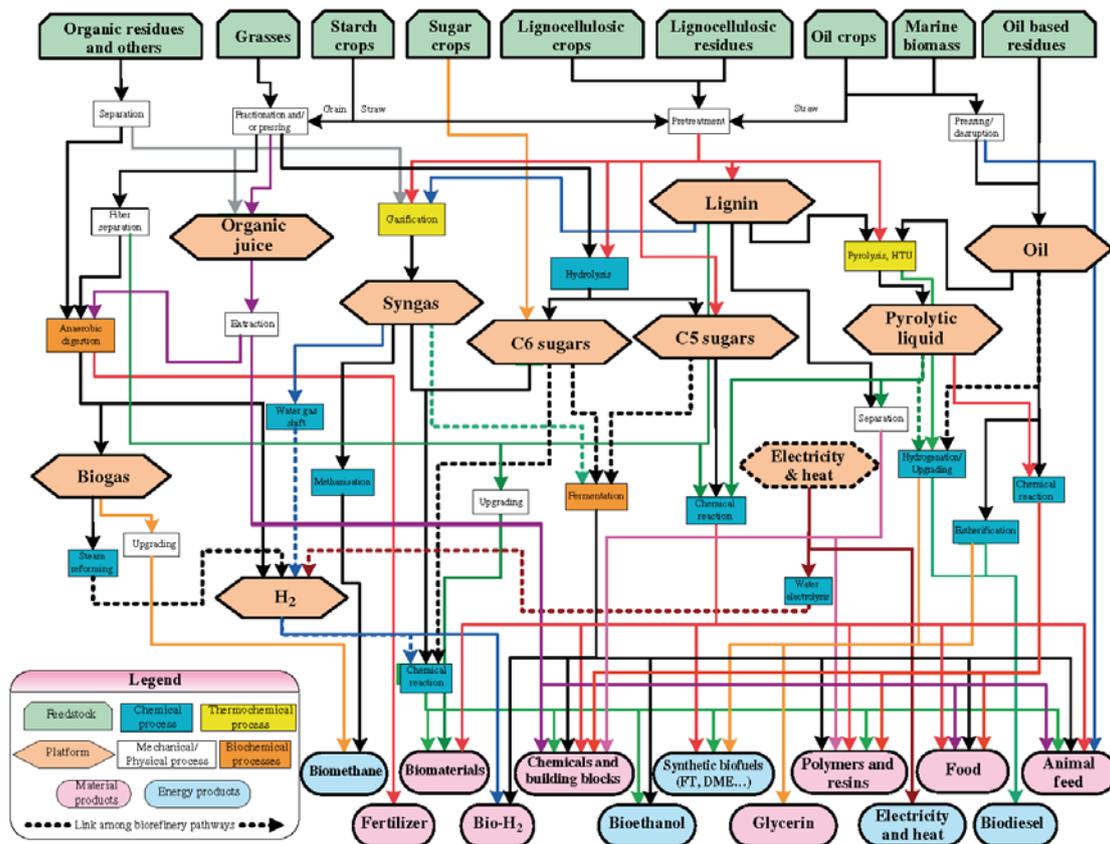


Figura 1.2. Red donde los sistemas de biorrefinería individuales se combinan.

Fuente: Cherubini *et al.*, 2009.

Para producir biocombustibles, bioquímicos, biomateriales, alimento para animales, etc., la materia prima es transformada en productos finales empleando diferentes procesos de conversión (Figura 1.2). Así, las biorrefinerías se pueden dividir en sistemas en los que las operaciones como el fraccionamiento/separación son los sistemas principales para la obtención de biocombustibles y bioquímicos. El objetivo de los procesos para la obtención de biocombustibles es despolimerizar y desoxigenar los componentes de la biomasa. La desoxigenación es particularmente importante, especialmente para la producción de biocombustibles para transporte, ya que la presencia de oxígeno puede reducir el contenido calorífico de las moléculas, proporcionándole una mayor polaridad, disminuyendo, por tanto, la mezcla con los combustibles fósiles existentes. Por el contrario, la presencia de oxígeno en productos químicos (polioles y ácidos orgánicos) proporciona, a menudo, propiedades físicas y químicas valiosas para el compuesto.

En los sistemas de biorrefinería se pueden aplicar diversos procesos tecnológicos para convertir la materia prima (biomasa lignocelulósica) en productos comercializables. Este enfoque de clasificación identifica cuatro subgrupos principales de procesos (Cherubini *et al.*, 2009).

1.3.1. PROCESOS MECÁNICOS/FÍSICOS

Son aquéllos que no cambian la estructura química de los componentes de la biomasa, sino que sólo producen una reducción de tamaño para la adaptación de la materia prima a los requisitos de la instalación o una separación de los componentes de la materia prima (por ejemplo, prensado, pretratamiento, molienda, separación, destilación, etc.).

1.3.2. PROCESOS BIOQUÍMICOS

Los procesos bioquímicos ocurren a temperaturas y velocidades bajas y se producen gracias a la acción de microorganismos y/o enzimas específicas que degradan el sustrato fermentable de la biomasa.

Mediante fermentación pueden transformarse aquellas materias primas que contienen un gran porcentaje de carbohidratos, bien en forma simple (sacarosa en la caña de azúcar) o bien en forma de polímeros de almidón (granos de cereal), inulina (patata) o polisacáridos de celulosa y hemicelulosa (materiales lignocelulósicos). También se pueden utilizar efluentes procedentes de la industria agroalimentaria, como los sueros lácteos. En la fermentación anaeróbica, uno de los principales productos obtenidos es el bioetanol, cuyo

proceso industrial genera un subproducto utilizado en la alimentación animal por su alto valor nutritivo llamado DDG “*Dried Distiller Grains*”. Pero además, es posible producir una gran variedad de productos que son especialmente interesantes en la industria: xilitol, ácido succínico, ácido itacónico, lisina, etc.

El otro proceso bioquímico, la digestión anaeróbica, ocurre en ausencia de oxígeno y la biomasa se descompone en una suspensión acuosa de productos sólidos y productos gaseosos conocidos como biogás, usado para la obtención de electricidad o energía térmica. Este proceso de transformación puede aplicarse sobre cualquier tipo de biomasa, especialmente en aquellas con un alto contenido en humedad (Bioenarea).

1.3.3. PROCESOS QUÍMICOS

En este tipo de procesos se produce una modificación en la estructura química de la molécula por reacción con otras sustancias. En este grupo cabría destacar los métodos de deslignificación cuando la materia prima empleada es un material lignocelulósico (métodos en medio acuoso como pastado a la sosa, al sulfito o al sulfato; métodos en medio orgánico como el organosolv; métodos de hidrólisis de polisacáridos como son los ácidos, hidrotérmicos, *steam explosion*, entre otros). También se incluyen en este grupo la transesterificación, hidrogenación, oxidación, etc.

1.3.4. PROCESOS TERMOQUÍMICOS

Estos procesos implican una descomposición térmica de los componentes de la biomasa y una liberación de energía en forma de calor u obtención de biocombustibles intermedios. Hay cuatro procesos termoquímicos principales que transforman la biomasa lignocelulósica en energía y productos químicos asociados a las instalaciones de biorrefinerías:

- ✚ **Combustión:** es la oxidación completa de la biomasa por el oxígeno del aire, cuya finalidad es la producción de energía. Libera simplemente, agua y CO₂, y puede servir para la calefacción doméstica o para la producción de vapor para procesos industriales y electricidad (Vila, 2005).
- ✚ **Gasificación:** consiste en un proceso de oxidación parcial (el oxígeno se limita a valores de entre un 10 y un 50% del teóricamente necesario para una combustión completa (Rivas, 2007)) de la biomasa a alta temperatura (800-1.500°C) originándose un producto gaseoso, denominado *syngas*, formado por una mezcla de H₂, CO, CO₂ y CH₄, el cual puede ser utilizado directamente como combustible para producir calor y electricidad o bien transformarse en combustibles mediante síntesis química

(biocombustibles sintéticos o BTL "biomass to liquids": *Fischer-Tropsch diesel*, dimetil-éter (DME), biometanol) o en productos químicos (alcoholes, ácidos orgánicos, amoníaco, metanol, etc) (Bioenarea; Paisley *et al.*, 1998; Spath and Dayton, 2003, Cherubini, 2010).

- ✚ **Pirólisis:** vía termoquímica de conversión de biomasa en la cual se trabaja a temperaturas intermedias (300-600 °C) y en ausencia de oxígeno, obteniéndose una serie de compuestos gaseosos similares al syngas, compuestos líquidos (*bio-oil*) y compuestos sólidos (*char*), en función de la temperatura y tiempo de calentamiento y otras condiciones de operación. Estos compuestos pueden ser utilizados para producción de energía eléctrica, síntesis de diésel y carbón vegetal (Bioenarea).
- ✚ **Licuefacción:** es una variante de la pirólisis en la que se añade un gas reductor (CO, H₂ o gas de síntesis) a temperaturas entre 300-500°C y a alta presión (120-200 bar) durante 5-15 minutos, para obtener una fase líquida con poder calorífico superior al de la biomasa inicial y que puede servir como materia prima para posteriores transformaciones químicas (Vila, 2005).

1.4. PRODUCTOS OBTENIDOS EN UNA BIORREFINERÍA

Los productos obtenidos en una biorrefinería deberían ser capaces de reemplazar a los productos basados en combustibles fósiles procedentes de la refinería del petróleo, ya sean productos químicos o energéticos.

1.4.1. PRODUCTOS ENERGÉTICOS (BIOCOMBUSTIBLES)

El término biocombustible se refiere a combustibles líquidos, gaseosos y sólidos, principalmente producidos a partir de biomasa. Se puede producir una gran variedad de biocombustibles a partir de biomasa como etanol, metanol, biodiésel, *Fischer-Tropsch*, hidrógeno, metano, etc. (Demirbas, 2008a; Singh Nigam and Singh, 2011). Cuando el biocombustible es líquido y se destina al transporte, se denomina biocarburante.

Los biocombustibles han emergido como una de las fuentes de combustible sostenible estratégicamente más importantes y son consideradas un camino fundamental de progreso para limitar las emisiones de efecto invernadero, mejorar la calidad del aire y encontrar nuevas fuentes energéticas (Delfort *et al.*, 2008; Singh Nigam and Singh, 2011).

De manera muy general, los biocombustibles se pueden clasificar como primarios y secundarios. Los primarios son empleados en su forma no procesada, principalmente para la

producción de calor y/o electricidad, como por ejemplo, la leña, las virutas de madera o los pellets. Los biocombustibles secundarios se producen mediante el procesamiento de la biomasa, por ejemplo, bioetanol, biodiésel, etc. Estos a su vez se dividen en biocombustibles de primera, segunda y tercera generación en base a la materia prima y tecnología empleada para su producción (Figura 1.3).

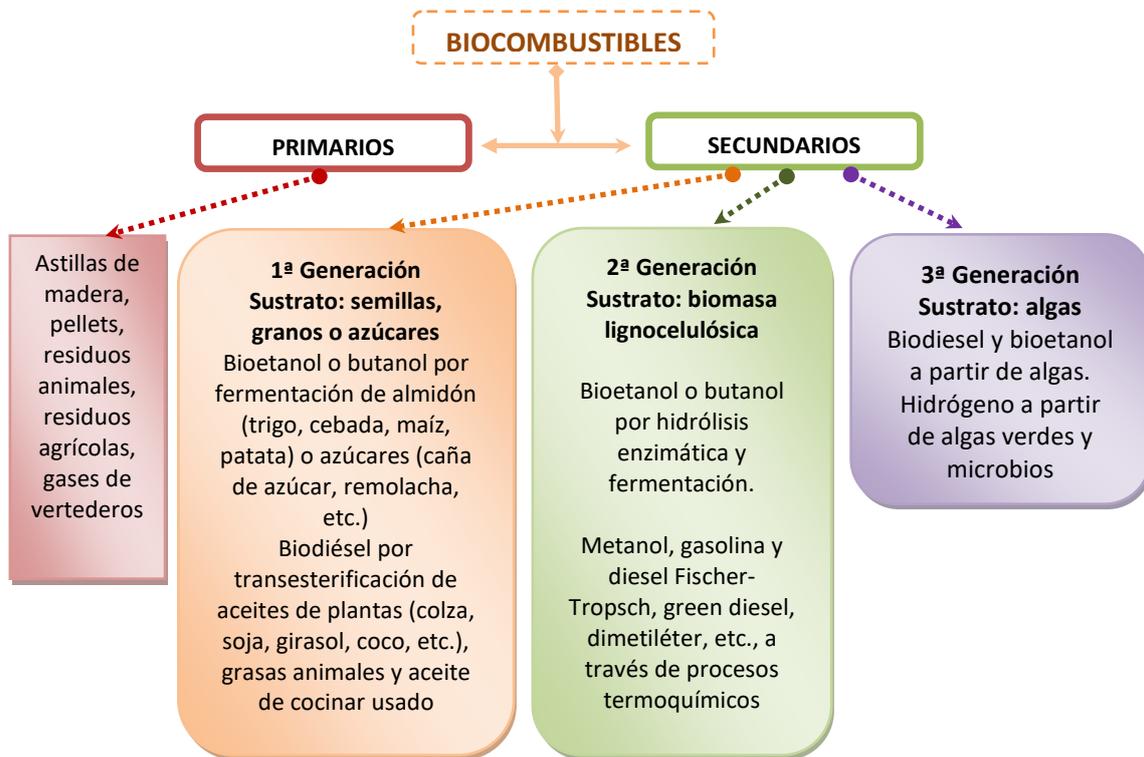


Figura 1.3: Clasificación de los biocombustibles

Fuente: Adaptado de Singh Nigam and Singh, 2011.

1.4.1.1. Biocombustibles gaseosos

1.4.1.1.1. Biogás

La fracción orgánica de prácticamente cualquier forma de biomasa se puede convertir por medio de digestión anaerobia en metano y dióxido de carbono (Kapdi *et al.*, 2005), conteniendo pequeñas proporciones de otros gases como hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y sulfuro de hidrógeno. El biogás es un combustible valioso que se produce en digestores llenos con la biomasa. La digestión puede continuar por un periodo que va desde 10 días hasta algunas semanas (Demirbas and Balat, 2006). La figura 1.4 representa el esquema de una planta de producción de biogás.

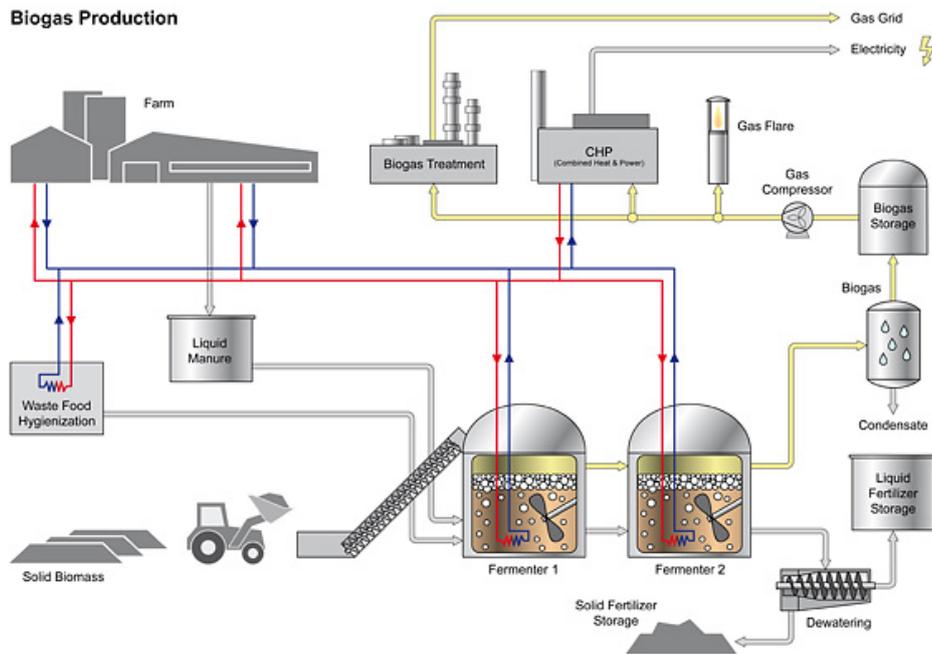


Figura 1.4: Esquema de una planta de producción de biogás.

Fuente: Sigma-energy.

1.4.1.1.2. Gas de síntesis (Syngas)

El gas de síntesis, también conocido como syngas, se trata de un combustible gaseoso que contiene cantidades variables de hidrógeno y monóxido de carbono, mayoritariamente, acompañado de otros gases como pueden ser dióxido de carbono, metano y agua, y que se obtiene a partir de sustancias ricas en carbono (hulla, carbón, coque, nafta, biomasa) sometidas a un proceso químico a alta temperatura. Algunos de los métodos usados para obtener gas de síntesis son; la gasificación del carbón, el reformado con vapor del gas natural o pirólisis y gasificación de biomasa. Este gas se utiliza como producto intermedio en industrias químicas y biorrefinerías y sus usos son muy variados. El gas de síntesis se puede convertir en alcanos, olefinas, compuestos oxigenados, y alcoholes como el etanol. Todos ellos se pueden mezclar o usar directamente como combustibles diésel, gasolinas y otros combustibles líquidos (figura 1.5). También se puede emplear para obtener compuestos químicos como amoníaco y metanol, para producir vapor y generar electricidad, así como para sintetizar biocombustibles mediante el proceso de *Fischer-Tropsch*. Muchos de los productos residuales que se obtienen en las biorrefinerías se almacenan para ser utilizados como materia prima puesto que cualquier sustancia que contenga carbono puede ser utilizada para su producción. Estos compuestos reaccionan a alta presión y elevada temperatura produciendo gas de síntesis (Sánchez, 2014).

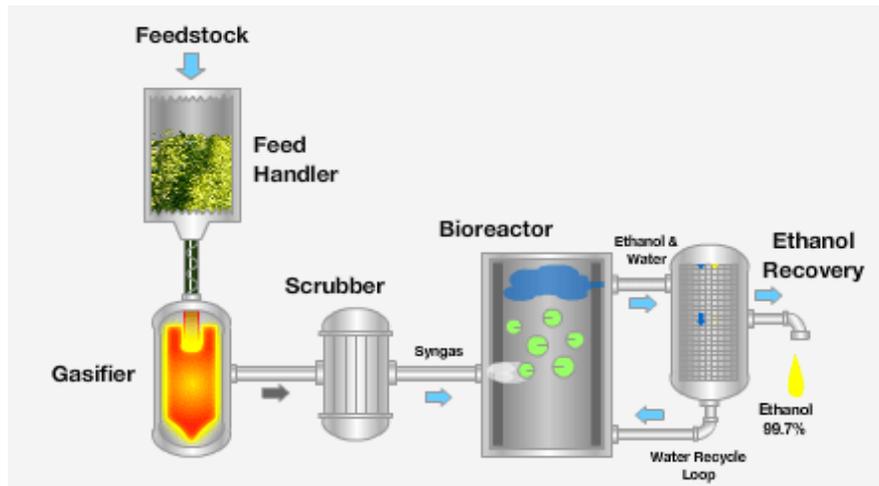


Figura 1.5: Esquema de una plataforma syngas para la producción de biocombustibles.

Fuente: Merkel, 2010.

1.4.1.1.3. Hidrógeno

El hidrógeno se puede producir por pirólisis a partir de biomasa (Demirbas, 2001; Nath and Das, 2003; Arni, 2004). La producción de hidrógeno a partir de biomasa requiere varias etapas de reacción: para la producción de hidrógeno de elevada pureza, el reformado de los combustibles es seguida por dos etapas de reacción de desplazamiento gas-agua (WGS, *Water Gas Shift*), en las cuales al adicionar vapor de agua se logra convertir el CO en CO₂ liberando hidrógeno, purificando el monóxido de carbono y eliminando el dióxido de carbono.

Por otro lado, las tecnologías de generación biológica de hidrógeno (biohidrógeno) proporcionan un amplio rango de aproximaciones para generar hidrógeno, incluyendo la biofotólisis directa, biofotólisis indirecta, foto-fermentaciones y la fermentación oscura (Levin *et al.*, 2004). Los procesos de producción biológica de hidrógeno son más respetuosos con el medio ambiente y precisan de menor energía comparados con los procesos termoquímicos y electroquímicos (figura 1.6) (Das and Veziroglu, 2001).

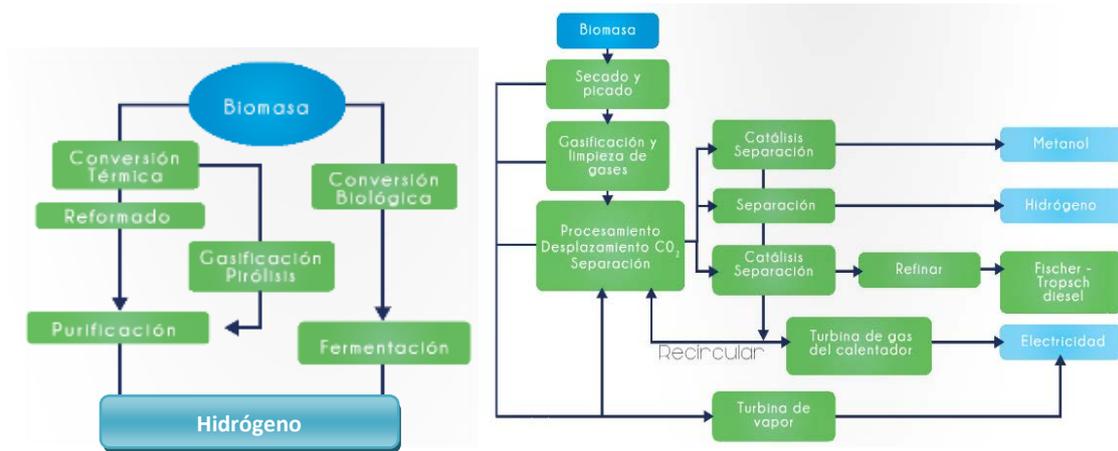


Figura 1.6: Producción de hidrógeno a partir de biomasa y su uso en celdas de combustible.

Fuente: Silva *et al.*, 2013.

1.4.1.1.4. Biometano

El biometano puede producirse a partir de la depuración del biogás generado por digestión anaerobia, o bien a partir del gas de síntesis generado en la gasificación de la biomasa. También se incluye el metano del proceso *Power-to-Gas*, cuando la energía eléctrica utilizada se ha generado a partir de fuentes renovables y el hidrógeno se convierte biológicamente en metano en el digestor, conjuntamente con el CO_2 (EBA).

La producción de metano por digestión anaerobia a partir de materiales lignocelulósicos puede consistir en tres fases, denominadas pretratamiento, hidrólisis anaeróbica y producción de metano, y post-tratamiento de la fracción líquida. Una etapa de separación del producto no es necesaria durante la etapa de producción de metano ya que el metano es, bajo condiciones normales, un gas, y se separará por sí mismo de la fracción líquida.

Se puede llevar a cabo un pretratamiento para mejorar el rendimiento de la hidrólisis y el rendimiento del metano total. La hidrólisis de la lignocelulosa y la conversión a metano es, en general, llevada a cabo en un reactor por un grupo de microorganismos. A menudo se realiza sólo la segunda fase, hidrólisis y producción de metano, para la producción y recuperación de energía (Hendriks and Zeeman, 2009).

La ventaja de emplear una mezcla de microorganismos es que casi todos los productos, como pentosas, hexosas, productos volátiles y algunas veces compuestos inhibidores como furfural y compuestos solubles de la lignina (en concentraciones no muy elevadas) se pueden convertir a metano tras un periodo de adaptación (Benjamin *et al.*, 1984; Fox *et al.*, 2003).

1.4.1.2.3. *Bio-char y bio-carbón activado*

El *biochar* se produce por la descomposición térmica de la materia orgánica bajo un suministro limitado de oxígeno y a temperaturas relativamente bajas, <700°C (pirólisis). Algunos autores proponen en su definición la particularidad de denominar al material pirolizado como *biochar* solamente cuando su destino es la aplicación como enmienda orgánica de suelos y para el secuestro de carbono en el mismo, para diferenciarlo así del tradicional carbón vegetal (*charcoal*) destinado a combustible. Se ha denominado a la combinación de la pirólisis de la biomasa y la aplicación del *biochar* obtenido en suelos, como un tipo de tecnología carbono negativa ya que en el proceso de pirólisis de la biomasa, aproximadamente entre un 20 y un 50% del carbono inicial queda fijado en forma de *biochar* (figura 1.9). El *biochar* presenta importantes ventajas cuando se emplea como enmienda para el suelo ya que debido a su naturaleza extremadamente porosa, su estructura es muy efectiva para retener tanto agua como nutrientes hidrosolubles. Además puede ser incorporado en los suelos en campos de cultivo para aumentar su fertilidad, estabilidad, reducir la lixiviación y la escorrentía superficial, aumentar el pH del suelo, así como absorber pesticidas y metales pesados (Lehmann and Joseph, 2009).

Por otro lado, el término carbón activado es usado para definir sustancias del tipo *biochar* que han sido activadas por diferentes métodos con el fin de incrementar el área superficial para su uso en diferentes procesos industriales. Así, los carbones activados se obtienen a través de dos métodos generales:

- ✚ **Activación física**, por gasificación parcial del carbón primario con vapor o dióxido de carbono o por una mezcla de ambos para incrementar su porosidad.
- ✚ **Activación química** del precursor (material orgánico) con un químico como el cloruro de zinc o el ácido fosfórico (Omar *et al.*, 2003). Actualmente, debido a los problemas ambientales que presenta el $ZnCl_2$ se ha visto parcialmente desplazado por el H_3PO_4 .

Los residuos agrícolas son muy buenos precursores para la producción de bio-carbones activados (Demirbas, 1999). Los materiales precursores empleados en la producción comercial de carbones activados son aquellos con elevados contenidos en carbono (Heschel and Klose, 1995). Los más comunes son del tipo lignocelulósico. Dentro de estos precursores se encuentran maderas o restos de podas, residuos agrícolas o agroalimentarios (cáscaras de frutas y de frutos secos). También se emplean en la preparación de carbones activados celulósicos comerciales o lignina.

Encuentra sus principales aplicaciones en las industrias químicas (recuperación de disolventes, desodorización del aire, mascarillas de gas, desulfuración de gases industriales, tratamiento de aguas potables, etc.); industria farmacéutica (adsorbente de uso general para la purificación de antibióticos, vitaminas y otros productos; vehículo excipiente en fármacos, etc.); industria alimenticia (muy importante en la fabricación de azúcares; tratamiento de aguas, de bebidas alcohólicas, etc.) (Martínez, 2012).

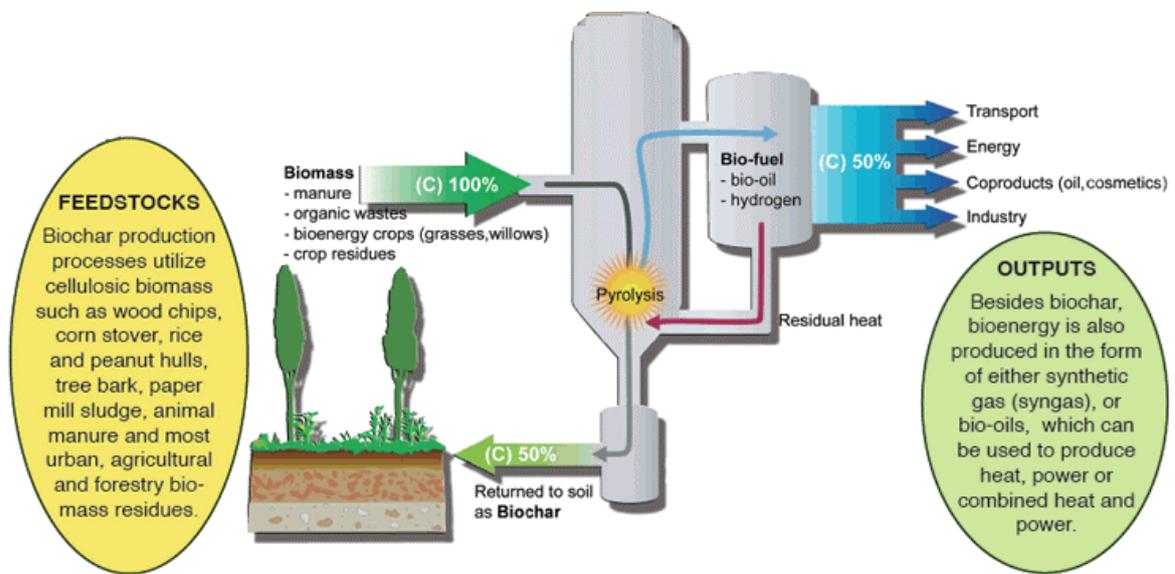


Figura 1.9: Esquema de producción de *Biochar*.

Fuente: Lehmann, 2007.

1.4.1.3. Biocombustibles líquidos o biocarburantes

Cuando el biocombustible es líquido y se destina al transporte se denomina biocarburante. La producción de biocombustibles líquidos trata de sustituir parcialmente a los combustibles líquidos convencionales (diésel y gasolina). Existe una clasificación para biocombustibles líquidos que incluye biocombustibles de “Primera Generación” y biocombustibles de “Segunda Generación” (Larson, 2008). La principal diferencia entre ellos surge en la materia prima empleada. Además, se encuentra en desarrollo la producción de biocombustibles de “Tercera Generación” (Patil *et al.*, 2008).

✚ **Biocombustibles de Primera Generación:** emplean materias primas “alimenticias” con azúcar o almidón accesible. Son producidos generalmente a partir de azúcares (Banat *et al.*, 1992; Love *et al.*, 1996; Brady *et al.*, 1996; Riordon *et al.*, 1996; Nigam *et al.*, 1997; Brady *et al.*, 1997a; Brady *et al.*, 1997b; Love *et al.*, 1998), granos o semillas (Turhollow and Heady, 1986; Gibbons and Westby, 1989; Suresh *et al.*, 1999; Zhao *et*

al., 2009) y requieren un proceso relativamente simple para producir el producto combustible final. El biocombustible mejor conocido de este tipo es el etanol producido por fermentación del azúcar extraído de plantas de cultivo y del almidón contenido en los granos del maíz u otros cultivos amiláceos (Larson, 2008). También se incluye en este grupo el biodiésel obtenido del aceite vegetal de plantas oleaginosas por procesos de transesterificación (Singh Nigam and Singh, 2011).

✚ **Biocombustibles de Segunda Generación:** Son producidos generalmente por dos métodos diferentes, procesamiento biológico y termoquímico, a partir de biomasa lignocelulósica agrícola. Esta biomasa puede provenir de residuos no comestibles procedentes de la producción de cultivos alimenticios o de biomasa de plantas no comestibles (por ejemplo, hierbas o árboles crecidos específicamente para la producción de energía). Sólo algunos biocombustibles de segunda generación como bioetanol o biobutanol son producidos por procesos bioquímicos. La conversión termoquímica de la biomasa conlleva procesos que requieren temperaturas y presiones mucho más extremas que las aplicadas en sistemas de conversión bioquímicos. Esta conversión comienza con un proceso de gasificación o pirólisis y termina con la obtención de un combustible limpio por medio de la síntesis de líquidos *Fischer-Tropsch* y que puede ser empleado directamente en los motores (Singh Nigam and Singh, 2011).

✚ **Biocombustibles de Tercera Generación:** Los derivados específicamente a partir de microbios y microalgas están considerados como una fuente de energía alternativa desprovista de las desventajas asociadas a los biocombustibles de primera y segunda generación, como es el alto coste de producción debido a la competencia con los alimentos en el caso de los de primera generación o la mayor inversión por unidad de producción en el caso de los biocombustibles de segunda generación (Singh Nigam and Singh, 2011). Avances recientes han demostrado que algunas especies de microbios como las levaduras, hongos y microalgas se pueden usar como fuentes potenciales para la producción de biodiésel ya que pueden biosintetizar y almacenar grandes cantidades de ácidos grasos en su biomasa (Xiong *et al.*, 2008). La habilidad de las levaduras para crecer de manera próspera en la biomasa lignocelulósica pretratada podría mejorar eficientemente la acumulación de lípidos, proporcionando una opción prometedora para la producción de aceite microbiano a partir de residuos agrícolas de una manera ambiental y económicamente racional (Singh Nigam and Singh, 2011). Por

su parte, las microalgas pueden producir lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades en cortos periodos de tiempo. Estos productos se pueden procesar en biocombustibles y co-productos de alto valor añadido (Brennan and Owende, 2010) empleando tecnologías de conversión termoquímicas (combustión directa, gasificación, licuefacción y pirólisis) y bioquímicas (digestión anaerobia, fermentación alcohólica, producción de hidrógeno fotobiológico).

La viabilidad de los biocombustibles de primera generación es cuestionable debido al conflicto con el suministro de alimento (Patil *et al.*, 2008). La utilización de sólo una pequeña fracción de la biomasa total de la planta reduce la eficiencia en el uso de la tierra. Los biocombustibles de primera generación tienen un coste de producción elevado debido a la competencia con la alimentación. La rápida expansión de la producción global de biocombustibles a partir de cereales, azúcar, y cultivos oleaginosos ha elevado el coste de ciertos cultivos y productos alimenticios. Estas limitaciones favorecen la búsqueda de biomasa no comestible para la producción de biocombustibles. Por otro lado, el empleo de la totalidad de la biomasa en la producción de biocombustibles de segunda generación proporciona una mejor eficiencia en el uso de la tierra en comparación con los biocombustibles de primera generación. Además, un menor coste de la materia para la alimentación y el uso de la biomasa no comestible favorece la producción de biocombustibles de segunda generación (Singh Nigam and Singh, 2011).

1.4.1.3.1. Bio-aceites

Los bio-aceites (*Bio-oils*) son combustibles líquidos o gaseosos condensables producidos a partir de biomasa, como cultivos agrícolas, residuos urbanos y subproductos agrícolas y forestales vía procesos termoquímicos o bioquímicos (Demirbas, 2007). Pueden sustituir a los combustibles convencionales en los motores de los vehículos, total o parcialmente en una mezcla (*European Commission* 2004). La conversión de biomasa a bio-aceite tiene una eficiencia de hasta el 70% para procesos de pirólisis rápida (figura 1.10).

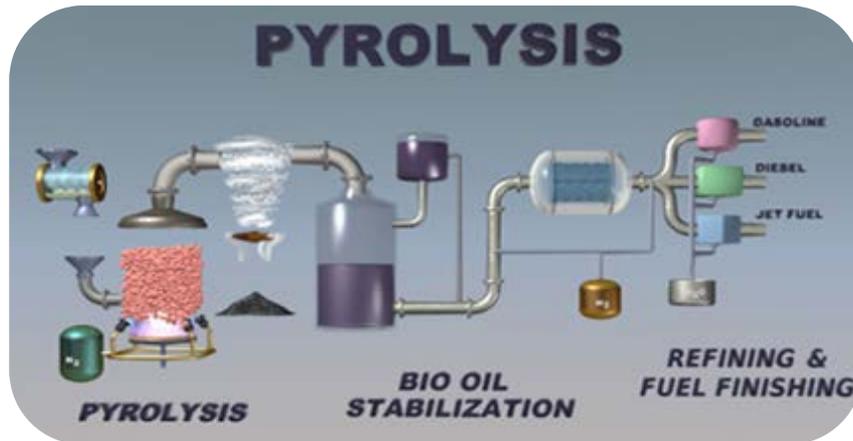


Figura 1.10: Proceso de producción de bio-aceite por pirólisis rápida.

Fuente: NREL.

1.4.1.3.2. Aceites vegetales, biodiésel y green diesel

Los aceites vegetales químicamente son moléculas de triglicéridos en las que tres grupos de ácidos grasos son ésteres unidos a una molécula de glicerol. Los aceites vegetales procedentes de las semillas oleaginosas pueden ser usados mezclados con combustibles diésel aunque su viscosidad es más elevada que estos combustibles por lo que se hace necesaria una modificación de los motores. Los (m)etil-ésteres del aceite vegetal, comúnmente referidos como “biodiésel”, son importantes candidatos como combustibles diésel alternativos. El nombre de biodiésel se le ha dado al aceite vegetal transesterificado para describir su uso como un combustible diésel (Demirbas, 2002; Demirbas, 2008b). Las ventajas que presenta el biodiésel es que resulta menos contaminante frente al diésel convencional y es de naturaleza renovable (Ghadge and Raheman, 2006). El llamado *Green Diesel* se produce mediante un proceso de refinación, en lugar de mediante una reacción química. El resultado es idéntico al petro-diésel pero no contiene azufre (www.biofuel.org.uk).

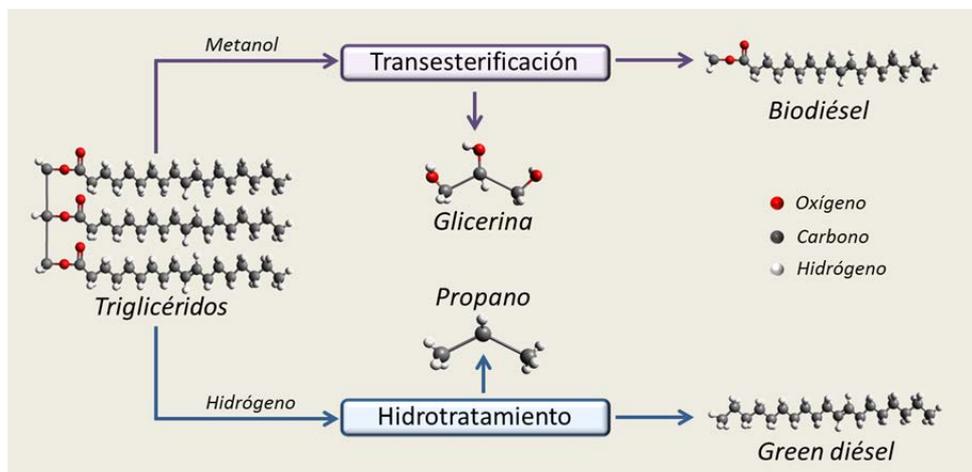


Figura 1.11: Comparativa entre el proceso de obtención de biodiésel y green diesel. Fuente: Ochoa, 2012

1.4.1.3.3. Biocombustibles Fischer-Tropsch

La síntesis *Fischer-Tropsch* es un conjunto de procesos catalíticos que pueden ser empleados para producir combustibles y químicos a partir de gas de síntesis (mezcla de CO y H₂), que pueden derivarse de gas natural, carbón o biomasa. La vía de síntesis *Fischer-Tropsch* Biomasa a Líquido (BTL-FT) está ganando cada vez más importancia ya que es capaz de producir combustibles limpios respetuosos con el medio ambiente. En el proceso BTL-FT, primero, la biomasa se convierte en *syngas* derivado de biomasa (*bio-syngas*) por gasificación. En segundo lugar, se lleva a cabo un proceso de limpieza para eliminar las impurezas, quedando un *bio-syngas* limpio. Finalmente, el *bio-syngas* limpio se conduce al reactor catalítico *Fischer-Tropsch* para producir *green gasoline* y *green diesel* así como otros biocombustibles (figura 1.12) (Hu *et al.*, 2012).

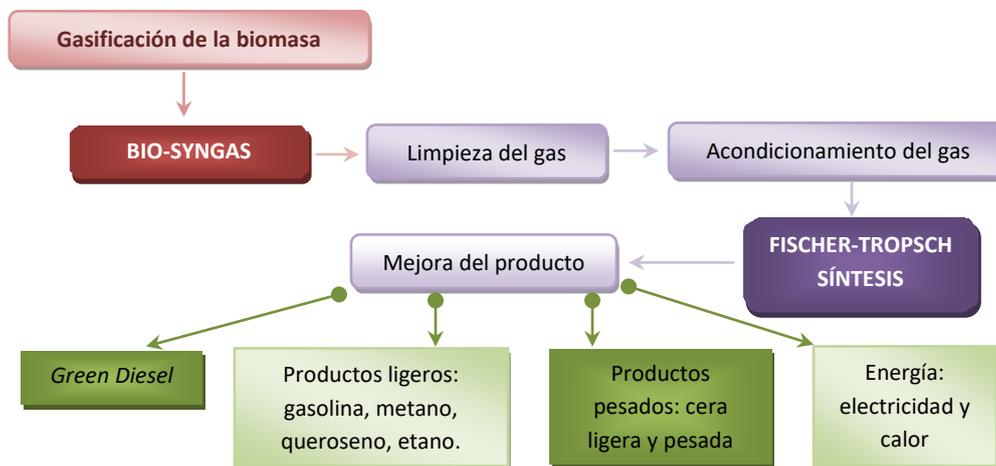


Figura 1.12: Producción de biocombustibles vía *Fischer-Tropsch*

1.4.1.3.4. Biobutanol

El butanol tiene una estructura de 4 carbonos que puede formar una cadena lineal o una estructura ramificada, resultando en diferentes propiedades. Existen diferentes isómeros basados en la localización del -OH y en la estructura de la cadena de carbono. El 1-butanol, también conocido como n-butanol, tiene una estructura lineal con el -OH en el carbono terminal; el 2-butanol es también una cadena lineal pero con el grupo OH en un carbono interno; el iso-butanol es un isómero ramificado con el grupo OH en el carbono terminal y el ter-butanol es un isómero ramificado con el grupo OH en un carbono interno (Jin *et al.*, 2011).

El n-butanol es un producto de fermentación del azúcar o almidón. Se genera por conversión anaeróbica de carbohidratos por cepas de *Clostridium acetobaculum* dando lugar a acetona, butanol y etanol. Dicha fermentación es conocida como fermentación ABE

(fermentación acetona-butanol-etanol) en proporción 3:6:1 (figura 1.13). Durante dicha fermentación se producen 3 clases mayoritarias de productos: disolventes (acetona, etanol y butanol); ácidos orgánicos (ácidos acético, láctico y butírico); y gases (dióxido de carbono e hidrógeno). Se considera que todo el n-butanol producido es biobutanol debido a los métodos de producción de las fermentaciones (Jin *et al.*, 2011). La producción de biobutanol es una fermentación bifásica, compuesta por una fase acidogénica, en la que se producen los ácidos acético y butírico; y una fase solventogénica, en la que se produce la conversión de dichos ácidos en acetona y butanol. Al final de la fermentación, la masa celular y otros sólidos suspendidos se eliminan por centrifugación y pueden ser aprovechados como alimento para ganado. El mayor punto débil de la fermentación ABE es que el metabolismo celular de Clostridia cesa en presencia de 20 g/L o más de estos productos.

El empleo de residuos agrícolas como materia prima para la producción de biobutanol resulta económicamente viable. Sin embargo, este material lignocelulósico se debe someter a un pretratamiento y posterior hidrólisis enzimática para la obtención de hidrolizados los cuales generan subproductos químicos (furfural, hidroximetilfurfural, compuestos fenólicos, etc.) que inhiben la fermentación y el crecimiento de las células. Existen diferentes estudios en bibliografía que reducen estos efectos inhibidores, entre los que se incluyen la dilución del hidrolizado, la eliminación de los inhibidores empleando *overliming* (alcalinización con hidróxido de calcio o carbonato) y el empleo de tamices moleculares/de resina adsorbentes.

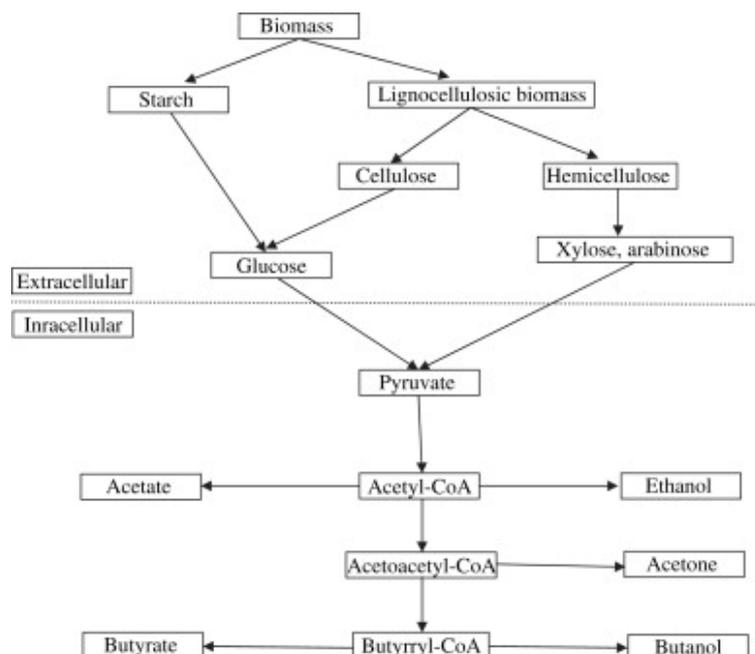


Figura 1.13: Ruta de producción ABE.

Fuente: Singh Nigam and Singh, 2011

1.4.1.3.5. Bioetanol

Si el etanol es producido empleando biomasa, se denomina bioetanol. El bioetanol se considera un recurso renovable y respetuoso con el medio ambiente (Singh Nigam and Singh, 2011). La fermentación es un proceso biológico anaeróbico en el que los azúcares son convertidos a alcohol por la acción de microorganismos, normalmente levaduras. El alcohol resultante de dicho proceso es etanol. El valor de cualquier tipo particular de biomasa como materia prima para la fermentación depende de la facilidad con la que se puedan convertir los azúcares. Como se ha dicho anteriormente, el bioetanol es un combustible derivado de fuentes renovables de materia prima; normalmente, plantas como trigo, remolacha azucarera, maíz, paja y madera. Puede ser de primera generación si la fuente de carbono para su producción son azúcares o almidón directamente extraídos de la planta; de segunda generación, si la fuente de carbono se deriva de los principales componentes de un material lignocelulósico; o tercera generación, si la fuente de carbono se deriva de organismos acuáticos autótrofos (www.biofuelstp.eu).

Generalmente, el proceso de producción de etanol de segunda generación consiste en las siguientes operaciones: reducción del tamaño de partícula (mediante molienda), liberación de la celulosa y las hemicelulosas del complejo protegido que forma la lignina, llevando a cabo diferentes métodos de pretratamiento (normalmente una combinación de presiones elevadas, temperatura y/o adición de químicos), la liberación de azúcares monoméricos de las cadenas poliméricas celulósicas y hemicelulósicas, y su fermentación a etanol. Estas operaciones se pueden llevar a cabo consecutivamente, como es el caso de los procesos de hidrólisis y fermentación separadas (SHF), total o parcialmente simultánea, como es el caso de los procesos de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) o con inoculación retrasada (DSSF), o completamente consolidado como es el caso del diseño de bioprocesamiento consolidado (CBP) (figura 1.14) (Paulova *et al.*, 2015).

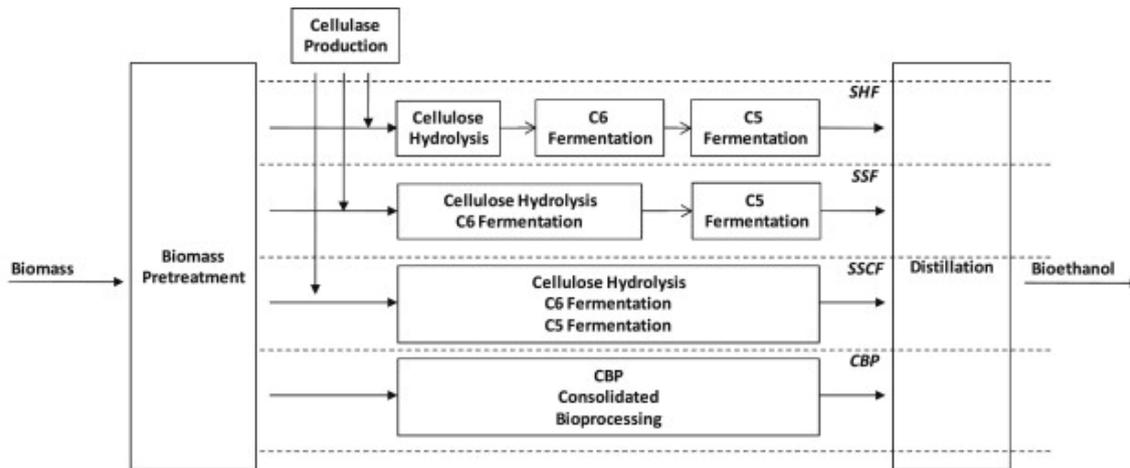


Figura 1.14: Integración de las etapas del proceso en la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos.

Fuente: Chiamonti *et al.*, 2012

Las tecnologías de obtención de etanol de segunda generación son complicadas y sus eficiencias pueden verse influenciadas por muchos factores como son el tipo de materia prima lignocelulósica, métodos de pretratamiento, uso u omisión de una etapa de detoxificación, tipo y cantidad de enzimas celulolíticas, los microorganismos empleados y su robustez (incluyendo la compatibilidad con cócteles enzimáticos en procesos simultáneos), condiciones de cultivo (configuración, temperatura, pH, concentración de sólidos, tipo y cantidad de nutrientes adicionados), así como el tipo de biorreactor (mezclado, tipo de operación, etc.). Por tanto, es muy importante encontrar una combinación óptima de todas las variables para un tipo concreto de materia prima. Para obtener los valores óptimos de todos los parámetros, se pueden emplear diferentes métodos de optimización como puede ser la metodología de superficies de respuesta (Jaisamut *et al.*, 2013; Paulova *et al.*, 2015).

El bioetanol es un aditivo/sustituto de la gasolina y resulta posible que materias primas como la madera, la paja o incluso los residuos domésticos puedan ser convertidos a etanol. El bioetanol se puede usar como una mezcla al 5% con gasolina según el estándar de calidad de la Unión Europea EN 228. Esta mezcla no requiere modificación del motor y está cubierta por la garantía del vehículo. Sometiendo el motor a una modificación, el bioetanol se puede usar en concentraciones más elevadas, por ejemplo, E85 (85% de bioetanol) (Demirbas, 2008b).

Este apartado se tratará en mayor extensión en la sección 4.

1.5. PRODUCTOS DE BASE BIOLÓGICA

Los químicos bio-basados y polímeros incluyen productos históricos con una larga historia en la producción bio-basada como es el ácido cítrico, productos recientemente introducidos como son el propilenglicol y productos actualmente en etapa de desarrollo. El alcance y la flexibilidad para la producción de químicos bio-basados que añaden valor a la operación de biorrefinería se ejemplifica en el amplio rango de químicos que actualmente se encuentran en desarrollo industrial. En la figura 1.15 se muestra una lista de químicos (*building blocks*) en desarrollo. En muchos casos, estos compuestos son también productos finales (etanol, metanol, etc.) pero representan una perspectiva sustancial para su uso como *building block* (IEA Bioenergy Task 42 on Biorefineries). Se denomina *building block* o producto químico base a aquellas moléculas con múltiples funcionalidades con el potencial de ser transformadas en nuevas familias de moléculas de interés industrial a partir de las cuales pueden obtenerse compuestos químicos y materiales con las prestaciones demandadas por el mercado.

En la tabla 1.1 se puede ver una clasificación general de los productos de base biológica.

| PRODUCTOS DE BASE BIOLÓGICA | |
|--|--|
| Productos químicos (figura 1.15) | Productos de las industrias de química fina, productos aromáticos, aminoácidos, xilitol, polialcoholes, ácidos (succínico, láctico, levulínico, etc.), fenoles, etc. de gran importancia para la industria química y farmacéutica. |
| Polímeros y resinas | Producidos por la conversión bioquímica de monómeros de biomasa como ácido poliláctico (PLA), resinas fenólicas y furánicas. |
| Biomateriales | Fibras de celulosa, nanofibras de celulosa y papel. |
| Productos para alimentación animal y humana | - |
| Fertilizantes | - |

Tabla 1.1: Clasificación de los productos de base biológica.

| Cn | Chemical | Company | Potential | |
|------------------------|------------------------------------|---|---|----------|
| 1 | Methanol | BioMCN, Chemrec | Growth | |
| | Formic acid | Maine BioProducts | Pipeline | |
| | Methane | Many | Growth | |
| | Syngas | BioMCN, Chemrec | Growth | |
| 2 | Ethylene | Braskem, DOW/Mitsui, Songyuan Ji'an Biochemical | Growth | |
| | Ethyl acetate | Zeachem | Pipeline | |
| | Ethanol | Many | Growth | |
| | Glycolic acid | Metabolic Explorer (Metex) | Pipeline | |
| | Ethylene glycol | India Glycols Ltd, Greencol Taiwan | Growth | |
| | Acetic acid | Wacker | Growth | |
| 3 | Lactic acid | Purac, NatureWorks, Galactec, Henan Jindan, BBKA | Growth | |
| | Acrylic acid | Cargill, Perstorp, OPXBio, DOW, Arkema | Pipeline | |
| | Glycerol | Many | Growth | |
| | 3-Hydroxy propionic acid | Cargill | Pipeline | |
| | Propylene | Braskem/Toyota Tsusho, Mitsubishi Chemical, Mitsui Chemicals | Pipeline | |
| | Epichlorohydrin | Solvay, DOW | Growth | |
| | 1,3-Propanediol | DuPont/Tate & Lyle | Growth | |
| | n-Propanol | Braskem | Pipeline | |
| | Ethyl lactate | Vertec BioSolvents | Growth | |
| | Isopropanol | Genomatica, Mitsui Chemicals | Pipeline | |
| | Propylene Glycol (1,2-Propanediol) | ADM | Growth | |
| | 4 | n-Butanol | Cathay Industrial Biotech, Butamax, Butalco, Cobalt/Rhodia | Growth |
| | | 1,4-Butanediol | Genomatica/M&G, Genomatica/Mitsubishi, Genomatica /Tate & Lyle | Pipeline |
| | | iso-Butanol | Butamax, Gevo | Growth |
| Iso-butene | | Gevo/Lanxess | Pipeline | |
| Methyl methacrylate | | Lucite/Mitsubishi Rayon, Evonik/Arkema | Pipeline | |
| Succinic acid | | BioAmber, Myriant, BASF /Purac, Reverdia (DSM/Roquette), PTT Chem / Mitsubishi CC | Growth | |
| 5 | Furfural | Many | Growth | |
| | Itaconic acid | a.o. Qingdao Kehai Biochemistry Co, Itaconix | Pipeline | |
| | Xylitol | a.o. Danisco/Lenzing, Xylitol Canada | Growth | |
| | Isoprene/ Farnesene | Goodyear/ Genencor, GlycosBio, Amyris | Pipeline | |
| | Glutamic acid | a.o. Global Biotech, Meihua, Fufeng, Juhua | Growth | |
| | Levulinic acid | Maine BioProducts, Avantium, Segetis, Circa Group | Pipeline | |
| 6 | Sorbitol | a.o. Roquette, ADM | Growth | |
| | Adipic acid | Verdezyne, Rennovia, BioAmber, Genomatica | Pipeline | |
| | Lysine | a.o. Global Biotech, Evonik/RusBiotech, BBKA, Draths, Ajinomoto | Growth | |
| | FDCA | Avantium | Pipeline | |
| | Isosorbide | Roquette | Growth | |
| | Glucaric acid | Rivertop renewables | Pipeline | |
| | Citric acid | a.o. Cargill, DSM, BBKA, Ensign, TTCA, RZBC | Growth | |
| | Caprolactam | DSM | Pipeline | |
| | n | PHA | Metabolic Explorer (Metex), Meridian plastics (103), Tianjin Green Bioscience Co. | Growth |
| | | Para-Xylene | Gevo, Draths*, UOP, Annelotech, Virent | Pipeline |
| Dicarboxylic acids | | Cathay Biotech, Evonik | Growth | |
| Fatty Acid derivatives | | Croda, Elevance | Growth | |

* Draths is recently acquired by Amrvis.

Figura 1.15: Químicos derivados de biomasa.

Fuente: IEA Bioenergy. Task 42 Biorefinery.

1.6. BIBLIOGRAFÍA

- Arni S. **2004**. Hydrogen-rich gas production from biomass via thermochemical pathways. *Energy Educ Sci Technol* 13, 47–54.
- Banat I.M., Nigam P. and Marchant R. **1992**. Isolation of a thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50 °C. *World J Microbiol Biotechnol* 8, 259-263. DOI: 10.1007/BF01201874.
- Benjamin M.M., Woods S.L. and Ferguson J.F. **1984**. Anaerobic toxicity and biodegradability of pulp mill waste constituents. *Water Res.* 18 (5), 601–607. DOI: 10.1016/0043-1354(84)90210-0.
- Biorrefinerías, una oportunidad de negocio para las zonas rurales y las industrias. Guía de actuación en las regiones participantes en el proyecto BIOREF. Actividades 5 y 6. Bioenarea. Improve regional policies for bioenergy and territorial development. Agencia Provincial de la Energía. Diputación de Ávila.
- Brady D., Nigam P., Marchant R., McHale L. and McHale A.P. **1996**. Ethanol production at 45°C by *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in magnetically responsive alginate matrices. *Biotechnol Lett* 18(10), 1213-1216. DOI: 10.1007/BF00128595
- Brady D., Nigam P., Marchant R. and McHale A.P. **1997a**. Ethanol production at 45°C by immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. *Bioproc Eng* 16, 101-104. DOI: 10.1007/PL00008941.
- Brady D., Nigam P., Marchant R., Singh D., McHale A.P. **1997b**. The effect of Mn²⁺ on ethanol production from lactose using *Kluyveromyces Marxianus* IMB3 immobilized in magnetically responsive matrices. *Bioproc Eng* 17, 31-34. DOI: 10.1007/PL000008953.
- Brennan L. and Owende P. **2010**. Biofuels from microalgae- A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sustain Energy Rev* 14, 557-577. DOI: 10.1016/j.rser.2009.10.009
- Cherubini F. **2010**. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemical. *Energ. Convers. Manage.* 51, 1412-1421. DOI:10.1016/j.enconman.2010.01.015
- Cherubini F., Jungmeier G., Wellisch M., Willke T., Skiadas I., Van Ree R., de Jong E. **2009**. Toward a common classification approach for biorefinery systems. *Biofuel Bioprod Bior.* DOI: 10.1002/bbb.172.
- Chiaramonti D., Prussi M., Ferrero S., Oriani L., Ottonello P., Torre P. and Cherchi F. **2012**. Review of pretreatment processes for lignocellulosic etanol production, and development of an innovative method. *Biomass Bioenerg.* DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.04.020

- Das D. and Veziroglu T.N. **2001**. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy* 26, 13–28. DOI: 10.1016/S0360-3199(00)00058-6.
- Delfort B., Durand I., Hillion G., Jaeger-Voirol A. and Montagne X. **2008**. Glycerin for new biodiesel formulation. *Oil Gas Sci Technol. Rev. IFP*, 63 (4) 395-404. DOI: 10.2516/ogst:2008033.
- Demirbas A. **1999**. Fuel properties of charcoal derived from hazelnut shell and the production of briquets using pyrolytic oil. *Energy* 24, 141–150. DOI: 10.1016/S0360-5442(98)00077-2.
- Demirbas A. **2001**. Yields of hydrogen- rich gaseous products via pyrolysis from selected biomass samples. *Fuel* 80, 1885–1891. DOI: 10.1016/S0016-2361(01)00070-9.
- Demirbas A. **2002**. Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. *Energy Convers Manage* 43, 2349–2356. DOI: 10.1016/S0196-8904(01)00170-4
- Demirbas M.F., Balat M. **2006**. Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: A global perspective. *Energy Convers Manage* 47, 2371–2381. DOI: 10.1016/j.enconman.2005.11.014.
- Demirbas A. **2007**. The influence of temperature on the yields of compounds existing in bio-oils obtaining from biomass samples via pyrolysis. *Fuel Proc Technol* 88, 591–597. DOI: 10.1016/j.fuproc.2007.01.010
- Demirbas A. **2008a**. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Conver Manage* 49, 125-130. DOI: 10.1016/j.enconman.2007.05.002.
- Demirbas A. **2008b**. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Convers Manage* 49, 2106-2116. DOI: 10.1016/j.enconman.2008.02.020
- EBA (European Biogas Association)
- EU Biorefinery Euroview & BIOPOL. **2007**. Sixth Framework Programme.
- European Commission (EC). 2004. Promoting biofuels in Europe. Directorate-General for Energy and Transport, B-1049 Bruxelles, Belgium; http://europa.eu.int/comm/dgs/energy_transport/index_en.html
- Fox M.H., Noike T. and Ohki T. **2003**. Alkaline subcritical-water treatment and alkaline heat treatment for the increase in biodegradability of newsprint waste. *Water Sci Technol* 48 (4), 77–84.

Ghadge S.V. and Raheman H. **2006**. Process optimization for biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil using response surface methodology. *Bioresour Technol* 97, 379–384. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.03.014

Gibbons W.R., Westby C.A. **1989**. Cofermentation of sweet sorghum juice and grain for production of fuel ethanol and distillers' wet grain. *Biomass* 18(1), 43-57. DOI: 10.1016/0144-4565(89)90080-2

Hendriks A.T.W.M and Zeeman G. **2009**. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 100, 10-18.

Heschel W., Klose E. **1995**. On the suitability of agricultural by-products for the manufacture of granular activated carbon. *Fuel* 74, 1786–1791. DOI: 10.1016/0016-2361(95)80009-7.

<http://biofuel.org.uk/>

Hu J., Yu F. and Lu Y. **2012**. Application of Fischer–Tropsch Synthesis in Biomass to Liquid Conversion. *Catalysts* 2, 303-326. DOI: 10.3390/catal2020303

International Energy Agency (IEA) of Bioenergy. Task 42 Biorefinery. Jong E., Higson A., Walsh P., Wellisch M. Bio-based chemicals. Value added products from biorefineries.

Jaisamut K., Paulová L., Patáková P., Rychtera M. and Melzoch K. **2013**. Optimization of alkali pretreatment of wheat straw to be used as substrate for biofuels production. *Plant Soil Environ* 59, 537-542.

Jin C., Yao M., Liu H., Lee C. F. and Ji J. **2011**. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renew Sust Energ Rev* 15, 4080-4106. DOI: 10.1016/j.rser.2011.06.001

Kamm B. and Kamm M. **2004**. Biorefinery Systems. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 18 (1) 1-6.

Kapdi S.S., Vijay V.K., Rajesh S.K., Prasad R. **2005**. Biogas scrubbing, compression and storage: perspective and prospectus in Indian context. *Renew Energy* 30, 1195–1202. DOI: 10.1016/j.renene.2004.09.012.

Larson E.D. **2008**. Biofuel production technologies: status, prospects and implications for trade and development. Report No. UNCTAD/DITC/TED/2007/10. United Nations Conference on Trade and Development, New York and Geneva.

Lehmann J. and Joseph S. **2009**. Biochar for environmental management: An introduction in biochar for environmental management. *Sci Tech. Ed.* Earthscan, London, UK.

Levin D. B., Pitt L., Love M. **2004**. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy* 29, 173–185.

- Love G., Gough S., Brady D., Barron N., Nigam P. and Singh D. **1998**. Continuous ethanol fermentation at 45°C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate and kissiris. *Bioproc Eng* 18, 187-189. DOI: 10.1007/PL00008982.
- Love G., Nigam P., Barron N., Singh D., Marchant R. and McHale A.P. **1996**. Ethanol production at 45°C using preparations of *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate and kissiris. *Bioproc Eng* 15, 275. DOI: 10.1007/BF02391589
- Martín Gil, J. **2009**. El futuro de los biocombustibles: Biorrefinerías integradas. Lección Inaugural del Curso Académico 2009-2010.
- Martínez de Yuso Ariza A. **2012**. Desarrollo de carbones activados a partir de residuos lignocelulósicos para la adsorción de recuperación de tolueno y N-hexano. Universidad San Jorge. Tesis Doctoral.
- Merkel L. **2010**. Coskata's Thermal Bio-Syngas to Biofuels Platform.
- Nath K., Das D. **2003**. Hydrogen from biomass. *Current Sci* 85, 265–271.
- National Renewable Energy Laboratory. www.nrel.gov.
- Nigam P., Banat I.M., Singh D., McHale A.P. and Marchant A.P. **1997**. Continuous ethanol production by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* immobilized on mineral kissiris at 45°C. *World J Microbiol Biotechnol* 13, 283-288. DOI: 10.1023/A:1018578806605.
- Ochoa Hernández C. **2012**. Biodiésel o green diesel, ¿alternativas al diésel convencional?. Instituto IMDEA Energía. Publicado por Javier Dufour, Madri+d Energía y Sostenibilidad
- Omar S., Girgis B. and Taha F. **2003**. Carbonaceous materials from seed hulls for bleaching of vegetable oils. *Food Res Int* 36, 11–17. DOI: 10.1016/S0963-9969(02)00102-3.
- Paisley M.A., Farris M.C., Black J., Irving J.M., Overend R.P. **1998**. Commercial demonstration of the Battelle/FERCO biomass gasification process: startup and initial operating experience. In: Overend R.P., Chornet E., editors. *Proceedings of fourth biomass conference of the Americas*. Oxford, UK, Oakland, USA: Elsevier Science; p. 1061–1066.
- Patil V. and Tran-Quang K. and Giselrød H.R. **2008**. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *Int J Mol Sci* 9 (7), 1188-1195. DOI: 10.3390/ijms9071188.
- Paulova L., Patakova P., Branska B., Rychtera M. and Melzoch K. **2015**. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances* 33, 1091-1107. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.002
- Plan de Energías Renovables (PER) 2011-2020. IDAE. Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía.

- Riordon C., Love G., Barron N., Nigam P., Marchant R. and McHale L. **1996**. Production of ethanol from sucrose at 45 °C by alginate immobilized preparations of the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Bioresource Technol* 55:171-173.
- Rivas B. **2007**. Aprovechamiento de residuos agroforestales industriales de carácter lignocelulósico para la producción biotecnológica de compuestos de interés alimentario.
- Sánchez Bastardo N. **2014**. Obtención de gas de síntesis a partir de biomasa utilizando catalizadores de níquel. TFG. Universidad de Valladolid.
- Silva Rubio L.A., Bermúdez huertas A. y Belancourt R. **2013**. Producción de hidrógeno a partir de biomasa y su uso en celdas de combustible. Industria y comercio. Superintendencia. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Singh Nigam P. and Singh A. **2011**. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog Energ Combust* 37, 52-68.
- Spath P.L. and Dayton D.C. **2003**. Preliminary screening – technical and economic assessment of synthesis gas to fuels and chemicals with emphasis on the potential for biomass-derived syngas, NREL task no. BBB3.4210, NREL, Co. USA.
- Suresh K., Kiran Sree N., Rao L.V. **1999**. Utilization of damaged sorghum and rice grains for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technol* 68(3), 301-304. DOI: 10.1016/S0960-8524(98)00135-7.
- Turhollow A.F. and Heady E.O. **1986**. Large-scale ethanol production from corn and grain sorghum and improving conversion technology. *Energy Agric* 5(4), 309-316. DOI: 10.1016/0167-5826(86)90029-X
- Vila C. **2005**. Evaluación experimental y simulación de tecnologías de procesamiento para la obtención de pastas de celulosa. Tesis Doctoral.
- Villar J.C. **2013**. Biorrefinerías anti CO2 con casi cualquier tipo de residuo orgánico. EFE verde.
- www.biofuelstp.eu. European Biofuels Technology Platform.
- www.ostargi.biz ; www.sigma-energy.gr
- Xiong W., Li X., Xiang J. and Wu O. **2008**. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbiodiesel production. *Appl Microb Biotechnol* 78, 29-36. DOI: 10.1007/s00253-007-1285-1
- Zhao R., Bean S.R., Wang D., Park S.H., Schober T.J. and Wilson J.D. **2009**. Small-scale mashing procedure for predicting ethanol yield of sorghum grain. *J Cereal Sci* 49(2), 230-238. DOI: 10.1016/j.jcs.2008.10.006

2. ESTRUCTURA DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

La pared celular de las plantas está formada principalmente por tres compuestos orgánicos: celulosa, hemicelulosas y lignina (figura 2.1), en una proporción que puede variar según la naturaleza del material lignocelulósico. Además, contiene cantidades menores de pectina, proteínas, extractos (materiales no estructurales solubles como azúcares no estructurales, clorofila y ceras) y cenizas (Kumar *et al.*, 2009).

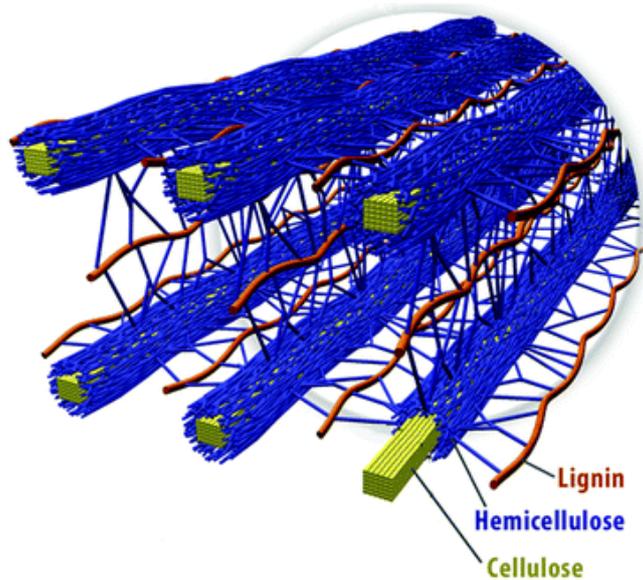


Figura 2.1: Disposición espacial de la celulosa, hemicelulosas y lignina en la pared celular de la biomasa lignocelulósica.

Fuente: Brandt *et al.*, 2012.

2.1. CELULOSA

La celulosa es la fuente orgánica renovable más abundante en la Tierra, formando parte de plantas, bacterias, algas, etc. Fue aislada por primera vez por Anselme Payen en 1839 a partir de madera tratada mediante una disolución de ácido nítrico e hidróxido sódico (Chen, 2014).

2.1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La celulosa es un homopolímero lineal compuesto por unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces β -1,4-glicosídicos. Contiene carbono (44,4%), hidrógeno (6,17%) y oxígeno (49,39%). La fórmula química de la celulosa es $(C_6H_{10}O_5)_n$; siendo n el grado de polimerización (DP), que representa el número de grupos de glucosa, variando desde cientos a miles o incluso decenas de miles. La unidad básica repetitiva de la celulosa es la celobiosa, el disacárido de β -1,4-D- glucopiranosas (figura 2.2). Aunque la estructura y composición de las paredes celulares

de las plantas varía ampliamente, el contenido de celulosa normalmente se encuentra entre un 35-50% del peso seco. Típicamente, las cadenas de celulosa en las paredes celulares primarias de las plantas presentan grados de polimerización en el rango de 5.000 a 7.500 unidades de monómeros de glucosa, siendo este valor de 10.000 para la madera y 15.000 para la celulosa del algodón (Wyman *et al.*, 2005). Las fibrillas contienen aproximadamente entre 60 y 80 moléculas de celulosa. Los enlaces de hidrógeno están formados entre moléculas adyacentes (enlaces intermoleculares). Estos enlaces permiten una estructura fibrilar de alta cristalinidad. Las zonas que presentan elevada cristalinidad son difíciles de penetrar por disolventes y reactivos. Por el contrario, las zonas relativamente más desordenadas (amorfas) son más accesibles y susceptibles a todas las reacciones químicas. El alto grado de cristalinidad de la celulosa cristalina confiere protección a la célula y constituye un impedimento al ataque de reactivos. No ocurre lo mismo con la celulosa amorfa, más fácilmente atacable.

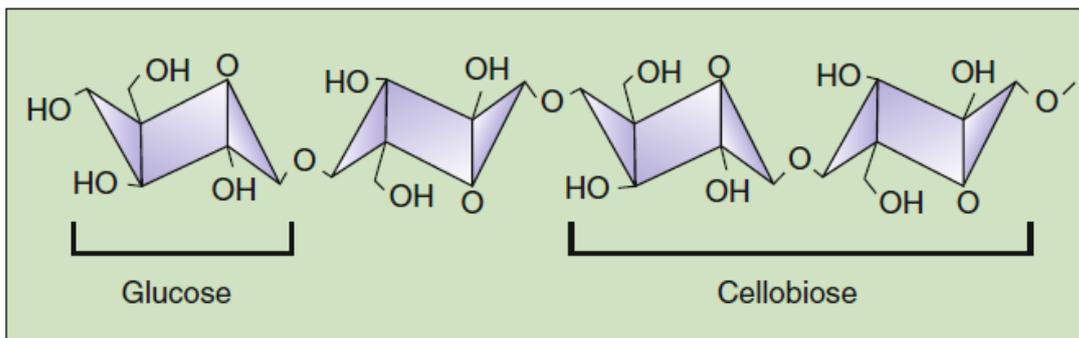


Figura 2.2: Estructura de la cadena molecular de la celulosa

Fuente: Chen, 2014.

Las disoluciones de hidróxido sódico a diferentes concentraciones y diferentes temperaturas pueden disolver la celulosa con diferente grado de polimerización. De acuerdo a las diferentes solubilidades bajo condiciones específicas, la celulosa se puede dividir en tres tipos: α -celulosa, la cual es disuelta en hidróxido sódico al 16,5% a 20°C; β -celulosa, que es extraída por deposición tras neutralizar la disolución ácida y la disolución remanente alcalina; y γ -celulosa, que es el resto soluble en la solución neutralizada. Staudinger (1930) usó un método de viscosidad para medir el DP de estas tres celulosas. Los resultados indicaron que los DPs de α -celulosa, β -celulosa, y γ -celulosa fueron mayores de 200, entre 10 y 200, y menores de 10, respectivamente. Tradicionalmente, la β -celulosa y la γ -celulosa son conocidas como hemicelulosas industriales. El término holocelulosa se refiere a todos los carbohidratos en el material celulósico natural, siendo también la suma de celulosa y hemicelulosas (Chen, 2014).

2.1.2. ESTRUCTURA DE AGREGACIÓN

El estado de agregación de la celulosa, también denominado estructura supramolecular de la celulosa, se refiere principalmente a cómo las moléculas de celulosa se ordenan para formar la estructura amorfa y cristalina. La técnica de difracción de rayos X ha sido utilizada para la determinación de la cristalinidad en madera y pastas (Stewart and Foster, 1976; Ahtee *et al.*, 1983; Zhan *et al.*, 1991; Canetti *et al.*, 1991; Focher *et al.*, 1994; Olaru *et al.*, 1995; Goswami *et al.*, 1996). Los estudios mostraron que en los agregados de macromoléculas de celulosa, las moléculas en estructura cristalina se ordenan regularmente y exhiben un claro patrón de rayos X, siendo la densidad de la celulosa en la región cristalina alta ($1,588 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Las cadenas moleculares en la región amorfa se ordenan de manera irregular y holgada, por lo que la distancia entre moléculas es grande. La densidad de la celulosa en la región amorfa es baja, $1,500 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. La cristalinidad de la celulosa, generalmente entre 30 y 80% se refiere al porcentaje de toda la celulosa ocupada en la región cristalina (Yang, 2008; Chen, 2014).

Se han descrito 4 tipos de polimorfos de celulosa: celulosas I, II, III y IV. Estos polimorfismos se refieren a la existencia de más de una forma cristalina, difiriendo en propiedades físicas y químicas como solubilidad, densidad, punto de fusión, forma cristalina y propiedades ópticas y eléctricas. La celulosa I ($I\alpha$ y $I\beta$) o celulosa nativa, es la forma más predominante. En 1937, Meyer y Misch propusieron una celda unidad de la red cristalina, suponiendo una celda unidad monoclinica y dos segmentos de cadena de celobiosa antiparalelos que funcionan en direcciones opuestas a lo largo del eje de la fibra. Las dimensiones de la celda unidad se muestran en la figura 2.3. Los tipos II, III (III_I y III_{II}) y IV (IV_I y IV_{II}), son aquellas formas cristalinas de celulosa “sintética” que se obtienen bajo procesamiento artificial. Hoy día, la estructura comúnmente aceptada de tipo I es la del modelo celular unitario monoclinico introducida por Meyer y Misch en 1937. Fue en 1984, cuando se demostró a través de técnicas como NMR (Atlla & VanderHart, 1984) y difracción de electrones (Sugiyama *et al.*, 1991) que las celulosas nativas eran, de hecho, una combinación de dos sub-alomorfos: celulosa $I\alpha$ y celulosa $I\beta$. La celulosa $I\alpha$ es el polimorfo primario en celulosas de bacterias y algas, mientras que la celulosa $I\beta$ es predominante en plantas superiores y fuentes animales. La celulosa nativa tiene una orientación paralela de la cadena (Hieta *et al.*, 1984) con celulosa $I\alpha$ triclinica con una cadena de celulosa por celda unidad y celulosa $I\beta$ monoclinica con dos cadenas paralelas por celda unidad con dimensiones similares a la originalmente propuesta por Meyer-Misch.

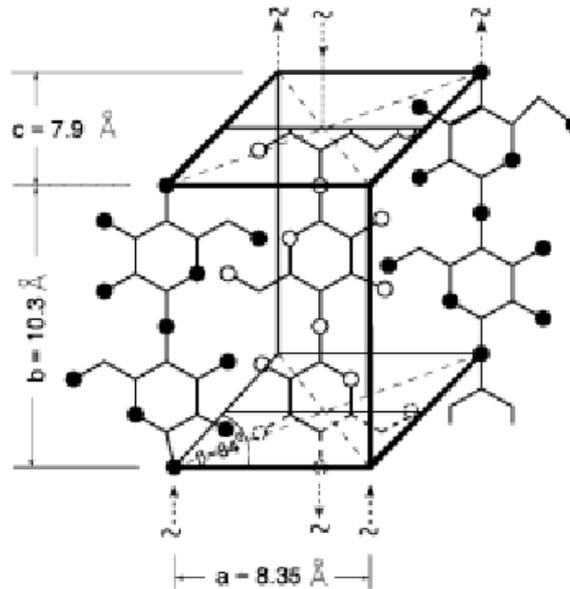


Figura 2.3: Modelo de celda unidad de la celulosa I de acuerdo a Meyer y Misch (Meyer & Misch 1937)

Además de la celulosa I, la celulosa II es la forma de celulosa más importante desde un punto de vista técnico y comercial. La celulosa II puede ser preparada precipitando la celulosa disuelta en un medio acuoso. También se obtiene por el llamado proceso de mercerización, por ejemplo, remojando la celulosa en una disolución de NaOH (17% - 20%, peso/volumen) seguido por la descomposición del intermediario por neutralización o lavando el NaOH. La mercerización se usa para activar el polímero previo a la producción técnica del éter de celulosa. El proceso de transformación de celulosa I a celulosa II es considerado generalmente irreversible.

La modificación de la celulosa III se obtiene tratando la celulosa nativa con amoníaco líquido (por debajo de -30°C) o con una amina orgánica como la etilendiamina, seguida por un lavado con alcohol. Existen pequeñas diferencias en las dimensiones de las redes cristalinas entre la dos submodificaciones de celulosa III_I y III_{IV}.

La celulosa IV se forma bajo tratamiento de las otras celulosas en un líquido apropiado a elevada temperatura y bajo tensión (figura 2.4).

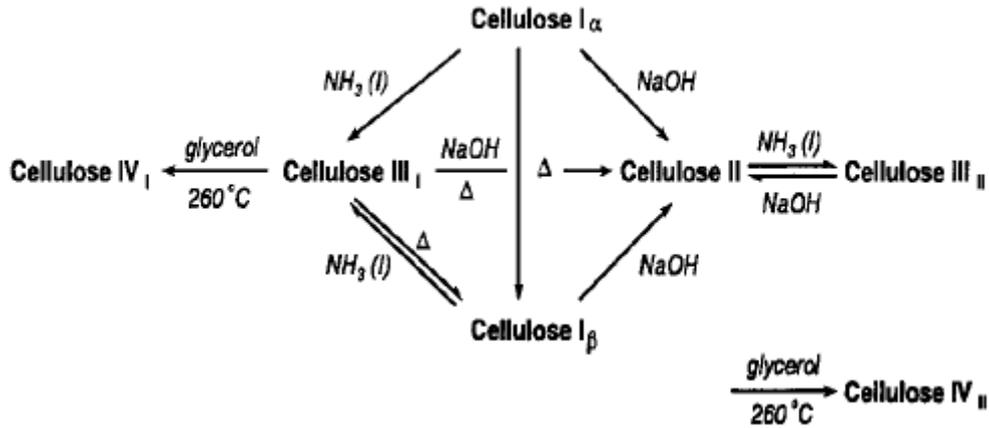


Figura 2.4: Transformación de la celulosa en sus polimorfos.

Fuente: Klemm *et al.*, 2005

2.1.3. ENLACES DE HIDRÓGENO

En la celulosa se dan dos tipos de enlaces de hidrógeno: intra- e intermoleculares. La presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares es de elevada importancia en relación a la conformación de la cadena simple y la rigidez. En la figura 2.5 se muestra, mediante los datos obtenidos por difracción de rayos X y espectroscopía NMR e IR, la existencia de enlaces de hidrógeno entre O-3-H y O-5' de la unidad de glucopiranososa adyacente y O-2-H y O-6' en la celulosa cristalina nativa (Liang and Marchessault, 1959; Marchessault and Liang, 1960; Gardner and Blackwell, 1974; Sarko and Muggli, 1974).

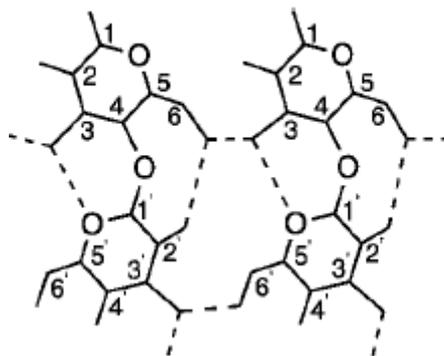


Figura 2.5: Sistema de enlaces de hidrógeno de la celulosa I

Fuente: Klemm *et al.*, 2005.

En la celulosa II, los enlaces de hidrógeno son esencialmente los mismos que los propuestos para la celulosa I, considerando el enlace de hidrógeno O-3-H y O-5'. La conformación del grupo C-6 hidroximetil difiere en cada cadena ya que las cadenas están

orientadas anti-paralelas en la celda unidad, por ejemplo, los grupos CH₂OH de las cadenas respectivas no son equivalentes (Kolpak and Blackwell, 1976). Debido a que una de las cadenas tiene un enlace de hidrógeno intramolecular por unidad de anhidroglucopiranososa mientras que la otra cadena tiene dos, se da una red de puentes de hidrógeno más compleja (Stipanovic and Sarko, 1976).

Se asume el enlace de hidrógeno intermolecular solamente en el grupo OH en las posiciones C-6' y C-3' de las moléculas de celulosa localizadas adyacentes en el mismo área de la red (planos 020) (Blackwell *et al.*, 1977).

El enlace de hidrógeno intermolecular en la celulosa II es significativamente más complejo comparado con el de la celulosa I. El modelo de cadena anti-paralela permite la formación de no sólo enlaces de hidrógeno intercatenarios sino también entre planos. La representación más ampliamente aceptada de la situación de los enlaces ha sido dada por Kolpak and Blackwell (1976, 1978), como se muestra en la figura 2.6.

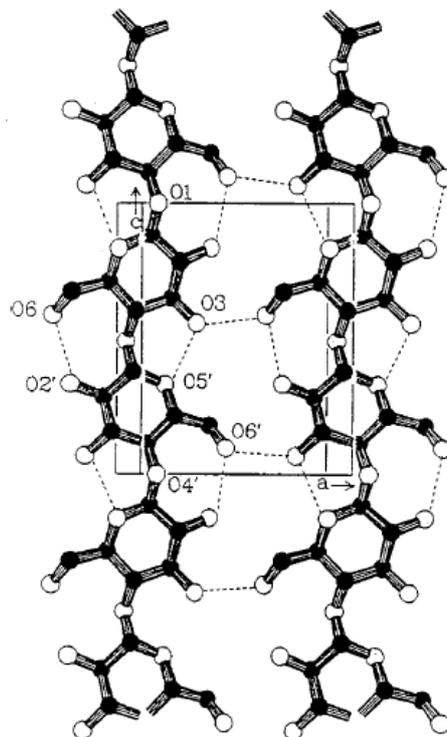


Figura 2.6: Patrón de enlace de celulosa I más probable (Kolpak and Blackwell, 1976, 1978)

Fuente: Klemm *et al.*, 2005

2.2. HEMICELULOSAS

La mayoría de los polisacáridos encontrados en las paredes celulares de las plantas pertenecen al grupo de la celulosa, hemicelulosas o pectinas. La celulosa es el polisacárido estructural dominante de las paredes celulares de las plantas. La rigidez de las microfibras de celulosa es reforzada dentro de una matriz de hemicelulosas y pectinas.

Las hemicelulosas, a diferencia de la celulosa, están compuestas de azúcares, formando cadenas más cortas y con ramificaciones. Entre los azúcares que forman las hemicelulosas podemos encontrar pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa), ácidos urónicos (ácido glucurónico, metilglucurónico y galacturónico) y deoxi-hexosas (ramnosa y fucosa) (Figura 2.7).

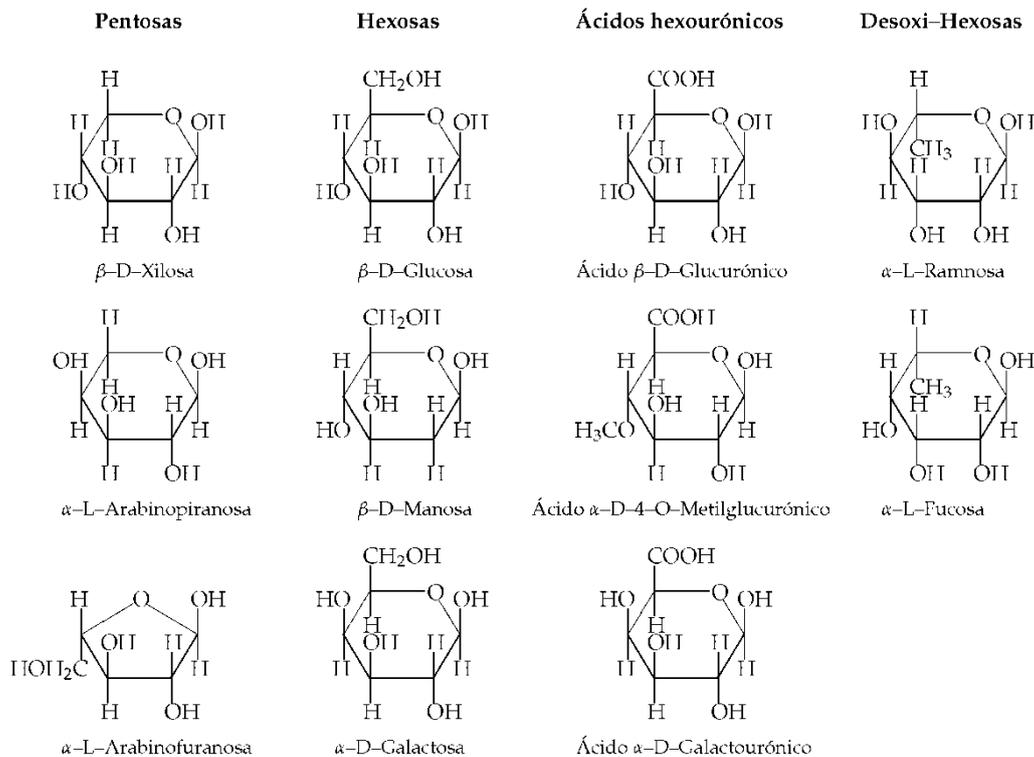


Figura 2.7: Compuestos que pueden formar parte de las poliosas

Fuente: Vila, 2005.

La cadena principal de una macromolécula hemicelulósica puede estar constituida por la misma unidad monomérica (homopolímero), como los xilanos, o por dos o más unidades distintas (heteropolímero), como los glucomananos.

Generalmente las hemicelulosas son clasificadas de acuerdo al residuo de azúcar principal en la cadena. Por ejemplo, xilanos, mananos, y glucanos, siendo los más prevalentes los xilanos y mananos. Dependiendo de las especies de plantas, la etapa de desarrollo, etc., se pueden encontrar varias subclases de hemicelulosas, incluyendo glucuronoxilanos, arabinoxilanos, mananos lineales, glucomananos, galactomananos, galactoglucomananos, β -glucanos y xiloglucanos. Estos subtipos diferentes pueden ser agrupados en dos categorías generales basadas en la hidratación de las fibras. Los polisacáridos de baja hidratación incluyen los arabinoxilanos, glucuronoxilanos, xiloglucanos y mananos lineales. A excepción de los mananos lineales, los cuales sirven principalmente como compuestos de almacenamiento en las semillas, la función principal de esta clase de hemicelulosas es estabilizar la pared celular a través de interacciones por puentes de hidrógeno con celulosa y covalente con lignina. Además, generalmente, son solubles en agua en su estado nativo debido a su construcción ramificada. Otras hemicelulosas, compuestas principalmente de hidrocoloides, son empleadas principalmente como energía extracelular, sistema de almacenamiento de materias primas y como un mecanismo de retención de agua en semillas. Los galactoglucomananos, glucomananos, galactomananos, y β -glucanos tienden a estar altamente hidratados y tener muy pocas o ninguna cadenas laterales unidas a ésteres.

2.2.1. FUNCIONALIDAD ESTRUCTURAL DE LAS HEMICELULOSAS

Se piensa que las hemicelulosas están implicadas en la regulación de la elongación y modificación de la pared celular y, al contrario que la lignina, se cree que tiene un fuerte efecto en las interacciones entre microfibrillas de celulosa. Las hemicelulosas, en combinación con la lignina y la celulosa, incrementan la resistencia a la degradación enzimática de la pared celular. Su composición química y características estructurales varían ampliamente con las especies, localización subcelular y etapas de desarrollo. A menudo, han sido documentadas como asociadas químicamente o reticuladas a otros polisacáridos, proteínas o lignina. Probablemente, no existan enlaces químicos entre la celulosa y las hemicelulosas sino enlaces de hidrógeno y fuerzas de *Van der Waals* (Wyman *et al.*, 2005).

Los grupos laterales del xilano pueden jugar un papel importante en el enlace de la lignina a las hemicelulosas. Se han identificado ambos enlaces éster entre la lignina y unidades del ácido metilglucurónico y los enlaces éter de la lignina a los grupos arabinosil. Los componentes fenólicos de bajo peso molecular de la lignina, como son el ácido felúrico y el ácido *p*-cumárico, están unidos covalentemente a las hemicelulosas.

Los grupos laterales, especialmente los sustituyentes acetil, afectan a las propiedades físico-químicas y a la biodegradabilidad de las hemicelulosas solubles o vinculadas a una matriz (Wyman *et al.*, 2005).

2.2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS HEMICELULOSAS

El contenido y la estructura de las hemicelulosas pueden variar entre las diferentes especies vegetales. La estructura viene principalmente definida por la composición de la cadena principal y las cadenas ramificadas de glucanos en las hemicelulosas. La cadena principal puede consistir en uno o más tipos de glicosil, y las conexiones entre grupos glicosil también son diferentes. A continuación, se detalla la clasificación de las principales hemicelulosas.

2.2.2.1. Estructura química de los xilanos

El término “xilano” es un término general para polisacáridos que tienen una cadena de β -(1 \rightarrow 4)-D-xilopiranososa con una variedad de cadenas laterales. El xilano es la hemicelulosa predominante en la mayoría de las paredes celulares de las plantas, generalmente comprende 1/3 de la biomasa total. Se encuentra principalmente en la pared celular secundaria y se acumula en la superficie de las microfibrillas de celulosa a medida que el complejo de celulosa sintasa produce la microfibrilla. Los xilanos forman enlaces cruzados (*cross-links*) entre la celulosa, lignina, otras hemicelulosas y pectina por medio de puentes de hidrógeno a otros polisacáridos y por enlaces covalentes a través de cadenas laterales arabinofuranosil a los ácidos ferúlicos y cumáricos encontrados en la lignina.

La composición y enlaces de las cadenas laterales determinan la variedad específica de xilano. La eliminación de estas cadenas laterales generalmente mejora la velocidad de degradación por las enzimas endoxilanasas. Los xilanos de las plantas herbáceas y anuales que tienen una cantidad elevada de sustituyentes α -L-arabinofuranósidos son conocidos como arabinoxilanos. Las cadenas laterales de arabinoxilano están constituidas principalmente por arabinofuranosa y grupos acetilo. Las ramificaciones de L-arabinofuranósidos están unidas por enlaces α -(1 \rightarrow 2,3) a la cadena de xilopiranososa.

Los xilanos de las maderas duras, altamente sustituidos con acetil y ácido glucurónico 4-O- metil, son conocidos como glucuronoxilanos. El 4-O-ácido metilglucurónico está unido a la cadena principal de xilano por enlaces α -(1 \rightarrow 2) glicosídicos, y el ácido acético es esterificado en el 2 y/o 3 carbono del grupo hidroxilo. La proporción molar de xilosa/ácido glucurónico/unidades acetilo es aproximadamente 10:1:7.

Al contrario que en las maderas duras y las plantas herbáceas, las hemicelulosas de las maderas blandas son en su mayoría galactoglucomananos, (15-20% de la biomasa total de la madera blanda), constituyendo los xilanos sólo el 7-10% de dicha biomasa. Los galactoglucomananos se dividen en dos subtipos de bajo y alto contenido en galactosa con proporciones de galactosa/glucosa/manosa de 0,1; 1:4 y 1:1:3, respectivamente. Los xilanos de las maderas blandas, arabino-4-O-metilglucuronoxilanos, no están acetilados, pero la cadena de xilano está sustituida en el carbón 2 y 3 con 4-O-metil- α -D-ácido glucurónico y residuos α -L-arabinofuranosil, respectivamente. El xilano de la madera blanda tiene una proporción de xilosa/ácido glucurónico/arabinosa de aproximadamente 8:1,6:1 a 10:2:1. También presenta un grado de polimerización menor, 100, comparado con los xilanos de las maderas duras, cuyo grado de polimerización está en torno a 200 (Wyman *et al.*, 2005).

2.2.2.2. Estructura química de los mananos y derivados de mananos.

Las maderas blandas presentan el mayor contenido de manano; algunas maderas duras tienen manano, conteniendo muy poca cantidad las plantas herbáceas. La manosa y la glucosa están unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) para formar un polímero no homogéneo como cadena principal.

La cadena principal de manano en maderas duras está compuesta por glucosa y manosa; la proporción de estos dos glicosilos es 1,5-2:1, y el grado de polimerización medio es de 60-70; si está o no acetilada no está aún del todo claro. En el caso de las maderas blandas, la glucosa y la manosa en una proporción de 3:1 se organizan aleatoriamente para formar la cadena principal, el galactosil está unido a la glucosa o manosa de la cadena principal por enlaces α -(1 \rightarrow 6), y el acetil parece estar uniformemente distribuido en los C2 y C3 de la manosa. El grado de polimerización medio es más de 60; algunos pueden alcanzar 100 (Chen, 2014).

Los compuestos de manano incluyen galactomanano, glucomanano, ácido glucurónico y galactoglucomanano. Los residuos de manosa están conectados por un enlace β -(1 \rightarrow 4) a la forma manano, pero forman galactomanano si están unidos a residuos de galactosa por un enlace α -(1 \rightarrow 6). La cadena principal de glucomanano está compuesta de glucosa y manosa, las cuales están unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) con la proporción residual de 1:3. El glucomanano también contiene un residuo de galactosa como cadena ramificada, por lo que, a veces, es denominada galactoglucomanano. Además, algún grupo hidroxilo de los residuos de manosa puede también estar acetilado. El ácido glucurónico prevalece en la pared celular, pero su

contenido es bajo. Los residuos de manosa, unidos por enlaces α -(1 \rightarrow 4), y residuos de ácido glucurónico, unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 2), existen alternativamente en la cadena principal de ácido glucurónico, cuyos extremos no sólo tienen xilosa o galactosa unida por enlaces β - (1 \rightarrow 6) sino que también tienen arabinosa enlazada por uniones 1 \rightarrow 3 (Yang, 2008; Chen, 2014).

2.2.2.3. Estructura química de los glucanos y xiloglucanos

Además de la celulosa, polisacárido dominante en las plantas, otros dos β -glucanos juegan un papel importante en la estructura y función de la pared celular de la planta, los β -glucano y xiloglucano. Éstos son químicamente similares a la celulosa, estando basados en una cadena de glucosa unida por enlaces β . El β -glucano consiste en mezclas de residuos de glucosa unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 4), mientras que el xiloglucano es un polímero de glucopiranosos unido por enlaces β -(1 \rightarrow 4) con grados variantes de residuos de xilosa unidos por enlaces α -(1 \rightarrow 6). Ambas estructuras están implicadas en el soporte y entrecruzamiento de la matriz de celulosa por medio de interacciones de los enlaces de hidrógeno con la celulosa, otras hemicelulosas y pectinas (Wyman *et al.*, 2005). El xiloglucano contiene principalmente glucosa, xilosa, y galactosa, y su proporción es aproximadamente 4:3:1. El xiloglucano en las plantas puede contener también fucosa y arabinosa (Chen, 2014).

2.2.2.4. Estructura química del arabinano

El arabinano está completamente constituido por arabinosa, y los residuos de α -L-arabinofuranosil están unidos entre ellos en el carbono 5 (C-5), formando la cadena principal. El arabinano contiene muchas cadenas ramificadas: algunas cadenas laterales de arabinofuranosil están enlazadas a O-2 u O-3 ó conectadas simultáneamente a O-2 y O-3, y algunas cadenas laterales están compuestas por arabinosa.

2.2.2.5. Estructura química del galactano y arabinogalactano

Los residuos de galactosa están conectados por enlaces β -(1 \rightarrow 4) para formar la cadena de galactano; los residuos de galactosa, como la cadena lateral, están unidos al O-6. Hay dos tipos de arabinogalactano: el más común tiene residuos de galactosa terminales unidos en O-3 y O-6, en O-3 u O-6, y residuos de arabinofuranosa unidos en O-3 u O-5. Otro tipo tiene residuos de galactosa unidos por O-4 u O-3 y enlaces O-4 y residuos de arabinofuranosa unidos terminalmente o por un enlace O-5. El arabinogalactano también puede ser un oligosacárido constituido por varios residuos de arabinosa. Además, el ácido ferúlico puede estar unido a algunos residuos de arabinosa y galactosa. El arabinogalactano en las paredes celulares puede

estar como una molécula independiente o como cadenas laterales en las moléculas de pectina (Chen, 2014).

2.3. LIGNINA

La lignina es el segundo polímero orgánico más abundante en las plantas tras la celulosa. Es un componente característico de las plantas superiores (gimnospermas y angiospermas). El contenido de lignina en las especies madereras y gramíneas es 20-40% y 15-20%, respectivamente. La lignina es el nombre de un grupo de sustancias cuya heterogeneidad se manifiesta en diferentes especies de plantas, la duración de la temporada de crecimiento, y las diferentes partes de las mismas. Proporciona rigidez a la pared celular y actúa como puente de unión entre las células, creando un material que es notablemente resistente a los impactos, compresiones y flexiones.

2.3.1. ESTRUCTURA DE LA LIGNINA

Químicamente la lignina es un polímero tridimensional amorfo constituido a partir de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos, que se unen entre sí por enlaces tipo alquil-aril-éter o carbono-carbono (Janshekar and Fiechter, 1983; García *et al.*, 1984). La lignina incluye tres monómeros estructurales básicos (figura 2.8): el monómero *p*-hidroxifenilo (tipo H) derivado del alcohol cumarílico, el monómero guayacilo (tipo G) derivado del alcohol coniferílico, y el monómero siringilo (tipo S) derivado del alcohol sinapílico.

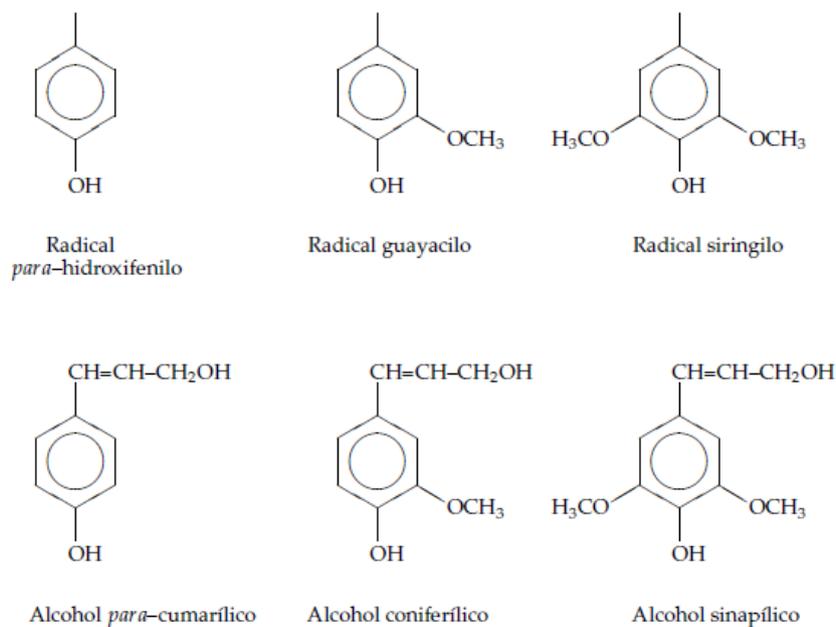


Figura 2.8: Unidades y monómeros básicos de la lignina; Fuente: Vila, 2005.

Aunque la lignina sólo tiene tres estructuras básicas, la proporción de estas estructuras básicas varía enormemente entre familias de plantas. La lignina en maderas duras incluye grandes cantidades de unidades siringilo. Las unidades estructurales de la lignina en maderas blandas son principalmente unidades tipo guayacilo, existiendo una pequeña cantidad de unidades del tipo *p*-hidroxifenilo. La lignina de la paja de trigo está formada por unidades guayacilo y siringilo no condensadas, y otras unidades condensadas.

En la figura 2.9 se pueden ver las principales características estructurales de las ligninas. Los enlaces éter en la lignina incluyen enlaces fenol-éter, alquil-éter, dialkil, diaril-éter, etc. Aproximadamente 3/4 de las unidades fenilpropano de la lignina están unidas a las unidades estructurales adyacentes por enlaces éter; sólo una pequeña parte está presente en forma de hidroxilo fenólico libre. Los enlaces fenol-éter representan el 70-80% de estos grupos, los éters guayacil glicerol- β -aril (β -O-4) son aproximadamente la mitad de los enlaces fenol-éter, seguidos por los éters guayacil glicerol- α -aril (α -O-4), conteniendo también otros tipos de enlaces éter. La lignina en maderas blandas y duras contiene principalmente enlaces éter del tipo aril glicerol- β -aril- $(\beta$ -O-4), representando aproximadamente la mitad de la lignina en maderas blandas y más del 60% en maderas duras. En los enlaces C-C de la lignina, el tipo dominante es el enlace β -5, β - β , seguido por β -1, β -2, 5-5, etc. (Tao *et al.*, 2003).

Los principales tipos de enlaces de la lignina que presentan las plantas herbáceas son los mismos que tienen las especies madereras. El principal tipo de enlace de la unidad estructural son enlaces glicerol- β -aril-éter aromáticos; estos se presentan en menor medida que en las maderas duras y en número similar a las maderas blandas. La proporción de enlaces carbono-carbono, tales como β -5 y β - β en las unidades estructurales, es mayor que en maderas duras. En la estructura de la lignina de las plantas herbáceas, una parte considerable de las unidades *p*-hidroxifenilpropano conecta con unidades fenilpropano en su forma éster. Tomando como ejemplo la paja, el 60% de las unidades *p*-hidroxifenilpropano están conectadas en la forma de sus ésteres. Además, la lignina de las plantas herbáceas contiene una pequeña cantidad de ésteres de ácido ferúlico.

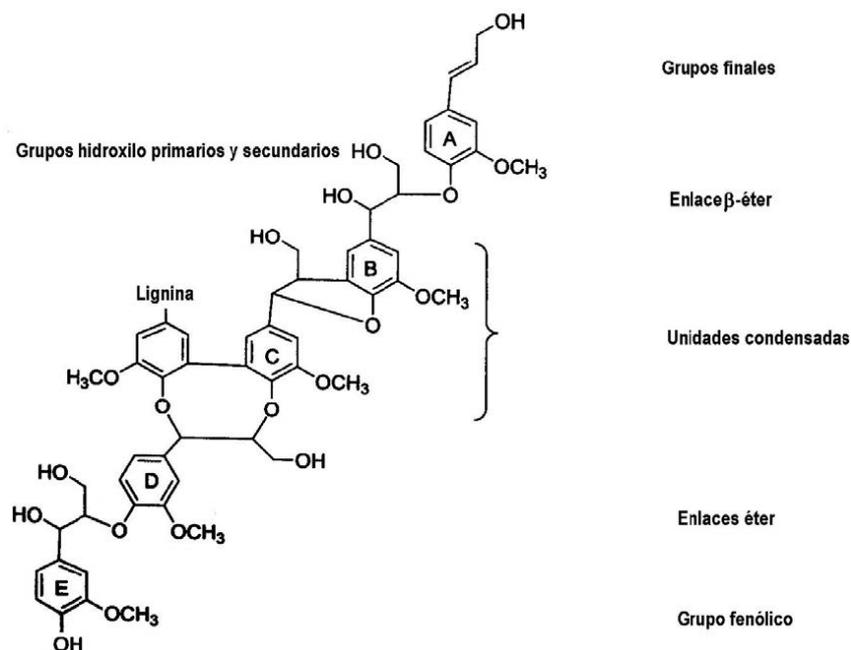


Figura 2.9: Principales características estructurales de la lignina

Fuente: Ochoa-Gómez, 2007.

2.3.2. PROPIEDADES QUÍMICAS DE LA LIGNINA

Las propiedades químicas de la lignina incluyen reacciones de halogenación, nitración, y oxidación en el anillo fenil; reacciones en el alcohol benzil, en el enlace aril-éter y en el alkil éter en la cadena lateral; reacción cromogénica de la lignina modificada, etc. Las reacciones químicas de la unidad estructural de la lignina están divididas en dos categorías: reacciones nucleofílicas y reacciones electrofílicas.

2.3.2.1. Reacciones químicas de la unidad estructural en la cadena lateral

Las reacciones en las cadenas laterales de la lignina están asociadas con el pasteado y la modificación de la lignina, siendo una reacción nucleofílica. Los reactivos que pueden conducir estas reacciones son (Gao and Tang, 1996; Tao and Guan, 2003; Chen, 2014):

- ✚ **Medio alcalino**, el efecto de los reactivos nucleofílicos OH^- , HS^- , y S_2^- conduce a la ruptura del enlace éter principal (por ejemplo, enlace α -aril éter, enlace tipo fenol α -alkoxi éter, y tipo fenol β -aril éter) y a la fragmentación y disolución parcial de la macromolécula de lignina.
- ✚ **Medio neutro**, la reacción con nucleófilos HSO_3^- o SO_3^{2-} conduce a la ruptura de enlace éter y trae los grupos SO_3^{2-} en la degradación de los fragmentos de lignina.

- ✚ **Medio ácido** principalmente relacionado con la reacción de fragmentación de la lignina en el proceso de pasteado con sulfito ácido. La disolución acuosa de SO_2 se emplea como reactivo conllevando a la ruptura de los enlaces éter α -aril fenólicos y no fenólicos, sulfonación del carbono α , aumentando la hidrofiliidad de la lignina.

2.3.2.2. Reacción química del anillo aromático en la estructura de la lignina

Las reacciones químicas del anillo aromático en la unidad estructural de la lignina están estrechamente ligadas a los procesos de modificación y han sido divididos en reacciones electrófilas y nucleófilas (Gao and Tang, 1996; Chen, 2014):

- ✚ **Reacción electrófila de sustitución:** ésta se refiere principalmente a las reacciones de sustitución y oxidación. Los reactivos electrofílicos incluyen cloro, dióxido de cloro, moléculas de oxígeno, ozono, catión nitro, catión nitroso, etc. La sustitución del reactivo electrófilo rompe las cadenas laterales de la lignina y conduce a la ruptura oxidativa de los enlaces β -aril éter. La cadena lateral alifática se oxida en un ácido carboxílico, y el anillo aromático se oxida en el compuesto de la estructura de O-quinona, que finalmente se oxidará en derivados de ácido dicarboxílico.
- ✚ **Reacción nucleófila:** los reactivos nucleófilos que pueden reaccionar con el anillo aromático de la lignina incluyen iones hidróxido, iones hipoclorito, e iones peróxido de hidrógeno. Estos reactivos nucleófilos pueden reaccionar con los grupos cromóforos en los fragmentos de lignina degradada, rompiendo la estructura cromófora hasta cierto punto.

2.3.2.3. Reacción cromogénica de la lignina

- ✚ **La reacción de condensación** de la lignina con ácidos inorgánicos concentrados está relacionada principalmente con la estructura aldehído coniferil en la estructura de la lignina.
- ✚ **La reacción cromogénica Mäule:** la lignina de las maderas duras llega a ser violeta rojiza cuando se trata por primera vez con KMnO_4 y HCl y después amoníaco. El anillo siringil genera metoxi o-dihidroxibenzeno bajo el efecto de KMnO_4 y HCl , generando una estructura metoxi-o-quinona, que se torna morada tras el tratamiento con amoníaco.
- ✚ **Reacción Cross-Bevan:** la madera húmeda sin extractos es tratada con cloro; la lignina se convierte en lignina clorada tras el tratamiento en ácido sulfínico y sulfito sódico, volviéndose la lignina rojo púrpura (Jiang, 2001; Chen, 2014).

2.3.3. PROPIEDADES FÍSICAS DE LA LIGNINA

Se pueden destacar 5 propiedades principales (Jiang, 2001; Chen, 2014):

- 1ª) Peso molecular y polidispersidad:** cualquier tipo de método separación puede causar alguna degradación parcial y cambios en la lignina. El peso molecular de la lignina varía con el método de separación. Además, bajo el efecto de la acción mecánica, enzimas o reactivos químicos, la estructura de la red tridimensional es degradada en fragmentos de lignina de diferentes tamaños, lo que conlleva a la polidispersidad del peso molecular de la lignina. La determinación del peso molecular de la lignina incluye el método osmométrico, el método de dispersión de luz, supercentrifugación, cromatografía por permeación de gel, cromatografía de líquidos de alta resolución, etc.
- 2ª) Solubilidad:** en la estructura de la lignina existen hidroxilos y muchos grupos polares, resultando en la formación de fuertes enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares, haciendo la lignina intrínseca insoluble en cualquier disolvente. La condensación o degradación hace que la lignina se pueda dividir en lignina soluble y lignina insoluble. La primera presenta una estructura amorfa y la segunda es la estructura morfológica de las fibras de la materia prima. La presencia de hidroxilos fenólicos y carboxilos hace que la lignina se pueda disolver en una disolución alcalina. La lignina extraída Brauns y la organosolv se pueden disolver en dioxano, metanol, etanol, acetona, metil *cellosolve*, y piridina. La lignina alkali y la lignosulfonada se pueden disolver normalmente en un alkali diluido, agua, y en solución salina. La lignina ácida no es soluble en ningún disolvente. Los mejores disolventes para la mayoría de las ligninas separadas son el bromuro de acetilo y el hexafluoruroisopropanol en ácido acético.
- 3ª) Propiedades térmicas:** la lignina es un polímero termoplástico amorfo. Presenta una ligera friabilidad a altas temperaturas. También tiene propiedades de transición vítrea. Bajo la temperatura de transición vítrea, la lignina se encuentra en la fase vítrea sólida; comienza a cambiar cuando se encuentra por encima de la temperatura de transición vítrea. La lignina se ablanda y se vuelve pegajosa, mostrando fuerza adhesiva. La temperatura de transición vítrea de la lignina ya separada varía con el material lignocelulósico, el método de separación, el peso molecular y el contenido en agua. La temperatura de ablandamiento de la lignina totalmente seca varía entre 127 y 129°C, la cual disminuye considerablemente con el incremento del contenido en agua, indicando que agua actúa como plastificante de la lignina.

4ª) Densidad relativa: la densidad relativa de la lignina oscila entre 1,35 y 1,50. La lignina preparada por métodos diferentes presenta densidades relativas diferentes.

5ª) Color: la lignina intrínseca es una sustancia blanca o casi incolora; el color de la lignina que se observa es el resultado del proceso de separación y preparación.

2.4. CENIZAS

En las plantas, aparte del carbono, hidrógeno, oxígeno, y otros elementos básicos, existe otro tipo de elementos que resultan indispensables en las células de las plantas, como el nitrógeno, azufre, fósforo, calcio, magnesio, hierro, potasio, sodio, cobre, zinc, manganeso, cloro, etc. Cuando una muestra se seca a 105°C y se procesa a 750°C en un horno, los elementos tales como el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, etc. desaparecen en forma de compuestos gaseosos, y el residuo que queda es la ceniza que contiene muchos tipos de elementos minerales en forma de óxido. El contenido de estas cenizas va a estar determinado por el tipo de planta y su ambiente de crecimiento (Yang, 2008; Chen, 2014).

2.5. PECTINA

La pectina es el mayor componente de la lámina media de la planta; está localizado entre los microfilamentos de celulosa de la pared celular, principalmente condensados por ácido galacturónico y su metil éster y compuesto por ramnosa y arabinosa. La pectina se puede dividir en ácido péctico, pectina y protopectina.

El ácido péctico es una cadena lineal unida por enlaces α -1,4 por 100 ácidos galacturónicos. La pectina es el componente principal de las sustancias intercelulares en las plantas superiores; es un polímero de cadena larga unido por enlaces glicosídicos α -1,4 por ésteres de ácido galacturónico y una cantidad pequeña de ácido galacturónico. El peso molecular de la protopectina es mayor que el del ácido péctico y la pectina. La protopectina existe principalmente en la pared primaria, y es insoluble en agua (Chen, 2014).

2.6. PIGMENTOS

Los pigmentos son sustancias importantes en los materiales lignocelulósicos. Los pigmentos en las plantas normalmente se generan a partir de la lignina y algunos productos de degradación de la lignina con anillos de benceno. Kringstad *et al.* demostraron que la estructura quinoide era el cromóforo más importante en la lignina. La formación y degradación de la lignina están involucradas con formaciones de paraquinonas y *O*-quinona. La *O*-quinona, roja, y las paraquinonas, amarillas, son las mayores estructuras cromogénicas de la lignina. Las

estructuras de paraquinona son mayoritariamente disueltas de forma individual en lugar de en forma de unidades condensadas, pero las estructuras de *O*-quinona permanecen principalmente en las macromoléculas de lignina sin llegar a diluirse (Li and Wu, 2006; Xi and Li, 2008).

Las plantas también contienen pequeñas cantidades de flavonoides y antocianina. En la transformación de los materiales, estos pigmentos son extraídos, afectando la posterior conversión de los materiales lignocelulósicos. La presencia de pigmentos puede causar cierto grado de inhibición en la hidrólisis enzimática y fermentación. Por ello, los pretratamientos de los materiales lignocelulósicos normalmente necesitan eliminar pigmentos del hidrolizado; estos tratamientos incluyen resinas, intercambio iónico, electrodiálisis, y precipitación.

2.7. PROTEÍNAS

Además de los principales componentes mencionados, la pared celular está enriquecida con proteínas. De acuerdo a la función fisiológica, existen dos grupos de proteínas en la pared celular: proteínas estructurales, que conforman la parte principal de las proteínas de la pared celular; la zimoproteína, que incluye docenas de proteínas con varias actividades enzimáticas (Han and Chen, 2007).

2.8. PARED CELULAR

En la figura 2.10 se puede observar la estructura de la pared celular de un material lignocelulósico. Las moléculas de celulosa se encuentran normalmente organizadas y agrupadas, determinando la estructura de la pared celular, la cual es compacta. Una fibrilla está compuesta de microfibrillas de celulosa entrelazada, que hacen a la celulosa más fuerte que un cable de acero del mismo espesor. Las microfibrillas se entraman en una red, conformando la estructura básica de la pared celular; siendo su diámetro entre 10-20 nm. Las microfibrillas están formadas de fibrillas primarias o básicas dispuestas en paralelo. El diámetro de estas fibrillas primarias oscila entre 2 y 4 nm. Esta es la unidad estructural en la que las moléculas de celulosa están unidas por enlaces β -1,4- glicosídicos (Zhang *et al.*, 1997). En algunas regiones de las microfibrillas, las moléculas de celulosa están organizadas de manera ordenada, teniendo la celulosa propiedades cristalinas. Esta organización estable de las moléculas de celulosa en microfibrillas se denomina micela.

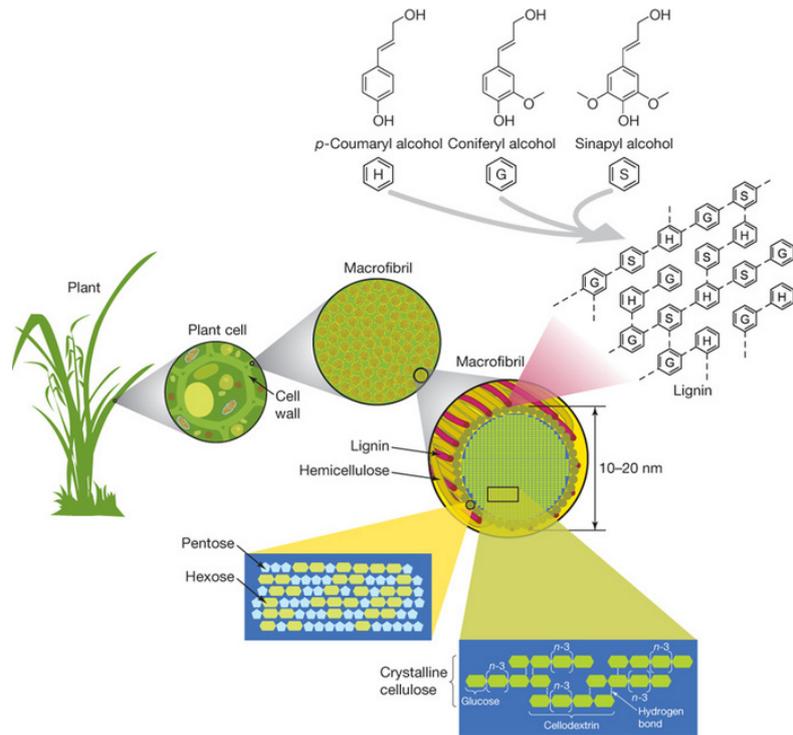


Figura 2.10: Estructura de la pared celular de un material lignocelulósico.

Fuente: Rubin, 2008.

Otro componente importante de la pared celular es la lignina. A excepción de la celulosa, es el polímero de cadena larga más abundante en la pared celular. Desde un punto de vista químico, las unidades básicas de la lignina son los derivados fenilpropanoicos y se combinan en sustancias de alto peso molecular por enlaces éter o enlaces carbono-carbono. En lo concerniente a las características físicas, la lignina contribuye a la dureza de la pared celular, concentrándose en ésta mayoritariamente. El contenido de lignina es aproximadamente el 20-32% en las plantas madereras y el 14-25% en las plantas herbáceas (Chen *et al.*, 1996). La pared celular de los tejidos protectores normalmente contiene también cutina, suberina, cera y otras sustancias grasas. Estos componentes reducen enormemente la pérdida de agua de las plantas.

Dependiendo del tiempo de formación y de la composición química, la pared celular se puede dividir en pared primaria y pared secundaria. Entre los principales componentes de la pared celular primaria se encuentran polisacáridos, proteínas, y otras muchas enzimas, glicoproteínas y algunos iones como calcio. Los principales polisacáridos de la pared primaria son celulosa, hemicelulosas y pectina. La celulosa representa el 15-30% del peso seco de la pared celular primaria. Las hemicelulosas interactúan con celulosas, formando una red con microfibrillas. La pectina se encuentra en un 30% de polisacárido de la pared celular primaria.

Estas células sin pared celular secundaria pueden especializarse y diferenciarse en diversos tipos de células. Por tanto, son importantes para producir regeneración. La función principal de la pared celular primaria es proporcionar soporte mecánico y estructural, mantener y determinar la morfología celular, controlar la velocidad y dirección del crecimiento celular, reservar hidratos de carbono, mantener la resistencia a los patógenos, resistir la deshidratación y activar la interacción entre las moléculas de señal fuente y las células (Song *et al.*, 2008). Muchas plantas solo tienen pared primaria, mientras que otras tienen ambas, primaria y secundaria. Cuando las células paran de crecer y el área superficial de la pared primaria no aumenta más, la pared secundaria comienza a formarse. Las células de la pared celular secundaria se forman dentro de la pared celular primaria y presentan algunas diferencias en la composición comparadas con las células primarias. Además de contener celulosa y hemicelulosas, la pared secundaria tiene lignina. La lignina es capaz de reticular altamente para mejorar el soporte mecánico haciendo que las plantas crezcan erguidas. La pared secundaria es particularmente importante para las células especializadas que están relacionadas con el refuerzo mecánico y el transporte de agua. La pared secundaria tiene más celulosa que la pared primaria pero pierde pectina, por lo que la pared celular secundaria es más dura, está menos extendida que la pared primaria, y no tiene enzimas ni glicoproteínas. El componente básico de la pared celular secundaria son las hemicelulosas. Normalmente se puede dividir en 3 capas (figura 2.11): capa interior (S3), capa media (S2), capa exterior (S1).

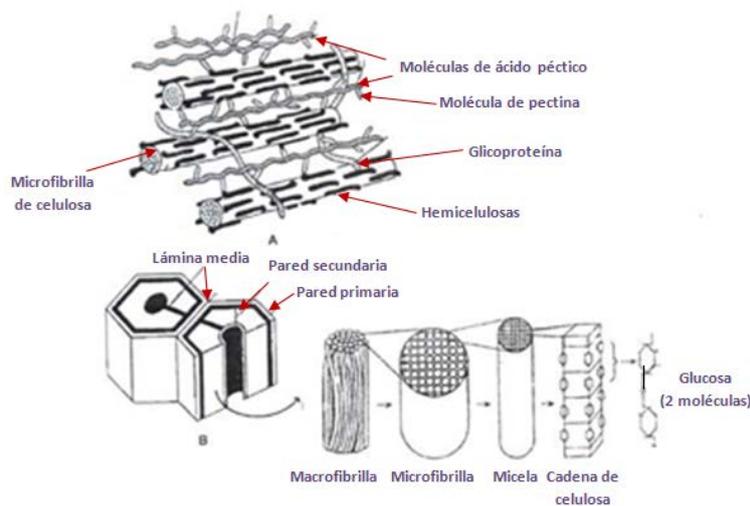


Figura 2.11: Estructura de la pared celular de una fibra de celulosa.

(A) Ultraestructura de la pared primaria. **(B)** Estructura detallada de la pared celular.

En resumen, si se analiza con profundidad la membrana celular, se observa que no es homogénea, sino que está formada por tres capas, una externa muy delgada denominada pared intercelular o laminilla media, otra también muy delgada denominada pared primaria, otra media muy gruesa denominada pared secundaria y, por último, una interna muy delgada denominada terciaria.

2.9. BIBLIOGRAFÍA

- Ahtee M., Hattula T., Mangs J. and Paakkari T. **1983**. An X-ray diffraction method for determination of crystallinity in Wood pulp. *Paperi Ja Puu* 65 (8), 475-480.
- Álvarez H. y Fernández-Golfín J.I. *Fundamentos teóricos del secado de la madera*. Madrid (España). 193 p. Colección monografías INIA, núm. 82.
- Atlla R.H., Vanderhart D.L. **1984**. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. *Science* 223 (4633), 283-285. DOI: 10.1126/science.223.4633.283.
- Blackwell J., Kolpak F. J. and Gardner K. H. **1977**. In *Cellulose Chemistry and Technology*, (J. C. Arthur, ed.) ACS Symposium Series.
- Brandt A., Gräsvik J., Hallett J. P. and Welton T. **2013**. Deconstruction of lignocellulosic biomaas with ionic liquids. *Green Chem* 15, 550-583. DOI: 10.1039/C2GC36364J.
- Canetti M., Cosentino C., Bocchio L., Gastaldi G. and Focher B. **1996**. Characterization of non-wood plant cellulose by X-ray and solid-state ^{13}C NMR. *Fourth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*. Stresa, Italy, Pp. 283-291.
- Chen, H. **2014**. *Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose in Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Chemical Industry Press, Beijing and Springer Science Business Media Dordrecht. DOI 10.1007/978-94-007-6898-7_2.
- Focher B., Capretti G., Marzetti A., Kotka B.V., Hua X. and Kaliaguine S. **1994**. Sulfonated aspen pulps. Effect of vapor-phase cooking temperature on the fiber structure. *Cell Chem Technol* 28 (6), 629-648.
- Chen H.Q., Gong Y., Fang Z. **1996**. The situation and aspect of application for macromolecule (l)-cellulose, lignin and starch. *Yunnan Chem Technol* 11(1), 41-46.
- Gao J. and Tang L.G. **1996**. *Cellulose science*. Beijing: Science Press.
- García F., Martín F. y Rodríguez J. **1984**. Posibilidades de aprovechamiento de la lignina en la industria química. *Ingeniería Química* 10, 249-254.
- Gardner K, H. and Blackwell J. **1974**. The structure of native cellulose. *Biopolymers* 13 (10), 1975-2001. DOI: 10.1002/bip.1974.360131005.

- Goswami T., Saikia C.N., Baruah R.K. and Sarma C.M. **1996**. Characterization of pulp obtained from *Populus deltoides* plants of different ages using IR, XRD and SEM. *Bioresource Technol* 57 (2), 209-214. DOI: 10.1016/0960-8524(96)00069-7.
- Han Y.J. and Chen H.Z. **2007**. Plant cell wall proteins & enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Prog Chem* 19(7/8), 1153–1158.
- Hieta K., Kuga S. and Usuda M. **1984**. Electron staining of reducing ends evidences a parallel-chain structure in Valonia cellulose. *Biopolymers* 23(10), 1807–1810.
- Janshekar, H. and Fiechter A. **1983**. Lignin: biosynthesis, application, and biodegradation. *Adv Biochem Eng Biot* 27, 119–178.
- Jiang T.D. **2001**. Lignin. Beijing: Chemical Industry Press.
- Klemm D., Schmauner H.P. and Heinze T. **2005**. Cellulose Polysaccharides. *Biopolymers online* 6. DOI: 10.1002/3527600035.bpol6010.
- Kolpak F. J. and Blackwell J. **1976**. Determination of the structure of cellulose II. *Macromolecules* 9 (2), 273-278. DOI: 10.1021/ma6005a019.
- Kolpak F. J. and Blackwell J. **1978**. Mercerization of cellulose: 2. The morphology of mercerized cotton cellulose. *Polymer* 19 (2), 132-135. DOI: 10.1016/0032-3861(78)90028-9.
- Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J. and Stroeve P. **2009**. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind Eng Chem Res* 48, 3713-3729. DOI: 10.1021/ie801542g.
- Li X.P. and Wu S. **2006**. Research development of the reaction characteristic between lignin quinonoid chromophoric group and hydrogen peroxide. *J Cellul Sci Technol* 14(4), 52–56.
- Liang C. Y. and Marchessault R.H. **1959**. Hydrogen bonds in native celluloses. *J Polym Sci* 35, 529-531. DOI: 10.1002/pol.1959.1203512919.
- Marchessault R. H. and Liang C. Y. **1960**. Infrared spectra of crystalline polysaccharides. III. Mercerized cellulose. *J Polym Sci* 43, 71-84. DOI: 10.1002/pol.1960.1204314107.
- Meyer K. H. and Misch L. **1937**. Constitution of the crystallized part of cellulose. VI. Positions of atoms in the spatial model of cellulose. *Helv Chim Acta* 20 (1), 232-244. DOI: 10.1002/hlca.19370200134.

- Ochoa-Gómez J.R. **2007**. Industria química basada en biomasa. Implicaciones tecnológicas. LEIA, centro de desarrollo tecnológico.
- Olaru N., Olaru L., Stoleriu A. and Leanca M. **1995**. Kinetic study of cellulose carboxymethylation. Effect of cellulose accessibility and solvent system on reaction rate. 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry. Helsinki, Finland. Volume III, Pp. 361-366.
- Rubin E. **2008**. Genomic of cellulosic biofuels. *Nature* 454, 841-845. DOI: 10.1038/nature07190.
- Sarko A. and Muggli R. **1974**. Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. III. Valonia cellulose and cellulose II. *Macromolecules* 7 (4), 486-494. DOI: 10.1021/ma60040a016.
- Song D.L., Shen J.H. and Li L.G. **2008**. Cellulose synthesis in the cell walls of higher plants. *Plant Physiol J* 44(4), 791–7.
- Staudinger H. and Schweitzer O. **1930**. Über hochpolymere Verbindungen, 48. Mitteil.: Über die Molekülgröße der Cellulose. *Ber. Dt. Chem. Ges.* 63, 3132–3154.
- Stewart C.M. and Foster R.C. **1976**. X-Ray diffraction studies related to forest products research. *Appita J* 29, 440-448.
- Stipacnovic A. J. and Sarko A. **1976**. Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides. 6. Molecular and cristal structure of regenerated cellulose II. *Macromolecules* 9 (5), 851-857. DOI: 10.1021/ma60053a027.
- Sugiyama J., Persson J. and Chanzy H. **1991**. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native cellulose. *Macromolecules* 24, 2461–2466.
- Tao Y.Z. and Guan Y.T. **2003**. Study of chemical composition of lignin and its application. *J Cellul Sci Technol* 11(1), 42–55.
- Vignote S. y Martínez I. *Tecnología de la Madera*. 3ª Ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2006. 678 p. ISBN: 84-8476-263-7.
- Vila C. **2005**. Evaluación experimental y simulación de tecnologías de procesamiento para la obtención de pastas de celulosa. Tesis Doctoral.
- Wyman C.E., Decker S.R., Himmel M. E., Brady J. W., Skopec C.E., Viikari L. **2005**. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose in Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. Second Edition. CRC Press. DOI: 10.1201/9781420030822.ch43

Xi W., Li X.P. **2008**. An investigation to reaction properties of hydrogen peroxide with β -O-4 lignin quinoid chromophoric group. *China Pulp Pap Ind* 29(16), 32–35.

Yang S.H. **2008**. *Plant fiber chemistry*. Beijing: China Light Industry Press.

Zhan H.Y., Chen J.X. and Kokta B.V. **1991**. Study of mechanism of aspen populus explosion high yield pulping. 6th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry. Melbourne: Vol.2, Pp. 130-107.

Zhang Y.Z., Liu J. and Gao P. **1997**. Scanning tunneling microscopy of the ultrastructure of native cellulose. *Acta Biophys Sin* 13(3), 375-379.

3. BIORREFINERÍA DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PASTAS CELULÓSICAS, PAPEL Y CELULOSA MOLDEADA

3.1. PRODUCCIÓN DE PASTAS CELULÓSICAS

Las pastas celulósicas proceden de materiales lignocelulósicos que han sido fraccionados física o químicamente, de modo que las fibras se liberan y dispersan en agua, formando una red.

Los procesos de pasteado se dividen en cuatro amplias categorías (tabla 3.1):

- 1ª) Pasteado químico.** Se emplean disolventes o reactivos químicos para separar la celulosa del resto de constituyentes (hemicelulosa y lignina). Una pasta producida sólo por métodos químicos se conoce como pasta química completa, del inglés "*full chemical pulp*". El punto en el que se produce la separación o liberación de las fibras de celulosa es, en líneas generales, tras la cocción en el intervalo de temperatura 130-180°C. En este punto se ha eliminado suficiente lignina y por tanto, el material lignocelulósico está lo suficientemente suave como para separarse en fibras con poca o ninguna acción mecánica. El rendimiento del proceso está dentro del intervalo 40-50%, conteniendo la pasta entre el 3-5% de lignina, pudiendo ser algo más elevada dependiendo del tipo de material lignocelulósico empleado. Estas pastas presentan una fuerza a la tracción elevada. Los métodos más empleados son: el proceso Kraft (también denominado alcalino o proceso al sulfato con un pH de cocción por encima de 12) y otros procesos al sulfito con un amplio rango de condiciones de pH en la cocción. Un método más antiguo y que se está limitando hoy en día a maderas duras y a fibras no madereras como la paja es el proceso a la sosa, el cual emplea hidróxido de sodio como único ingrediente de pasteado activo.
- 2ª) Pasteado semi-químico.** También denominado pasteado químico de alto rendimiento. Consiste de dos etapas con rendimientos de entre el 60% y el 80%. En la primera etapa se aplica un tratamiento químico suave el cual es seguido por un tratamiento de refinado mecánico moderado. De este modo se da la eliminación parcial de la lignina y hemicelulosas. La primera etapa del proceso semi-químico puede ser similar a cualquier método de pasteado químico convencional, excepto que la temperatura, tiempo de cocción y la concentración de reactivo se ven reducidos.
- 3ª) Pasteado químico-mecánico.** Los procesos de pasteado químico-mecánico consisten en dos etapas con rendimientos del 85-95%. Un tratamiento químico suave es seguido por una acción mecánica drástica, aunque menos drástica que si no existiese

pretratamiento químico. Se conserva el contenido y la estructura original de la lignina, pero se pierden los extractos y pequeñas cantidades de hemicelulosa.

4ª) Pasteado mecánico. La pasta mecánica es producida utilizando sólo el desgaste mecánico de los materiales lignocelulósicos; no se emplean químicos diferentes al agua o vapor de agua. El rendimiento del proceso oscila entre un 90-98%. La lignina queda retenida en la pasta. Las pastas mecánicas se caracterizan por elevados rendimientos, alto volumen, y bajo coste. Poseen menor fuerza a la tracción dado que la lignina interfiere con los enlaces de hidrógeno entre las fibras cuando se fabrica el papel. La lignina también tiene un efecto sobre la pasta y hace que se vuelva amarilla con la exposición al aire y a la luz (Vila, 2005).

La energía mecánica requerida para separar las fibras se incrementa de los procesos 1 al 4, disminuyendo la dependencia de la acción química. Así, los métodos de pasteado químico se apoyan en el efecto de los disolventes y/o reactivos químicos para separar las fibras, mientras que los métodos mecánicos se basan principalmente en la acción física. Cuantos más productos químicos estén involucrados, menor será el rendimiento del proceso y el contenido final de lignina en la pasta, ya que la acción química degrada y solubiliza los componentes lignocelulósicos, especialmente la lignina y hemicelulosas. Por otro lado, el pasteado químico produce fibras individuales que no son cortadas, lo que se traduce en la obtención de papel más fuerte, ya que la lignina, la cual interfiere con los enlaces de hidrógeno de las fibras, es eliminada en gran medida.

| | | |
|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| Pastas químicas | Ácidas | Al sulfito |
| | Alcalinas | A la sosa |
| | | Al sulfato o Kraft |
| | | Oxidantes |
| | Otros procesos (sin azufre) | Hidrotrópicos |
| | | Extracción con disolventes orgánicos |
| Pastas semi-químicas | Al sulfito neutro (NSSC) | |
| | Al sulfito ácido | |
| | Al bisulfito | |
| | Al sulfito alcalino | |
| | Al sulfato | |
| | A la sosa en frío | |
| | Sin azufre | |
| Pastas químico-mecánicas | Químico-mecánica | |
| | Quimicotermomecánica | |
| Pastas mecánicas | De molinos | |
| | De refinador (RMP) | |
| | Termomecánica (TMP) | |

Tabla 3.1: Clasificación de las pastas celulósicas.

Fuente: Villar y Jiménez, 2005.

El presente trabajo se centra en el pasteado químico “a la sosa antraquinona” y su comparación con el proceso Kraft en una de las publicaciones, por lo que serán estos dos procesos de pasteado los que se expliquen en detalle a continuación.

3.1.1. PASTEADO KRAFT O AL SULFATO

El proceso de pasteado químico más importante usado hoy día es el proceso Kraft (Gellerstedt, 2001; Dimmel and Gellerstedt, 2010). Entre sus ventajas se incluye la obtención de papeles con excelentes propiedades de resistencia, bajos requerimientos de energía, bajos costes de químicos, e idoneidad para especies madereras. Por el contrario, las desventajas son: bajos rendimientos de las pastas (40-50%), costes de inversión de capital elevados, color marrón de la pasta obtenida no blanqueada, elevado coste de los químicos empleados para el blanqueo, cantidades significativas de componentes orgánicos en los efluentes de blanqueo y fuertes olores.

En la cocción Kraft convencional, la lignina es disuelta con un licor de cocción acuoso alcalino fuerte (licor blanco) que contiene principalmente hidróxido sódico (NaOH) y sulfuro de sodio (Na₂S) como reactivos de cocción activos (Alén, 2000; Sixta *et al.*, 2006). Las reacciones que ocurren durante el pasteado Kraft son complejas y no están totalmente descritas (Alén, 2000; Sixta *et al.*, 2006; Lapierre, 2010). Los agentes químicos activos principales en el proceso Kraft son aniones hidróxido (OH⁻) y de sulfuro de hidrógeno (HS⁻). Es conocido que el HS⁻ juega un papel importante en el pasteado Kraft acelerando la deslignificación al reaccionar con la lignina, mientras que las reacciones carbohidrato se encuentran afectadas principalmente por la alcalinidad (por el OH⁻). Además, el licor blanco contiene pequeñas cantidades de Na₂SO₄, Na₂CO₃, Na₂S₂O₃, NaCl y CaCO₃, junto con otras sales. Las concentraciones de los químicos de cocción activos se expresan convencionalmente como alkali activo (AA: NaOH+Na₂S) y alkali efectivo (AE: NaOH+ ½ Na₂S) (Lehto and Alén, 2014).

Tanto los digestores *batch* como los continuos se emplean en el pasteado Kraft. Por lo general, los tiempos de cocción varían de 1 a 3 horas y las temperaturas de 150°C a 180°C. El efecto total del tiempo y la temperatura de cocción se presenta normalmente a través de un simple valor numérico, el llamado factor H (Vroom 1957). Durante el pasteado Kraft (figura 3.1), la deslignificación se da en tres fases distintas (Dimmel and Gellerstedt, 2010). La primera fase de deslignificación se caracteriza como una “fase de extracción”, durante la cual la selectividad de la deslignificación es bastante baja, resultando la eliminación del 15% al 25% de

la lignina inicial, pero conduciendo simultáneamente a una pérdida de hasta un 40% de las hemicelulosas. A medida que el proceso continúa, la deslignificación se acelera debido al incremento de temperatura. Durante esta segunda fase, la velocidad de deslignificación es controlada por reacciones químicas de primer orden. La velocidad de deslignificación permanece alta durante la etapa de deslignificación hasta que aproximadamente el 90% de la lignina inicial se ha disuelto. La fase final de deslignificación se da lentamente y la pérdida de carbohidratos aumenta significativamente. La selectividad de deslignificación del pasteado Kraft es bastante baja, conduciendo a la degradación de los polisacáridos del material lignocelulósico a bajas temperaturas cuando el material entra en contacto con el licor de cocción. A medida que prosigue el proceso de pasteado, el licor blanco se enriquece gradualmente con un mezcla extremadamente compleja de lignina degradada, productos de degradación de carbohidratos, y cationes y aniones inorgánicos, convirtiéndose finalmente en licor negro (Alén *et al.*, 1984, 1985; Niemelä *et al.*, 1985; Niemelä and Sjöström 1986a, b, 1988; Niemelä 1988a, b,c, 1989, 1990a, b; Sixta *et al.*, 2006; Hellstén *et al.*, 2013; Lehto and Alén, 2014).

Tras el pasteado, el licor negro es separado de la pasta, concentrado al 65-80% (contenido seco en sólidos), y quemado en la caldera para la recuperación de químicos de cocción y producción de energía (Adams, 1997; Vakkilainen, 2008). Tras la combustión, la fracción inorgánica que contiene Na_2CO_3 y Na_2S junto con una cantidad menor de Na_2SO_4 se disuelve en agua para formar el licor verde (Hupa, 1997; Vakkilainen, 2008). El licor verde reacciona con cal (CaO) en la etapa de caustificación. En esta etapa, el Na_2CO_3 se convierte a NaOH , que puede ser empleado de nuevo como licor blanco. El rendimiento de la conversión química y la recuperación es cercano al 90%; por tanto, el licor blanco aún contiene pequeñas cantidades de Na_2CO_3 y otras sales de sodio (Lehto and Alén, 2014).

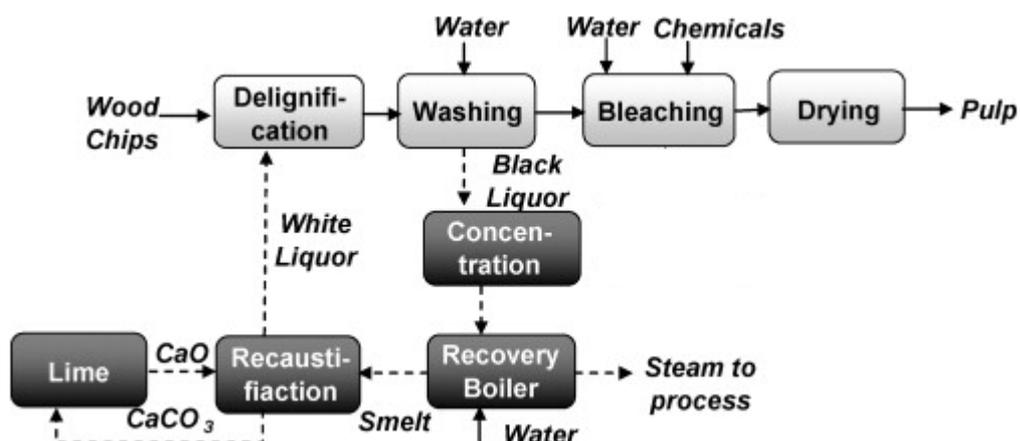


Figura 3.1: Esquema del proceso kraft. Fuente: Mateos-Espejel *et al.*, 2011

3.1.2. PASTEADO A LA SOSA-ANTRAQUINONA

En el proceso Kraft, los compuestos de azufre formados pueden causar problemas de olor a concentraciones extremadamente bajas (Martínez *et al.*, 1997; Bordado and Gomes, 2002, 2003). Los métodos de pasteado alternativo comprenden principalmente procesos alcalinos libres de azufre, normalmente en presencia de algunos catalizadores, tales como el pasteado a la sosa combinado con el catalizador antraquinona (AQ) (Biermann, 1996; Feng *et al.*, 2002; Ban *et al.*, 2009; Prinsen *et al.*, 2013; Ikeda and Magara, 2015). Sin el catalizador, el pasteado alcalino libre de azufre presenta algunas desventajas: cuando el NaOH es el único reactivo químico, el proceso de pasteado es más lento y produce menos pasta y más débil debido a la degradación alcalina de los carbohidratos, a medida que las condiciones de cocción alcalina descompone los hidratos de carbono. El pasteado a la sosa-AQ (figura 3.2) se emplea principalmente para la deslignificación de materiales no madereros, como paja de cereales, residuos agrícolas varios, y plantas anuales (Feng and Alén, 2001; Finell and Nilsson, 2004; Hedjazi *et al.*, 2009). De los materiales madereros, las maderas duras son más adecuadas para el pasteado sosa-AQ que las maderas blandas (Lehto and Alén, 2014).

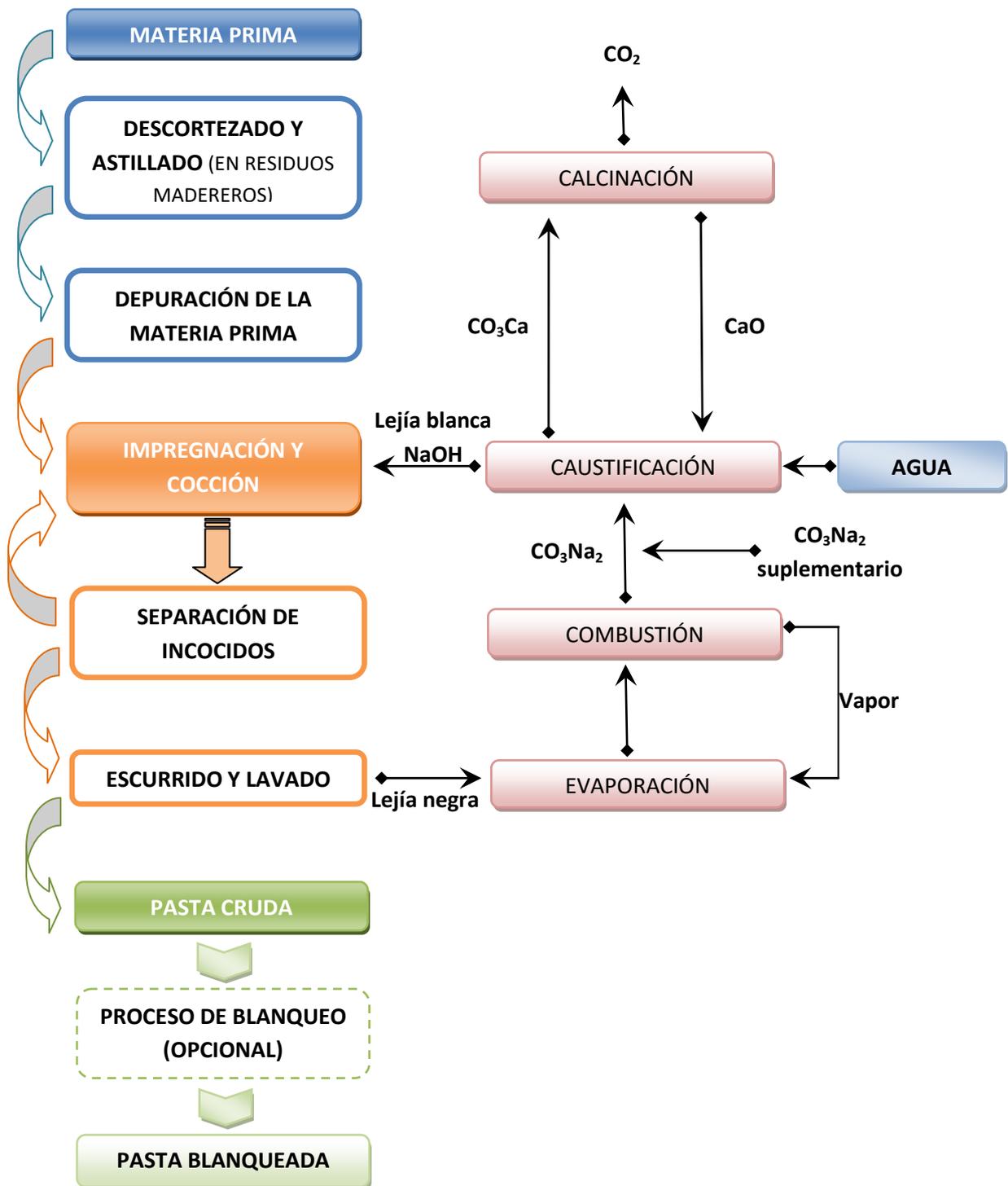


Figura 3.2: Proceso de pasteado a la sosa.

Fuente: Adaptado de Requejo, 2012.

El pasteado a la sosa fue inventado en Inglaterra por Burgess y Watts en 1851. Debido al poco entusiasmo y acogida que tuvo este nuevo proceso, Burgess llevó el método a los Estados Unidos en 1854, comenzando a funcionar la primera fábrica en 1866. Muchas de las primeras fábricas que usaban este método se pasaron al método Kraft cuando fue descubierto (Bierman, 1996).

Como catalizador, la antraquinona (AQ) se puede usar en procesos Kraft, a la sosa, y sulfito alcalino para aumentar la deslignificación y disminuir la degradación de los carbohidratos (Bierman, 1996; Prinsen *et al.*, 2013). Las ventajas generales del uso de la AQ incluyen: aumentos en las velocidades de deslignificación, selectividad mejorada, cargas de álcali reducidas, y propiedades de las pastas mejoradas (Fengel and Wegener, 1989). El uso de la antraquinona se documentó por primera vez en 1977. Posteriormente se han llevado a cabo modificaciones de la AQ, denominada 9,10 dioxoantraceno, como la antraquinona soluble (SAQ), denominada 1,4-dihidro-9,10-dihidroantraceno (Bierman, 1996).

El mecanismo químico del pasteado alcalino con AQ es bien conocido (Dimmel, 1996; Dimmel and Gellerstedt, 2010). La AQ actúa como un catalizador redox, siendo doble su función durante el proceso de pasteado. La AQ reacciona con grupos terminales aldehído (grupos terminales reductores) presentes en las cadenas de carbohidratos y las oxida a ácidos ardónicos estables en álcali con la formación simultánea de antrahidroquinona (AHQ) (Chai *et al.*, 2007). El ciclo catalítico es completado por la lignina que reacciona con AHQ oxidándola de nuevo a AQ (Lundquist *et al.*, 1981; Venica *et al.*, 2008a, b). La reacción entre la lignina y la AHQ induce la escisión de enlaces éter β -aril a través de un intermediario metilenquinona, conduciendo a aductos propensos a la fragmentación bajo condiciones alcalinas. De manera simultánea, con la división de los enlaces éter β -arílicos, la AHQ es regenerada a AQ (figura 3.3). Además de esta etapa de reacción reductora, se han propuesto mecanismos alternativos para el deterioro de la lignina provocada por la AQ. Se ha sugerido que los grupos terminales γ -CH₂OH presentes en las cadenas laterales de la lignina son oxidados por la AQ a grupos terminales γ -CHO, llevando a las cadenas laterales a ser susceptibles a la fragmentación álcali catalizada, incluyendo reacciones reversas aldol y eliminación β . Además, se puede producir alguna degradación de los enlaces C-C (C- α y C- β) (Lehto and Alén, 2014).

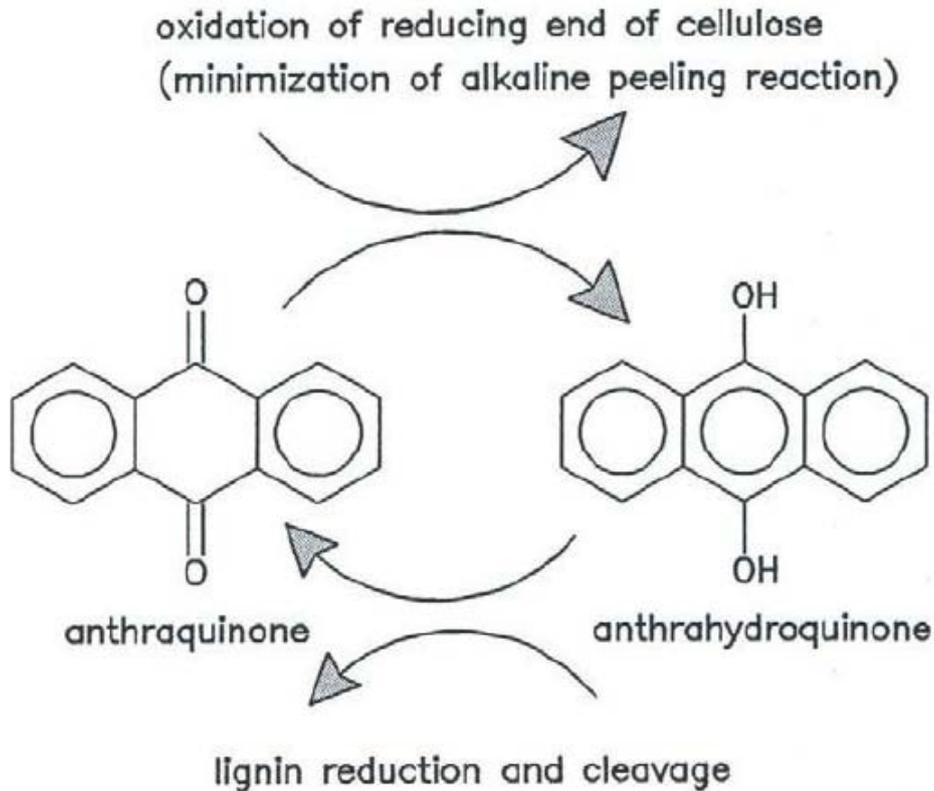


Figura 3.3: Acción cíclica de la antraquinona (AQ).

Fuente: Bierman, 1996.

3.1.3. OTROS MÉTODOS DE PASTEADO QUÍMICO DESTACADOS. PROCESOS DE PASTEADO CON DISOLVENTES ORGÁNICOS

A lo largo de la década de los setenta del pasado siglo, se empezó a pensar cómo solucionar los inconvenientes de los procesos clásicos (olores desagradables, bajos rendimientos, elevada contaminación, pastas difíciles de blanquear, grandes inversiones, elevados consumos de agua, energía, reactivos y materias primas, etc.), modificando los procesos primero, y proponiendo procesos sin azufre después. Sin embargo, se encontraron nuevas dificultades como la difícil recuperación de los reactivos y los problemas de contaminación. En la década de los ochenta, se revisan los procesos que utilizan disolventes orgánicos, como alternativos a los clásicos. La principal ventaja de los procesos con disolventes orgánicos era que aprovechaban íntegramente las materias primas; a veces, se consideraba a estos procesos más que como productores de pastas, productores de celulosa hidrolizable, polímeros fenólicos de lignina y azúcares. En la década de los noventa, el proceso Kraft no tiene competidores dentro de los procesos químicos de pasteado, pero los problemas medioambientales y las elevadas inversiones necesarias llevan a la conclusión de que sería

conveniente buscar nuevos procesos de producción de pastas. Estos pueden ser los procesos que emplean disolventes orgánicos, que además siguen la filosofía actual de que la materia prima no es sólo fuente de fibras celulósicas, sino que se ha de aprovechar íntegramente. Actualmente, la aplicación de cualquier proceso de pastado que utilice disolventes orgánicos implica la obtención de pastas, lignina, azúcares y otros productos, buscando el aprovechamiento integral de las materias primas (figura 3.4).

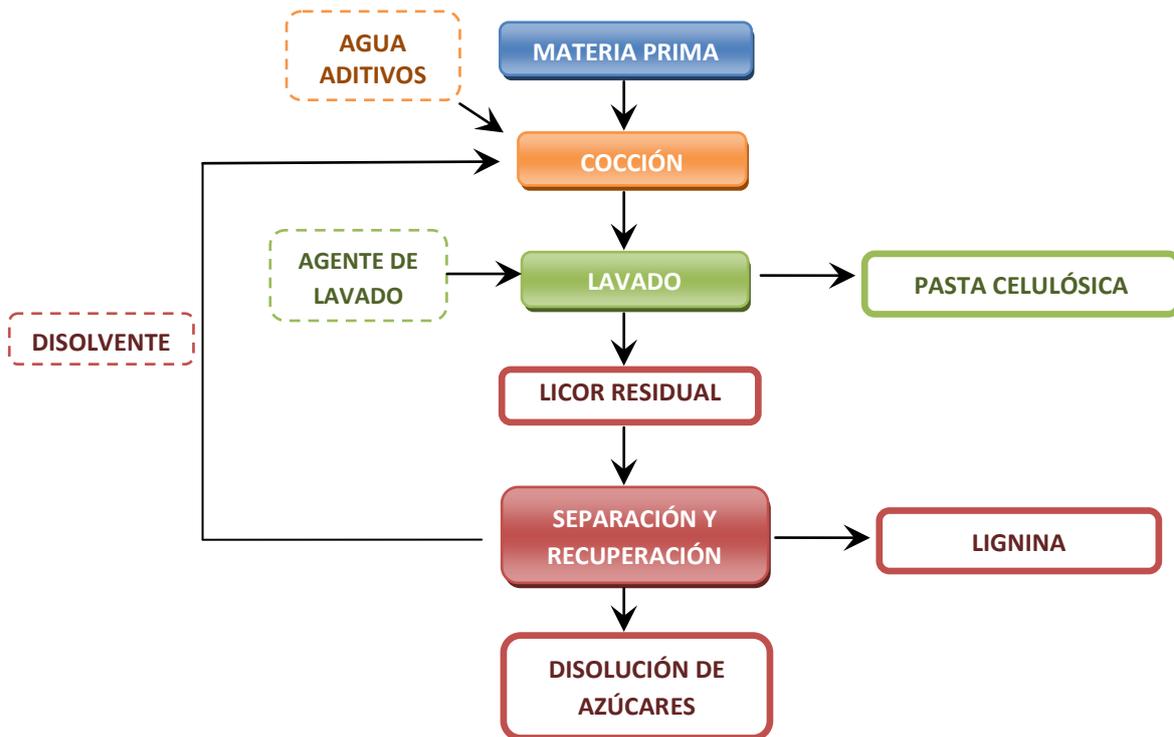


Figura 3.4: Tratamiento de deslignificación mediante disolventes orgánicos.

Fuente: Adaptado de Requejo, 2012.

En la industria papelera se han empleado multitud de disolventes orgánicos puros o en disolución acuosa (metanol, etanol, propanol, butanol, isobutanol, alcohol bencílico, glicerol, glicol, etilenglicol, trietilenglicol, fenol, acetona, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, diozono, diversas aminas, éter, éster, formaldehído, cloroetanol, etc.), y con la adición o no de catalizadores (ácidos, bases y sales), consiguiendo una deslignificación selectiva y una lignina poco alterada químicamente.

Se puede distinguir entre disolventes de bajo punto de ebullición (metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, etc.) fácilmente recuperables por destilación, y los de alto punto de ebullición (trietilenglicol, etilenglicol, etc.), que pueden operar a baja presión, siendo difíciles de recuperar.

3.1.3.1. Pasteado con alcoholes

Los disolventes más utilizados han sido los alcoholes, siendo el etanol uno de los más prometedores, pues combina su alta velocidad de deslignificación en condiciones de operación favorables y su fácil recuperación. Los alcoholes primarios son más selectivos para la deslignificación que los secundarios y terciarios. Los mejores resultados se han obtenido con el etanol. Por otra parte, el metanol produce menos pérdidas de hemicelulosas que el butanol.

Entre los catalizadores se encuentran los ácidos minerales (clorhídrico, sulfúrico, bromhídrico, etc.) y orgánicos (fórmico, acético, propiónico, oxálico, málico, salicílico, succínico, benzoico, cítrico, etc.), las sales (cloruro aluminico, fluoruro bórico, cloruros, sulfatos y nitratos de calcio y magnesio, sulfitos, sulfuros, etc.) y otros productos (álcalis, amoníaco, antraquinona, etc).

3.1.3.1.1. Procesos en medio ácido

Los procesos de deslignificación con alcoholes en medio ácido están entre los procesos organosolv más estudiados debido a la simplicidad de su sistema de recuperación de reactivos y a la posibilidad de una fácil recuperación de subproductos.

En los procesos denominados autocatalizados, el medio ácido se consigue por la generación del ácido acético y el ácido fórmico a partir de los grupos ácidos presentes en la materia prima. En medio ácido la deslignificación transcurre mediante la rotura de los enlaces entre la lignina y los polisacáridos y entre los monómeros de la lignina.

 **Proceso ALCELL:** dentro de los procesos autocatalizados se encuentra el proceso ALCELL, cuyo nombre procede de la contracción de las palabras inglesas ALcohol y CELLulose. Este proceso emplea disoluciones acuosas de etanol (50% en volumen) como agente de deslignificación. Es un proceso autocatalizado por la aparición de ácido acético que proviene de las hemicelulosas, que se ioniza liberando iones hidronio. Éstos actúan despolimerizando la lignina por reacciones de hidrólisis. De los procesos catalizados por ácidos destaca el proceso *Batelle-Geneve*, que utiliza mezclas de fenol y agua.

3.1.3.1.2. Procesos en medio alcalino

Los procesos organosolv en medio alcohólicos alcalino se pueden considerar como una modificación de los procesos alcalinos convencionales (sosa, Kraft, y proceso al sulfito). La presencia de un disolvente orgánico en el medio de cocción contribuye a aumentar la solubilidad de la lignina y la difusión de los fragmentos de lignina solubilizada. En comparación con los procesos organosolv en medio ácido, los procesos alcalinos permiten tratar tanto maderas de resinosas como maderas de frondosas, pero el sistema de recuperación de reactivos es más complejo. Comparando estos procesos en medio alcalino con los que se llevan a cabo en medio ácido, el rendimiento en pasta es mayor en los alcalinos, pero inferior a las pastas Kraft. Destacan (Vila, 2005):

- ✚ **Proceso ORGANOCELL:** se utiliza como medio para la deslignificación con metanol, agua, NaOH y antraquinona. Es un proceso en dos etapas: la primera con metanol-agua y la segunda con metanol-agua-sosa. Se obtienen rendimientos aceptables de entre un 45-50% (Shatalov and Pereira, 2005) y es aplicable a multitud de materias primas. El inconveniente más importante es que resulta difícil trabajar con metanol a altas presiones, y la recuperación del disolvente se ve dificultada por la presencia de NaOH.

- ✚ **Proceso ASAM:** *Alkali-Sulfite-Anthraquinone-Methanol*. Es una variante del proceso al sulfito alcalino que incorpora aproximadamente un 25% de metanol a los licores de cocción. Resulta posible la recuperación de disolventes y reactivos mediante destilación tras la combustión de los licores empleados en la cocción. Presenta ventajas como la flexibilidad en cuanto al tipo de materia prima, elevada selectividad y susceptibilidad de las pastas al blanqueo TCF (*Totally Chlorine Free*).

- ✚ **Proceso ASAE:** *Alkali-Sulfite-Anthraquinone-Ethanol*. Emplea mezclas de álcali, Na_2SO_3 , antraquinona y etanol (Sarkanen, 1990).

3.1.3.2. Pasteado con ácidos orgánicos

Los procesos organosolv en medio ácido orgánico más estudiados son los que se basan en la utilización de disoluciones concentradas de ácidos de cadena corta como el ácido acético o el ácido fórmico como medios de deslignificación, con o sin adición de catalizadores. Entre estos destacan (Vila, 2005):

- ✚ **Proceso ACETOSOLV:** utiliza disoluciones de ácido acético (en concentraciones del 75 al 95% en peso) y pequeñas concentraciones de HCl (usualmente entre el 0,2 y el 0,5% en peso). Presenta la ventaja de poder emplearse en diferentes materias primas como maderas frondosas, maderas coníferas y materiales no leñosos. Como inconveniente cabe destacar que es un medio corrosivo por lo que es necesario emplear materiales o recubrimientos especiales.

- ✚ **Proceso MILOX:** se basa en la utilización de disoluciones concentradas de ácido fórmico en presencia de peróxido de hidrógeno. El tratamiento se lleva a cabo normalmente en tres etapas consecutivas. En la primera, el material lignocelulósico se mezcla con una disolución acuosa de ácido fórmico y H₂O₂, generándose *in situ* ácido peroxifórmico. En la segunda etapa se emplea el mismo medio de reacción que en la primera, pero aumentando la temperatura. En esta etapa, el ácido peroxifórmico se descompone produciendo ácido fórmico. En la tercera etapa, la fase sólida deslignificada procedente de la segunda etapa reacciona con un nuevo medio conteniendo ácido fórmico al 80% y peróxido de hidrógeno. La mayor desventaja que presenta es la recuperación del disolvente, que supone un gasto considerable energético que se complica por la formación de azeótropos (un azeótropo binario entre el ácido fórmico y el agua, y un azeótropo ternario entre el agua, el ácido fórmico y el ácido acético obtenido como subproducto durante la reacción de deslignificación).

- ✚ **Proceso ACETOCELL:** se basa en el empleo de mezclas de ácido acético y agua a temperaturas del orden de los 200°C en ausencia de catalizador para evitar problemas de corrosión.

- ✚ **Proceso FORMACELL:** este proceso se lleva a cabo en medios que contienen 90-95% de ácido acético y 5-10% de ácido fórmico. Está estrechamente ligado al proceso Acetosolv, respecto al cual permite limitar la corrosión y facilitar el blanqueo. El proceso Formacell destaca por el grado de deslignificación alcanzable, mediante el cual se obtiene una pasta con buenas propiedades mecánicas y altos rendimientos. Al igual que en el proceso Acetosolv y Milox, la lignina obtenida mediante el proceso Formacell se puede utilizar para aplicaciones con alto valor añadido (Benar *et al.*, 1998; Gonçalves and Benar, 2001).

3.2. FABRICACIÓN DE PAPEL Y ENVASES SOSTENIBLES

El papel, que se define como una hoja constituida por fibras vegetales de origen natural, afieltradas y entrelazadas, ha sido muy valorado por todas las civilizaciones. Los primeros datos del uso del papel como soporte para la escritura se sitúan en el antiguo Egipto donde se utilizaban láminas entrecruzadas y prensadas de una especie de caña denominada *Papyrus*, aunque fueron los chinos los que en el año 105 a.C. fabricaron el primer papel hecho con pasta celulósica procedente de vegetales (Sánchez, 2010). En su composición entraban fibras de bambú, de corteza de madera, de cáñamo y de otros vegetales, que, previo blanqueo por cocción con alguna lejía, se maceraban en agua, siendo luego vertidas en un cedazo de filamentos de bambú, delgados como hilos. Sobre estos cedazos se formaban unas hojas que, una vez secadas al sol o al calor de una estufa, se pulían con una piedra suave, dando lugar a un papel ligero, blanco, liso y resistente, muy apto para su uso como soporte de escritura (López *et al.*, 2005). En España, el papel fue introducido por los árabes e importado a Europa.

La fabricación de papel implica dos etapas principales:

- 1ª) **Obtención de pastas celulósicas** (desarrollado en los puntos anteriores).
- 2ª) **Formación de hojas de papel.** En esta etapa, la pasta, tratada convenientemente para desarrollar algunas propiedades características, se somete a operaciones que tienen por finalidad extenderla en forma de láminas y eliminar la mayor parte de su humedad. Esencialmente, se provoca un entrecruzamiento de las fibras celulósicas, de forma que, por la superposición de varias capas, se consiga el espesor de lámina deseado. En la industria, esta operación se realiza en las “máquinas de papel” en diferentes etapas (figura 3.5) (*SCA publication papers*):
 - a) **Caja de admisión:** aquí la pasta se compone de un 99% de agua y materiales de proceso y de un 1% de fibra. Se necesita este volumen de agua para evitar la floculación, es decir, la tendencia de las fibras a aglutinarse. La caja de admisión distribuye un flujo controlado y regular de pasta a la siguiente parte de la máquina para empezar a formar la hoja de papel.
 - b) **Máquina de papel plana o de doble tela:** la suspensión de pasta se traslada de la caja de admisión a la sección de tela mediante un flujo controlado y constante. La tela es una malla con finos orificios en la que se inicia el proceso de drenaje de la suspensión, que permite que las fibras formen una alfombrilla entretejida. La mayoría de las fibras se orientan en el sentido de desplazamiento de la tela, lo que origina un papel con una mayor resistencia en la dirección de la máquina respecto a

su sentido transversal. Con el fin de evitar un papel con dos caras distintas, una segunda tela procesa la parte superior de la suspensión en su desplazamiento sobre la tela inferior. El uso de chapas de turbulencia y cajas de aspiración posibilita el drenaje del lado superior de la suspensión, uniformizando así la distribución de fibras finas y disminuyendo la diferencia entre las caras. Entre los últimos avances en tecnología papelera se incluye la producción de **sistemas *Gap Former***, utilizados en máquinas de papel de alta velocidad. Esta tecnología extrae la pasta suspendida de la caja de admisión y la inyecta mediante boquillas individuales en todo el ancho de la máquina de papel, directamente entre las dos telas. Ello permite el drenaje simultáneo de ambos lados, propiciando una estructura más uniforme en la formación de la hoja.

- c) **Sección de prensado:** la hoja de papel, todavía con un alto contenido en agua, atraviesa una serie de grandes rodillos de acero que la comprimen, expulsando así una mayor cantidad de agua. La hoja de papel se sujeta a modo de “sandwich” entre capas de fieltro absorbente al pasar por entre los rodillos. El fieltro actúa como un papel secante en la absorción de agua, mientras que unas cajas de vacío extraen el agua de los fieltros antes de volver a encontrarse con la hoja de papel. Al final de la sección de prensado, el grado de sequedad se sitúa sobre el 40-50%. La hoja de papel ya puede sostenerse por sí misma.
- d) **Sección de secado:** esta sección consta de una serie de cilindros calentados mediante vapor sobre los que pasa la hoja de papel. Los cilindros se disponen de modo que contactan primero con un lado del papel y luego con el otro para garantizar su homogénea deshidratación. Al final, el grado de sequedad es del 90-95%, dependiendo del tipo de producto elaborado.
- e) **Estucado:** en la producción de papel que requiera una mayor calidad y blancura, durabilidad prolongada e imprimabilidad superior, se puede añadir una capa de estuco al papel base producido. La capa de estuco se compone principalmente de caolín (arcilla) y carbonato cálcico (CaCO_3).
- f) **Satinado:** el papel se satina para proporcionarle su acabado final. La función de la calandra consiste en corregir las pequeñas anomalías en la estructura del papel y aportar a éste el acabado final. En el papel estucado, la calandra pule la superficie estucada para proveer suavidad y un brillo de acabado conforme a la especificación requerida.

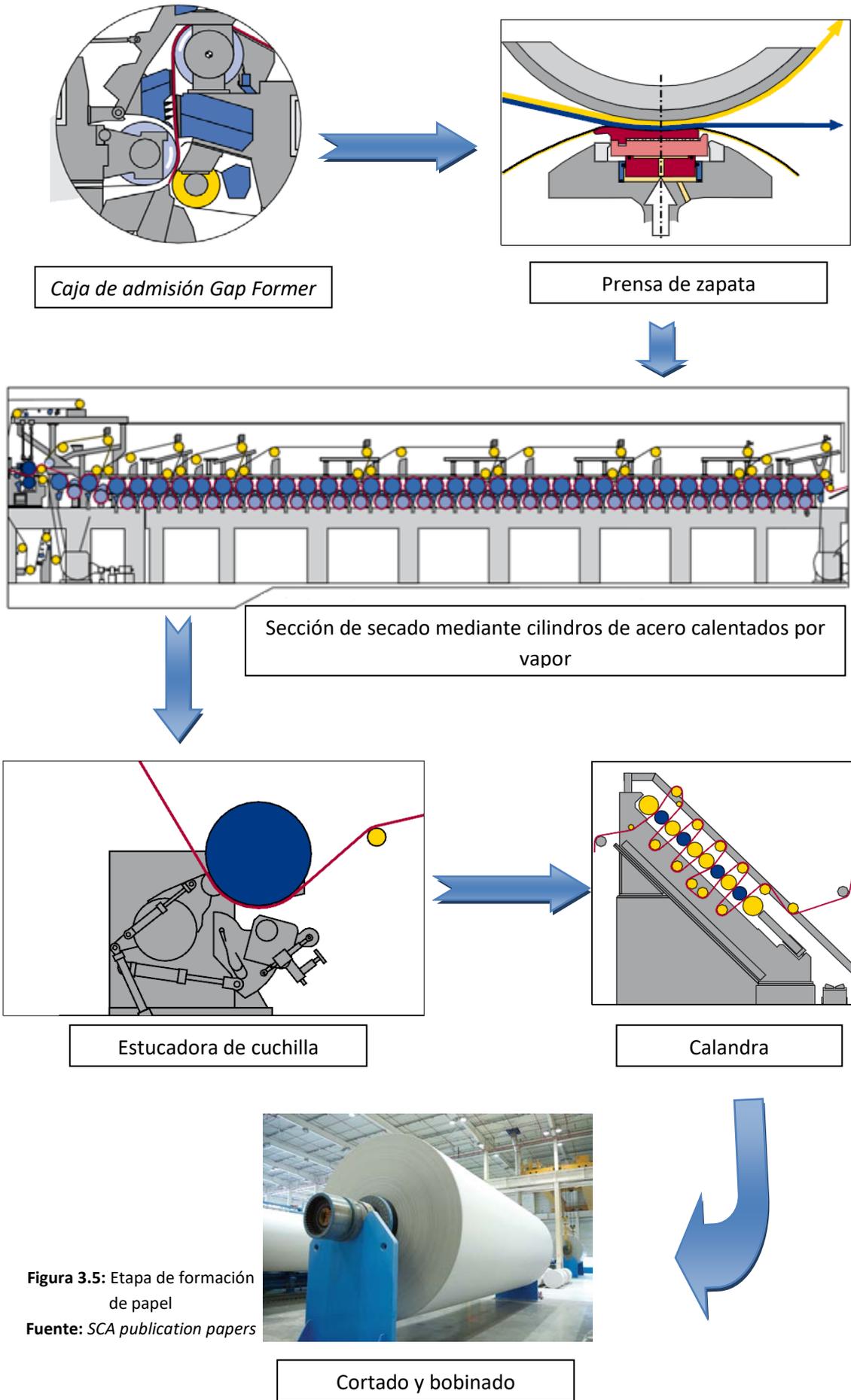


Figura 3.5: Etapa de formación de papel

Fuente: SCA publication papers

Tradicionalmente, las fibras celulósicas empleadas en la fabricación del papel y cartón se obtenían a partir de materias primas no madereras como lino, algodón y paja de cereales, y no fue hasta la invención de la imprenta cuando las necesidades de producción de papel aumentaron en tal proporción que hicieron necesaria la búsqueda de nuevas materias primas, como las especies madereras (coníferas y frondosas).

Los 5,7 millones de m³ de madera que la industria española de la celulosa y el papel utilizó en 2014 como materia prima proceden en un 78% de plantaciones locales de pino y eucalipto, que ocupan 420.580 hectáreas, el 2,3% de la superficie total arbolada de nuestro país. El resto de la madera es importada procediendo asimismo de plantaciones de esas mismas especies. Las importaciones de madera para papel son fundamentalmente de eucalipto, mientras la casi totalidad de la madera de pino es de procedencia nacional. A lo largo del periodo 2011-2014, el consumo de madera nacional se ha situado en torno al 80%, diez puntos porcentuales por encima de los datos registrados en los años anteriores. Según la FAO, las mayores áreas forestales de Europa corresponden a Rusia, Suecia, Finlandia, España y Francia (Aspapel, 2015). En 2014, España produjo 1,98 millones de toneladas (Mt) de pasta celulósica a partir de madera, siendo los mayores productores del mundo, EEUU, con 47 Mt, seguido por Canadá, Brasil, Suecia y Finlandia (FAOSTAT, 2016).

Sin embargo, en los últimos años se está recuperando el uso de antiguas materias primas (paja de cereales, algodón, etc.). El uso de estas materias primas no madereras o alternativas presentan varias ventajas con respecto al empleo de las materias primas convencionales:

- ✚ Permiten sustituir las especies madereras, disminuyendo la deforestación.
- ✚ Se disminuyen las importaciones de madera o pastas celulósicas en países con déficit de materias primas madereras, lo que supondría un beneficio para su economía.
- ✚ Se produce una revalorización de los productos agroalimentarios, ya que sus residuos pueden considerarse como subproductos al utilizarse para la producción de fibras de celulosa.
- ✚ Se evita la contaminación del suelo evitando la generación de plagas, y del aire por la quema incontrolada de los residuos generados procedentes de los productos agrícolas.

En la Unión Europea se siembran unas 58 Mha, con una producción superior a los 300 Mt. Según las últimas previsiones de la Comisión Europea de diciembre de 2015, la producción

comunitaria de cereales alcanzará los 307,7 Mt en la campaña de comercialización 2015/2016. De esta cifra global, 149,2 Mt corresponden a trigo blando, 60,9 Mt a cebada y 56,6 Mt a maíz. En base a dichas previsiones, España pasaría a ser el 5º productor comunitario, con 18,8 Mt, adelantando a Rumanía (16,7 Mt) y por detrás de Francia (71,6 Mt), Alemania (48,3 Mt), Polonia (29,9 Mt) y Reino Unido (24,4 Mt) (MAGRAMA, 2016).

En particular, en el año 2014, la producción de cebada (*Hordeum vulgare*) en el mundo fue de 144 millones de toneladas, de las cuales el 59,9% se produjo en Europa (figura 3.6). De ellas, 10 millones de toneladas se produjeron en España, lo que supone un 12% del total de producción de Europa. En el mismo año, España estaba situada a la cabeza de los productores de este cereal en el mundo, ocupando el quinto lugar por detrás de Rusia, Alemania, Francia y Canadá (figura 3.7). Además, es la materia prima más producida en España seguida por trigo, maíz, aceituna y remolacha. Considerando una ratio de hasta 0,53 kg paja/kg cereal (Larsen *et al.*, 2012), la cantidad de residuo agrícola que se puede aprovechar para la producción de papel es importante. Existen estudios que consideran este índice de residuo aún mayor, de hasta 1,3 kg residuo/kg de producto (Callejo *et al.*, 2008).

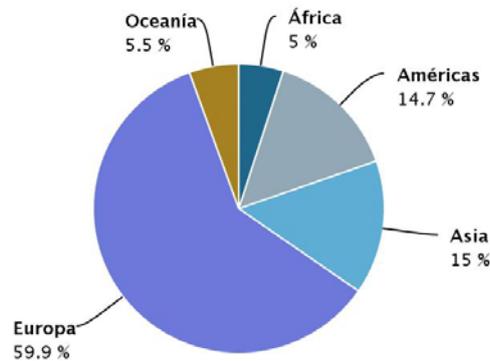


Figura 3.6: Proporción de producción de cebada por región (2013).

Fuente: FAOSTAT, 2016.

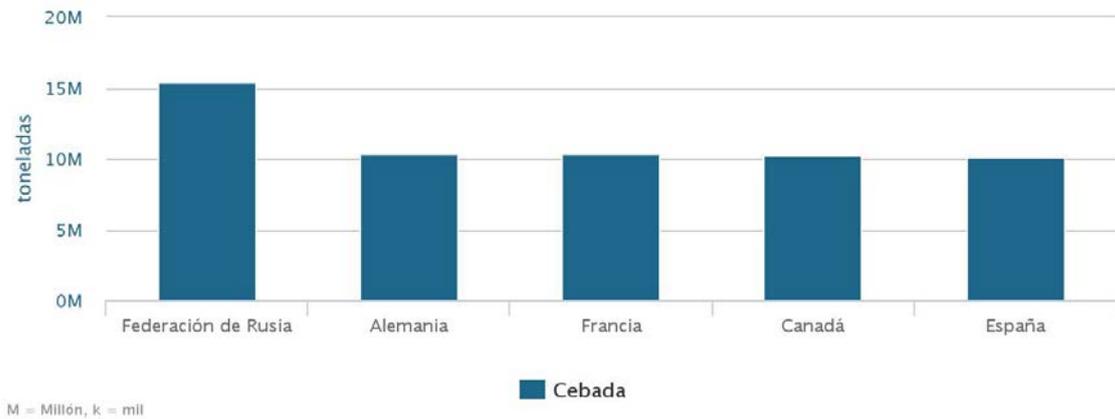


Figura 3.7: Producción cebada (cereal) de los cinco principales productores en el mundo (2013).

Fuente: FAOSTAT, 2016.

Según los últimos datos disponibles del Censo Agrario 2009 (Instituto Nacional de Estadística-INE), en España se contabilizan 390.386 explotaciones de cereales, con un tamaño medio de 15,82 hectáreas. La mayor parte de las explotaciones y de la superficie se encuentran en Castilla y León (26,3% de las explotaciones totales y 32% de la superficie total), Castilla La Mancha (16,33% y 22,23%), Andalucía (11% y 11,6%) y Aragón (10,76% y 13,23%). En la figura 3.8 se observa la distribución de la superficie (ha) de cereales por comunidades autónomas para la campaña 2015/2016.

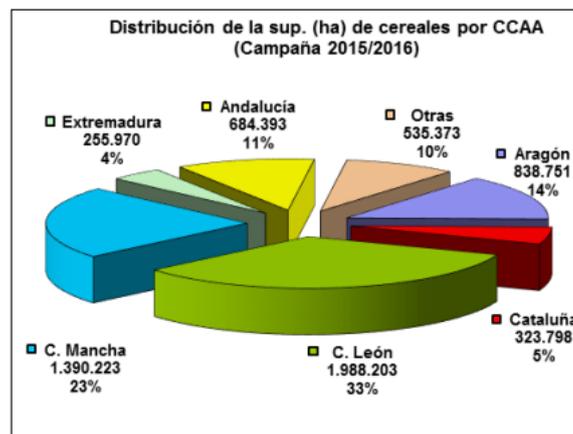


Figura 3.8: Distribución de la superficie en España por Comunidades Autónomas.

Fuente: MAGRAMA, 2016

En cuanto a la producción de avena (cereal), según la FAO, en el año 2014, Europa produjo el 64,1% de la totalidad mundial de este cereal, seguido por América, Oceanía, Asia y África, siendo Rusia occidental el mayor productor de Europa (figura 3.9).

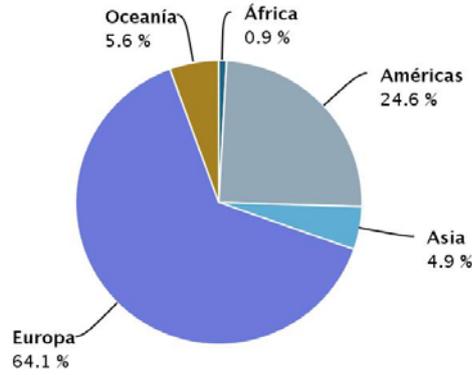


Figura 3.9: Proporción de producción por continente.

Fuente: FAOSTAT, 2016.

En bibliografía se encuentran rangos en el índice de residuo (kg/kg) para este cereal que va desde 0,57 (FAOSTAT) hasta 1,30 (CIEMAT).

De acuerdo a las estadísticas más recientes de la FAO, el continente situado a la cabeza productor de pasta celulósica a partir de otras fibras, principalmente fibras no madereras, en el año 2014 fue Asia, con un 79,8% de la producción total mundial, seguido por Europa, 13,1%, América, 5,5% y África, 1,6%. Como se observa en la figura 3.10, China es el principal productor del mundo, con 7,5 M toneladas; seguido por India, con 2 M toneladas; España, con 900 mil toneladas y Rusia, con 400 mil toneladas.

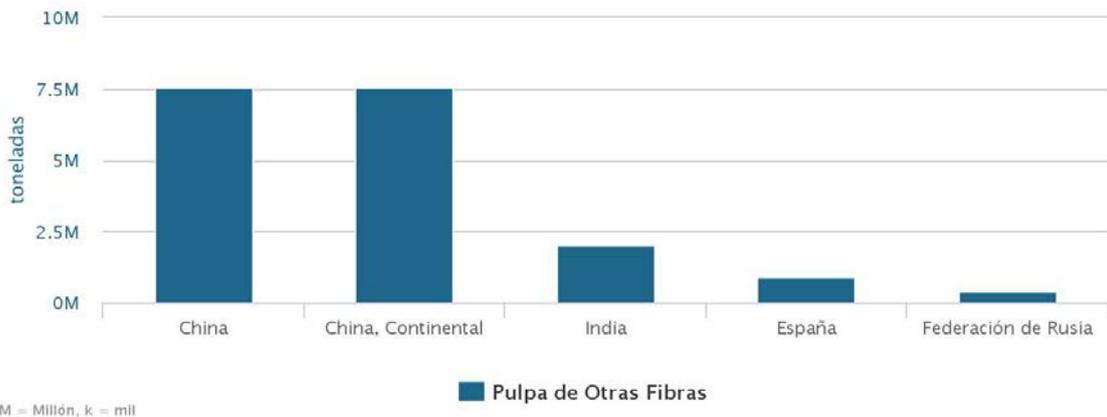


Figura 3.10: Los cinco principales productores de pasta celulósica a partir de otras fibras en el mundo.

Fuente: FAOSTAT, 2016.

El empleo de estas materias primas no madereras, por tanto, puede ser dirigido a la obtención tanto de papel como de envases sostenibles para la alimentación, clínicos, *packaging* industrial, etc. (figura 3.11), a través del proceso Specel® (figura 3.12), el cual se encuadra dentro de los procesos continuos de producción de pasta semiquímica. Emplea como único reactivo hidróxido sódico, en condiciones suaves de temperatura (100°C) y presión (atmosférica). Mediante este proceso se obtiene pasta de alta calidad. Además presenta alta simplicidad de instalación y operación. Existen varias plantas que emplean este proceso en Fredericia (Dinamarca), Cuba 9 en Quivican, Papelera Jatibonico, BIVIS en el centro de investigación de la Universidad de Grenoble y Ancesi Cimu Touglis en París, S.P.E S.L. (*Straw Pulping Engineering S.L.*), en Aragón (España), entre otras.



Figura 3.11: Envases sostenibles.

Fuente: Ecopapel.

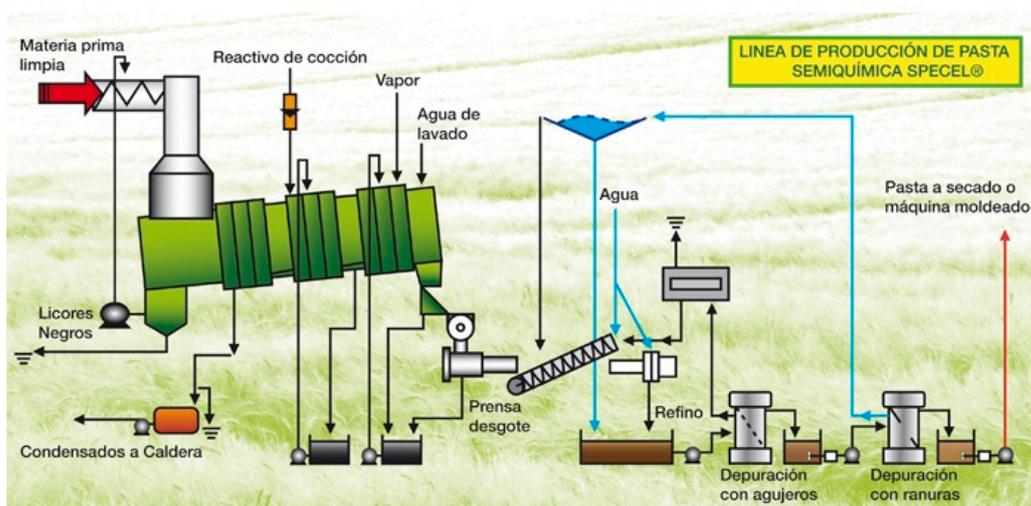


Figura 3.12: Esquema del proceso Specel.

Fuente: Ecopapel.

3.2.1. AGUAS RESIDUALES EN LA INDUSTRIA DEL PAPEL

Las aguas residuales de las fábricas de papel contienen, además de los restos de los materiales lignocelulósicos, sustancias tales como productos químicos de destintado, agentes blanqueadores, productos químicos del proceso de elaboración y aditivos. Estas sustancias se caracterizan por su alta demanda química de oxígeno (DQO) y se procesan, en su gran mayoría, en instalaciones propias de cada establecimiento fabril o en plantas purificadoras locales, primero en forma químico-mecánica y luego de manera completamente biológica.

En el proceso de fabricación de papel, el agua sirve de medio de desintegración de la materia prima, transporte de las fibras y formación del papel. Durante este proceso se consume un elevado volumen de agua. Como resultado, los efluentes generados contienen una elevada contaminación debida a más de 250 compuestos diferentes. Algunos son de origen natural, procedentes del material lignocelulósico (lignina, taninos, etc.), pero otros son sintéticos, incorporados al efluentes en los procesos de fabricación y blanqueo de las pastas de celulosa, como es el caso de fenoles, dioxinas y furanos.

Para evitar el impacto ambiental que supondría el vertido directo de estos efluentes al medio ambiente, existen dos estrategias opuestas: Tratamiento de las aguas sin reutilización (ciclo abierto) y el tratamiento mediante un sistema de vertido cero (ciclo cerrado).

- ✚ **Ciclo abierto:** el objetivo es la reducción de la contaminación de los efluentes en grado suficiente para que puedan ser vertidos cumpliendo la normativa y así evitar cualquier impacto ambiental. Los efluentes a tratar incorporan valores extremos de pH, elevado contenido de materia orgánica, sólidos en suspensión, compuestos organohalogenados (AOX), nitrógeno y fósforo, entre otros contaminantes. Un tratamiento satisfactorio de los efluentes comprendería etapas como una homogeneización y neutralización del pH, una coagulación-floculación previa a una decantación y, finalmente, la eliminación de la materia orgánica mediante un proceso biológico (anaerobio o aerobio) o mediante una oxidación avanzada (con ozono). Posteriormente a todas estas etapas, el efluente podría ser vertido al medio ambiente.
- ✚ **Ciclo cerrado:** se trata de un sistema de gestión ambiental que persigue el menor impacto ambiental del proceso en su conjunto. Así, se minimiza tanto la generación de vertidos líquidos como el consumo de agua potable mediante la reutilización del agua

recuperada de los efluentes. Inicialmente, es necesaria una etapa de homogeneización y neutralización de pH y una decantación para sedimentar los sólidos en suspensión de mayor partícula. A continuación, el tratamiento sigue con una oxidación avanzada para destruir las moléculas orgánicas de gran tamaño y que pueden ser refractarias en un posterior proceso biológico; un tratamiento anaerobio, en el que se reduzca el contenido de materia orgánica disuelta en el líquido a la vez que se genera biogás y una filtración del efluente de la digestión, primero mediante filtros de arena y posteriormente con membranas de ultrafiltración. Finalmente, un proceso de ósmosis inversa. El permeado obtenido tiene la calidad necesaria para poder ser utilizado dentro del proceso de fabricación de papel, mientras que los rechazos se tratan mediante un proceso de evaporación al vacío para reducir todo lo posible su volumen. El agua recuperada en la evaporación también puede ser reutilizada mientras que el concentrado, un volumen mínimo, se debe gestionar como residuo. Los lodos generados en el proceso de digestión anaerobia, conjuntamente con residuos vegetales se pueden quemar en una caldera, y tanto el calor producido en la caldera como el generado en el aprovechamiento del biogás, sirven para satisfacer los requerimientos energéticos del evaporador al vacío. Así, de este modo, se recupera la mayor parte del agua utilizada en el proceso, se genera una cantidad mínima de residuo a gestionar externamente, energéticamente se producen grandes sinergias entre diferentes procesos, por lo que a nivel global, se dispone de un sistema de gestión ambiental muy sostenible (Condorchem, 2016).

3.2.2. EMISIONES A LA ATMÓSFERA

Las principales emisiones contaminantes de este tipo de procesos son las de CO₂, CO, NO_x, SO₂, COVNM y partículas procedentes de los procesos de combustión para generar calor y vapor, así como las emisiones de compuestos de cloro y COVNM procedentes de los fenómenos químicos que tienen lugar en los distintos procesos.

Otra fuente de contaminación incluida en este apartado son los fuertes olores producidos en las industrias de producción de pastas Kraft, ya que el olfato es muy sensible a los compuestos azufrados tales como los mercaptanos; si bien, mediante nuevas tecnologías se ha logrado solucionar en gran medida este problema, ya que la emisión de estos compuestos se reduce a valores inapreciables instalando sistemas que capturan e incineran estos gases (hornos especiales o calderas) (Requejo, 2012).

3.3. BIBLIOGRAFÍA

- Adams T. N. **1997**. General characteristics of kraft black liquor recovery boilers, in Kraft recovery boilers, Adams T. N. (ed.), TAPPI Press, Atlanta, GA, USA. Pp. 3-38.
- Alén R. Lahtela M., Niemelä K. and Sjöström E. **1985**. Formation of hydroxycarboxylic acids from softwood polysaccharides during alkaline pulping. *Holzforschung* 39 (4), 235-238. DOI: 10.1515/hfsg.1985.39.4.235.
- Alén R., Niemelä K. and Sjöström E. **1984**. Gas-liquid chromatographic separation of hydroxy monocarboxylic acids and dicarboxylic acids on a fused-silica capillary column. *J Chromatogr* 301, 273-276. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)89197-4.
- Alén R. **2000**. Basic chemistry of wood delignification, in Forest products chemistry, Stenius P. (ed.), Series: Papermaking Science and Technology, book 3, Fapet Oy, Helsinki, Finland. Pp. 58-104.
- Aspapel. **2015**. Memoria de sostenibilidad (www.aspapel.es/sostenibilidad/memoria).
- Ban W., Liu Q., Guo J., Mao H. and Lucia L. A. **2009**. A study of anthraquinone-fortified green liquor pretreatments of loblolly pine chips. *Holzforschung* 63 (3), 272-277. DOI: 10.1515/HF.2009.055.
- Benar P., Gonçalves A. R., Mandelli D. and Schuchardt U. **1998**. Eucalyptus organosolv lignins: study of the hydroxymethylation and use in resols. *Bioresource Technol* 68, 11-16. DOI: 10.1016/S0960-8524(98)00076-5.
- Biermann C. J. **1996**. Handbook of Pulping and Papermaking, Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Bordado J. C. M. and Gomes J. F. P. **2002**. Atmospheric emissions of kraft pulp mills. *Chem Eng Proc* 41 (8), 667-671. DOI: 10.1016/S0255-2701(01)00184-2.
- Bordado J. C. M. and Gomes J. F. P. **2003**. Emission and odour control in kraft pulp mills. *J Clean Prod* 11 (7), 797-801. DOI: 10.1016/S0959-6526(02)00101-4.
- Callejo López J. A., de Santa Marta León Cívico F., Montilla León V. M., Sanz Pagés A., Parra Heras T. y Cáceres Clavero F. **2008**. Potencial energético de la biomasa residual agrícola y ganadera en Andalucía. Secretaría general de agricultura, ganadería y desarrollo rural. Junta de Andalucía. SE-3339-2008.

Chai X. S., Samp J., Hou Q. X., yoon S. H. and Zhu J. Y. **2007**. Possible mechanisms for anthraquinone species diffusion in alkaline pulping. *Ind Eng Chem Res* 46 (15), 5245-5249. DOI: 10.1021/ie0615741.

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT). Ministerio de Educación y Ciencia.

Condorchem envitech. www.condorchem.com. Last accessed: May, 2016.

Dimmel D. **1996**. Pulping with Anthraquinone: Fundamental Chemistry, IPST Technical paper Series Number 626, Institute of Paper Science and Technology, Atlanta, GA, USA.

Dimmel D. and Gellerstedt G. **2010**. Chemistry of alkaline pulping, in: Lignin and Lignans-Advances in Chemistry, Heitner C., Dimmel D. and Schmidt J. (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Pp 350-391.

Ecopapel. www.ecopapel.es. Last accessed: December, 2016.

Feng Z. and Alén R. **2001**. Soda-AQ pulping of reed canary grass. *Ind Crop Prod* 14 (1), 31-39. DOI: 10.1016/S0926-6690(00)00086-8.

Feng Z., Alén R. and Niemelä K. **2002**. Formation of aliphatic carboxylic acids during soda-AQ pulping of kenaf bark. *Holzforschung* 56 (4), 388-397. DOI: 10.1515/HF.2002.061.

Fengel D. and Wegener G. **1989**. Wood- Chemistry, Ultrastructure, Reactions, Walter de Gruyter, Berlin, Germany.

Finel M. and Nilsson C. **2004**. Kraft and soda-AQ pulping of dry fractionated reed canary grass. *Ind Crop Prod* 19 (2), 155-165. DOI: 10.1016/j.indcrop.2003.09.002.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT). **2016** (www.fao.org).

Gellerstedt G. **2001**. Pulping chemistry, in Wood and cellulosic chemistry. Hon D. and Shiraishi N. (eds.), 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA. Pp. 859-905.

Gonçalves A. R. and Benar P. **2001**. Hydroxymethylation and oxidation of organosolv lignins and utilization of the products. *Bioresource Technol* 79, 103-111.

Hedjazi S., Kordsachia O., Patt R., Latibari A. J. and Tschirner U. **2009**. Alkaline sulfite-anthraquinone (AS/AQ) pulping of wheat Straw and totally chlorine free (TCF) bleaching of pulps. *Ind Crop Prod* 29 (1), 27-36. DOI: 10.1016/j.indcrop.2008.03.013.

- Hellstén S., Lahti J., Heinonen J., Kallioinen M., Mänttari M. and Sainio T. **2013**. Purification process for recovering hydroxy acids from soda black liquor. *Chem Eng Res Des* 91(12), 2765-2774. DOI: 10.1016/j.cherd.2013.06.001.
- Hupa M. **1997**. Recovery boiler chemistry, in *Kraft recovery boilers*, Adams T. N. (ed.), TAPPI Press, Danvers, MA, USA. Pp. 39-60.
- Ikeda T. and Magara K. **2015**. Chemical properties of softwood soda-anthraquinone lignin. *J Wood Chem Technol* 35 (3), 167-177. DOI: 10.1080/02773813.2014.905605.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). Censo Agrario 2009. www.ine.es
- Lapierre C. **2010**. Determining lignin structure by chemical degradations, in *Lignin and Lignans, Advances in Chemistry*, Heitner C., Dimmel D. R and Schmidt J. A. (eds.), Boca Raton, FL, USA. Pp. 11-42.
- Larsen U.S., Bruun S., Lindedam J. **2012**. Straw yield and saccharification potential for ethanol in cereal species and wheat cultivars. *Biomass Bioenerg* 45, 239-250. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.06.012.
- Lehto J. T. and Alén R. J. **2014**. Chemical pretreatments of Wood chips prior to alkaline pulping- A review of pretreatment alternatives, chemical aspects of the resulting liquors, and pulping outcomes. *BioResources* 10 (4), 8604-8656.
- López F., Alaejos J. y Jiménez L. **2005**. Materias primas, en *Pastas celulósicas de materias primas alternativas a las convencionales*. Pp 25. Editorial Gráfica Sol. Sevilla.
- Lundquist K., Simonson R. and Tingsvik K. **1981**. Investigation of lignins from soda and soda/anthraquinone cooking of spruce Wood. *Pap Puu* 63 (11), 709-712.
- Martínez J. M., Reguant J., Salvadó J. and Farriol X. **1997**. Soda-anthraquinone pulping of a softwood mixture: Applying a pseudo-kinetic severity parameter. *Bioresource Technol* 60 (2), 161-167. DOI: 10.1016/s0960-8524(97)00010-2.
- Mateos –Espejel E., Savulescu L. and Paris Jean. **2011**. Base case process development for energy efficiency improvement, application to a Kraft pulping mil. Part I: Definition and characterization. *Chem Eng Res Des* 89 (6), 742-752. DOI: 10.1016/j.cherd.2010.09.012.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). **2016**. (www.magrama.gob.es).

- Niemelä K. **1988a**. GLC-MS studies on pine kraft black liquors, part I. Identification of monomeric compounds. *Holzforschung* 42 (3), 169-173. DOI: 10.1515/hfsg.1988.42.3.169.
- Niemelä K. **1988b**. GLC-MS studies on pine kraft black liquors, part II. Identification of hydroxy acids with a stilbene structure. *Holzforschung* 42 (3), 175-176. DOI: 10.1515/hfsg.1988.42.3.169.
- Niemelä K. **1988c**. The formation of 2-hydroxy-2-cyclopenten-1-ones from polysaccharides during kraft pulping of pine Wood. *Carbohyd Res* 184, 131-137. DOI: 10.1016/0008-6215(88)80011-9.
- Niemelä K. **1989**. GLC-MS studies on pine kraft black liquors, part V. Identification of catechol compounds. *Holzforschung* 43 (2), 99-103. DOI: 10.1515/hfsg.1989.43.2.99.
- Niemelä K. **1990a**. Conversion of xylan, starch, and chitin into carboxylic acids by treatment with alkali. *Carbohyd Res* 204, 37-49. DOI: 10.1016/0008-6215(90)84019-Q.
- Niemelä K. **1990b**. The formation of hydroxy monocarboxylic acids and dicarboxylic acids by alkaline thermochemical degradation of cellulose. *J Chem Technol Biot* 48 (1), 17-28. DOI: 10.1002/jctb.280480103.
- Niemelä K., Alén R. and Sjöström E. **1985**. The formation of carboxylic acids during kraft and kraft-anthraquinone pulping of birch Wood. *Hofzforschung* 39 (3), 167-172. DOI: 10.1515/hfsg.1985.39.3.167.
- Niemelä K. and Sjöström E. **1986a**. Alkaline degradation of mannan. *Holzforschung* 40 (1), 9-14. DOI: 10.1515/hfsg.1986.40.1.9.
- Niemelä K. and Sjöström E. **1986b**. Simultaneous identification of aromatic and aliphatic low molecular weight compounds from alkaline pulping liquor by capillary gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Holzforschung* 40 (6), 361-368. DOI: 10.1515/hfsg.1986.40.6.361.
- Niemelä K. and Sjöström E. **1988**. The conversión of cellulose into carboxylic acids by a drastic alkali treatment. *Biomass* 15 (4), 223-231. DOI: 10.1016/0144-4565(88)90058-3.
- Prinsen P., Rencoret J., Gutiérrez A., Liitiä T., Tamminen T., Colodette J. L., Berbis M., Jiménez-Barbero J., Martínez A. T. and del Río J. C. **2013**. Modification of the lignin structure during alkaline delignification of Eucalyptus Wood by kraft, soda-AQ, and soda-O₂ cooking. *Ind Eng Chem Res* 52 (45), 15702-15712. DOI: 10.1021/ie401364d.

- Requejo Silva A. **2012**. Las podas de olivo como materia prima para la producción de derivados de las hemicelulosas, pastas celulósicas y bioetanol. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Sánchez R. **2010**. Aprovechamiento integral del *Hesperaloe funifera* mediante fraccionamiento de sus componentes. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Sarkanen K. V. **1990**. Chemistry of solvent pulping. TAPPI J. 73 (10), 215-219.
- SCA. Fabricación de papel. Soporte técnico de los papeles para SCA *Publication Papers* (www.sca.com)
- Shatalov A. A. and Pereira H. **2005**. *Arundo donax L.* reed: new perspectives for pulping and bleaching. Part 4. Peroxide bleaching of organosolv pulps. *Bioresource Technol* 96, 865-872. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.09.005.
- Sixta H., Potthast A. and Krottschek A. W. **2006**. Chemical pulping processes, in *Handbook of pulp*. Sixta H (ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. Pp. 325-366. DOI: 10.1002/9783527619887.
- Vakkilainen E. **2008**. Chemical recovery, in *Chemical pulping, part 2, Recovery of chemicals and energy*. Tikka P. (ed), Paperi ja Puu Oy, Helsinki, Finland. Pp. 10-35.
- Venica A. D., Chen C. L. and Gratzl J. S. **2008a**. Soda-AQ delignification of poplar wood. Part 1: Reaction mechanism and pulp properties. *Holzforschung* 62 (6), 627-636. DOI: 10.1515/hf.2008.118.
- Venica A. D., Chen C. L. and Gratzl J. S. **2008b**. Soda-AQ delignification of poplar wood. Part 2: Further degradation of initially dissolved lignins. *Holzforschung* 62 (6), 637-644. DOI: 10.1515/hf.2008.119.
- Vila C. **2005**. Evaluación experimental y simulación de tecnologías de procesamiento para la obtención de pastas de celulosa. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo.
- Villar Gutiérrez J y Jiménez Alcaide L. **2005**. Pasteado mecánico en, *Pastas celulósicas de materias primas alternativas a las convencionales*. Editorial Gráfica Sol. Sevilla.

4. BIORREFINERÍA DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS Y BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

4.1. SITUACIÓN ACTUAL

En la actualidad, son muchos los esfuerzos en investigación en el desarrollo de nuevas fuentes de energía que se están llevando a cabo en diversos países. La biomasa vegetal constituye el recurso natural más abundante en la Tierra y, dado su naturaleza renovable y disponibilidad, es una fuente potencial para la producción de bioenergía, como es el caso del bioetanol (Gupta and Verma, 2015).

Brasil y EEUU son los dos países mayores productores de bioetanol, con un 26,72% y 56,72%, respectivamente, del total de la producción mundial (Licht, 2013). En estos países, la producción a gran escala de bioetanol depende, principalmente, de la sacarosa obtenida de la caña de azúcar en el caso de Brasil y del almidón obtenido del maíz en EEUU. Actualmente, la producción de etanol a partir de maíz, almidón y azúcar está generando un gran debate social debido a la competencia de estos usos con el eminentemente alimentario, tanto humano como animal. El empleo del conocido como petróleo de oro verde (*green gold petroleum*), procedente de residuos lignocelulósicos, evitaría la continua lucha existente entre alimento y combustible causado por la producción de bioetanol dependiente de cereales (Bjerre *et al.*, 1996). De acuerdo a Kim y Dale (2003), la producción de bioetanol potencial total a partir de residuos agrícolas procedentes del cultivo de maíz, cebada, avena, arroz, trigo, sorgo y caña de azúcar es de $4,91 \cdot 10^{11}$ L. Como se ha comentado, la biomasa lignocelulósica es renovable, barata y además está disponible en grandes cantidades. Este material lignocelulósico incluye todo tipo de residuos, como los procedentes de cultivos, hierbas, serrín, astillas de madera, etc. Así, la producción de bioetanol podría ser la ruta para la utilización efectiva de los residuos agrícolas, con las ventajas añadidas de, además de valorizar un residuo, emplear una tecnología socialmente aceptable, respetuosa con el medio ambiente y que contribuiría a la reducción de las emisiones de efecto invernadero (Viikari *et al.*, 2012).

Wang (2014) estudió el rendimiento anual de los cultivos y los residuos generados de dichos cultivos de 2010 y concluyó que el cultivo de cereales produce mucho más residuo que rendimiento en grano; en contraposición a los cultivos azucareros y de tubérculos que producen una menor cantidad de residuo y un mayor rendimiento (tabla 4.1)

Annual estimate of world crop yield/world crop residue production in 2010 (10⁴ ton) [57,58].

| Crops | Africa | | America | | Asia | | Europe | | Oceanic | | World | |
|--------------------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|---------|---------------|--------|---------------|------|---------------|---------|
| | Yield/residue | | Yield/residue | | Yield/residue | | Yield/residue | | Yield/residue | | Yield/residue | |
| Barley | 668 | 1004 | 1603 | 2409 | 1975 | 2969 | 7349 | 11,050 | 760 | 1143 | 12,345 | 18,576 |
| Maize | 6358 | 6358 | 44,534 | 44,534 | 24,575 | 24,575 | 8510 | 8510 | 53 | 53 | 84,031 | 84,031 |
| Millet | 1527 | 2316 | 27 | 41 | 1567 | 2378 | 33 | 50 | 4 | 6 | 3158 | 4792 |
| Oats | 20 | 20 | 508 | 508 | 98 | 98 | 1195 | 1195 | 142 | 142 | 1962 | 1962 |
| Rice | 2298 | 3449 | 3697 | 5549 | 63,184 | 94,830 | 432 | 649 | 21 | 31 | 69,632 | 104,507 |
| Rye | 7 | 10 | 248 | 377 | 167 | 254 | 2267 | 3450 | 54 | 81 | 2572 | 3914 |
| Sorghum | 2111 | 3166 | 2251 | 3376 | 980 | 1469 | 71 | 106 | 160 | 240 | 5572 | 8358 |
| Wheat | 2210 | 3318 | 11,273 | 16,919 | 29,252 | 43,904 | 20,371 | 30,575 | 2258 | 3389 | 65,365 | 98,104 |
| Total | 15,198 | 19,640 | 64,141 | 73,715 | 121,798 | 170,477 | 40,229 | 55,585 | 3452 | 5086 | 244,648 | 32,4244 |
| <i>Sugar crops</i> | | | | | | | | | | | | |
| Sugar beet | 1028 | 259 | 3103 | 782 | 3663 | 924 | 15,051 | 3795 | 0 | 0 | 22,845 | 5760 |
| Sugar cane | 8959 | 2242 | 96,384 | 24,115 | 62,410 | 15,615 | 1 | 0 | 3355 | 839 | 171,109 | 42,811 |
| Total | 9987 | 2501 | 99,487 | 24,898 | 66,073 | 16,538 | 15,052 | 3795 | 3355 | 839 | 193,954 | 48,571 |
| <i>Tubers</i> | | | | | | | | | | | | |
| Potatoes | 2233 | 558 | 3966 | 991 | 15,250 | 3812 | 10,812 | 2703 | 181 | 45 | 32,442 | 8111 |
| Sweet potato | 1522 | 383 | 0 | 0 | 94 | 24 | 5 | 1 | 74 | 19 | 10,764 | 2711 |
| Total | 3755 | 942 | 3966 | 991 | 15,344 | 3836 | 10,817 | 2704 | 255 | 64 | 43,206 | 10,821 |

Tabla 4.1: Estimación anual mundial de rendimiento cultivo/producción de residuo de cultivo en 2010 (10⁴ ton).

Fuente: Xie and Peng, 2011; Wang, 2014; Gupta and Verma, 2015.

En la tabla 4.2 se muestra la producción potencial de bioetanol a partir de residuos agrícolas por continentes. Encabezando la lista, se encuentra Asia, que obtendría el mayor volumen de bioetanol a partir de la paja de arroz, seguida por Europa y Norte América, cuya producción potencial sería muy similar, obteniendo el mayor volumen de bioetanol a partir de la paja de trigo para el primer caso y del rastrojo de maíz para el segundo.

| Continents | Corn stover | Barley straw | Oat straw | Rice straw | Wheat straw | Sorghum straw | Bagasse | Total |
|-----------------|-------------|--------------|-----------|------------|-------------|---------------|---------|-------|
| Africa | - | - | - | 5.86 | 1.57 | - | 3.33 | 10.8 |
| Asia | 9.57 | 0.61 | 0.07 | 186.8 | 42.6 | - | 21.3 | 261.0 |
| Europe | 8.23 | 13.7 | 1.79 | 1.10 | 38.9 | 0.10 | 0.004 | 63.8 |
| North America | 38.4 | 3.06 | 0.73 | 3.06 | 14.7 | 1.89 | 1.31 | 63.2 |
| Central America | - | 0.05 | 0.009 | 0.77 | 0.82 | 0.31 | 5.46 | 7.42 |
| Oceania | 0.07 | 0.60 | 0.12 | 0.47 | 2.51 | 0.09 | 1.84 | 5.70 |
| South America | 2.07 | 0.09 | 0.06 | 6.58 | 2.87 | 0.41 | 18.1 | 30.2 |

Tabla 4.2: Producción potencial de bioetanol, en GL, a partir de biomasa lignocelulósica por continente.

Fuente: Kim and Dale, 2004; Gupta and Verma, 2015

En la tabla 4.3 se muestra el coste de producción de bioetanol en diferentes países en función de la materia prima empleada. Puede observarse que los residuos lignocelulósicos presentan un menor coste de producción (0,14-0,43 US\$/L) comparado con otros cultivos.

| Country | Raw material | Costs (US\$/L) |
|-------------------|----------------------------------|----------------|
| Petrol (gasoline) | | 0.34 |
| Brazil | Sugarcane | 0.16–0.22 |
| India | Sugarcane | 0 |
| India | Sorghum | 0 |
| France | Sugar beet | 0.60–0.68 |
| Europe | Sugar beet | 0.45 |
| EU | Wheat | 0.36–0.57 |
| EU | sugarbeet | 0.43–0.73 |
| New Zealand | Whey | 0.42–0.49 |
| Canada | Corn | 0 |
| Canada | Wheat | 0 |
| Europe | Wheat | 0.42 |
| United States | Mix of lignocellulosic materials | 0.43 |
| Thailand | Cassava | 0.18 |
| China | Wheat | 0 |
| China | Corn | 0 |
| China | Molasses | 0.32 |
| China | Sweet sorghum | 0.29 |
| United States | Corn | 0.25–0.40 |
| US | Corn | 0.57 |
| | Corn stover | 0.61–0.78 |
| US | Corn fiber | 0.55 |
| US | Wheat straw | 0.59 |
| | Spruce (softwood) | 0.59–0.85 |
| | Salix (hardwood) | 0.65–0.96 |
| | Lignocellulose (biowaste) | 0.14–0.43 |

Tabla 4.3: Coste de producción de bioetanol en diferentes países.

Fuente: Gupta and Verma, 2015.

4.2. NORMATIVA SOBRE BIOENERGÍA Y BIOCOMBUSTIBLES

4.2.1. NORMATIVA EN EEUU

De acuerdo a la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OCDE), el apoyo del Gobierno Estadounidense a la producción de biocombustibles ha sido motivado principalmente por políticas agrícolas y energéticas con el objetivo de incentivar la renta agraria y las industrias del sector agrícola. Más recientemente, el respaldo para la producción y uso de biocombustibles ha llegado a ser el núcleo de muchas políticas nacionales con el fin de reducir las emisiones de CO₂ del sector del transporte.

Los EEUU es el mayor productor de etanol del mundo, con 4,5-4,9·10¹⁰ L de biocombustible anuales. En 2005 el Congreso de los EEUU presentó la Ley de Política Energética, y en 2007 la Ley de Independencia y Seguridad Energética (EISA) creando un Estándar de Combustibles Renovables (RFS) en el que se requería un volumen mínimo de combustible renovable para mezclarlo con el combustible derivado del petróleo en cantidades crecientes anuales hasta 2022. El Estándar de Combustibles Renovables EISA (RFS2), estableció un objetivo de 13,6·10¹⁰ L de combustibles renovables en la gasolina estadounidense para 2022. De esos 13,6·10¹⁰ L, 6·10¹⁰ L deberán ser de etanol celulósico. De acuerdo a la EISA (2007) se estableció el ciclo de vida con los límites de emisiones de gases de efecto

invernadero para cada categoría, requiriendo un porcentaje de mejora el cual toma como referencia a la gasolina y el diesel al que se reemplaza. El biocombustible celulósico derivado de materia prima renovable que contenga celulosa, hemicelulosa o lignina debe tener un ciclo de vida de emisiones de gases de efecto invernadero al menos un 60% más bajo que el punto de referencia de los combustibles derivados del petróleo.

4.2.2. **NORMATIVA COMUNITARIA (UNIÓN EUROPEA)**

Los objetivos a alcanzar son contemplados por la UE a través de distintos mecanismos legislativos como: Decisiones del Parlamento Europeo, Regulaciones, Planes de Acción y Directivas del Consejo, así como Recomendaciones y Documentos de análisis de otras instituciones. En relación al sector energético, la UE contempla la consecución de los siguientes objetivos en el año 2020:

- ✚ Ahorrar un 20% del consumo de energía.
- ✚ Aumentar hasta el 20% el porcentaje de energías renovables en el consumo total.
- ✚ Aumentar hasta el 10% mínimo el porcentaje de biocarburantes de automoción en el consumo total.
- ✚ Con ello, contribuir a reducir como mínimo un 20% las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI).

La Normativas más importantes referentes a este sector energético a nivel comunitario se recogen a continuación.

4.2.2.1. **Energías renovables y biocombustibles**

- ✚ Directiva (UE) 2015/1513 del Parlamento Europeo y del Consejo de 9 de septiembre de 2015 por la que se modifica la Directiva 98/70/CE, relativa a la calidad de la gasolina, y la Directiva 2009/28/CE, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables, se establece que, para el cómputo en el objetivo de energías renovables en el transporte, el porcentaje de biocarburantes producidos a partir de cereales y otros cultivos ricos en almidón, de azúcares, de oleaginosas y de otros cultivos plantados en tierras agrícolas como cultivos principales fundamentalmente con fines energéticos no podrá superar el 7% para el año 2020. Los biocarburantes producidos a partir de residuos no implican una demanda adicional de suelo, aportando reducciones considerables de las emisiones de gases de efecto invernadero. Para cumplir los objetivos previstos, debería fomentarse la utilización de los biocarburantes

procedentes de materias primas residuales, teniendo en cuenta lo establecido en la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, en particular, el principio de jerarquía de residuos.

- ✚ Plan de Acción Europeo de la Biomasa (COM(2005)628 final), por el que se establecen medidas para incrementar el desarrollo de la energía de la biomasa a partir de madera, residuos y cultivos agrícolas, creando incentivos basados en el mercado para su utilización y eliminando obstáculos para el desarrollo del mercado.
- ✚ Comunicación de la Comisión sobre la aplicación práctica del régimen de sostenibilidad de la UE para los biocarburantes y biolíquidos y sobre las reglas de contabilización aplicables a los biocarburantes (2010/C160/02).
- ✚ Comunicación de la Comisión sobre regímenes voluntarios y valores por defecto del régimen de sostenibilidad de la UE para los biocarburantes y biolíquidos (2010/C160/01).

4.2.3. **NORMATIVA EN ESPAÑA**

Para alcanzar los objetivos establecidos en relación al uso de energías renovables y ahorro y eficiencia energética contemplados en el marco comunitario, el estado español ha transpuesto esta Normativa y ha elaborado además diversos Planes de Acción con el fin de establecer directrices y medidas a seguir para el desarrollo de estos sectores. Destacan:

- ✚ Plan de las Energías Renovables (PER) 2011-2020. Lamentablemente, debido a la crisis que está azotando al país, el consejo de ministros aprobó un año después de la puesta en vigor del PER el RD-ley 1/2012, de 27 de enero, por el que se procede a la suspensión de preasignación de retribución y a la suspensión de los incentivos económicos para nuevas instalaciones de producción de energía eléctrica a partir de cogeneración, fuentes de energía renovables y residuos.
- ✚ Plan de Acción Nacional de Energías Renovables (PANER) 2011-2020.
- ✚ Plan de Acción de Ahorro y Eficiencia Energética 2011-2020.
- ✚ Estrategia para el desarrollo del uso energético de la biomasa forestal residual.
- ✚ Estrategia Española de Cambio Climático y Energía Limpia Horizonte 2007-2010-2020.

La normativa que regula los biocarburantes se resume en:

- ✚ Real Decreto 61/2006, de 31 de enero, por el que se determinan las especificaciones de gasolinas, gasóleos, fuelóleos y gases licuados del petróleo y se regula el uso de

determinados biocarburantes. Modificado mediante Real Decreto 1088/2010, de 3 de septiembre, en lo relativo a las especificaciones técnicas de gasolinas, gasóleos, utilización de biocarburantes y contenido de azufre de los combustibles para uso marítimo.

- ✚ Real Decreto 1597/2011, de 4 de noviembre, por el que se regulan los criterios de sostenibilidad de los biocarburantes y biolíquidos, el Sistema Nacional de Verificación de la Sostenibilidad y el doble valor de algunos biocarburantes a efectos de su cómputo, establece, entre otras cuestiones, la metodología de cálculo de las emisiones de gases de efecto invernadero, las definiciones aplicables en dicho cálculo y la descripción de los agentes económicos integrados en la cadena de producción y comercialización de biocarburantes y biolíquidos, cuyas instalaciones y productos estarán sujetos a inspección y control en el marco del sistema nacional de verificación del cumplimiento de los criterios de sostenibilidad de los biocarburantes y biolíquidos.
- ✚ Real Decreto 1085/2015, de 4 de diciembre, de fomento de biocarburantes, por el que se establece para el año 2016 un objetivo global anual mínimo obligatorio de venta o consumo de biocarburantes del 4,3%, y para los años 2017, 2018, 2019 y 2020, unos objetivos del 5%, 6%, 7% y 8,5%, respectivamente, todos ellos en contenido energético.
- ✚ Orden IET/2786/2015, de 17 de diciembre, por la que se modifica 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.

En resumen, en los últimos años la mayoría de los países han puesto en marcha políticas energéticas con el fin de apoyar las energías renovables y así potenciar la diversidad energética mediante el uso de fuentes autóctonas. Son muchas las medidas que los gobiernos pueden poner en práctica para compensar el alto coste actual de la producción energética con renovables así como para animar al consumidor, destacando entre estas medidas los incentivos fiscales y el desarrollo de normativa de apoyo. Estas medidas pueden ser de efecto directo como préstamos y subvenciones a la inversión y a la investigación, incentivos basados en tarifas y primas establecidas, exenciones fiscales y sistemas de certificados verdes; o de efecto indirecto como el establecimiento de objetivos de desarrollo de energías renovables, impuestos nacionales a la emisión, impuestos y cuotas de CO₂ e impuestos sobre el comercio exterior (Gupta and Verma, 2015).

4.3. PROCESAMIENTO DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS PARA LA OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS Y BIOETANOL 2G

El pretratamiento es el proceso inicial y más importante para la separación de la celulosa libre de los residuos agrícolas (Gupta and Verma, 2015). Tras un pretratamiento de autohidrólisis (agua a elevada temperatura y presión) de un material lignocelulósico se obtiene una fase sólida, rica en celulosa y lignina; y una fracción líquida o hidrolizado rico en hemicelulosas. En cuanto a la fracción sólida, tras el pretratamiento se puede llevar a cabo una etapa de deslignificación para facilitar la posterior hidrólisis enzimática. El segundo proceso más importante es el de hidrólisis enzimática, llevado a cabo por enzimas que transforman la celulosa en glucosa. Tras este paso, se requiere un proceso de fermentación en el que se produzca la conversión de glucosa a etanol por mediación de microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis*, *Candida brassicae*, *Mucor indicus*, etc. Las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación se pueden unificar en un solo proceso denominado Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF). Por otro lado, la fracción líquida o hidrolizado obtenido se puede someter a una etapa de detoxificación para la eliminación de compuestos no deseados, y una posterior hidrólisis ácida para la obtención de azúcares hemicelulósicos fermentables; o bien se puede purificar para aislar oligosacáridos, los cuales tienen un elevado valor añadido en diferentes industrias. A continuación se presenta un esquema del trabajo llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral (figura 4.1).

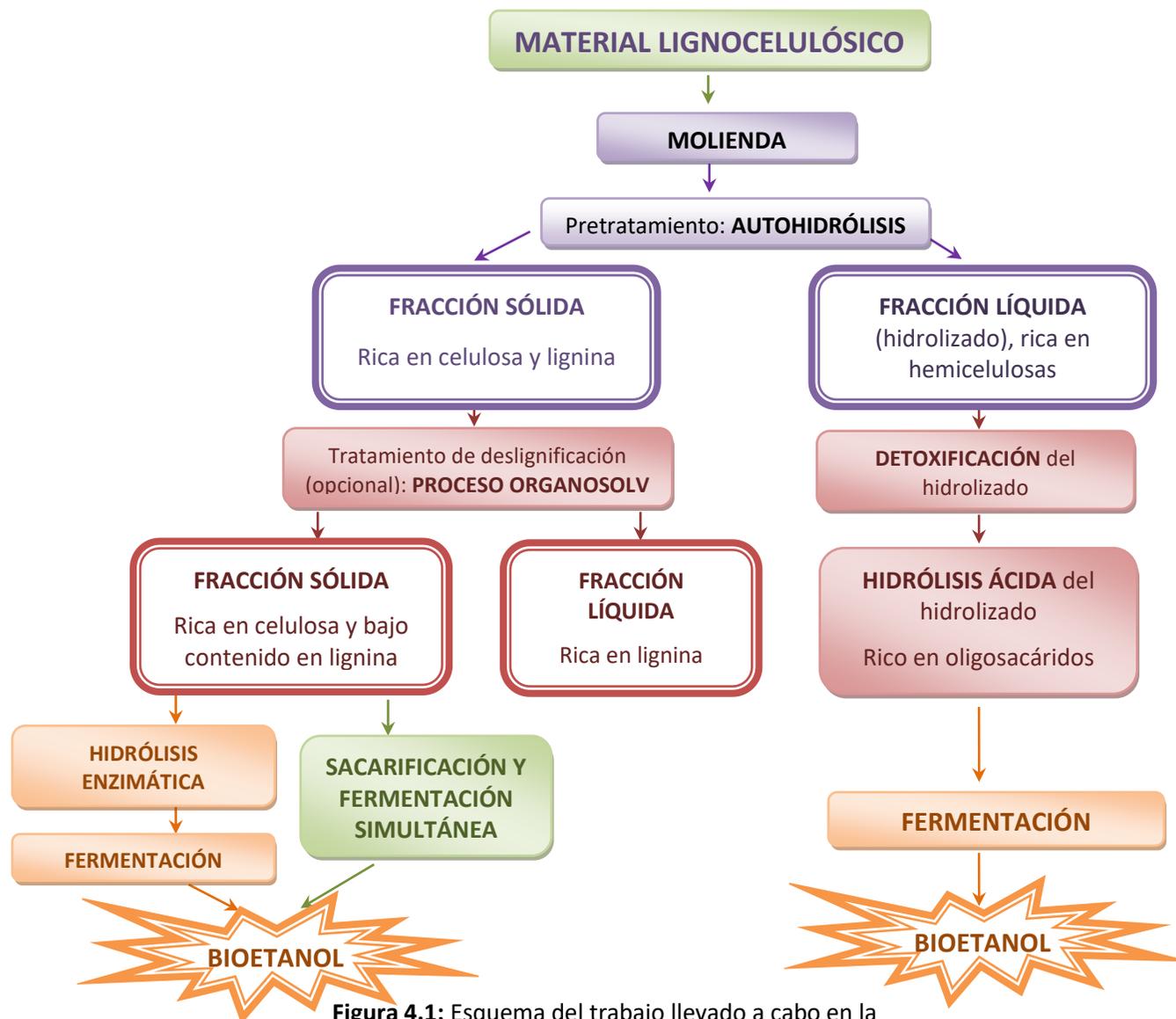


Figura 4.1: Esquema del trabajo llevado a cabo en la presente memoria

4.4. FACTORES CLAVE PARA UN PRETRATAMIENTO EFECTIVO DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Dado que los materiales lignocelulósicos poseen diferentes características físico-químicas, es necesario adoptar pretratamientos apropiados basados en las propiedades de cada materia prima. Además, la elección de un pretratamiento específico tiene un gran impacto en todas las etapas posteriores en el esquema global de conversión en términos de digestibilidad de celulosa, generación de compuestos tóxicos potencialmente inhibidores para las levaduras, requerimientos energéticos de agitación, demanda de energía en el proceso *downstream* y demanda para el tratamiento de aguas residuales (Galbe and Zacchi, 2007). Algunos estudios describen diversos parámetros (recuperación de pentosas, tamaño de materia requerido, concentración de compuestos tóxicos formados durante el pretratamiento y una baja demanda energética) como los factores determinantes en la elección de un pretratamiento efectivo (Sun and Cheng, 2002; Alvira *et al.*, 2010).

Existen diversas propiedades clave a tener en cuenta a la hora de elegir un proceso de pretratamiento avanzado y de bajo costo (Palmqvist and Han- Hägerdal, 2000; Klinke *et al.*, 2002; Oliva *et al.*, 2003; Yang and Wyman, 2008; Alvira *et al.*, 2010):

- ✚ **Rendimientos elevados** para múltiples cultivos.
- ✚ **Alta digestibilidad de los sólidos pretratados:** la celulosa procedente de un pretratamiento debería ser altamente digerible con rendimientos superiores al 90% en menos de 5 días y preferiblemente en menos de 3 días con una carga enzimática menor de 10 FPU/g celulosa.
- ✚ **Degradación de azúcares no significativa:** se deberían alcanzar rendimientos elevados cercanos al 100% de azúcares celulósicos y hemicelulósicos mediante la etapa de pretratamiento.
- ✚ **Cantidad mínima de compuestos inhibidores:** el líquido hidrolizado procedente del pretratamiento debería ser fermentable siguiendo una etapa de acondicionamiento de bajo costo y alto rendimiento. Unas condiciones duras durante el pretratamiento conducen a una degradación parcial de las hemicelulosas y a la generación de compuestos inhibidores derivados de la descomposición de los azúcares pudiendo afectar a las posteriores etapas de hidrólisis y fermentación. Los compuestos inhibidores y sus cantidades dependen de la materia prima y de la dureza del tratamiento. Los productos de degradación derivados del pretratamiento de los materiales lignocelulósicos se pueden dividir en las siguientes clases: ácidos

carboxílicos, derivados furánicos y compuestos fenólicos. Los principales derivados de furanos son furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF), derivados de la degradación de pentosas y hexosas, respectivamente. Los ácidos débiles son mayoritariamente acético, fórmico y levulínico. Los compuestos fenólicos incluyen alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos.

- ✚ **Operación a escala razonable y coste moderado de reactores:** los reactores de pretratamiento deberían ser bajos en costo, minimizando su volumen y empleando materiales apropiados en su estructura para evitar la corrosión en ambientes químicos.
- ✚ **La no producción de residuos sólidos:** los químicos formados durante la etapa de acondicionamiento del hidrolizado para las etapas siguientes, no debería representar un reto para su eliminación.
- ✚ **Efectividad con bajos contenidos de humedad:** el uso de materia prima con un alto contenido en materia seca reduce el consumo energético durante el pretratamiento.
- ✚ **Obtención de elevadas concentraciones de azúcares** para asegurar una concentración adecuada de etanol.
- ✚ **Recuperación de lignina y otros constituyentes** para simplificar el proceso de *downstream* y para su conversión en coproductos de alto valor añadido.
- ✚ **Requerimientos mínimos de calor y energía.**

4.5. PRETRATAMIENTO MECÁNICO: MOLIENDA

El proceso de molienda, consiste en triturar la biomasa lignocelulósica en pequeños fragmentos, considerándose un pretratamiento mecánico. El objetivo de este tipo de pretratamientos es reducir el tamaño de partícula, conduciendo a un incremento de la superficie específica disponible y a una reducción del grado de polimerización (Palmowski and Muller, 1999). El incremento del área superficial específica, la reducción del grado de polimerización y la rotura de la biomasa son factores que aumentan el rendimiento total de la hidrólisis de la lignocelulosa en la mayor parte de los casos entre un 5 y un 25% (dependiendo del tipo de biomasa, tiempo de molienda y duración de la misma), reduciendo también el tiempo de digestión entre un 23 y un 59% y, por tanto, produciendo, por tanto, un aumento de la velocidad de hidrólisis (Palmowski and Muller, 1999; Delgenés *et al.*, 2002; Hartmann *et al.*, 1999).

El mayor inconveniente de este pretratamiento es el elevado requerimiento energético, el cual va a depender del tamaño final de partícula que se desee obtener y de las características de la biomasa (Hendriks and Zeeman, 2009).

4.6. PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO: AUTOHIDRÓLISIS DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA (BLC)

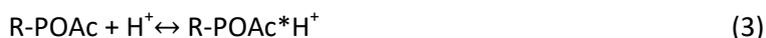
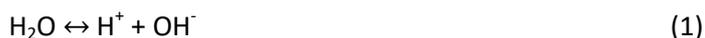
El objetivo principal del pretratamiento hidrotérmico es solubilizar las hemicelulosas, dejando la mayor parte de la celulosa y la lignina en la fase sólida (Palmowski and Muller, 1999). El proceso hidrotérmico se considera un pretratamiento rentable (Delgenés et al., 2002) y, en general, presenta diversas ventajas:

- ✚ No requiere la adición ni recuperación de químicos diferentes al agua.
- ✚ Apenas presenta problemas de corrosión de los equipos.
- ✚ Se trata de una operación simple y económica.
- ✚ Da lugar a un fraccionamiento selectivo de la materia prima.
- ✚ La solubilización de la hemicelulosa produce compuestos valiosos (principalmente oligómeros) con diversas aplicaciones.
- ✚ En la fase líquida se obtienen cantidades pequeñas de los compuestos potencialmente inhibidores de los microorganismos fermentativos, como furfural, hidroximetilfurfural o ácido acético.
- ✚ La fase sólida es más susceptible a tratamientos posteriores (de deslignificación o de hidrólisis enzimática).

La fase sólida presenta un contenido mayor en celulosa, que puede producir mayores concentraciones de glucosa y de etanol. Por tales motivos, el proceso hidrotérmico se puede considerar como un proceso de fraccionamiento respetuoso con el medio ambiente. Este proceso se viene empleando principalmente como pretratamiento para la producción de bioetanol de segunda generación.

En el pretratamiento hidrotérmico la biomasa lignocelulósica se mezcla con agua y se somete a elevadas temperaturas y presiones, penetrando en las estructuras de las células, hidratando la celulosa y despolimerizando las hemicelulosas a oligómeros y monómeros, quedando disuelta hasta el 60% de la biomasa en el proceso. En agua y a elevadas temperaturas (150-230°C), los puentes de hidrógeno comienzan a debilitarse permitiendo la autoionización del agua en iones hidronio ácidos (H_3O^+), los cuales actúan como catalizadores,

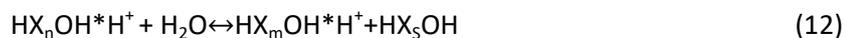
e iones hidróxido básicos (OH^-). En la región subcrítica (100-374°C), la constante de ionización (K_w) del agua aumenta con la temperatura. Los iones hidronio atacan los enlaces éter que existen entre los monómeros de los polisacáridos y también entre los grupos acetilo y urónicos y dichos monómeros. En esta reacción se generan ácidos orgánicos como el ácido acético, que aumentan la concentración de los iones hidronio, favoreciendo las reacciones de hidrólisis. Liu (2010) presenta el siguiente modelo para la solubilización de hemicelulosas durante el proceso hidrotérmico (Ec. 1-12):



Etapas de reacción para solubilizar las hemicelulosas:



Etapas de reacción para reducir la longitud de la cadena en el procesado del licor hidrotérmico:



Donde X_n representa un grupo medio n -xilooligómero, $m+s=n$, R - denota la celulosa o lignina unida al material lignocelulósico, P representa un segmento de hemicelulosa, HX_nOH es un n -xilooligómero, HOAc representa la molécula de ácido acético y Ac es CH_3CO (grupo acetilo).

4.6.1. VARIABLES OPERACIONALES DEL PRETRATAMIENTO HIDROTÉRMICO

Las variables de operación más importantes del proceso hidrotérmico son: temperatura, tiempo de residencia, tamaño de partícula, concentración (relación líquido/sólido, RLS) y pH. Éstas deben ser tenidas en cuenta para maximizar el rendimiento (Ruiz *et al.*, 2013):

- ✚ **Temperatura/tiempo:** la relación temperatura-tiempo influye fuertemente en las características físico-químicas de los materiales lignocelulósicos. Se requiere un control estricto de las reacciones a elevadas temperaturas debido a la degradación térmica, ya que se puede producir una degradación de los azúcares hemicelulósicos produciendo furfural. Diversos trabajos muestran que temperaturas bajas de reacción y tiempos de residencia más prolongados favorecen el rendimiento en la obtención de pentosas disminuyendo la formación de inhibidores (Duff and Murray, 1996; Kálmán *et al.*, 2002; Karagöz *et al.*, 2004)

- ✚ **Tamaño de partícula:** la reducción del tamaño de partícula incrementa la densidad aparente, mejora las propiedades de flujo y aumenta la porosidad y el área superficial. Una mayor área superficial aumenta el número de puntos de contacto para la reacción química (Ruiz *et al.*, 2011; Brownell *et al.*, 1986). Normalmente, cuando se emplean tamaños de partícula mayores, aparecen problemas de transferencia de calor que conllevan un sobrecalentamiento del exterior (con la consiguiente formación de inhibidores) y una autohidrólisis incompleta del interior. Este problema se puede evitar reduciendo el tamaño de partícula, como un pretratamiento previo al de autohidrólisis. Además, Hosseini y Shah (2009) demostraron que es posible mejorar hasta en un 50% la eficiencia energética del pretratamiento optimizando las propiedades del tamaño de partícula

- ✚ **Concentración (relación líquido/sólido, RLS):** también conocida como consistencia. Puede afectar a la concentración de catalizador (ácido) en el medio de reacción de dos modos: (1) la disminución de la RLS conlleva una mayor concentración de ácido acético favoreciendo la despolimerización y (2) conduce también a un incremento en la capacidad tampón, que está principalmente relacionada con el contenido en cenizas de la materia prima, disminuyendo la velocidad de hidrólisis. Normalmente la RLS puede variar entre 2 y 100 (p/p), aunque los valores más comunes empleados están alrededor de 10. Elevados valores de RLS están normalmente asociados a reactores

continuos. La RLS también dependerá de la capacidad de retención del agua de la materia prima. Además, esta variable puede influir en la forma en la que el calor y los químicos (H_3O^+) penetran en el material lignocelulósico, causando un tratamiento irregular del material si la relación líquido/sólido no es la adecuada. Esto podría resultar en la degradación selectiva de la parte más externa del material lignocelulósico. Rodríguez *et al.* (2009) demostraron que es posible obtener altas concentraciones de glucosa, xilosa, arabinosa y ácido acético combinando altas temperaturas con una relación líquido/sólido y un tiempo de tratamiento medio-bajo. La principal ventaja deriva de que a RLS altas se emplea menos líquido para la misma cantidad de sólido, con lo que se podrían tener equipos más pequeños, obteniendo concentraciones más altas en la fase líquida. Los mayores inconvenientes radicarían en problemas de mezcla y un mayor coste de agitación.

✚ **pH:** monitorizar y controlar el pH durante el proceso hidrotérmico maximizará la solubilización de la fracción hemicelulósica en forma de oligosacáridos solubles líquidos al mismo tiempo que minimizará la concentración de iones hidronio y por consiguiente, la degradación de estos oligosacáridos y monosacáridos en productos de degradación (Mosier *et al.*, 2005; Weil *et al.*, 1998)

✚ **Severidad (S_0):** la severidad se emplea para medir la intensidad de los pretratamientos hidrotérmicos, y permite comparar tratamientos que no hayan sido realizados bajo las mismas condiciones de operación. Viene definida como el logaritmo del factor de severidad (R_0) (Lavoie *et al.*, 2010), en términos de efectos combinados de tiempo y temperatura durante el proceso hidrotérmico, incluyendo los periodos de calentamiento y enfriamiento. La ecuación aplicada es la siguiente (ec. 13 y 14):

$$\log R_0 = \log \left[\int_{t=0}^{t_F} \exp \left(\frac{T(t) - T_{REF}}{\omega} \right) dt \right] \quad (13)$$

$$S_0 = \log R_0 = \log [R_{0\text{ HEATING}} + R_{0\text{ COOLING}}] \quad (14)$$

Donde $T(t)$ ($^{\circ}C$) es el perfil "total" de temperatura, con calentamiento y enfriamiento de modo conjunto, y ω y T_{REF} son parámetros cuyos valores se han descrito en bibliografía ($\omega = 14.75$ $^{\circ}C$; $T_{REF} = 100^{\circ}C$).

4.6.2. EFECTOS DEL PRETRATAMIENTO HIDROTÉRMICO SOBRE LOS COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

4.6.2.1. Efectos sobre la celulosa

El proceso hidrotérmico favorece el acceso de las enzimas a la estructura del material en una posterior hidrólisis enzimática, incrementando de esta manera el potencial de sacarificación de la celulosa. Además se producen una serie de cambios físicos que permitirán una mejora en los rendimientos del proceso de hidrólisis enzimática (Ruiz *et al.*, 2013):

- ✚ Aumento en el tamaño de poro que conllevará a una mejor accesibilidad de la enzima.
- ✚ Incremento en el área superficial accesible, que también está relacionado con la susceptibilidad del sustrato a la hidrólisis enzimática.
- ✚ Disminución del índice de polimerización con la severidad del tratamiento.
- ✚ Alteraciones en la cristalinidad debido a la solubilización selectiva de la celulosa amorfa.

4.6.2.2. Efectos sobre las hemicelulosas

Las hemicelulosas están formadas por varias unidades estructurales, incluyendo azúcares de 5 átomos de carbono (pentosas: xilosa y arabinosa) y azúcares de 6 carbonos (manosa, galactosa y glucosa) que pueden ser sustituidos con grupos fenólicos, urónicos o acetilos. El xilano es la unidad estructural de las hemicelulosas más abundante en la mayoría de los residuos agrícolas (formado principalmente por unidades de xilosa). Durante el proceso hidrotérmico casi la totalidad de las hemicelulosas pueden ser eliminadas del material lignocelulósico, dando lugar a productos solubles de alto valor añadido como son los oligómeros, monosacáridos, productos de descomposición de los azúcares (furfural o HMF) y ácido acético (derivado de la hidrólisis de los grupos acetilo). Además, cuando el xilano se somete al proceso hidrotérmico bajo condiciones de temperatura suaves, se producen xilooligosacáridos (XOS) y xilosa de elevada masa molecular, siendo éstos los productos mayoritarios derivados de las hemicelulosas presentes en el licor de autohidrólisis. Bajo condiciones de operación severas, la xilosa se puede deshidratar formando furfural, que a su vez puede derivar en otros productos de degradación (Ruiz *et al.*, 2013).

4.6.2.3. Efectos sobre la lignina

La lignina se encuentra siempre asociada con las hemicelulosas, no sólo mezclada físicamente sino también a través de enlaces covalentes. Durante el proceso hidrotérmico, los enlaces lignina y lignina-hemicelulosa pueden romperse, despolimerizarse parcialmente y

relocalizarse (figura 4.2). Además, la fracción de lignina solubilizada depende de las condiciones de operación (severidad de las condiciones de reacción) y de la materia prima. Lora y Wyman (1978) y Bobleter y Concini (1979) sugieren un mecanismo de dos fases para la reacción de la lignina (Ruiz *et al.*, 2013):

- ✚ **Primera fase** que constaría de una reacción muy rápida donde los fragmentos de lignina con bajo peso molecular y elevada reactividad se solubilizan debido a la ruptura de los enlaces lignina-carbohidratos en fragmentos solubles.
- ✚ **Segunda fase** en la cual sucede una reacción más lenta donde los fragmentos solubles reaccionan entre ellos por recondensación y repolimerización de la lignina que también ocurre en presencia de ácidos orgánicos liberados en el proceso hidrotérmico.

Por otro lado, la despolimerización parcial de la lignina y la rotura de las uniones lignina-hemicelulosa produce parte de los compuestos fenólicos presentes en los licores de hidrotérmico.

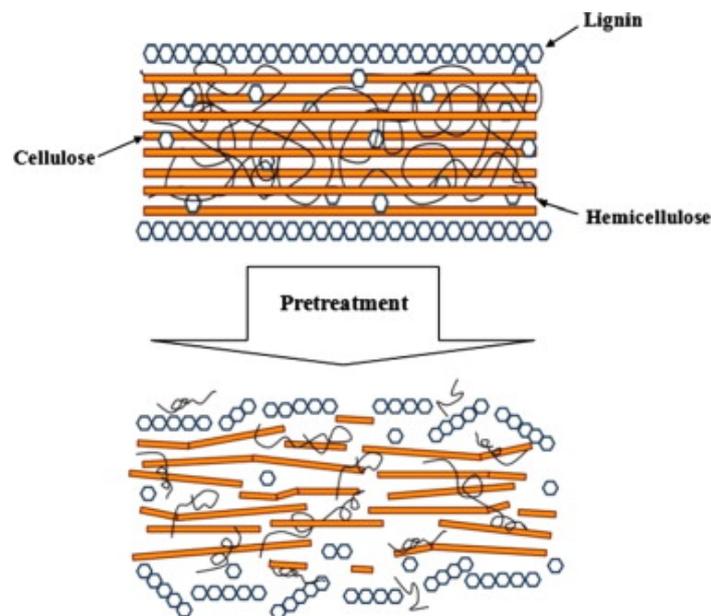


Figura 4.2: Esquema del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.

Fuente: Mood *et al.*, 2013.

4.7. PRETRATAMIENTO QUÍMICO: PROCESO ORGANOSOLV

El objetivo del proceso organosolv es solubilizar la lignina, dejando la mayor parte posible de la celulosa en la fase sólida, obteniendo de la biomasa una elevada concentración de celulosa adecuada para los procesos biológicos *downstream* a costes moderados y limitando la formación de inhibidores. El objetivo de la aplicación del proceso organosolv en la presente Tesis doctoral es eliminar la máxima cantidad de lignina de la fase sólida tras el pretratamiento de autohidrólisis, facilitando el acceso de las enzimas a la celulosa y favoreciendo, en consecuencia, el proceso de hidrólisis enzimática en los experimentos de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF). Se puede emplear una mezcla de disolventes orgánicos u orgánicos acuosos para descomponer y solubilizar los constituyentes de la biomasa, en particular la lignina y parte de las hemicelulosas. En este proceso, la celulosa permanece en la fase sólida. Entre los disolventes aptos para este propósito, los más relevantes son metanol, etanol, acetona, etileno y glicol. En bibliografía se ha descrito el uso de catalizadores, sin embargo, una temperatura de operación elevada (160-200°C) es suficiente para conseguir una buena deslignificación, limitando la necesidad de catalizadores (Aziz and Sarkanen, 1989).

4.7.1. REACCIONES DE LA LIGNINA Y LOS CARBOHIDRATOS DURANTE EL PROCESO ORGANOSOLV SIN CATALIZADORES

La concentración de alcohol y la dureza de la reacción son factores determinantes que influyen en la eliminación de la lignina. Así, una concentración relativamente baja de alcohol conlleva la despolimerización de la lignina a través de las rupturas de los enlaces éter α y β , formando fragmentos de lignina con bajos pesos moleculares. Una baja concentración de etanol da como resultado una elevada concentración de iones hidronio (H_3O^+), reduciendo por tanto, el grado de polimerización de la lignina. La rotura del éter α -arílico forma un carbocatión benzílico que puede reaccionar con agua o etanol produciendo la despolimerización de la lignina. La ruptura de los enlaces éter β -arílicos de la lignina se puede explicar por el mecanismo que conlleva la pérdida del grupo γ -metílico y la eliminación de formaldehído. El éter enólico es hidrolizado a la forma de guayacol y acetaldehído 2(4-hidroxi-3-metoxifenil), y el guayacol es desmetilado a catecol. Los enlaces β -O-4 se rompen en forma de enlaces β -1, y serán degradados posteriormente para producir estilbenos en condiciones ácidas. Con el aumento de la severidad del proceso de fraccionamiento, las unidades fenólicas siringil y las fenólicas condensadas aumentan, disminuyendo los grupos alifáticos hidroxílicos en la lignina disuelta.

Además, las reacciones de condensación también tienen lugar durante el proceso de fraccionamiento organosolv. El ácido acético liberado en la hidrólisis de los grupos acetilo de las hemicelulosas protonan los grupos OH en los C_α de la lignina, formando carbocationes reactivos, fácilmente enlazables con átomos de carbono rico en electrones (C5 o C6) de otro anillo aromático. El carbocatión benzílico formado durante la escisión del éter α-arílico se puede unir también con un átomo de carbono rico en electrones de otro anillo aromático. El fraccionamiento con etanol conlleva a la despolimerización de la celulosa y a una disminución de la polidispersidad de la celulosa. Dado que el grado de polimerización de la celulosa se reduce, el número de extremos reductores de la celulosa aumenta (Li *et al.*, 2015).

Debido al coste de los disolventes, el etanol y el metanol son preferibles frente a otros alcoholes con puntos de ebullición más elevados: etileno, glicol, alcohol tetrahydrofurfurílico. Sin embargo, aunque el etanol es un disolvente común, es un inhibidor del proceso hidrolítico. En general, un tema crucial en el proceso organosolv es la fase de recuperación del disolvente. Los disolventes empleados en el proceso necesitan ser drenados desde el reactor, evaporados, condensados y reciclados para reducir los costes operacionales. La destilación simple parece ser la solución preferible para la recuperación de disolventes. La optimización simultánea de todas las operaciones unitarias es una tarea fundamental para hacer rentable el proceso organosolv (Chiaramonti *et al.*, 2012).

García y colaboradores (2011) sometieron a simulación un proceso de fraccionamiento basado en etanol (Alcell® (figura 4.3)) con el objetivo de realizar una evaluación económica y obtener las condiciones de operación apropiadas. La materia prima se mezcló con una solución de etanol al 60% y una RLS 6/1 a 160°C durante 90 minutos. Los productos obtenidos consistieron en una fracción sólida húmeda (principalmente celulosa) y una fracción líquida (hemicelulosas disueltas, lignina y disolvente remanente) la cual fue sometida a ultrafiltración, precipitación y destilación para preparar los productos y reciclar los disolventes. Mediante simulaciones informáticas, las demandas de calentamiento y enfriamiento se redujeron en un 34,7% y 49,5%, respectivamente, haciendo que el proceso fuera competitivo (Li *et al.*, 2016, García *et al.*, 2011).

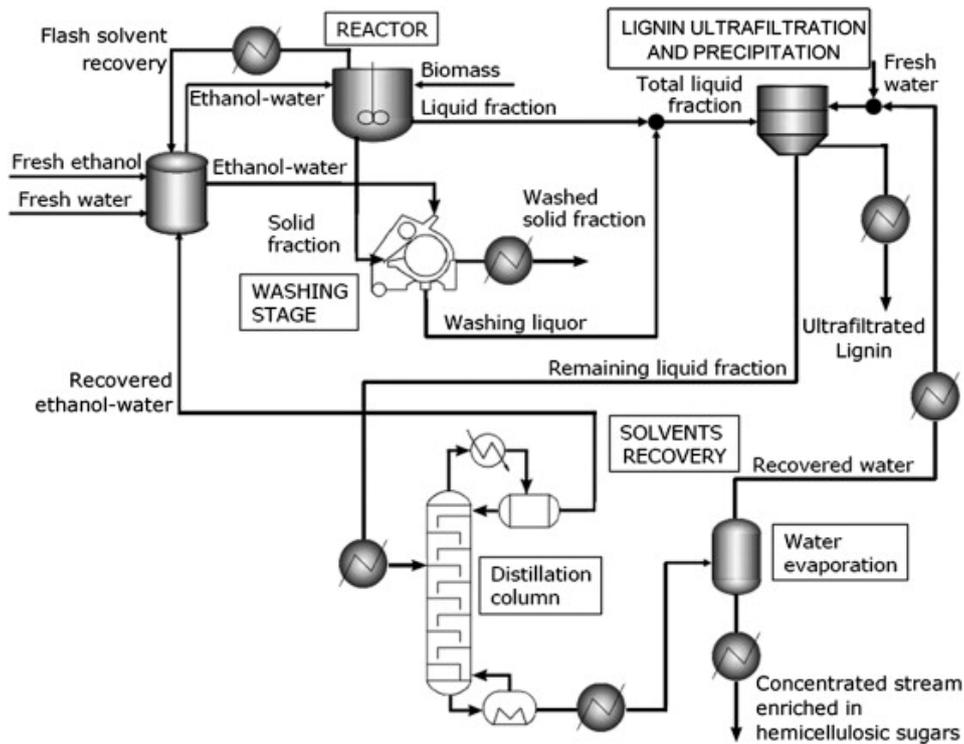


Figura 4.3: Diagrama del proceso de biorefinería organosolv-etanol.

Fuente: García *et al.*, 2011.

4.8. APROVECHAMIENTO DE LA FRACCIÓN SÓLIDA PROCEDENTE DE LOS PRETRATAMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL

4.8.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CELULOSA

La hidrólisis mediante las enzimas apropiadas representa un método muy efectivo para liberar azúcares simples procedentes de materiales lignocelulósicos. La hidrólisis de la celulosa está catalizada por una clase de enzimas conocidas como celulasas. Estas enzimas pueden ser producidas por hongos como *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* y/o bacterias como *Clostridium cellulovorans*. Al menos tres grupos mayoritarios de enzimas denominadas endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas están involucradas en la hidrólisis de la celulosa a glucosa, siendo sus acciones sinérgicas. Las endoglucanasas (figura 4.4) atacan regiones de baja cristalinidad en la fibra de celulosa y crea extremos libres en la cadena. Las exoglucanasas (figura 4.5) acortan la molécula mediante la generación de moléculas de celobiosa de la cadena con extremos libres, que es hidrolizada a glucosa por la acción de la β -glucosidasa (figura 4.6). La hidrólisis enzimática puede estar influenciada por las concentraciones de sustrato y producto final, actividad enzimática y condiciones de reacción. La β -glucosidasa juega un papel importante en el proceso de hidrólisis, ya que la celobiosa es un producto final inhibidor de muchas celulasas incluyendo las exo y endoglucanasas (Galbe

and Zacchi, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002). La β -glucosidasa, a su vez, es inhibida por la glucosa siendo la hidrólisis enzimática sensible a la concentración de sustrato (Talebnia *et al.*, 2010).

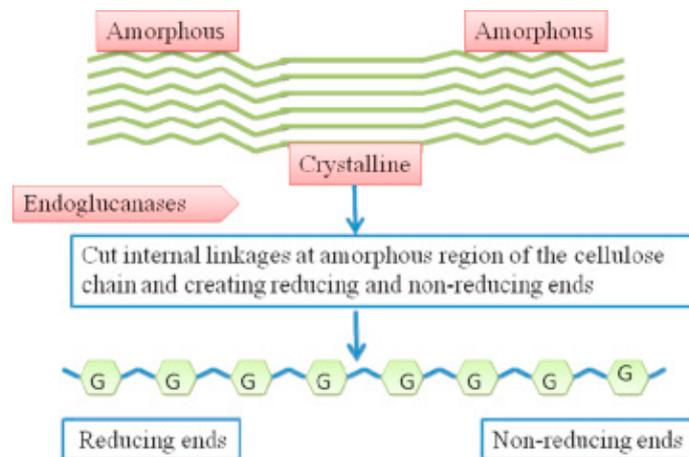


Figura 4.4: Función de las endoglucanasas.

Fuente: Gupta and Verma, 2015.

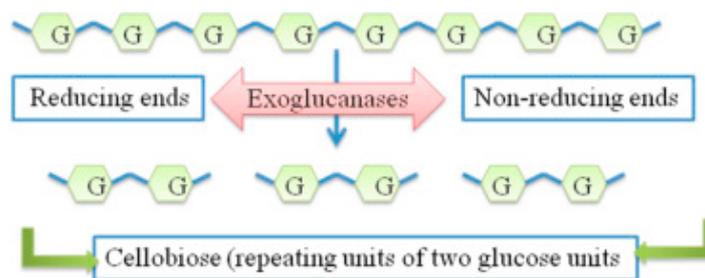


Figura 4.5: Función de las exoglucanasas.

Fuente: Gupta and Verma, 2015.

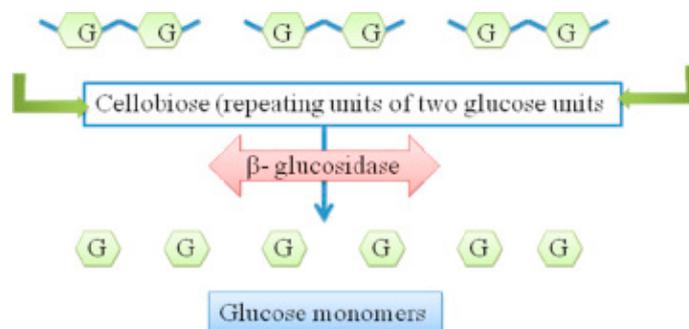


Figura 4.6: Función de las β -glucosidasas.

Fuente: Gupta and Verma, 2015.

El pretratamiento de los materiales lignocelulósicos así como las condiciones de hidrólisis; temperatura y pH, están entre los factores que influyen en la eficiencia de la hidrólisis enzimática. La mayoría de las enzimas celulasas muestran una actividad óptima a temperaturas entre 45 y 55°C y un pH entre 4 y 5 (Galbe and Zacchi, 2002). En estudios de laboratorio se emplea una dosis de celulasa de 10-30 (FPU/g celulosa) ya que producen una hidrólisis con un rendimiento de glucosa elevado en un tiempo relativamente corto (48-72h). Sin embargo, la carga de enzimas puede variar dependiendo del pretratamiento, tipo y concentración de la materia prima (Talebna *et al.*, 2010).

La acción de las enzimas celulolíticas tiene lugar en tres etapas: adsorción, biodegradación y desorción. La actividad de la celulasa disminuye durante la hidrólisis y se cree que la adsorción irreversible de la enzima en la celulosa es parcialmente responsable de su desactivación (Talebna *et al.*, 2010).

4.8.1.1. Factores limitantes de la hidrólisis enzimática

Algunos de los factores principales que influyen en la hidrólisis enzimática de la celulosa de los materiales lignocelulósicos están relacionados con el sustrato. Estos factores limitantes de la hidrólisis enzimática están directamente conectados con el pretratamiento aplicado. A continuación, se presentan los más importantes (Alvira *et al.*, 2010):

- ✚ **Cristalinidad de la celulosa (índice de cristalinidad, CrI):** el pretratamiento de los materiales lignocelulósicos mejora la capacidad de hidrolizarse pero en algunos casos aumenta el CrI de la fracción celulósica. Este hecho parece estar provocado por la eliminación de lignina o por la reducción de la celulosa amorfa tras llevar a cabo pretratamientos como, por ejemplo, la explosión de vapor. Por el contrario, los pretratamientos a elevados valores de pH han mostrado tener un menor efecto e incluso reducir la cristalinidad de la biomasa en algunos casos (Kumar and Wyman, 2009).
- ✚ **Grado de polimerización de la celulosa:** el grado de polimerización está relacionado con otras características del sustrato, como la cristalinidad. Durante la hidrólisis enzimática, las endoglucanasas cortan por sitios internos las cadenas de celulosa, siendo responsables de la disminución del grado de polimerización de los sustratos celulósicos. Sin embargo, independientemente de que el sustrato sea atacado, parece existir una nivelación del grado de polimerización de la celulosa relacionado con el

aumento de recalcitrancia de la celulosa cristalina residual (Mansfield *et al.*, 1999). Se ha demostrado que los pretratamientos afectan a la longitud de la cadena de celulosa disminuyendo el grado de polimerización, sugiriendo que la eliminación de xilanos presenta un mayor impacto en la longitud de la cadena de celulosa que la eliminación de la lignina (Kumar and Wyman, 2009).

- ✚ **Área superficial disponible del sustrato (volumen de los poros):** la accesibilidad del sustrato a las enzimas celulolíticas es uno de los factores que más influyen en el proceso de hidrólisis. Por tanto, uno de los objetivos principales del pretratamiento es aumentar el área superficial disponible para el ataque enzimático.
- ✚ **Barrera de lignina (contenido y distribución):** la presencia de lignina y hemicelulosas dificulta el acceso de las enzimas celulasas a la celulosa, reduciendo así la eficacia de la hidrólisis. La lignina, por tanto, limita la velocidad de la hidrólisis enzimática actuando como barrera física.
- ✚ **Contenido de hemicelulosas:** la eliminación de las hemicelulosas aumenta el tamaño medio de poro del sustrato y, por tanto, incrementa la accesibilidad y la probabilidad de que la celulosa sea hidrolizada (Chandra *et al.*, 2007).
- ✚ **Tamaño de partícula de la materia prima:** existen evidencias que sostienen que la reducción del tamaño de partícula aumenta el área superficial específica y, por consiguiente, la accesibilidad de las enzimas a la celulosa (Sun and Cheng, 2002).
- ✚ **Porosidad:** el tamaño de poro del sustrato en relación con el tamaño de las enzimas es el factor limitante principal en la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica (Chandra *et al.*, 2007). Las celulasas pueden quedar atrapadas en los poros si el área interna es mucho mayor que el área externa, siendo este el caso de muchos materiales lignocelulósicos. Un aumento de la porosidad mediante procesos de pretratamiento puede mejorar de manera significativa la hidrólisis.
- ✚ **Espesor de la pared celular:** La barrera de cera que contiene la cutícula de las plantas y la corteza de los árboles impide la entrada de las enzimas.

4.8.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LAS HEMICELULOSAS RESIDUALES EN LA FRACCIÓN SÓLIDA

En ciertas ocasiones se requiere una reducción de la severidad del pretratamiento para disminuir el coste económico. Un factor de severidad bajo produce una menor liberación de azúcares y por consiguiente, hará necesario el uso de una mayor cantidad de enzimas, así como de diferentes tipos de las mismas para conseguir altas conversiones de azúcares a partir de las fracciones celulósica y hemicelulósica. En este contexto, el desarrollo de hemicelulasas y otras enzimas accesorias necesarias para la completa degradación de los componentes lignocelulósicos se ha convertido en una cuestión importante (Alvira *et al.*, 2010).

Los pretratamientos normalmente buscan la eliminación completa de las hemicelulasas para mejorar la hidrólisis de la celulosa. Por tanto, el impacto de la hidrólisis enzimática de las fibras de hemicelulosa en la hidrólisis de la celulosa no se consideró importante hasta hace poco tiempo. Se puede esperar que la actividad hemicelulolítica en las preparaciones de celulosa sean lo suficientemente altas para proporcionar la hidrólisis necesaria de la hemicelulosa residual en la matriz sólida. En la tabla 4.4 se presenta el patrón de actividad enzimática de una celulosa comercial típica (*Celluclast* de *Novozymes*), complementada con β -xilosidasa (*Novozym 188*).

| Actividades celulasa y hemicelulasa | Actividad |
|-------------------------------------|-------------|
| FPU* | 20 FPU/g |
| HEC* | 6100 nkat/g |
| Mananasa | 1200 nkat/g |
| Xilanasa | 8200 nkat/g |
| β -glucosidasa | 950 nkat/g |
| β -manosidasa | 15 nkat/g |
| β -xilosidasa | 100 nkat/g |
| α -arabinosidasa | 160 nkat/g |
| α -galactosidasa | 140 nkat/g |

Tabla 4.4. Actividades celulasa y hemicelulasa en *Celluclast* complementada con β -xilosidasa (*Novozym 188*;

*actividad β -glucosidasa excluida), calculada en una dosis FPU de 20 FPU/G de sustrato.

Fuente: Adaptada de Wyman *et al.*, 2004.

Como se puede observar en la tabla 4.4, a una concentración de celulosa, empleada frecuentemente, de 20 FPU/g de sustrato, la actividad xilanasa correspondiente es aproximadamente 8200 nkat/g de sustrato. El katal (kat) es una unidad derivada del sistema internacional empleada para cuantificar la actividad catalítica de las enzimas. Un katal es la cantidad de enzima que convierte un mol de sustrato por segundo. Si se estima por gramo de

xilano en el sustrato, la dosis de xilanasas se hace aún mayor, ya que el contenido de xilano residual en el sustrato se encuentra normalmente por debajo del 10% del peso seco. Las actividades de las enzimas accesorias son bastante bajas, pero su papel en la solubilización del xilano enlazado en la matriz es menos significativo. La actividad de la acetil-esterasa, sin embargo, podría jugar un papel crucial si la materia prima se encuentra aún acetilada.

Existen estudios sobre la hidrólisis de los xilanos en sustratos de matrices de fibras enlazadas en las pastas celulósicas pero no con el objetivo de hidrolizar la celulosa. En tales experimentos se ha encontrado que la mayoría de las enzimas tienen efectos mínimos en la hidrólisis de los xilanos (Viikari *et al.*, 1994). Aunque los sustratos de las pastas difieren significativamente de los materiales lignocelulósicos pretratados, por ejemplo con respecto al grado de acetilación, estos resultados son extrapolables a otros sustratos. En dichos estudios se concluye que si el sustrato sólido contiene xilano desacetilado, las xilanasas por sí mismas deberían de ser capaces de solubilizar los xilanos a oligómeros. Sin embargo, si la matriz fibrosa contiene grupos acetilo, éstos podrían restringir la hidrólisis (Wyman *et al.*, 2004).

4.8.3. FERMENTACIÓN A ETANOL DE LA FRACCIÓN SÓLIDA CELULÓSICA: PROCESO DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF)

Como se ha comentado anteriormente, la conversión enzimática de celulosa a etanol implica operaciones separadas de pretratamiento de la biomasa para abrir su estructura y permitir el ataque enzimático y liberar glucosa que será posteriormente fermentada a etanol. Con el tiempo, apareció el concepto de hidrólisis y fermentación separada o SHF para designar esta secuencia de operaciones. Los avances realizados concernientes al pretratamiento y a las enzimas celulolíticas mejoraron el rendimiento del proceso SHF aumentando la accesibilidad de la enzima al sustrato, favoreciendo el balance y el nivel de actividad enzimática, respectivamente. Desafortunadamente, la glucosa y, parcialmente la celobiosa, son potentes inhibidores de la acción celulasa. Aunque los rendimientos se pueden mejorar añadiendo altas cargas de celulosa, esta estrategia origina unos costes enzimáticos excesivos (Wyman *et al.*, 2004).

Una estrategia alternativa es la conocida como proceso de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) que fue descrita por primera vez en una patente de Gauss *et al.* (1976) y usada en 1977 por el mismo grupo de investigación (Takagi *et al.*, 1977; Paulova *et al.*, 2015). El proceso SSF integra la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico pretratado con la fermentación de la glucosa liberada en una sola etapa, llevada a cabo simultáneamente

en un único reactor para convertir rápidamente la glucosa en etanol a medida que es liberada, reduciendo la acumulación de este poderoso inhibidor de la actividad celulásica (figura 4.7). La influencia de la acumulación de la glucosa en la actividad de las enzimas celulolíticas fue demostrada en el modelo desarrollado por Oh *et al.* (2000), quienes encontraron que la velocidad de hidrólisis de celulosa inicial disminuía entre un 20% y un 60% debido a la inhibición de la enzima a concentraciones de glucosa de 5 y 20 g/L, respectivamente. Por tanto, la eliminación de la acumulación de glucosa mejora la velocidad de hidrólisis de la celulosa y, por consiguiente, acorta el tiempo de operación (Paulova *et al.*, 2015).

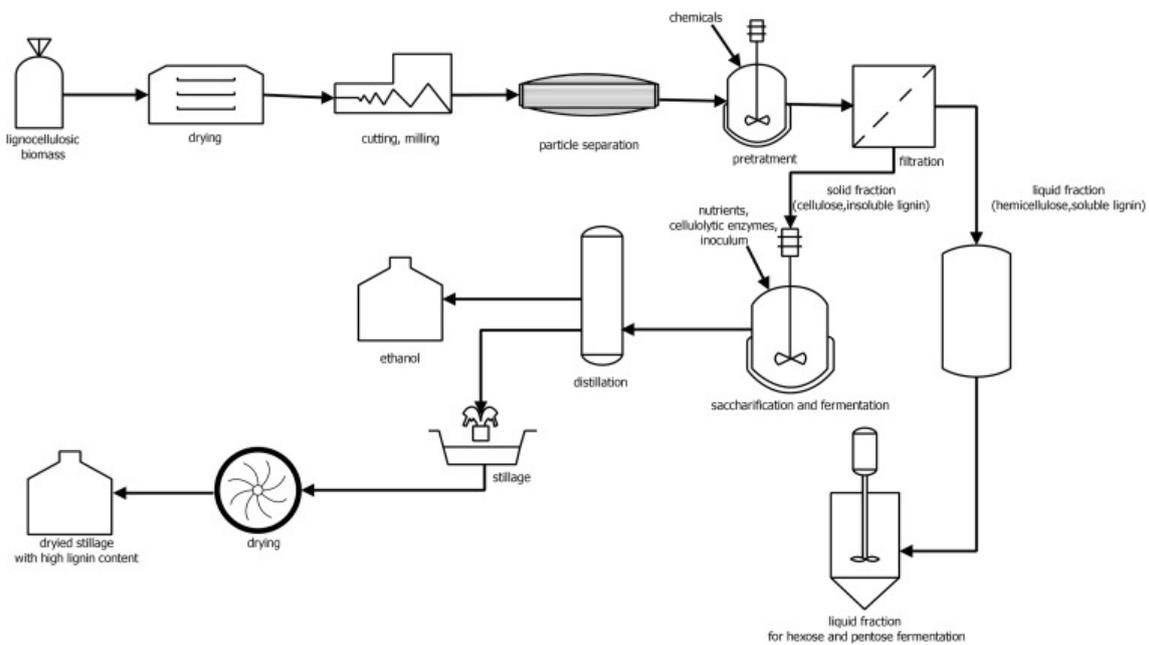


Figura 4.7. Operaciones unitarias del proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF).

Fuente: Paulova *et al.*, 2015

Aunque la temperatura del proceso SSF tiene que reducirse por debajo de la temperatura óptima de trabajo de las enzimas celulolíticas (normalmente entre 45-50°C), para adaptarse a la menor temperatura de tolerancia de los organismos fermentativos (28-37°C), la SSF resulta mejor en términos de velocidades, rendimientos, y concentraciones de etanol frente a la hidrólisis separada llevada a cabo a temperaturas más elevadas que son óptimas para el desarrollo de funciones de la celulasa (Wyman *et al.*, 2004). Alternativamente es necesario llegar a una solución de compromiso entre ambas temperaturas, normalmente alrededor de 37°C. Esto tiene dos consecuencias: la primera afecta a la velocidad con la que la glucosa se libera de la celulosa, pudiendo causar limitaciones de carbono que afectan a la fermentación; y la segunda afecta la actividad de las enzimas celulolíticas disminuyendo el metabolismo de la cepa microbiana. Ambas consecuencias dan lugar a una productividad

reducida y obteniendo a menudo una concentración final menor de etanol (Paulova *et al.*, 2015).

Siguiendo con la identificación de la configuración de la SSF, a mitad de los años 70 se buscaron organismos fermentativos que tolerasen el estrés combinado de altas temperaturas (para aumentar la velocidad de hidrólisis), bajos niveles de glucosa (debido al rápido metabolismo del azúcar del organismo), y altas concentraciones de etanol. Sin embargo, se encontró que era más importante la rápida conversión de celobiosa a glucosa que la temperatura de fermentación (Wright *et al.*, 1987). Investigaciones posteriores mostraron que el cocultivo de un organismo fermentativo de celobiosa menos tolerante al etanol *Brettanomyces clausenii*, con uno más tolerante al etanol, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mejoraba el rendimiento, y más tarde se vio que otra levadura, *Bretanomyces custerii*, fermentaba la celobiosa directamente a etanol y además presentaba tolerancia a etanol, eliminando la necesidad del sistema de cocultivo (Spindler *et al.*, 1992). Más recientemente, se ha llevado a cabo la modificación genética de bacterias para fermentar xilosa a etanol y también fermentar celobiosa a etanol tanto de manera natural como a través de modificaciones genéticas. Además, estos organismos han sido genéticamente modificados para producir endoglucanasa además de fermentar la celobiosa (Zhou and Ingram, 2001). Dichas cepas pueden utilizar una fracción sustancial de celulosa amorfa y podrían también reducir la necesidad añadir enzimas si se aplicase una mezcla rica en celobiohidrolasa (Wyman *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la *Kluyveromyces marxianus* es una buena candidata para un proceso de SSF llevado a cabo a temperatura elevada, ya que muchas cepas pueden producir etanol de manera eficiente a 38-45°C, y también son capaces de utilizar arabinosa, galactosa, manosa o xilosa presentes en el medio lignocelulósico. Otros autores (Kádar *et al.*, 2004) observan ninguna diferencia significativa entre *S. cerevisiae* y *K. marxianus* con respecto al rendimiento en etanol conseguido durante el proceso SSF. Ambos valores se encontraron en el rango de 0,31-0,34 g/g. Recientemente se han aislado y caracterizado algunas cepas termotolerantes de *S. cerevisiae* que pueden ser explotadas para la producción de etanol (Shahsavarani *et al.*, 2012). Algunas cepas genéticamente modificadas de *Hansenula polymorpha* o *Candida glabrata* también tienen potencial para llevar a cabo SSF a elevadas temperaturas. Las investigaciones en desarrollo continúan en la búsqueda de organismos fermentativos que sean tolerantes a la temperatura y posean otras características que se ajusten mejor con las condiciones de operación preferidas por la celulasa.

Diversas investigaciones (Boyle *et al.*, 1997; Cho and Yo, 1999; Bollok *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2001) han aplicado la SSF en una amplia variedad de materias primas pretratadas bajo diversas condiciones. El hecho de combinar la SSF con la fermentación de azúcares hemicelulósicos ha recibido especial atención como modo de obtener etanol y otros productos. Asimismo, la SSF se ha aplicado en procesos *Fed-batch* y continuos, los cuales ofrecen ventajas para la manufactura de productos a partir de materiales celulósicos comparados con configuraciones más convencionales en modo *batch*. Estas ventajas incluyen disminución del tiempo de operación, así como menores costes de operación (Wyman *et al.*, 2004). La adición en *Fed-batch* del material pretratado es un método para aumentar las concentraciones de azúcar en el proceso. Permite dosificar el sustrato de manera repartida durante un periodo más largo de tiempo, y por consiguiente disminuir la viscosidad de manera gradual en el biorreactor comparado con el modo *batch*. El primer lote o adición se licúa por la acción de las enzimas celulolíticas hasta la siguiente adición de sustrato (Paulova *et al.*, 2015). En la presente Tesis doctoral se emplean ambos métodos; el método *batch* en el que todo el sustrato limitante se adiciona al inicio de la fermentación; y el modo *Fed-batch*, en el que el sustrato limitante, biomasa lignocelulósica pretratada, así como los nutrientes se añaden en diferentes lotes al biorreactor (Wyman *et al.*, 2004).

La tecnología SSF ha mostrado ser una candidata líder para aplicaciones a corto plazo y parece ser que permanecerá así hasta que se desarrollen nuevas celulasas que trabajen mucho más rápido, con una inhibición por producto mínima, y a elevadas temperaturas (Wyman *et al.*, 2004).

4.8.3.1. *Saccharomyces cerevisiae* en el proceso de producción de etanol

La levadura es el organismo eucariótico más simple de nuestros días. Son microorganismos unicelulares clasificados en el reino Fungi. Hoy en día la levadura se ha convertido en un microorganismo clave para muchos tipos de producciones industriales y alimentarias.

En el metabolismo de la levadura, su energía química, en forma de ATP, proviene de la oxidación de moléculas orgánicas y es usada como recurso energético por la célula. Las levaduras metabolizan diversos azúcares, hexosas como glucosa, fructosa, galactosa o manosa; o en algunos casos pueden usar pentosas como xilosa o arabinosa; o disacáridos como maltosa o sacarosa, aunque la glucosa y la fructosa son los sustratos preferidos. Las rutas metabólicas para la asimilación de hexosas y disacáridos comparten las mismas etapas, produciéndose la

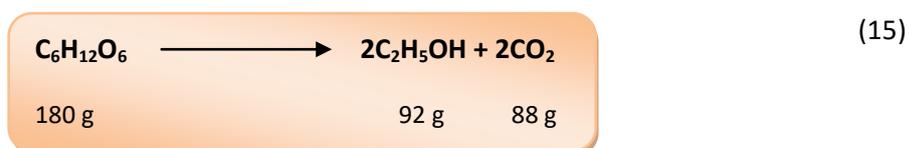
mayoría de los elementos metabólicos a partir de los intermediarios de la glicólisis; y la ruta de las pentosas fosfato, difiriendo sólo en las etapas básicas iniciales del metabolismo.

La conversión del azúcar puede ocurrir en un ambiente anaeróbico o aeróbico. El primer caso es la llamada fermentación; y en presencia de oxígeno se llama respiración. El proceso más común para la conversión de la glucosa generalmente es conocido como fermentación alcohólica, el cual ocurre anaeróbicamente obteniéndose como productos finales etanol y CO₂.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es responsable del 95 % de la producción de etanol, pero presenta el inconveniente de no fermentar las pentosas (que en materiales agrícolas y maderas duras son los monómeros mayoritarios de la fracción hemicelulósica). Esta levadura fermenta diversos sustratos, incluyendo disacáridos de sacarosa y maltosa que pueden ser asimilados mediante dos mecanismos (Romaní, 2011):

- ✚ Los disacáridos son hidrolizados por enzimas extracelulares y los monosacáridos son transportados al interior de la célula.
- ✚ Los disacáridos son transportados al interior de la célula e hidrolizados por enzimas intracelulares.

Como se ha comentado anteriormente, la glucosa es el sustrato de preferencia para ser metabolizado, por lo que hasta que no desaparece no se consumen otros azúcares como maltosa y maltotriosa. La ecuación estequiométrica (ec. 15) de la producción de etanol a partir de glucosa por vía fermentativa, fue descrita por Gay-Lussac en 1810:



Aunque la fermentación normalmente se da en ausencia de oxígeno, no es una regla estricta. Incluso en presencia de elevados niveles de oxígeno, si los azúcares se encuentran totalmente accesibles para ser metabolizados, las levaduras escogen fermentar en lugar de respirar. Este fenómeno es conocido como *efecto Crabtree*. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura *Crabtree negativa* ya que es capaz de producir etanol aeróbicamente en presencia de elevadas concentraciones de glucosa en el exterior (Faria-Oliveira *et al.*, 2013).

La glucosa puede ser utilizada por *S. cerevisiae* como única fuente de carbono y energía. Llega al citosol de la célula después de atravesar la pared celular (permeable a los azúcares) y la membrana plasmática a través de proteínas transportadores (permeasas) por el proceso de difusión facilitada (aprovechando la mayor concentración de monosacáridos).

4.8.3.1.1. Ruta Embden-Meyerhof

La levadura sigue el camino glucolítico por la vía *Embden-Meyerhof*. Desde la glucosa hasta la síntesis de etanol, se dan 6 etapas fundamentales (figura 4.8) (Faria-Oliveira *et al.*, 2013):

- 1ª) **Formación de hexosas fosfato:** la primera etapa de la ruta glucolítica consiste en la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato por la acción de las hexoquinasas (Hxkp) y la glucoquinasa (Glkp), las cuales están relacionadas con la alta afinidad de captación de glucosa. A continuación, la glucosa-6-fosfato es isomerizada por la fosfoglucosa isomerasa a fructosa-6-fosfato. A continuación, la fructosa-6-fosfato es convertida por la fosfofructoquinasa (Pfkp), la cual requiere energía en forma de ATP, en fructosa-1,6-difosfato.
- 2ª) **Formación de triosas fosfato:** la enzima aldolasa (fructosa 1,6-difosfato aldolasa, Fbap) cataliza la rotura reversible de fructosa-1,6-difosfato en dos moléculas de tres carbonos, el gliceraldehído-3-fosfato y su isómero dihidroxiacetonafosfato. Estos dos compuestos se pueden convertir entre ellos, de nuevo, de manera reversible, por la triosafosfato isomerasa (Tpip).
- 3ª) **Oxidación de gliceraldehído-3-fosfato:** el gliceraldehído-3-fosfato es primeramente oxidado por NAD^+ (con la producción de NADH, el cual formará parte del proceso en las etapas últimas de la glicólisis cuando el acetaldehído dé etanol) y después fosforilado, bajo la catálisis de la 3-fosfato deshidrogenasa (Tdhp). El 1,3-difosfoglicerato resultante, por la acción de la fosfoglicerato quinasa (pgkp), dona un grupo fosfato a una molécula de ADP originando el 3-fosfoglicerato, liberando una molécula de energía (ATP). A continuación, se produce una reubicación del grupo fosfato en la posición 2, llevada a cabo por la fosfoglicerato mutasa (pgmp); preparando, de esta forma, la siguiente reacción, la deshidratación por la enolasa (Enop) y de la cual resulta el fosfoenol piruvato, una molécula de elevada energía
- 4ª) **Formación del piruvato:** El fosfoenol piruvato formado en la etapa anterior es fosforilado por la piruvato quinasa (Pykp) dando piruvato y liberando también otra molécula de ATP.

5ª) Descarboxilación del piruvato: en la fermentación alcohólica, el piruvato es descarboxilado para dar acetaldehído y CO_2 , por la acción de la piruvato descarboxilasa (Pdc1p).

6ª) Reducción del acetaldehído: en la reacción final, catalizada por la alcohol deshidrogenasa (Adhp), el acetaldehído es reducido produciendo etanol y promoviendo la reoxidación del NADH a NAD^+ .

Al mismo tiempo, y además de las dos moléculas de CO_2 y etanol formadas por molécula de glucosa, el azúcar es incorporado en otros subproductos como la biomasa de la levadura, ácidos (pirúvico, acetaldehído). Asimismo, hay que tener en cuenta que a la fermentación va asociada un crecimiento del cultivo y, por tanto, la composición de la biomasa se oxida más que la glucosa. En consecuencia, se puede obtener un exceso de equivalentes de reducción. La forma en la que las levaduras eluden este problema, bajo condiciones anaeróbicas, consiste en la producción de glicerol por reducción del intermediario glucolítico dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato catalizado por NAD^+ (dependiente de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, y su posterior desfosforilación debido a la acción de la glicerol-3-fosfatasa (Parés y Juárez, 1997; Faria-Oliveira *et al.*, 2013).

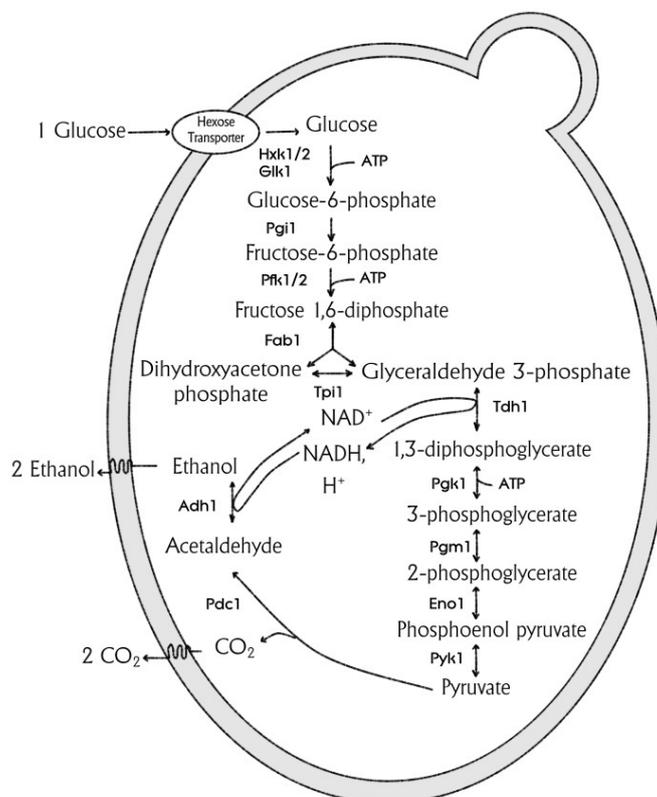


Figura 4.8: Fermentación alcohólica. Etapas enzimáticas en *S. cerevisiae*

Fuente: Faria-Oliveira *et al.*, 2013.

4.8.3.2. Factores que influyen en el proceso de producción de bioetanol

Los factores más influyentes en el proceso de producción de bioetanol son nutricionales, de aireación, pH, temperatura y presencia de compuestos inhibidores en el medio (Romaní, 2011).

4.8.3.2.1. Requerimientos nutricionales

El cultivo de los microorganismos debe realizarse en condiciones adecuadas que permitan llevar a cabo el mantenimiento y crecimiento celular, además de la producción del producto deseado. Para ello, los microorganismos deben disponer de los nutrientes necesarios (carbono, nitrógeno, elementos minerales y vitaminas).

✚ **Fuente de carbono:** la levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede emplear como fuente de carbono y energía, en primer lugar glucosa y sacarosa, aunque también puede usar fructosa, galactosa, manosa, maltosa y suero hidrolizado, además de etanol. La concentración de la fuente de carbono afecta a la velocidad de la fermentación, y al comportamiento y desarrollo de las células de la levadura. La concentración adecuada de azúcar se sitúa entre el 10 y el 18%. En concentraciones superiores se observa deficiencia respiratoria en la levadura, y un descenso de la velocidad de fermentación; y en concentraciones inferiores o muy bajas el proceso no es económico, lo que implica la necesidad de un mayor volumen para la fermentación.

✚ **Fuente de nitrógeno:** las levaduras tienen un contenido en nitrógeno alrededor del 10% en peso, por lo que el nitrógeno debe ser un constituyente importante del medio de crecimiento. El nitrógeno asimilable debe administrarse en forma de amoníaco, urea o sales de amonio, aunque también pueden emplear mezclas de aminoácidos. Ni el nitrato, ni el nitrito pueden ser asimilados. Se han encontrado numerosas sales de amonio inorgánicas responsables del crecimiento de *Saccharomyces*, como acetato, carbonato, bicarbonato, lactato, sulfato, tartrato, y mono-, di-, tri- fosfato de amonio. El sulfato de amonio es la fuente de nitrógeno más usada, porque además proporciona azufre. La urea también puede ser asimilada por *Saccharomyces* como fuente de nitrógeno, y se utiliza industrialmente, pero para obtener un crecimiento comparable al de las sales de amonio, es necesario administrar vitaminas como la biotina, para facilitar su administración.

- ✚ **Fósforo:** el fósforo es un elemento esencial para el crecimiento de todas las levaduras, ya que controla la síntesis de lípidos y carbohidratos y mantiene la integridad de la pared celular. Las levaduras toman el fosfato como anión monovalente H_2PO_4^- , por el contrario, el anión divalente no es absorbido. La cantidad de fosfato asimilado depende de la cantidad aportada. El H_2PO_4^- es añadido normalmente en concentraciones de 0,6 mM/g, para la obtención de tasas de fermentación adecuadas.

- ✚ **Azufre:** constituye alrededor del 0,4% del peso celular de las levaduras. La levadura *Saccharomyces* puede conseguir el azufre a partir de sales inorgánicas (sulfatos, sulfitos o tiosulfato), que son reducidos a aminoácidos dentro de la célula. Aunque la metionina es la fuente de azufre más adecuada, generalmente, la fuente de azufre elegida para las fermentaciones industriales es el sulfato de amonio por su bajo coste.

- ✚ **Oligoelementos:** los oligoelementos requeridos por la levadura *Saccharomyces* para un crecimiento activo son macroelementos (K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn y Cl), en concentraciones entre 0,1-1 mM; microelementos (Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni, V) entre 0,1-100 μM y los inhibidores (Ag, As, Ba, Hg, Li, Ni, Os, Pb, Se, Te), que pueden afectar negativamente al crecimiento cuando se encuentran en concentraciones por encima de 100 μM .

4.8.3.2.2. Aireación

La adición de oxígeno en la fermentación de *Saccharomyces* es necesaria para mantener la viabilidad de las células, ya que el oxígeno actúa como aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa, durante la respiración de la levadura. Bajo condiciones de elevada concentración de oxígeno, la fermentación del azúcar a etanol está inhibida (efecto Pasteur) (Fiechter *et al.*, 1981). La respiración libera más energía que la fermentación, por consiguiente es el proceso principal, pero en la práctica no tienen lugar los dos casos extremos de respiración o fermentación. Niveles de oxígeno disuelto en el medio de cultivo de alrededor de un 20% de saturación son necesarios para el mantenimiento de las células de la levadura y su crecimiento, y no afectan al proceso fermentativo (Gordon and Stewart, 1972). Altas concentraciones de azúcares tienen un efecto inhibitor sobre el crecimiento de la levadura, por tanto, en fermentaciones aerobias la tasa de crecimiento específica decrece a medida que aumenta la concentración de azúcar inicial (Ghose and Tyagi, 1979; Requejo, 2012).

4.8.3.2.3. pH

El pH tiene interés porque durante la fermentación, la levadura toma el nitrógeno de los aminoácidos orgánicos lo que hace que los aminoácidos pierdan su carácter anfótero y pasen a ácidos, provocando un descenso de pH en medio. Si el pH es bajo se evitan problemas de contaminación, pero la fermentación se ve ralentizada, ya que afecta al desarrollo de la levadura. El pH más favorable para el crecimiento de esta levadura se encuentra entre 4,4-5 (Romaní, 2011).

4.8.3.2.4. Temperatura

Afecta tanto a efectos fisiológicos de la levadura como a problemas físicos. La levadura *Saccharomyces* tiene una temperatura óptima de crecimiento entre 28 y 35 °C. La tasa de metabolismo de las levaduras se incrementa con la temperatura hasta un valor de 35 °C, por encima del cual desciende gradualmente entre 35 y 43 °C.

4.8.3.2.5. Presencia de compuestos inhibidores

El furfural y el hidroximetilfurfural (HMF) son aldehídos procedentes de la degradación de las pentosas y hexosas, respectivamente, y ejercen un efecto inhibitor incluso a bajas concentraciones, ya que actúan como aceptores de los electrones procedentes del NADH y el NADPH, empleándose el primero en la reducción de furfural y el segundo en la del HMF. La presencia de furfural y de HMF sobre los microorganismos ejerce una reducción de la tasa específica de crecimiento (Navarro, 1994); una disminución de la productividad volumétrica de etanol (Navarro, 1994); así como un descenso de la productividad específica de etanol (Palmqvist *et al.*, 1999). Los compuestos fenólicos son compuestos aromáticos de bajo peso molecular muy tóxicos para los microorganismos, ya que su interacción con determinadas zonas hidrofóbicas de las células causan una pérdida de la integridad de la membrana afectando a su capacidad de actuar como barrera selectiva (Heipieper *et al.*, 1994). La inhibición puede producirse por sustrato, donde a altas concentraciones, éste se convierte en un fuerte inhibidor, o por producto, en cuyo caso el crecimiento de la levadura se ve alterado por una concentración de etanol en el medio de un 3% (v/v), al alterar el grado de polaridad de la membrana celular y del citoplasma.

4.8.4. DESTILACIÓN DE ETANOL

A pesar de que el proceso *downstream* es el que más energía consume durante la producción de etanol, la recuperación del etanol del medio de fermentación es necesaria. El medio final está compuesto por agua y etanol. La mezcla agua-etanol no se puede separar por

procesos de destilación convencionales porque forman un sistema de mezcla no ideal. La deshidratación es un método sofisticado porque se forma una mezcla azeotrópica con agua (95,6% en peso a una temperatura de 78,15°C), lo que hace imposible la separación en una sencilla columna de destilación. Así, la purificación del etanol se da en 3 etapas: destilación, rectificación y deshidratación. En las dos primeras etapas se obtiene una disolución con alta concentración en etanol (aproximadamente el 92,4% en peso). Después, la mezcla es deshidratada para obtener etanol anhidro por deshidratación, que se puede llevar a cabo mediante destilación azeotrópica, destilación extractiva, extracción líquido-líquido, adsorción, o por métodos de separación híbrida complejos (Canilha *et al.*, 2012). Sólo el alcohol absoluto o de 98,9% molar se puede mezclar con gasolina (López y Lozada, 2005).

4.9. APROVECHAMIENTO DE LA FRACCIÓN LÍQUIDA PROCEDENTE DE LOS PRETRATAMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS Y AZÚCARES HEMICELULÓSICOS FERMENTABLES

El pretratamiento de autohidrólisis se ha sugerido como la mejor solución para una tecnología de pretratamiento estándar en las biorrefinerías basadas en materiales lignocelulósicos, aunque pueda requerir de una etapa de posthidrólisis para convertir los oligosacáridos en monosacáridos (Girio *et al.*, 2010). Durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, la mayor parte de las hemicelulosas insolubles se eliminan de la superficie de las microfibrillas de celulosa y se rompen en varios oligosacáridos solubles. La mayoría de los oligosacáridos liberados durante el pretratamiento de la biomasa son productos de la hidrólisis de las hemicelulosas. Los tipos de oligosacáridos dependen de la estructura y la composición de las correspondientes hemicelulosas. Las formas predominantes de polisacáridos hemicelulósicos en la mayoría de los materiales lignocelulósicos, excepto en las maderas blandas, son los xiloglucanos y los “heteroxilanos”. En los residuos agrícolas, los más abundantes tanto en la pared primaria como en la secundaria son los glucuronoarabinoxilanos (en los materiales lignocelulósicos, la fracción en masa de la pared secundaria basado en el peso seco total de la planta es mucho mayor que el de la pared primaria). Por tanto, los xilooligosacáridos (XOs) de la hidrólisis de los heteroxilanos son el tipo predominante de oligosacáridos liberados durante el pretratamiento (Qing *et al.*, 2013). Dado que los microorganismos productores de etanol más eficientes no son capaces de asimilar los oligosacáridos hemicelulósicos, su hidrólisis es casi un requisito obligatorio para mejorar la corriente de azúcares hemicelulósicos. Las opciones de posthidrólisis para la hidrólisis de los XOs se pueden simplificar en dos:

- ✚ **Hidrólisis ácida:** los factores principales que afectan a la recuperación de monosacáridos en la posthidrólisis ácida son la concentración de catalizador, el tiempo de reacción y la temperatura. El catalizador principal empleado es un ácido fuerte, el ácido sulfúrico, aunque también se puede llevar a cabo con otros ácidos, débiles, como el fosfórico. Bajo condiciones de posthidrólisis totalmente optimizadas, la recuperación de azúcares puede llegar al 100%, comparada con la segunda etapa de la hidrólisis ácida diluida estándar (121°C; 4% H₂SO₄ y 60 minutos) la cual se emplea generalmente para la hidrólisis ácida cuantitativa de los oligosacáridos
- ✚ **Hidrólisis enzimática:** otro método para llevar a cabo la hidrólisis de los oligosacáridos en azúcares monoméricos es el empleo de enzimas. El inconveniente que presenta este método es que la velocidad de reacción es mucho menor con respecto a la hidrólisis ácida.

4.9.1. INHIBIDORES DE LOS HIDROLIZADOS LIGNOCELULÓSICOS Y DETOXIFICACIÓN

El tipo de compuestos tóxicos y su concentración en los hidrolizados lignocelulósicos dependen tanto de la materia prima como de las condiciones operacionales empleadas para la hidrólisis. Además, algunas variables de fermentación como las condiciones fisiológicas de las células, la concentración de oxígeno disuelto, y el pH del medio, están también asociados con la toxicidad de estos compuestos, en muchos casos acentuando su efecto tóxico. Los compuestos tóxicos pueden estresar a los organismos fermentativos hasta el punto en el que la utilización eficiente de los azúcares se reduce y la formación de producto disminuye. De acuerdo a Olsson y Hahn-Hägerdal (1996) y Parajó *et al.* (1998), los compuestos tóxicos se pueden dividir en cuatro grupos:

- ✚ **Productos de degradación del azúcar:** durante la autohidrólisis, las pentosas y las hexosas pueden degradarse a furfural y 5-hidroximetilfurfural, respectivamente. Éstos son compuestos tóxicos que, dependiendo de su concentración en el medio fermentativo, pueden inhibir las células y afectar la velocidad de crecimiento específico
- ✚ **Productos de degradación de la lignina:** una amplia variedad de compuestos (aromáticos, poli aromáticos, fenólicos y aldehídicos) se liberan de la lignina durante la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos. Los compuestos fenólicos tienen un considerable efecto inhibitorio en la fermentación de los hidrolizados lignocelulósicos, y

aquéllos con bajo peso molecular son los más tóxicos. Provocan división y pérdida de integridad de las membranas biológicas, afectando por tanto, su habilidad para servir como barreras selectivas y matrices para las enzimas

- ✚ **Compuestos derivados de la estructura lignocelulósica:** diversos productos inhibidores, como los extractos de la materia prima (resinas ácidas, ácidos tanínicos y terpenos) y ácido acético derivado de los grupos acetilos presentes en las hemicelulosas, son descargados al hidrolizado durante el proceso de autohidrólisis
- ✚ **Iones de metales pesados:** los iones de metales pesados (hierro, cromo, níquel y cobre) se pueden originar por la corrosión del reactor durante el proceso hidrotérmico, y su toxicidad inhibe enzimas en las rutas metabólicas de los microorganismos.

Existe una amplia variedad de métodos de detoxificación que incluye métodos biológicos (empleando enzimas específicas o microorganismos que actúan sobre los inhibidores presentes), físicos (evaporación y uso de membranas) y físico-químicos (resinas de intercambio iónico, neutralización, *overliming*, carbón activado y extracción con disolventes orgánicos). Estos métodos transforman los inhibidores en compuestos activos o reducen su concentración. La efectividad de un método de detoxificación depende tanto del tipo de hidrolizado hemicelulósico como del microorganismo empleado, ya que cada tipo de hidrolizado tiene un grado diferente de toxicidad, y cada especie de microorganismo posee un grado diferente de tolerancia a los inhibidores.

Entre los diferentes tipos de detoxificación, el *overliming* es considerado como el método más usado. Este proceso consiste en un incremento del pH del hidrolizado ácido seguido por una reducción del mismo hasta alcanzar un pH deseable para llevar a cabo el proceso fermentativo. El principio de este proceso es la precipitación de componentes tóxicos y la inestabilidad de algunos inhibidores a elevado pH. Este método ha demostrado una elevada eficacia en la eliminación de inhibidores y es ampliamente usado. Se ha considerado como un método prometedor y económico, proporcionando buena eficacia en la eliminación de los compuestos furánicos (Canilha *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2009; Antunes *et al.*, 2012; Canilha *et al.*, 2012).

Tras la detoxificación y posthidrólisis del hidrolizado, se puede llevar a cabo la bioconversión de las pentosas a bioetanol, a través de la ruta de las pentosas fosfato, explicada en el punto anterior.

4.9.2. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE XILOOLIGOSACÁRIDOS PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE ALTO VALOR AÑADIDO

Se ha demostrado que los xilooligosacáridos tienen propiedades prebióticas importantes y por tanto, un gran potencial para su uso en productos médicos, alimenticios y de higiene (Vázquez *et al.*, 2000). Tras llevar a cabo el proceso hidrotérmico para la obtención de xilooligosacáridos, se pueden aplicar diferentes tecnologías para aislar y purificar estos xilooligosacáridos en los rangos deseados de grado de polimerización para aplicaciones prebióticas. Este mercado de rápido crecimiento de xilooligosacáridos crea grandes oportunidades para procesar hidrolizados de pretratamiento ricos en xilano en las biorrefinerías celulósicas en productos de alto valor que pueden mejorar la economía de conversión. Para producir más fracciones de XOs puras usadas en industrias alimentarias o farmacéuticas, el licor de hidrólisis debe ser refinado eliminando los monosacáridos y otros compuestos que no sean azúcares para obtener el contenido más elevado posible de XOs o en un rango dado de grado de polimerización. La purificación y separación de los XOs procedentes del licor de autohidrólisis es complicado y puede requerir un procesado multietapa para reacción y/o fraccionamiento. Dependiendo del grado de pureza deseado, puede ser necesaria una secuencia de tratamientos físicoquímicos como son: extracción con disolventes, adsorción con materiales de superficie activa, técnicas de separación cromatográfica, separación con membrana y cromatografía de separación centrífuga (Qing *et al.*, 2013).

4.10. BIBLIOGRAFÍA

- Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M. and Negro M. J. **2010**. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource technol* 101, 4851-4861. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.
- Antunes F. A. F., Milessi T. S. S., Oliveira I., Chandel A. K., and Silva S. S. **2012**. Characterization of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate after detoxification with overliming and activated charcoal, in *Proceedings of the 20th European Biomass Conference and Exhibition, Milan, Italy*.
- Aziz S. and Sarkanen K. **1989**. Organosolv pulping - a review. *Tappi J* 72(3), 169-173.
- Boletín Oficial del Estado. **2006**. Real Decreto 61/2006, de 31 de enero, por el que se fijan las especificaciones de gasolinas, gasóleos, fuelóleos y gases licuados del petróleo, se regula el uso de determinados biocarburantes y el contenido de azufre de los combustibles para uso marítimo. BOE nº 41 de 17 de Febrero de 2006.
- Boletín Oficial del Estado. **2010**. Real Decreto 1088/2010, de 3 de septiembre, por el que se modifica el Real Decreto 61/2006, de 31 de enero, en lo relativo a las especificaciones técnicas de gasolinas, gasóleos, utilización de biocarburantes y contenido de azufre de los combustibles para uso marítimo. BOE nº5 de 5 de Septiembre de 2010.
- Boletín Oficial del Estado. **2011**. Real Decreto 1597/2011, de 4 de noviembre, por el que se regulan los criterios de sostenibilidad de los biocarburantes y biolíquidos, el Sistema Nacional de Verificación de la Sostenibilidad y el doble valor de algunos biocarburantes a efectos de su cómputo. BOE nº267 de 5 de Noviembre de 2011.
- Boletín Oficial del Estado. **2015**. Real Decreto 1085/2015, de 4 de diciembre, de fomento de los Biocarburantes. BOE nº 291 de 5 de Diciembre de 2015.
- Boletín Oficial del Estado. **2015**. Orden IET/2786/2015, de 17 de diciembre, por la que se modifica 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. BOE nº 306 de 23 de Diciembre de 2015
- Bollok M., Reczey K. and Zacchi G. **2000**. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce to ethanol. *Appl Biochem Biotech* (84), 69-80. DOI: 10.1385/ABAB:84-86:1-9:69.
- Boyle M. and Barron N. **1997**. Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Biotechnol Lett* 19, 49. DOI: 10.1023/A:1018315003916.

- Brownell H. H., Yu E. K. C. and Saddler J. N. **1986**. Steam-explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnol and Bioeng* 28, 792–801. DOI: 10.1002/bit.260280604.
- Canilha L., Carvalho W., Giuliatti M., Felipe M. D. G. A. and Silva J. B. A. E. **2008**. Clarification of a wheat straw-derived medium with ion-exchange resins for xylitol crystallization. *J Chem Technol Biot* 83 (5), 715-721. DOI: 10.1002/jctb.1861.
- Canilha L., Chandel A. K., dos Santos Milessi T. S., Fernandes Antunes F. A., da Costa Freitas W. L., Almeida Felipe M. G. and Silverio da Silva S. **2012**. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. *J Biomed Biotechnol*. Volume 2012, Article ID 989572, 15 pages. DOI: 10.1155/2012/989572.
- Carvalho W., Canilha L. and Silva S. S. **2008**. Semi-continuous xylose-to-xylitol bioconversion by Ca-alginate entrapped yeast cells in a stirred tank reactor. *Bioproc Biosyst Eng* 31 (5), 493–498, 2008. DOI: 10.1007/s00449-007-0187-z.
- Chandra R. P., Bura R., Mabee W. E., Berlin A., Pan X. and Saddler J. N. **2007**. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108, 67–93. DOI: 10.1007/10 2007 064.
- Chiaromonti D., Prussi M., Ferrero S., Oriani L., Ottonello P., Torre P. and Cherchi F. **2012**. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass Bioenerg* 46, 25-35. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.04.020.
- Cho K. M and Yoo Y. J. **1999**. Novel SSF process for ethanol production from microcrystalline cellulose using the delta-integrated recombinant yeast, *Saccharomyces cerevisiae* L2612 delta GC. *J Microbiol Biotechnol* 9, 340.
- Delgenés J. P., Penaud V. and Moletta R. **2002**. Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes Chapter 8. In: *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*. IWA Publishing. Pp. 201–228.
- Diario Oficial de la Unión Europea. **2015**. Directiva 2015/1513 del Parlamento Europeo y del Consejo de 9 de septiembre de 2015 por la que se modifica la Directiva 98/70/CE, relativa a la calidad de la gasolina, y la Directiva 2009/28/CE, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables.
- Diario Oficial de la Unión Europea. Comunicación de la Comisión. Plan de acción sobre la biomasa. COM (2005) 628 final.

- Diario Oficial de la Unión Europea. Comunicación de la Comisión sobre la aplicación práctica del régimen de sostenibilidad de la UE para los biocarrburantes y biolíquidos y sobre las reglas de contabilización aplicables a los biocarrburantes. 2010/C 160/02.
- Diario Oficial de la Unión Europea. Comunicación de la Comisión sobre regímenes voluntarios y valores por defecto del régimen de sostenibilidad de la UE para los biocarrburantes y biolíquidos. 2010/C 160/01.
- Duff S. J. B. and Murray W. D. **1996**. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technol* 55, 1–33. DOI: 10.1016/0960-8524(95)00122-0.
- Estrategia Española para el desarrollo del uso energético de la biomasa forestal residual. Comisión Estatal para el Patrimonio Natural y la Biodiversidad. Subdirección general de política forestal y desertificación. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Estrategia Española de Cambio Climático y Energía Limpia. Horizonte 2007-2012-2020. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Faria-Oliveira F., Puga S. and Ferreira C. **2013**. *Yeast: World's Finest Chef en Food Industry*. Capítulo 23. DOI: 10.5772/53156. ISBN978-953-51-0911-2.
- Fiechter A., Fuhrmann G. F. and Käppli O. **1981**. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cell. *Adv Microb Physiol* 22, 123-183. DOI: 10.1016/S0065-2911(08)60327-6.
- Galbe M. and Zacchi G. **2002**. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biot* 59, 618–628. DOI: 10.1007/s00253-002-1058-9.
- Galbe M., Zacchi G. **2007**. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108, 41–65. DOI: 10.1007/10 2007 070.
- García A., González Alriols M., Llano-Ponte R. and Labidi J. **2011**. Energy and economic assessment of soda and organosolv biorefinery process. *Biomass Bioenerg* 35, 516-525. DOI: 10.1016/j.biombioe.2010.10.002.
- Gauss V.F., Suzuki S. and Takagi M. **1976**. Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments. US33990944A.
- Ghose T. K. and Tyagi R. D. **1979**. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermenter design. *Biotechnol Bioeng* 21 (8), 1401-1420. DOI: 10.1002/bit.260210808.

- Girio F. M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L. C., Marques S. and Bogel-Lukasik R. **2010**. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technol* 101, 4775–4800. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- Gordon P. A. and Stewart P. R. **1972**. Effect of lipid status on cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis in anaerobic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 72(2), 231-242. DOI: 10.1099/00221287-72-2-231.
- Gupta A. and Verma J.P. **2015**. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renew Sust Energ Rev* 41, 550–67. DOI: 10.1016/j.rser.2014.08.032.
- Hartmann H., Angelidaki I. and Ahring B.K. **1999**. Increase of anaerobic degradation of particulate organic matter in full-scale biogas plants by mechanical maceration. In: Mata-Alvarez J., Tilche A. and Cecchi F. (Eds). *Proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes, Barcelona*. Vol. 1. Pp 129-136.
- Hendriks A.T.W.M. and Zeeman G. **2009**. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol* 100, 10–18. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.027
- Heipieper H. J., Weber F. J., Sikkema J., Keweloh H and de Bont J. A. M. **1994**. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol* 12, 409-415. DOI: 10.1016/0167-7799(94)90029-9.
- Karagöz S., Bhaskar T., Muto A., Sakata Y. and Uddin M.A. **2004**. Low temperature hydrothermal treatment of biomass: effect of reaction parameters on products and boiling point distributions. *Energ Fuel* 18, 234–241. DOI: 10.1021/ef030133g.
- Klinke H .B., Ahring B. K., Schmidt A. S. and Thomsen A. B. **2002**. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technol* 82, 15–26.
- Krishna S. H., Reddy T. J. and Chowdary T. J. **2001**. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technol* 77, 193. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00151-6.
- Licht F.O. **2013**. Renewable fuels association, ethanol industry outlook 2008–2013 reports. Available at: (www.ethanolrfa.org/pages/annual-industry-outlook)
- Bjerre A.B., Olesen A.B., Fernqvist T. **1996**. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicelluloses. *Biotechnol Bioeng* 49, 568-77. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960305)49:5<568::aid-bit10>3.0.CO;2-6.

- Mood S. H., Golfeshan A. H., Tabatabaei M., Jouzani G. S., Najafi G. H., Gholami M. and Ardjmand M. **2013**. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew Sust Energ Rev* 27, 77-93. DOI: 10.1016/j.rser.2013.06.033.
- Hosseini S. A. and Shah N. **2009**. Multiscale modelling of hydrothermal biomass pre-treatment for chip size optimization. *Bioresource Technol* 100, 2621–2628. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.11.030.
- Kálmán G., Varga E. and Réczey K. **2002**. Dilute sulphuric acid pretreatment of corn stover at long residence times. *Chem Biochem Eng Q* 16, 151–157.
- Lavoie J. M., Capek-Menard E., Gauvin H. and Chornet E. **2010**. Production of pulp from *Salix viminalis* energy crops using the FIRSST process. *Bioresource Technol* 101, 4940–4946. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.09.021.
- Kádár Z., Szengyel Z. and Réczey K. **2004**. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Ind Crops Prod* 20, 103–110. DOI: 10.1016/j.indcrop.2003.12.015.
- Kim S. and Dale B.E. **2004**. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg* 26, 361-75. DOI: 10.1016/j.biombioe.2003.08.002.
- Kumar R. and Wyman C. E. **2009**. Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology? *Bioresource Technol* 100, 4193–4202. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.11.058.
- Li M. F., Yang S. and Sun R. C. **2016**. Recent advances in alcohol and organic acid fractionation of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol* 200, 971-980. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.004.
- Liu S. **2010**. Woody biomass: niche position as a source of sustainable renewable chemicals and energy and kinetics of hot-water extraction/hydrolysis. *Biotechnol Adv* 28, 563–582. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.006.
- López Jiménez J. A. y Lozada Salgado H. **2005**. Obtención de etanol anhidro a partir de un proceso de destilación con adición de electrolitos. Universidad Nacional de Colombia.
- Mansfield S. D., Mooney C. and Saddler J. N. **1999**. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol Prog* 15, 804–816. DOI: 10.1021/bp9900864.

- Mosier N., Hendrickson R., Ho N., Sedlak M. and Ladisch M.R. **2005**. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource Technol* 96, 1986–1993. DOI: 10.1016/biortech.2005.01.013.
- Navarro A. R. **1994**. Effects of furfural on ethanol formation by *Saccharomyces cerevisiae*: mathematical models. *Curr Microbiol* 29, 87-90. DOI: 10.1007/BF01575753.
- OECD/TIF. *Biofuels: linkingsupport to performance*; 2008. ISBN: 978-92-82-10179-7.
- Oh K. K., Kim S. W., Jeong Y. S., Hong S. I. 2000. Bioconversion of cellulose into ethanol bynonisothermal simultaneous saccharification and fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 89, 15–30. DOI: 10.1385/ABAB:89:1:15.
- Oliva J. M., Sáez F., Ballesteros I., González, A. Negro M. J., Manzanares P. and Ballesteros M. **2003**. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 141–154. DOI: 10.1385/ABAB: 105: 1-3: 141.
- Olsson L. and Hahn-Hägerdal B. **1996**. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb Technol* 18, 312-331. DOI: 10.1016/0141-0229(95)00157-3.
- Palmowski L. and Muller J. **1999**. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. In: II International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste. Barcelona 15–17 June. Pp. 137–144.
- Palmqvist E., Almeida J. S. and Hahn-Hägerdal B. **1999**. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol Bioeng* 62 (4), 447-454. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990220)62:4<447::AID-BIT7>3.0.CO;2-0.
- Palmqvist E. and Hahn-Hägerdal B. **2000**. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresource Technol* 74, 25–33. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00161-3.
- Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. **1998**. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technol* 66, 25–40. DOI: 10.1016/S0960-8524(98)00037-6.
- Parés R. y Juárez A. **1997**. *Etanol en Bioquímica de los microorganismos*. Ed. Reverté, S.A.

- Paulova L., Patakova P., Branska B., Rychtera M., Melzoch K. **2015**. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnol Adv* 33, 1091–1107. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.002.
- Plan de Acción de Ahorro y Eficiencia Energética **2011-2020**. Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía. Ministerio de Industria, Energía y Turismo. www.idae.es
- Plan de Energías Renovables (PER) **2011-2020**. Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía. Ministerio de Industria, Energía y Turismo. www.idae.es
- Plan Nacional de Energías Renovables (PANER) **2011-2020**. Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía. Ministerio de Industria, Energía y Turismo. www.idae.es
- Qing Q., Li H., Kumar R. and Wyman C. E. **2013**. Xylooligosaccharides Production, Quantification, and Characterization in Context of Lignocellulosic Biomass Pretreatment, in *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*. Ed. Wiley. DOI: 10.1002/9780470975831.ch19.
- Rabinovich M. L., Melnik M. S. and Boloboba A. V. **2002**. Microbial cellulases (Review). *Appl Biochem Micro* 38, 305–321.
- Requejo Silva A. **2012**. Las podas de olivo como materia prima para la producción de derivados de las hemicelulosas, pastas celulósicas y bioetanol. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Rodríguez A., Moral A., Sánchez R., Requejo A. and Jiménez L. **2009**. Influence of variables in the hydrothermal treatment of rice straw on the composition of the resulting fractions. *Bioresource Technol* 100, 4863–4866. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.04.030.
- Romaní Pérez A. **2011**. Contribución al estudio de procesos para la obtención de bioetanol de segunda generación. Tesis Doctoral. Universidad de Vigo.
- Ruiz H. A., Rodríguez-Jasso R., Fernandes B. D., Vicente A. A. and Teixeira J. A. **2013**. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renew Sust Energ Rev* 21, 35-51. DOI: 10.1016/j.rser.2012.11.069
- Ruiz H. A., Ruzene D. S., Silva D. P., Quintas M. A. C., Vicente A. A. and Teixeira J. A. **2011**. Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw- effect of particle size and process conditions. *J Chem Technol Biot* 86, 88–94. DOI: 10.1002/jctb.2518.

- Shahsavarani H., Sugiyama M., Kaneko Y., Chuenchit B. and Harashima S. **2012**. Superior thermotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient bioethanol fermentation can be achieved by overexpression of *RSP5 ubiquitin ligase*. *Biotechnol Adv* 30, 1289–300. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.002.
- Spindler D. D., Wyman C. E., Grohmann K. and Philippidis G. P. **1992**. Evaluation of the cellobiose-fermenting yeast *Brettanomyces custersii* in the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnol Lett* 14, 403-407. DOI: 10.1007/BF01021255.
- Sun Y. and Cheng J. **2002**. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol* 83, 1–11. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7.
- Takagi M., Abe S., Suzuki S., Emert G. H., Yata N. A. **1977**. Method for production of ethanol directly from cellulose using cellulase and yeast. In: Ghose T. K., editor. Delhi: OOT. Pp. 551–571.
- Talebnia F., Karakashev D. and Angelidaki I. **2010**. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technol* 101, 4744–4753. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.080
- Vázquez M. J., Alonso J. L., Domínguez H. and Parajó J. C. **2000**. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends Food Sci Tech* 11 (11), 387–393. DOI: 10.1016/S0924-2244(01)00031-0.
- Viikari L., Kantelinen A., Buchert J. and Puls J. **1994**. Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials. *Appl Microbiol Biotechnol* 41, 124. DOI: 10.1007/BF00166093.
- Viikari L., Vehmaanpera J. and Koivula A. **2012**. Lignocellulosic ethanol: from science to industry. *Biomass Bioenerg* 46, 13-24. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.05.008.
- Wang L. **2014**. Sustainable bioenergy production in: Xie G. and Peng L. editors. Genetic engineering of bioenergy crops towards high biofuel production. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Weil S., Brewer M., Hendrickson R., Sarikaya A. and Ladish M.R. **1998**. Continuous pH monitoring during pretreatment of yellow poplar wood sawdust by pressure cooking in water. *Appl Biochem Biotech* 70, 99–111. DOI: 10.1007/BF02920127.
- Wright J. D., Wyman C. E. and Grohmann K. **1988**. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. *Appl Biochem Biotechnol* 18, 75. DOI: 10.1007/BF02930818.

- Wyman C.E., Decker S.R., Himmel M. E., Brady J. W., Skopec C.E., Viikari L. **2004**. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose in Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility. Second Edition. CRC Press. DOI: 10.1201/9781420030822.ch43
- Xie G. and Peng L. **2011**. Genetic engineering of energy crops: a strategy for biofuel production in China. *J Integr Plant Biol* 53, 143-50. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2010.01022.x.
- Yang B. and Wyman C.E. **2008**. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod Bior* 2, 26–40. DOI: 10.1002/bbb.49.
- Zhou S. D. and Ingram L. O. **2001**. Simultaneous saccharification and fermentation of amorphous cellulose to ethanol by recombinant *Klebsiella oxytoca* SZ21 without supplemental cellulase. *Biotechnol. Lett.* 23, 1455. DOI: 10.1023/A:1011623509335.
- Zhu J. J., Yong Q., Xu Y. and Yu S. Y. **2009**. Comparative detoxification of vacuum evaporation/steam stripping combined with overliming on corn stover prehydrolyzate, in *Proceedings of the International Conference on Energy and Environment Technology (ICEET)*. Pp 240–243.

5. BIORREFINERÍA DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE NANOFIBRAS DE CELULOSA O CELULOSA NANOFIBRILAR

El término “nanocelulosa” se refiere generalmente a los materiales celulósicos que tienen al menos una dimensión en el rango nanométrico. La nanocelulosa se puede producir por diferentes métodos a partir de varias fuentes lignocelulósicas. Recientemente se ha generado un interés considerable en las nanofibras de celulosa debido a sus extraordinarias propiedades, entre las que cabe destacar: baja expansión térmica definida como el ratio longitud-diámetro, robustez mejorada, buenas propiedades mecánicas y ópticas, *paper making*, aditivo para revestimiento (*coating*), envasado de alimentos (*food packaging*), y propiedades barrera a distintos tipos de gases. Además, la incorporación de nanorefuerzos bio-basados en otros polímeros como las nanofibras de celulosa ha demostrado ser una estrategia importante para la obtención de nanocomposites con un rendimiento mecánico mayor (Abdul Khalil *et al.*, 2012).

5.1. CLASIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE NANOCELULOSA

La nanocelulosa se puede clasificar en 3 subcategorías principales en base a sus dimensiones, funciones, y métodos de preparación, dependiendo principalmente de la fuente celulósica y de las condiciones de procesado. La terminología empleada para estas estructuras es CNC para nanocristales de celulosa (*cellulose nanocrystal*) y CNF para celulosa nanofibrilada (*cellulose nanofibers*). Otros tipos de nanocelulosa son; de origen bacteriano (*bacterial nanocellulose*, BNC) la cual es sintetizada desde glucosa por una familia de bacterias, la *Gluconoacetobacter xylinus* (Klemm *et al.*, 2011), y la nanocelulosa *electrospun* (*electrospun nanocellulose*, ECNF), también generada al igual que la bacteriana por un proceso ascendente *bottom-up* a partir de celulosa disuelta usando *electrospinning*. En los métodos *bottom-up* se comienza con una estructura nanométrica y mediante un proceso de autoensamblado se crea una estructura mayor que la estructura con la que se comenzó. Estas dos nanocelulosas se diferencian de las CNC y CNF en que estas últimas se producen por la desintegración de las fibras de celulosa en partículas nanométricas a través de un proceso descendente *top-down* (Nechyporchuk *et al.*, 2016). Las técnicas *top-down* producen estructuras muy pequeñas desde materiales de mayores dimensiones.

5.1.1. NANOCRISTALES DE CELULOSA (CNC)

Los nanocristales de celulosa (CNC) fueron producidos por vez primera por Ranby en 1949. Éstos tienen estructura cristalina, forma alargada y una flexibilidad muy limitada

comparada con las CNF porque no contienen regiones amorfas. Los CNC se conocen también como *nanowhiskers*, *nanorods* y *rodlike cellulose crystals* y se aíslan normalmente de fibras de celulosa a través de un proceso de hidrólisis ácida. Comúnmente, los CNC tienen un diámetro de 2-20 nm y una longitud que varía entre 100 nm y varios micrómetros (Hube *et al.*, 2008; George and Ramana, 2011;). Su composición es 100% celulosa, siendo altamente cristalina y oscilando las zonas cristalinas entre el 55 y el 88% (Moon *et al.*, 2011). El grado de cristalinidad, la diversidad dimensional y la morfología dependen de la fuente del material celulósico y de las condiciones de preparación (Habibi *et al.*, 2010).

5.1.2. CELULOSA NANOFIBRILADA (CNF)

Celulosa nanofibrilar (*nanofibrillar cellulose*) y nanofibras de celulosa (*cellulose nanofiber*) son términos empleados para hacer referencia a la celulosa microfibrilada que se encuentra comercialmente disponible. Las CNF como nuevo material celulósico fue introducido por Turbak *et al.* (1983a, b) y Herrick *et al.* (1983) quienes produjeron celulosa con dimensiones laterales en el rango nanométrico pasando una suspensión acuosa de pasta celulósica de madera blanda varias veces por una homogeneizador de alta presión. Durante dicho tratamiento, y debido a las elevadas fuerzas de cizallamiento, se produjeron redes fuertemente entrelazadas de nanofibras, conteniendo dominios cristalinos y amorfos (Nechporchuk *et al.*, 2016). Las nanofibras de celulosa son flexibles y largas (varios micrómetros de longitud), con un diámetro aproximado de entre 5-60 nm (Klemm *et al.*, 2011; Abdul Khalil *et al.*, 2014). Están formadas por dominios amorfos y cristalinos. Las CNF se producen generalmente por deslaminación del material lignocelulósico por presión mecánica antes y/o después de un tratamiento químico o enzimático (Klemm *et al.*, 2005).

5.2. PRODUCCIÓN DE NANOFIBRAS DE CELULOSA

Los procesos de producción de las nanofibras de celulosa son una combinación de diferentes operaciones, variando los diferentes tipos de CNF obtenidas. Así, los pasos a seguir son (Nechporchuk *et al.*, 2016):

- ✚ **Proceso de purificación.** Mediante la cocción y el blanqueado si lo que se desea obtener son fibras de celulosa puras, CNF; o sólo cocción si se desea producir lignocelulosa nanofibrilar, LCNF. Este paso emplea métodos similares o iguales a los usados en la industria papelera.

- ✚ **Pretratamiento mecánico o biológico/químico o una secuencia de ambos.** Un pretratamiento adecuado de las fibras celulósicas promueve la accesibilidad de los grupos hidroxilo, incrementa la superficie interna, altera la cristalinidad y rompe los enlaces de hidrógeno de la celulosa, y además, potencia la reactividad de las fibras (Szczesna-Antczak *et al.*, 2012). El pretratamiento mecánico convencional puede ser a través de un proceso de homogeneización, un proceso de molienda, o un proceso de mezclado. Entre los procesos biológicos/químicos empleados se pueden citar: hidrólisis enzimática, carboxilación, carboximetilación, cuaternización, sulfonación y pretratamiento asistido con disolventes (Pääko *et al.*, 2007; Wägberg *et al.*, 2008; Jiang and Hsieh, 2013; Ho *et al.*, 2011; Liimatainen *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2014).

- ✚ **Tratamiento mecánico principal** que puede realizarse a través de procesos de homogeneización, molienda, refinado, extrusión, mezclado, ultrasonificación, *cryocrushing*, explosión de vapor, *ball milling* y/o *aqueous counter collision*.

- ✚ Finalmente, se puede llevar un tratamiento alternativo o **post-tratamiento**, que consiste principalmente en una modificación química superficial que le proporciona nuevas propiedades a las CNF; mejoran la compatibilidad con matrices poliméricas en la aplicación en composites, conservan sus características intrínsecas, para preparar CNF redispersable en agua. Adicionalmente, se puede emplear la centrifugación, filtración y otras técnicas como post-tratamiento para fraccionar el material celulósico obtenido.

En este apartado se va a desarrollar el proceso de molienda y homogeneización, por ser los dos tratamientos mecánicos empleados en el presente trabajo, así como el pretratamiento químico de carboxilación vía oxidación TEMPO por ser uno de los más conocidos y aplicados en el proceso de producción de nanofibras.

5.2.1. PROCESO MECÁNICO DE MOLIENDA O GRINDING

La molienda de fricción ultra-fina es una técnica empleada para la producción de nanofibras de celulosa. Los ***Supermasscolloider grinders*** (Masuko Sangyo Co. Ltd., Japón) (figura 5.1) son comúnmente usados para dicho tratamiento. Durante el proceso, la suspensión de celulosa se pasa entre los discos de molienda rotativos y estáticos. La distancia entre estos discos se puede ajustar, lo cual permite evitar el problema de obstrucción. Debido a las fuerzas de cizalla generadas entre los discos, la pared celular se deslaminada y las

nanofibrillas se separan. Varios investigadores han trabajado en la producción de CNF mediante este método con dos modalidades: utilizando como materia inicial pasta celulósica no secada nunca (Iwamoto *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2011; Bulota *et al.*, 2012; Jonoobi *et al.*, 2012) o celulosa secada una vez (Wang *et al.*, 2012; Nechyporchuk *et al.*, 2015; Nechyporchuk *et al.*, 2016). Uno de los parámetros importantes que afectan a la caracterización resultante de las CNF/LCNF es el número de ciclos por los que se pasa a través del *grinder*.



Figura 5.1: Supermasscolloider grinder

Fuente: Masuko Sangyo Co. Ltd.

5.2.2. PROCESO MECÁNICO DE MICROFLUIDIZACIÓN

Un microfluidizador (figura 5.2) está constituido por una bomba de aire de alta presión que trabaja a la presión de operación deseada a una velocidad constante. La materia en suspensión pasa a través de unos microcanales de geometría fijada dentro de la cámara de interacción (figura 5.3). Como resultado, el producto es acelerado a altas velocidades. La suspensión se divide en dos microcanales que al volverse a unir impactan a gran velocidad. La energía de entrada se disipa produciéndose la ruptura celular. El resultado es un tamaño de partícula uniforme, reducido (nanométrico) y desaglomerado. Las presiones máximas que pueden alcanzar varían entre 23.000 y 40.000 psi, dependiendo del modelo, pudiendo ser el rango de velocidad de flujo en el primer caso entre 100-500 mL/min. Los modelos más actuales permiten un control de temperatura que oscila en el rango de -25°C a 75°C (Microfluidics Inc.).

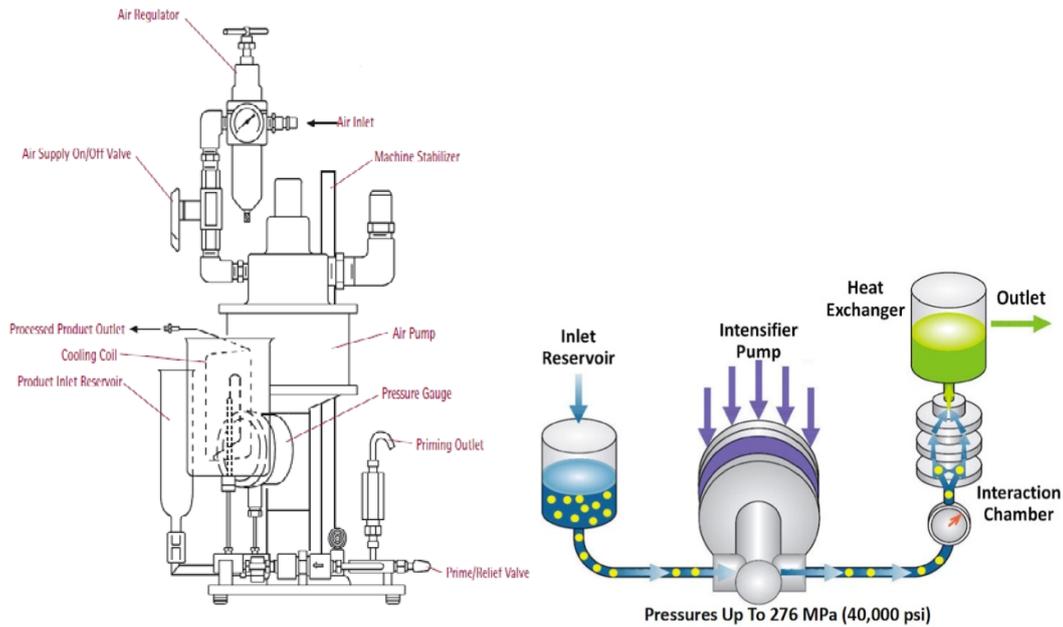


Figura 5.2: Microfluidizador.

Fuente: Microfluidics Inc.

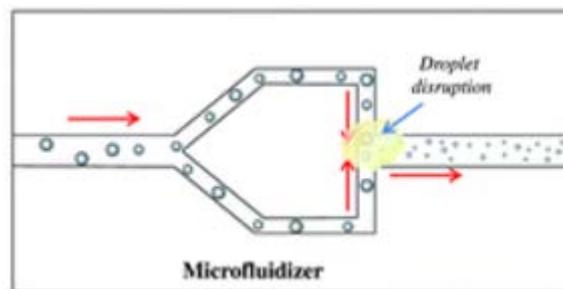


Figura 5.3: Detalle de la cámara de interacción de un microfluidizador.

Fuente: McClements, 2010.

5.2.3. PROCESO DE CARBOXILACIÓN VÍA OXIDACIÓN TEMPO

La figura 5.4 muestra un esquema de la individualización de las nanofibras celulósicas vegetales por carboxilación superficial empleando el catalizador TEMPO. La oxidación mediada por TEMPO es un método para la modificación de la superficie de la celulosa por la que los grupos funcionales carboxilados y aldehídos pueden ser incorporados a las celulosas nativas sólidas bajo condiciones acuosas suaves (Cintil *et al.*, 2014).

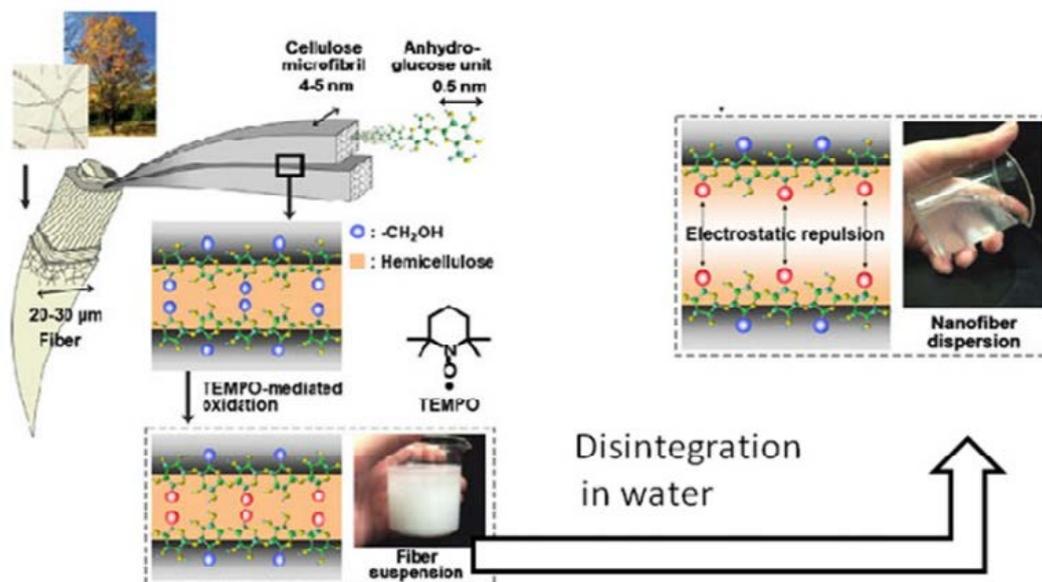


Figura 5.4: Esquema de la individualización de las nanofibras celulósicas vegetales por carboxilación superficial empleado el catalizador TEMPO.

Fuente: Cintil et al., 2014.

Fue en 1993 cuando Davis y Flitsch, estudiaron el uso del radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxyl (TEMPO) para la oxidación selectiva de los grupos de alcohol primarios de los monosacáridos. De Nooy *et al.* (1994) observaron una oxidación selectiva de grupos de alcohol primarios de polisacáridos a carboxilatos empleando TEMPO, hipobromuro e hipoclorito a pH básico. Este método fue empleado por Saito *et al.* (2006) para oxidar la celulosa y producir CNF.

El principio básico del tratamiento TEMPO/NaBr/NaClO (figura 5.5) es la oxidación de las fibras de celulosa por el ión nitrosonio (${}^{\dagger}\text{N}=\text{O}$), generado *in situ* mediante la reacción del radical TEMPO con los oxidantes. Como consecuencia de esto, los grupos de alcoholes primarios de celulosa son convertidos a aldehídos, los cuales son posteriormente oxidados a grupos carboxílicos. Se ha encontrado que se produce una despolimerización de la celulosa durante la reacción de oxidación, asumiéndose dos fenómenos asociados con esta despolimerización de la celulosa: la β -eliminación debido a la presencia de los grupos aldehído C6 bajo condiciones alcalinas, y la escisión de la unidad anhidroglucosa debido a la presencia de radicales hidroxilo formados como reacciones laterales (Isogai *et al.*, 2011; Coseri *et al.*, 2013; Nechyporchuk, 2016).

Para evitar la despolimerización, Zhao *et al.*, (1999) y Saito *et al.* (2009) estudiaron con éxito el uso de TEMPO/NaClO/NaClO₂. Asimismo, para evitar el amarilleado de las CNF durante el secado en horno a 105°C debido a la presencia de algunos grupos aldehído remanentes-los cuales también interfieren en la medida del grado de polimerización-, se propuso llevar a cabo una reacción de reducción empleando borohidruro de sodio para convertir los grupos aldehído residuales en alcoholes, o una reacción de oxidación, usando clorito de sodio para transformar los grupos aldehído en fracciones carboxílicas (Saito and Isogai, 2006; Mishra *et al.*, 2012; Shinoda *et al.*, 2012).

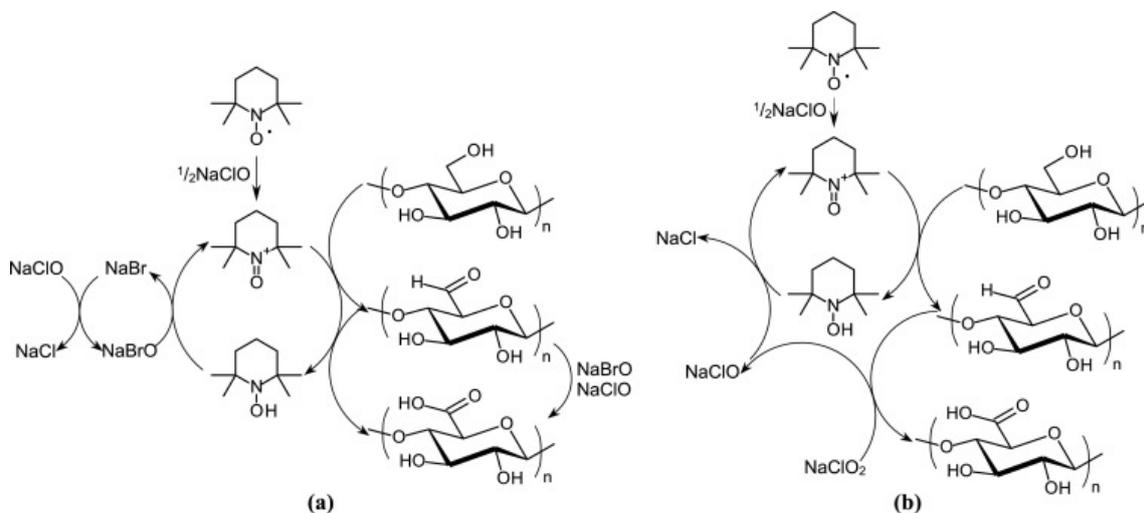


Figura 5.5: Esquema de la oxidación de los grupos alcoholes primarios de la celulosa por medio de:

(a) TEMPO/NaBr/NaClO en agua a pH básico y

(b) TEMPO/NaClO/NaClO₂ en agua a pH neutro o ligeramente ácido.

Fuente: Nechyporchuk, 2016.

5.3. APLICACIONES DE LAS NANOFIBRAS DE CELULOSA

Las nanofibras de celulosa son una alternativa potencial a los materiales derivados del petróleo, gracias a la cristalinidad y estructura que presentan, las cuales las hacen atractivas para aplicaciones que requieren propiedades barrera. Así, las nanofibras de celulosa pueden ser empleadas como agente de refuerzo, se pueden combinar con polielectrolitos en el procesamiento de fibras y se pueden usar en la fabricación de composites. Asimismo, presentan un gran potencial en el campo biomédico (Zhang *et al.*, 2013). Otras aplicaciones destacables son los excelentes geles que forman en dispersiones acuosas a bajos contenidos de sólidos, aerogeles resistentes, espumas, emulsiones y dispersiones estabilizantes. Muchas de estas aplicaciones se basan en la dureza y la elevada relación de aspecto (proporción longitud-anchura) de las fibrillas en los materiales CNF (Arola *et al.*, 2013).

5.3.1. APLICACIÓN DE NANOCELULOSA EN BIOMEDICINA Y COSMÉTICOS

La nanocelulosa pura es inocua para las personas así como biocompatible (Iolovich and Figovsky, 2008a, b). Por tanto, se puede usar para aplicaciones tales como productos de higiene personal, cosméticos, y biomedicina. Una de las aplicaciones más simples de las dispersiones de nanocelulosa es su uso para la estabilización de suspensiones médicas evitando la separación de fases y la sedimentación de los ingredientes pesados. La celulosa químicamente modificada puede ser un “transportador” prometedor para la inmovilización de enzimas y otros fármacos (Iolovich and Figovsky, 2008a, b). Debido a su tamaño nanométrico, el complejo transportador-fármaco puede penetrar a través de los poros de la piel y tratar las enfermedades dérmicas. Además, se puede emplear como un agente suave de peeling activo en cosméticos. La nanocelulosa bacteriana que contiene un elevado grado de hidratación (99% agua) es aplicable en cosméticos como, por ejemplo, mascarillas hidratantes, así como ingrediente de cremas hidratantes (Klemm *et al.*, 2005; Klemm *et al.*, 2006). Además, también se puede usar en biomedicina para la preparación de nanoimplantes, apósitos, pañuelos e hidrogeles, entre otros (Klemm *et al.*, 2006; Brown *et al.*, 2007; Hubbe *et al.*, 2008; Iolovich, 2008).

5.3.2. APLICACIÓN DE NANOCELULOSA EN COMPOSITES

Los biocomposites tienen una o más de sus fases procedentes de materiales naturales (por ejemplo, fibras vegetales de cultivos como algodón, lino, cáñamo, madera reciclada, residuos agrícolas, etc.). La matriz de un composite puede estar formada por un polímero natural derivado de aceites vegetales o almidones. Sin embargo, resulta mucho más común que sean polímeros sintéticos de derivados fósiles (termoplásticos vírgenes o reciclados) los que actúen como matrices (Johansson *et al.*, 2012).

Las nanofibras de celulosa se pueden emplear como material de relleno o refuerzo para preparar composites con disoluciones de polímeros solubles en agua, así como con acrílicos para cambiar la viscosidad e incrementar las propiedades mecánicas de los composites secos. La adición de nanocelulosa a polímeros biodegradables es de gran importancia, permitiendo la mejora de las propiedades mecánicas y la aceleración de la velocidad de degradación (Iolovich, 2008).

El uso de fibras lignocelulósicas presenta unas condiciones de trabajo y manejo más seguras comparadas con el uso de fibras sintéticas. Además las bio-fibras son no abrasivas a los

equipos de mezclado y moldeado, lo que puede contribuir a reducciones significativas en los costes de producción.

La producción de composites 100% de base biológica como sustitutos de los productos sintéticos es aún un reto. Una solución viable sería combinar pequeñas cantidades de resinas sintéticas con resinas de base biológica para desarrollar un producto rentable obteniendo un mayor rendimiento y un abanico más amplio de aplicaciones. Los agro-polímeros obtenidos a partir de biomasa por fraccionamiento, como almidón y celulosa, son las fuentes renovables más conocidas disponibles para producir bioplásticos (Belgacem and Gandini, 2011; Vázquez *et al.*, 2011). Normalmente, los llamados biocomposites verdes (*green biocomposites*) se producen integrando fibras naturales en polímeros de base biológica como celulosa, polilactida, almidón, polihidroxialcanoatos (PHAs), y plásticos basados en soja (Mohanty *et al.*, 2002). Los biocomposites basados en fibras de celulosa regenerada, fibras puras de celulosa, fibras de pastas celulósicas o MFC (celulosa microfibrilada) incorporados en matrices poliméricas como PVOH o PLA han sido descritos por Cheng *et al.* (2007).

Aunque el uso de fibras naturales para reforzar plásticos presenta muchas ventajas, las propiedades de los composites no siempre cumplen los requerimientos del material para las aplicaciones deseadas. Uno de los principales motivos es la débil adhesión entre las fibras hidrofílicas y los materiales de la matriz hidrofóbica. La solución más común a este problema es el uso de anhídrido maleico como compatibilizador, para mejorar la adhesión entre las fibras y la matriz polimérica.

Existen estudios sobre el empleo de la lignina como agente de acoplamiento en composites de fibras naturales. La lignina puede actuar como compatibilizador entre las fibras hidrofílicas y el polímero de la matriz hidrofóbica, reforzando, por tanto, la interfaz matriz-fibra (Johansson *et al.*, 2012).

Las áreas de investigación en composites de nanofibras de celulosa incluyen aplicaciones en envasado de alimentos, industria de automoción, materiales de construcción, fabricación de muebles, films transparentes para dispositivos, nanopapeles y membranas de filtración (figura 5.6). La producción de tales nanocomposites incluye métodos simples entre los que se encuentran: casting de dispersiones acuosas de CNF usando materiales solubles en matrices acuosas; films hechos por casting de dispersiones CNF mezclados con dispersiones poliméricas de látex; modificación de la superficie de las CNF seguido por una mezcla en un

disolvente con la matriz polimérica para formar films por casting; dispersión de las CNF secas en la matriz hidrofóbica, etc. (Zhang *et al.*, 2013).



Figura 5.6: Aplicaciones de las nanofibras de celulosa. Debido a su morfología y propiedades físicas características, las nanofibras de celulosa son un material prometedor para su uso en una amplia variedad de campos: material para filtros, material de embalaje con alta barrera al gas, dispositivos electrónicos, alimentos, medicinas, cosméticos, etc.

Fuente: Nippon Paper Group.

5.3.3. APLICACIÓN DE NANOCELULOSA EN EMBALAJE BASADO EN PAPEL

El embalaje (*packaging*) es una parte sustancial de nuestra vida diaria mostrando el consumo de materiales para embalar un incremento continuo en el tiempo. La industria europea de envase y embalaje tiene un valor de mercado de unos 80 mil millones de euros y cuenta con aproximadamente el 40% del mercado global del *packaging*. La tendencia futura será hacia mercados crecientes a escala global. Los productos manufacturados a partir de materiales renovables actualmente sólo representan el 2% del mercado, excluyendo el *packaging* tradicional basado en fibras (por ejemplo, papel). El desarrollo de materiales renovables de altas prestaciones es un factor importante para el crecimiento sostenible de la industria del *packaging*. Así, en la última década se han llevado a cabo en Europa diversos proyectos nacionales e internacionales enfocados en el potencial de los bio-materiales para reemplazar los materiales de embalaje derivados del petróleo (Food Biopack Project, SustainPack, SustainComp, SUNPAP, FlexPakRenew y RenewFuncBarr).

Como se ha comentado anteriormente, un campo emergente son los *nanofillers* renovables de celulosa. Los *fillers*, en este contexto, se refieren a una variedad de estructuras nanométricas cuya función no consiste sólo en rellenar una matriz sino también en proporcionar una mejora en las propiedades, como por ejemplo, la fuerza. Los films preparados a partir de nanocelulosa, frecuentemente denominados como nanopapers o nanopapeles, pueden llegar a tener sorprendentes propiedades mecánicas así como otras características útiles (Gonçalves *et al.*, 2008; Sehaqui *et al.*, 2010; Olsson *et al.*, 2010). En el estudio llevado a cabo por Henriksson *et al.*, (2008) cabe destacar el potencial de los nanopapeles, entre otras características, por su comportamiento mecánico excepcional. La habilidad de los nanopapeles de celulosa para mantener su integridad a elevados esfuerzos o tensiones queda reflejado en el estudio llevado a cabo por Svagan *et al.* (2007). Además, estudios recientes han mostrado la posibilidad de incrementar la resistencia del papel a la rotura añadiendo celulosa nanofibrilada a las estructura del mismo. Henriksson *et al.* (2008) trabajaron en la formación de nanopapeles muy densos, $1-1,2 \text{ g/cm}^3$, que resultaron tener excelentes propiedades mecánicas, obteniendo un módulo de Young de 10-14 GPa y una resistencia a la tracción de 130-214 MPa. Estas características son entre 2 y 5 veces más altas que aquellas obtenidas para papel común formado por un proceso convencional (Cintil *et al.*, 2014).

La celulosa es el componente básico del papel, pudiendo resultar extraño emplearlo como revestimiento (*coating*) sobre sí mismo. Sin embargo, en los últimos tiempos se han producido diversos materiales basados en celulosa (hidroxipropil celulosa y ésteres de celulosa de cadena larga) o derivados de celulosa (*nanowhiskers* o celulosa nanofibrilada) que pueden ser empleados como *coating* sobre papel para, de este modo, mejorar sus propiedades. De entre los diferentes materiales, la celulosa nanofibrilada, ha mostrado propiedades barrera muy interesantes usándose en estudios diferentes relacionados con el *paper coating*. En particular, se demostró que la CNF carboximetilada puede conducir a propiedades barrera muy elevadas, siempre y cuando cubra la superficie del papel completamente. Así mismo, se ha demostrado que el papel recubierto con unos pocos gramos de CNF por metro cuadrado muestra un descenso de hasta seis órdenes de magnitud en la permeabilidad de aire y también una resistencia incrementada a la grasa (Hult *et al.*, 2010). La carboximetilación parece jugar un papel importante en la definición de las propiedades barrera de CNF, dado que la celulosa nanofibrilar obtenida sin dicho tratamiento da *coatings* discontinuos aun aplicando elevados gramajes de *coating*. Así, el papel obtenido mostró un descenso en la permeabilidad al aire de menos de dos órdenes de magnitud y los valores de transmisión de oxígeno estuvieron por

encima de los medidos para films de CNF puro (Aulin *et al.*, 2010; Syverud and Stenius, 2009). Sin embargo, no sólo el gramaje del *coating* sino también las interacciones entre las capas de *coating* y la base de papel determinan las propiedades barreras finales (Johansson *et al.*, 2012).

5.4. REOLOGÍA

Entendiendo como fluido aquella sustancia que no puede soportar un esfuerzo sin ponerse en movimiento, se puede decir que la Reología es “la ciencia del flujo y la deformación”, es decir, la rama de la física que estudia el comportamiento de los fluidos sometidos a diferentes tipos de esfuerzos. El campo de la Reología se extiende desde la mecánica de los fluidos Newtonianos por una parte, hasta la elasticidad de Hooke por otra.

Para tales estudios se usan aparatos llamados reómetros, que permiten cuantificar los parámetros inherentes al proceso, para así obtener, mediante gráficas adecuadas, la relación entre el esfuerzo y el cizallamiento (figura 5.7).



Figura 5.7: Reómetro AR 2000

Fuente: TA Instruments

La fuerza F requerida para mover el plato superior se relaciona con el área en contacto con la sustancia y para llegar a una medida específica es necesario dividir la fuerza total necesaria para el movimiento por el área en contacto con la sustancia. A esta relación se le denomina **Esfuerzo de Corte τ** (el movimiento entre planos es siempre referido como “corte” o “cizalla”, en inglés “shear”). Las unidades en el Sistema Internacional serían Pascales (Pa).

El cizallamiento ejercido sobre el material es relacionado con la velocidad relativa de movimiento y la distancia entre platos. A una velocidad, v , dada, mayor esfuerzo se requiere en una unidad de material cuando los platos están más cercanos. La medida específica de este trabajo por unidad de material es llamada **velocidad o tasa de deformación o corte**, y es definida como la velocidad relativa dividida por la distancia entre platos.

Las características reológicas de un fluido son uno de los criterios esenciales en el desarrollo de productos en el ámbito industrial. Frecuentemente, éstas determinan las propiedades funcionales de algunas sustancias e intervienen durante el control de calidad, los tratamientos (comportamiento mecánico), el diseño de operaciones básicas como bombeo, mezclado y envasado, almacenamiento y estabilidad física, etc.

En el campo de la celulosa, las investigaciones se han enfocado en las propiedades reológicas de diferentes tipos de suspensiones de celulosa procedente de varias fuentes (celulosa bacteriana, celulosa de algas, algodón, pasta maderera, etc.) como *whiskers* de celulosa (Orts *et al.*, 1998; Ebeling *et al.*, 1999; Bercea and Navard, 2000; Azizi *et al.*, 2005), hidrogeles (Tatsumi *et al.*, 1999, 2002; Rudraraju and Wyandt, 2005; Myhranyan *et al.*, 2007; Tatsumi, 2007;), y suspensiones de celulosa microfibrilada (Dinand *et al.*, 1996, 1999; Tatsumi *et al.*, 1999, 2002; Lowys *et al.*, 2001; Togrul and Arslan, 2003; Pääkkö *et al.*, 2007; Tatsumi, 2007; Wagberg *et al.*, 2008). En muchos casos, las suspensiones de celulosa se han empleado directamente tras la preparación (Dinand *et al.*, 1996; Dinand *et al.*, 1997; Dinand *et al.*, 1999; Tatsumi *et al.*, 1999; Tatsumi *et al.*, 2002; Tatsumi, 2007; Wagberg *et al.*, 2008), ya que éstas son difíciles de conservar. Desafortunadamente, tras el secado se produce un aumento en el grado de entrecruzamiento de las microfibrillas debido a enlaces de hidrógeno adicionales que no se pueden romper durante el rehumedecimiento (Minor, 1994; Weise, 1998). Además, las propiedades de hinchamiento iniciales no se reestablecen tras el rehumedecimiento de las fibras. Lo que se conoce como hornificación (Jayme, 1942). Por tanto, la redispersión de la celulosa microfibrilada en agua, una vez secas, no permite la recuperación de las propiedades reológicas de la suspensión inicial (Lowys *et al.*, 2001). En particular, el método de liofilización es el más usado para la conservación de las micro/nanofibras y conlleva una pérdida importante de las propiedades reológicas (Lowys, 1999). Para prevenir o revertir este fenómeno se han añadido aditivos poliméricos solubles en agua a las suspensiones de celulosa antes de liofilizarlas. Entre estos aditivos se pueden destacar las hemicelulosas, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilato de sodio o derivado de poliacrilamida catiónica (Centola and Borruso, 1967; Lowys *et al.*, 2001; Rebuzzi and Evtuguin, 2006; Köhnke and

Gatenholm, 2007). El mayor inconveniente de este procedimiento es lo caro que resulta para llevarlo a la práctica. Encontrar un proceso de conservación fácilmente aplicable a escala industrial y que afecte poco a las propiedades reológicas de las suspensiones de celulosa es aún un reto (Agoda-Tandjawa *et al.*, 2010).

5.4.1. CLASIFICACIÓN DE LOS FLUIDOS



Figura 5.8: Esquema de la clasificación de los fluidos

5.4.1.1. Fluidos Newtonianos

Se caracterizan por cumplir la Ley de Newton, que establece que existe una relación lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación. La viscosidad de un fluido Newtoniano no depende del tiempo de aplicación del esfuerzo, aunque sí puede depender tanto de la temperatura como de la presión a la que se encuentre.

5.4.1.2. Fluidos No Newtonianos

Son aquéllos en los que la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación no es lineal.

Cuando los fluidos no-Newtonianos se someten a velocidades de corte por encima de 10 seg^{-1} se dan varios fenómenos que pueden ser clasificados en 4 categorías:

- 1ª) Características de flujo de fase líquida o dispersante.
- 2ª) Efectos de fase suspendida o dispersada.
- 3ª) Interacciones partícula-partícula.
- 4ª) Efectos poliméricos cuando las sustancias macromoleculares se solubilizan en la fase líquida dispersante.

El origen de los fenómenos de flujo no-Newtonianos es atribuido a varios tipos de partículas líquidas y sólidas suspendidas en la fase líquida, y/o macromoléculas poliméricas solubilizadas en ella. El efecto principal es que, en el flujo, la transferencia de energía cinética a través de la masa del fluido cambia porque las partículas se trasladan y rotan bajo la influencia del flujo superimpuesto, además de por el movimiento del fluido. Como resultado, los esfuerzos de cizalla puede aumentar o disminuir dependiendo de:

- ✚ Las interacciones de fase dispersante y dispersa.
- ✚ Interacciones partícula-partícula, las cuales determinan el grado de agregación de partículas.
- ✚ Las interacciones mecánicas de las partículas dispersadas debidas a los efectos hidrodinámicos.

Las propiedades reológicas del fluido dependen de una energía potencial neta manifestada por la superposición de fuerzas secundarias (por ejemplo, electrostáticas, Van der Waals y solvatación) y efectos mecánicos debido a los fenómenos hidrodinámicos. Así, el equilibrio entre la asociación y disociación de las partículas que forman esta estructura controla la Reología cuando se somete el fluido a cizallamiento. Cuando las partículas son también asimétricas, la orientación juega un papel adicional.

La Reología de las suspensiones con baja concentración de sólidos viene dictada principalmente por las interacciones interfaciales líquido-partículas. Con el aumento del contenido en sólidos, sin embargo, la distancia media entre partículas disminuye y las interacciones partícula-partícula y los efectos hidrodinámicos influyen en el flujo. Las partículas se encuentran normalmente rodeadas por una capa de líquido inmovilizada (capa de solvatación), la cual es arrastrada a lo largo de la trayectoria de las partículas en el flujo. El espesor de esta capa depende del potencial electrocinético de la superficie de la partícula, de la fuerza iónica, de la adsorción del polímero, y de las interacciones iónicas entre las partículas y la fase continua. Por tanto, cualquier relación funcional entre la resistencia de la masa a fluir y la concentración volumétrica depende de la cercanía de las partículas empaquetadas juntas sometidas a cizallamiento.

Los efectos hidrodinámicos, los cuales controlan la frecuencia de colisión de las partículas, juegan un papel adicional en la determinación del empaquetamiento máximo bajo cizallamiento. A medida que la concentración volumétrica se incrementa, también lo hace la

viscosidad del fluido, y estos efectos tienen un mayor impacto en las reestructuraciones características del flujo.

Otro parámetro crítico es el estado de floculación y agregación de las partículas. La asociación de las partículas debido a las interacciones partícula-partícula induce la formación de una red estructural interna en suspensión generando un entramado tridimensional. Antes del cizallamiento inicial, el estado de la dispersión y su habilidad para comenzar a fluir dependen de la energía potencial barrera que mantienen las partículas separadas, la cual es determinada por las fuerzas secundarias. A bajas velocidades de cizallamiento, la estructura de la suspensión resiste la deformación y, a veces, el flujo no comienza hasta que la destrucción de la estructura interna se completa. A velocidades más altas, se produce la ruptura de la estructura interna. El cizallamiento compite con la formación de estructuras debido al aumento de la frecuencia de las colisiones entre partículas. Efectos electroviscosos provenientes de interacciones de doble capa, cambios en la fuerza iónica de la suspensión, y la presencia de polielectrolitos poliméricos juegan un papel adicional en la Reología.

Es importante señalar que el histórico de cizallamiento afecta al comportamiento reológico debido a la habilidad de muchos fluidos de “recordar” tratamientos previos. Las suspensiones deformadas por primera vez tienen propiedades reológicas diferentes de aquellas que se dan tras el cese del flujo. El tiempo de recuperación de los fluidos no-Newtonianos depende de la orientación de las partículas y de los efectos de colisión durante la reconstrucción de la estructura.

Las sustancias poliméricas solubilizadas en dispersiones, como los polímeros naturales o sintéticos, también tienen un profundo efecto en la Reología. Esto sucede debido a que las macromoléculas solubilizadas crean una estructura en la suspensión como un gel (*gel-like network*, en inglés), que es más fuerte que la estructura inducida por las interacciones partícula-partícula, que atrapa una gran cantidad de fase líquida. A medida que la velocidad de cizallamiento aumenta, el gel es destruido liberando el agua atrapada, por lo que la viscosidad disminuye. Una vez destruido, el gel puede reformarse cuando el flujo cesa (Triantafillopoulos, 1988).

Los fluidos No-Newtonianos se clasifican en:

5.4.1.2.1. *Independientes del tiempo*

Estos fluidos se pueden clasificar dependiendo de si presentan o no esfuerzo umbral, es decir, si necesitan un mínimo valor de esfuerzo cortante para que el fluido se ponga en movimiento.

a) Fluidos sin esfuerzo umbral

a.1) Pseudoplásticos (*Shear-Thinning*): Se caracterizan por una disminución de su viscosidad y de su esfuerzo cortante con la velocidad de deformación. Los grumos y agregados de las partículas originalmente presentes en la suspensión son destruidos por la cizalla. Los mecanismos específicos para este tipo de comportamiento reológico son:

- ✚ Fractura de la estructura debido a los efectos hidrodinámicos donde la velocidad de disociación es mayor que la velocidad de su asociación.
- ✚ Orientación favorable de macromoléculas o partículas asimétricas dispersadas en el flujo.
- ✚ Disminución o eliminación de la capa de solvatación que rodea a las partículas debido a los efectos hidrodinámicos.

El grado de pseudoplasticidad depende del estado estructural de la dispersión previa al cizallamiento y de la composición de la fase dispersante.

a.2) Dilatantes (*Shear-Thickening*): Los fluidos dilatantes son suspensiones en la que se produce un aumento de la viscosidad con la velocidad de deformación, es decir, un aumento del esfuerzo cortante con dicha velocidad. Este comportamiento se puede atribuir a:

- ✚ Un incremento localizado en la concentración de partículas, como floculación o agregación inducido por el cizallamiento
- ✚ Velocidades crecientes de alineamiento de partículas debido a un gradiente de velocidad del fluido que compite con desalineación debido al movimiento Browniano.

La reología dilatante depende de la partícula y la forma, así como de la estabilidad coloidal. Así, los sistemas poco estabilizados desarrollan dilatancia a velocidades relativamente menores.

- b) Fluidos con esfuerzo umbral o viscoplásticos:** Este tipo de fluido se comporta como un sólido hasta que sobrepasa un esfuerzo cortante mínimo (esfuerzo umbral) y a partir de dicho valor se comporta como un líquido.

La razón por la que se comportan así los fluidos plásticos es la gran interacción existente entre las partículas suspendidas en su interior, formando una capa llamada solvatación. Están formados por dos fases, con una fase dispersa formada por sólidos y burbujas distribuidos en una fase continua.

En estos fluidos las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno producen una atracción mutua entre partículas. También aparecen fuerzas de repulsión debidas a potenciales de la misma polaridad. En este tipo de fluidos se forman coloides cuyas fuerzas repulsivas tienden a formar estructuras de tipo gel. Si las partículas son muy pequeñas poseen entonces una gran superficie específica, rodeados de una capa de adsorción formada por moléculas de fase continua. Gracias a esta capa, las partículas inmovilizan gran cantidad de fase continua hasta que no se aplica sobre ellas un esfuerzo cortante determinado.

5.4.1.2.2. Dependientes del tiempo

Se clasifican en dos tipos: tixotrópicos y reopéticos.

- a) Tixotrópicos:** En los que su viscosidad disminuye al aumentar el tiempo de aplicación del esfuerzo cortante, recuperando su estado inicial después de un reposo prolongado. Se caracterizan por un cambio en su estructura interna al aplicar un esfuerzo. La tixotropía ocurre debido a la existencia de fuerzas interpartícula que producen estructuras tridimensionales en el seno del fluido. Estas estructuras, llamadas flóculos o agregados, son relativamente débiles y tienden a desagregarse cuando se somete el fluido a un campo de deformación. La viscosidad va disminuyendo al aplicar una cizalla y acto seguido vuelve a aumentar al cesar dicho esfuerzo de corte debido a la reconstrucción de sus estructuras y al retraso que se produce para adaptarse al cambio.

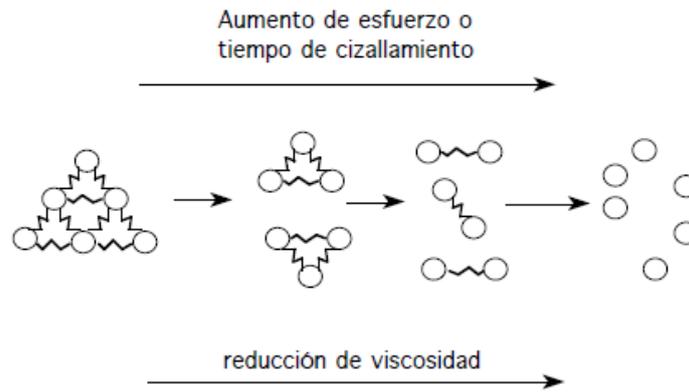


Figura 5.9: Modelo idealizado de los sistemas dispersos floculados en reposo y al ser sometidos a cizallamiento.

Fuente: Rojas *et al.*, 2012.

En la figura 5.9 se muestra un modelo idealizado de un sistema disperso que ha floculado, y su desagregación a medida que el sistema es sometido a un esfuerzo o campo de deformación.

La figura 5.10 representa la respuesta macroscópica del sistema, o curva de flujo. En el reposo, o a muy bajas tasas de corte, no hay energía suficiente para superar las fuerzas antes mencionadas y se produce, a lo sumo, una deformación elástica del fluido, la cual es casi reversible si el esfuerzo se mantiene por debajo de τ_0 . Sin embargo, una vez que se ha superado este valor umbral, se inicia la desagregación de partículas (o rompimiento de los enlaces), momento en el cual puede aparecer un máximo en la curva de flujo (o esfuerzo elástico). En el límite de altas tasas de corte, una vez que ha ocurrido la desagregación de las partículas, el fluido puede alcanzar un comportamiento viscoso simple, o comportamiento Newtoniano (Rojas *et al.*, 2012).

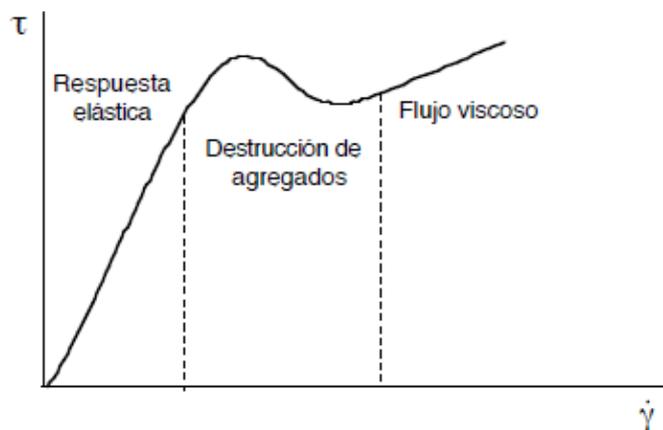


Figura 5.10: Modelo idealizado de los sistemas dispersos floculados. Respuesta macroscópica.

Fuente: Rojas *et al.*, 2012.

En la figura 5.11 se muestran curvas de flujo típicas para un fluido tixotrópico cuando este ha sido sometido a ciclos sucesivos de cizallamiento. A medida que progresan los ciclos de cizallamiento, la resistencia a fluir cambia, produciendo lazos de histéresis. Si la resistencia a fluir disminuye a medida que evoluciona la deformación, se dice que el material presenta una tixotropía positiva. Si ocurre el comportamiento opuesto, se dice que el comportamiento es tixotrópico negativo.

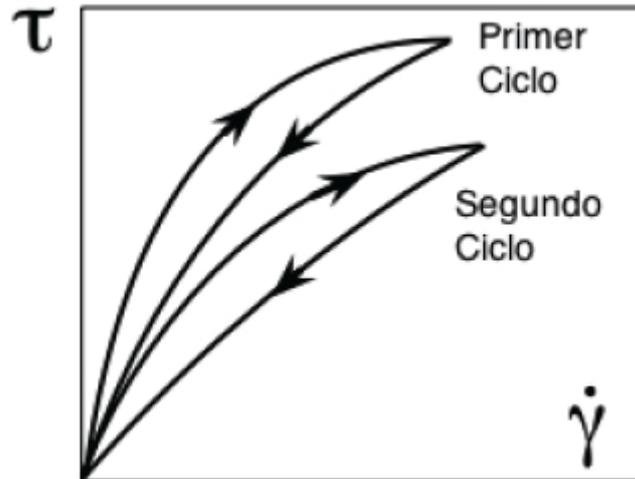


Figura 5.11: Comportamiento de flujo de fluidos tixotrópicos sometidos a varios ciclos de cizallamiento.

Fuente: Rojas *et al.*, 2012

- b) Reopécticos:** Se caracterizan por tener un comportamiento contrario a los tixotrópicos, es decir, su viscosidad aumenta con el tiempo de aplicación del esfuerzo de corte y con la velocidad de deformación aplicada y vuelven a su estado anterior tras un tiempo de reposo. Esto se debe a que si se aplica una fuerza, se produce una formación de enlaces intermoleculares conllevando un aumento de la viscosidad, mientras que si cesa ésta, se produce una destrucción de los enlaces dando lugar a una disminución de la viscosidad.

5.4.1.3. Viscoelásticos

Son los formados por la suma de un componente elástico (Hookeano o no) que absorbe la energía aplicada, transformándola durante la deformación en energía potencial, de forma que cuando esta cesa, la deformación vuelve a su estado inicial, y un componente viscoso (Newtoniano o no), que absorbe la energía aplicada transformándola en calor y fluyendo. El término viscoelasticidad engloba el comportamiento de muchos fluidos que pueden exhibir elasticidad y flujo cuando son sometidos a cizallamiento. Esto se traduce en el

comportamiento siguiente: a bajas deformaciones, el fluido viscoelástico se comporta literalmente como un sólido elástico. A altas deformaciones, estos fluyen de forma viscosa; es decir, como líquidos.

5.4.2. TEORÍA DE LOS EXPERIMENTOS OSCILATORIOS

Un experimento oscilatorio consiste en someter un fluido a un esfuerzo o deformación sinusoidal. Esta deformación puede expresarse en forma matemática como:

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (1)$$

Donde γ_0 es la amplitud de la onda de deformación y ω es la frecuencia de oscilación. El esfuerzo resultante a la deformación es:

$$\tau = \tau_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (2)$$

Donde δ es el ángulo de fase. Las ecuaciones para γ y τ , en estos casos, se han representado en la figura 5.12. El ángulo de fase δ es cero para los sólidos elásticos y 90° para los líquidos Newtonianos. Un fluido viscoelástico exhibe un ángulo de fase de entre cero y 90° .

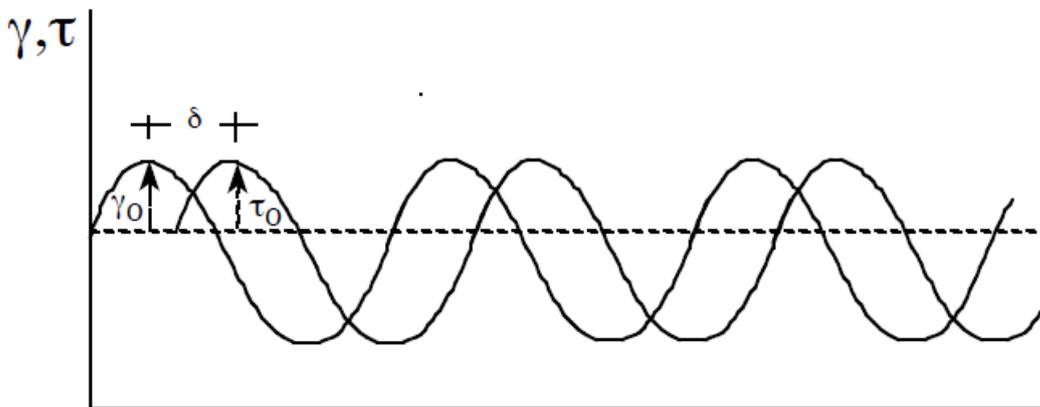


Figura 5.12: Deformación oscilatoria y respuesta del esfuerzo, mostrando el ángulo de fase entre estímulo y respuesta.

Fuente: Rojas *et al.*, 2012.

El esfuerzo puede descomponerse en dos componentes, un componente en fase y un componente fuera de fase. Puede definirse entonces un módulo de elasticidad complejo:

$$G^* = G' + i G'' \quad (3)$$

La señal en fase, G' , se denomina módulo de almacenamiento (elástico), o energía almacenada por ciclo y se calcula como:

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma} \cos \delta \quad (4)$$

La señal fuera de fase, G'' , o módulo de pérdidas (o módulo viscoso), o energía disipada por ciclo, se expresa como:

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad (5)$$

En la figura 5.13 se observa la respuesta de un material real sometido a un ensayo oscilatorio. En ella se distinguen cinco zonas diferentes:

- ✚ **Zona I:** Zona de flujo o terminal donde G'' predomina, lo cual indica un comportamiento viscoso, es decir, el material fluye.
- ✚ **Zona II:** Es la zona de transición al flujo. A partir de frecuencias elevadas, cuando aún $G' > G''$, se encuentra el punto de intersección entre los módulos que marca el comienzo del comportamiento viscoso.
- ✚ **Zona III:** Zona gomosa, indica la meseta exhibida por G' , que puede considerarse esencialmente constante en ese rango de frecuencia. El comportamiento elástico predomina y el material se comporta como un sólido. En algunos casos, cuando la pendiente según la cual disminuye G'' es suficientemente pequeña, es posible considerar que esta zona se aproxima a un comportamiento viscoelástico lineal.
- ✚ **Zona IV:** Zona de transición vítrea. G'' comienza a aumentar rápidamente y se produce otro corte entre los módulos, lo cual representa un segundo tiempo característico del material.
- ✚ **Zona V:** Corresponde a la región cristalina donde G'' predomina.

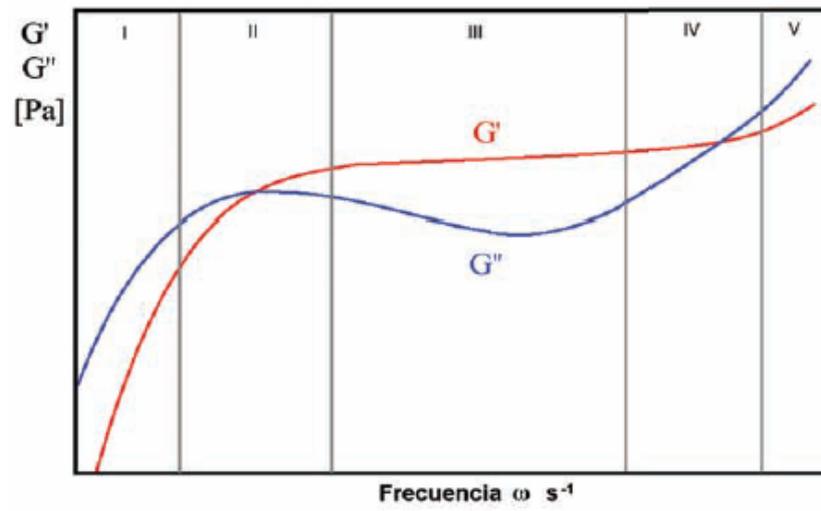


Figura 5.13: Respuesta de un material real sometido a un ensayo oscilatorio.

Fuente: Rojas *et al.*, 2012.

5.5. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul Khalil H. P. S., Bhat A. H. and Ireana Yusra A. F. **2012**. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. *Carbohydr Polym* 87, 963-979. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.08.078.
- Abdul Khalil H. P. S., Davoudpour Y., Nazrul Islam Md., Mustapha A., Sudesh K., Dungani R. and Jawaid M. **2013**. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical process: A review. *Carbohydr Polym* 99, 649-665. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.08.069
- Agoda-Tandjawa G., Durand S., Berot S., Blassel C., Gaillard C., Garnier C. and Doublier J.L. **2010**. Rheological characterization of microfibrillated cellulose suspensions after freezing. *Carbohydr Polym* 80, 677-686. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.11.045.
- Arola S., Malho J. M., Laaksonen P., Lille M., and Linder M. B. **2013**. The role of hemicellulose in nanofibrillated cellulose networks. *Soft Matter* 9, 1319-1326. DOI: 10.1039/c2sm26932e.
- Aulin C., Gällstedt M. and Lindström T. **2010**. Oxygen and oil barrier properties of microfibrillated cellulose films and coatings. *Cellulose* 17 (3), 559-574. DOI: 10.1007/s10570-009-9393-y.
- Azizi Samir, M. A. S., Alloin F. and Dufresne A. **2005**. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules*, 6(2), 612–626. DOI: 10.1021/bm0493685.
- Belgacem M. N. and Gandini A. **2011**. Production, chemistry and properties of cellulose-based materials, In Plackett, D. (ed.) *Biopolymers- New Materials for Sustainable Films and Coatings*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, UK, Chapter 8. DOI: 10.1002/9781119994312.ch8.
- Bercea M. and Navard P. **2000**. Shear dynamics of aqueous suspensions of cellulose whiskeys. *Macromolecules* 33(16), 6011–6016. DOI:10.1021/ma000417p.
- Brown R., Czaja W., Jeschke M. and Young, D. **2007**. Multi-ribbon nanocellulose as a matrix for wound healing. *US Pat.* 2007053960.
- Bulota M., Kreitsmann K., Hughes M. and Paltakari J. **2012**. Acetylated microfibrillated cellulose as a toughening agent in poly(lactic acid). *J Appl Polym Sci* 126, 449-458. DOI: 10.1002/app.36787.

- Carrillo C. A., Laine J. and Rojas O. J. **2014**. Microemulsion systems for fibers deconstruction into cellulose nanofibrils. *ACS Appl Mater Inter* 6, 22622-22627. DOI: 10.1021/am5067332.
- Centola G. and Borruso D. **1967**. The influence of hemicelluloses on the beatability of pulps. *TAPPI J* 50 (7), 344-347.
- Cheng Q., Wang S. and Rials T.G. **2007**. Biodegradable nanocomposites reinforces with cellulose fibrils. Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI) & Forest Product Society. International Conference on Nanotechnology for the Forest Products Industry, June 13-15, Knoxville, TN. 61 (Poster).
- Cintil J. C., Lovely M. and Sabu T. **2014**. Review of recent research in nanocellulose preparation from different lignocellulosic fibers. *Rev Adv Mater Sci* 37, 20-28.
- Coseri S., Biliuta G., Simionescu B. C., Stana-Kleinschek K., Ribitsch V. and Harabagiu V. **2013**. Oxidized cellulose: survey of the most recent achievements. *Carbohydr Polym* 93, 207-215, DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.03.086.
- De Nooy A. E. J., Besemer A. C. and Van Bekkum H. **1994**. Highly selective TEMPO mediated oxidation of primary alcohol groups in polysaccharides. *Recl Trav Chim Pay-B* 113, 165-166. DOI: 10.1002/recl.19941130307.
- Dinand E., Chanzy H. and Vignon M. R. **1996**. Parenchymal cell cellulose from sugar beet pulp: Preparation and properties. *Cellulose* 3(3), 183-188. DOI: 10.1007/BF02228800.
- Dinand E., Chanzy H. and Vignon M. **1997**. Parenchymal cell cellulose from sugar beet pulp: Preparation and properties. *Abstr Pap Am Chem S* 213, 59-CELL.
- Dinand E., Chanzy H. and Vignon M. R. **1999**. Suspensions of cellulose microfibrils from sugar beet pulp. *Food Hydrocolloid* 13(3), 275-283. DOI: 10.1016/S0268-005X(98)00084-8.
- Ebeling T., Paillet M., Borsali R., Diat O., Dufresne A. and Cavaille J. Y. **1999**. Shear-induced orientation phenomena in suspensions of cellulose microcrystals, revealed by small angle X-ray scattering. *Langmuir* 15(19), 6123-6126. DOI: 10.1021/la990046+.
- George J. and Ramana, K. V. **2011**. Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. *Int J Biol Macromol* 48, 50-57. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.09.013.
- Gonçalves G., Marques P. A. A. P., Trindade T., Neto C. P. and Gandini A. **2008**. Superhydrophobic cellulose nanocomposites. *J Coll Interf Sci* 324 (1), 42-46. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.04.066.

- Habibi Y., Lucia L. A. and Rojas O. J. **2010**. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self assembling, and applications. *Chem Rev* 110, 3479–3500. DOI: 10.1021/cr900339w.
- Henriksson M., Berglund L. A., Isaksson P., Lindström T. and Nishino T. **2008**. Cellulose nanopaper structures of high toughness. *Biomacromolecules* 9, 1579-1585. DOI: 10.1021/bm800038n.
- Herrick F. W., Casebier R. L., Hamilton J. K. and Sandberg K. R. **1983**. Microfibrillated cellulose: morphology, and accessibility. In Sarko A. (Ed.), *Proceedings of the Ninth Cellulose Conference*. *Appl Polym Symp*, vol. 37. Wiley, N. Y. Pp. 797-813.
- Ho T. T. T., Zimmermann T., Hauert R. and Caseri W. **2011**. Preparation and characterization of cationic nanofibrillated cellulose from etherification and high-shear disintegration processes. *Cellulose* 18, 1391–1406. DOI: 10.1007/s10570-011-9591-2.
- Hubbe M. A., Rojas O. J., Lucia L. A. and Sain M. **2008**. Cellulosic nanocomposites: A review. *BioResources* 3(3), 929-980.
- Hult E. L., Iotti M. and Lenés M. **2010**. Efficient approach to high barrier packaging using microfibrillar cellulose and shellac. *Cellulose* 17 (3), 575-586. DOI: 10.1007/S10570-010-9408-8.
- Ioelovich M. **2008**. Nanostructured cellulose: Review. *BioResources* 3 (4), 1403-1418.
- Ioelovich M. and Figovsky, O. **2008a**. Nano-cellulose as promising biocarrier. *J Mater Res* 47-50, 1286-1289. DOI: 10.4028/0-87849-378-6.1286.
- Ioelovich M. and Figovsky O. **2008b**. Nano-cellulose as a biocarrier. *J. SITA* 10 (1), 37-41.
- Isogai A., Saito T. and Fukuzumi H. **2011**. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale* 3, 71. DOI: 10.1039/c0nr00583e.
- Iwamoto S., Nakagaito A.N. and Yano H. **2007**. Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites. *Appl Phys A* 89, 461–466. DOI: 10.1007/s00339-007-4175-6.
- Jayme G. **1942**. Über die reaktionsfähigkeit von zellstoffen. *Cellulosechemie* 21(4), 73–86.
- Jiang F. and Hsieh Y. L. **2013**. Chemically and mechanically isolated nanocellulose and their self-assembled structures. *Carbohydr Polym* 95, 32-40. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.02.022.

- Johansson C., Bras J., Mondragon I., Nechita P., Plackett D., Simon P., Gregor Svetec D., Virtanen S., Giacinti Baschetti M., Breen C., Clegg F. and Aucejo S. **2012**. Renewable fibers and bio-based materials for packaging applications- A review of recent developments. *BioResources* 7 (2), 2506-2552.
- Jonoobi M., Mathew A. P. and Oksman K. **2012**. Producing low-cost cellulose nanofiber from sludge as new source of raw materials. *Ind Crops Prod* 40, 232-238. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.03.018.
- Klemm D., Heublein B., Fink H. P. and Bohm A. **2005**. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Edit* 44, 2-37. DOI: 10.1002/anie.200460587.
- Klemm D., Kramer F., Moritz S., Lindstrom T., Ankerfors M. and Gray D. **2011**. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angew Chem Int Edit* 50, 5438–5466. DOI: 10.1002/anie.201001273.
- Klemm D., Schumann D., Kramer F., Hessler N., Hornung M., Schmauder H. P. and Marsch S. **2006**. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. *Adv Polym Sci* 205, 49-96. DOI: 10.1007/12_097.
- Köhnke T. and Gatenholm P. **2007**. The effect of controlled glucuronoxylan adsorption on drying-induced strength loss of bleached softwood pulp. *Nord Pulp Pap Res J* 22(4), 508–515. DOI: 10.3183/NPPRJ-2007-22-04-p508-515.
- Liimatainen H., Visanko M., Sirviö J., Hormi O. and Niinimäki J. **2013**. Sulfonated cellulose nanofibrils obtained from wood pulp through regioselective oxidative bisulfite pre-treatment. *Cellulose* 20, 741–749. DOI: 10.1007/s10570-013-9865-y.
- Lowys M. P. **1999**. *Comportement physicochimique de suspensions de fibres cellulosiques. Rôle des additifs*. France. Grenoble: Université Joseph Fourier (p. 247).
- Lowys M. P., Desbrieres J. and Rinaudo M. **2001**. Rheological characterization of cellulosic microfibril suspensions. Role of polymeric additives. *Food Hydrocolloid* 15(1), 25–32. DOI: 10.1016/S0268-005X(00)00046-1.
- Masuko Sangyo Co. Ltd. www.masuko.com
- McClements D. J. **2010**. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter* 7, 2297-2316. DOI: 10.1039/C0SM00549E.
- Microfluidics Inc. www.microfluidicscorp.com

- Mihranyan A., Edsman K. and Stromme M. **2007**. Rheological properties of cellulose hydrogels prepared from *Cladophora* cellulose powder. *Food Hydrocolloid* 21(2), 267–272. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2006.04.003.
- Minor J. L. **1994**. Hornification – Its origin and meaning. *Progr Pap Recycling* 3(2), 93–95.
- Mishra S. P., Manent A. S., Chabot B. and Daneault C. **2012**. The use of sodium chlorite in post-oxidation of TEMPO-oxidized pulp: effect on pulp characteristics and nanocellulose yield. *J Wood Chem Technol* 32, 137–148. DOI: 10.1080/02773813.2011.624666.
- Mohanty A. K., Misra M. and Drzal L.T. **2002**. Sustainable bio-composites from renewable resources: Opportunities and challenges in the Green Materials World. *J Polym Environ* 10 (12), 19-26. DOI: 10.1023/A:1021013921916.
- Moon R. J., Martini A., Nairn J., Simonsen J. and Youngblood J. 2011. Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. *Chem Soc Rev* 40, 3941–3994. DOI: 10.1039/C0CS00108B.
- Nechyporchuk O., Belgacem M. N. and Bras J. **2016**. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Ind Crops Prod* 93, 2-25. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.02.016
- Nechyporchuk O., Pignon F. and Belgacem M. N. **2015**. Morphological properties of nanofibrillated cellulose produced using wet grinding as an ultimate fibrillation process. *J Mater Sci* 50, 531-541. DOI: 10.1007/s10853-014-8609-1.
- Nippon Paper Group. www.nipponpapergroup.com
- Olsson R. T., Azizi Samir M. A. S., Salazar-Álvarez G., Belova L., Stroem V., Berglund L. A., Ikkala O., Nogues J. and Gedde U. W. **2010**. Making flexible magnetic aerogels and stiff magnetic nanopaper using cellulose nanofibrils as templates. *Nat Nanotechnol* 5 (8), 584-588. DOI: 10.1038/nnano.2010.155.
- Orts W. J., Godbout L., Marchessault R. H. and Revol J. F. **1998**. Enhanced ordering of liquid crystalline suspensions of cellulose microfibrils: A small angle neutron scattering study. *Macromolecules* 31(17), 5717–5725. DOI: 10.1021/ma9711452.
- Pääkkö M., Ankerfors M., Kosonen H., Nykänen A., Ahola S., Österberg M., Ruokolainen J., Laine J., Larsson P.T., Ikkala O. and Lindström T. **2007**. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. *Biomacromolecules* 8, 1934–1941. DOI: 10.1021/bm061215p.

- Rånby B. G. **1949**. Aqueous colloidal solutions of cellulose micelles. *Acta Chem Scand* 3, 649-650. DOI: 10.3891/acta.chem.scand.03-0649.
- Rebuzzi F. and Evtuguin D. V. **2005**. Effect of glucuronoxylan on the hornification of *Eucalyptus globulus* bleached pulps. *Macromol Sy* 232, 121–128. DOI: 10.1002/masy.200551414.
- Rojas O.J., Briceño, M.I. y Avendaño J. **2012**. Fundamentos de Reología. Laboratorio de formulación, interfases, Reología y procesos. Universidad de los Andes.
- Rudraraju, V. S. and Wyandt C. M. **2005**. Rheology of microcrystalline cellulose and sodiumcarboxymethyl cellulose hydrogels using a controlled stress rheometer: Part II. *Int J Pharmaceut* 292(1–2), 63–73. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.10.012.
- Saito T., Hirota M., Tamura N., Kimura S., Fukuzumi H., Heux L. and Isogai A. **2009**. Individualization of nano-sized plant cellulose fibrils by direct surface carboxylation using TEMPO catalyst under neutral conditions. *Biomacromolecules* 10, 1992–1996. DOI: 10.1021/bm900414t.
- Saito T. and Isogai A. **2006**. Introduction of aldehyde groups on surfaces of native cellulose fibers by TEMPO-mediated oxidation. *Colloids Surf A* 289, 219–225. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2006.04.038.
- Saito T., Nishiyama Y., Putaux J. L., Vignon M. and Isogai A. **2006**. Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from TEMPO-catalyzed oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules* 7, 1687–1691. DOI: 10.1021/bm060154s.
- Sehaqui H., Liu A., Zhou Q. and Berglund L.A. **2010**. Fast preparation procedure for large, flat cellulose and cellulose/inorganic nanopaper structures. *Biomacromolecules* 11 (9), 2195-2198. DOI: 10.1021/bm100490s.
- Shinoda R., Saito T., Okita Y. and Isogai A. **2012**. Relationship between length and degree of polymerization of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils. *Biomacromolecules* 13, 842–849, DOI: 10.1021/bm2017542.
- Spence K. L., Venditti R. A., Rojas O. J., Habibi Y. and Pawlak J. J. **2011**. A comparative study of energy consumption and physical properties of microfibrillated cellulose produced by different processing methods. *Cellulose* 18, 1097–1111. DOI: 10.1007/s10570-011-9533-z.
- Svagan A. J., Samir M. A. S. A. and Berglund L. A. **2007**. Biomimetic polysaccharide nanocomposites of high cellulose content and high toughness. *Biomacromolecules* 8, 2556-2563. DOI: 10.1021/bm0703160.

- Syverud K., and Stenius P. **2009**. Strength and barrier properties of MFC films. *Cellulose* 19, 75-85. DOI: 10.1007/s10570-008-9244-2
- Szczesna-Antczak M., Kazimierczak J. and Antczak T. **2012**. Nanotechnology methods of manufacturing cellulose nanofibers. *Fiber and Textile in Eastern Europe* 20(2(91)), 8-12.
- TA Instruments. www.tainstruments.com
- Tatsumi D. **2007**. Rheology of cellulose fiber disperse systems and cellulose solutions. *Nihon Reoroji Gakk*, 35(5), 251-256.
- Tatsumi D., Ishioka S. and Matsumoto T. **1999**. Effect of particle and salt concentrations on the rheological properties of cellulose fibrous suspensions. *Nihon Reoroji Gakk* 27(4), 243-248.
- Tatsumi D., Ishioka S. and Matsumoto T. **2002**. Effect of fiber concentration and axial ratio on the rheological properties of cellulose fiber suspensions. *J Soc Rheol Jpn* 30(1), 27-32.
- Togrul H. and Arslan N. **2003**. Flow properties of sugar beet pulp cellulose and intrinsic viscosity-molecular weight relationship. *Carbohydr Polym* 54 (1), 63-71. DOI: 10.1016/S0144-8617(03)00146-2.
- Triantafillopoulos N. **1988**. Measurement of Fluid Rheology and Interpretation of Rheograms. Second Edition. Kaltec Scientific, Inc.
- Turbak A. F., Snyder F. W. and Sandberg K. R. **1983a**. Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential, in Sarko A. (Ed.), *Proceedings of the Ninth Cellulose Conference*. Appl Polym Symp, vol. 37. Wiley, N. Y. Pp. 815-827.
- Turbak A. F., Snyder F. W. and Sandberg K. R. **1983b**. Microfibrillated cellulose. Patent U. S. 4374702.
- Vázquez A., Forestri M. L. and Cyras V. **2011**. Production, chemistry and degradation of starch-based polymers, In Plackett, D. (ed.) *Byopolymers- New Materials for Sustainable Films and Coatings*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, UK, Chapter 2. DOI: 10.1002/9781119994312.ch2.
- Wågberg L., Decher G., Norgren M., Lindström T., Ankerfors M. and Axnäs K. **2008**. The build-up of polyelectrolyte multilayers of microfibrillated cellulose and cationic polyelectrolytes. *Langmuir* 24(3), 784-795. DOI:10.1021/la702481v.

- Wang Q. Q., Zhu J. Y., Gleisner R., Kuster T. A., Baxa U. and McNeil S. E. **2012**. Morphological development of cellulose fibrils of a bleached eucalyptus pulp by mechanical fibrillation. *Cellulose* 19, 1631–1643. DOI: 10.1007/s10570-012-9745-x.
- Weise U. **1998**. Hornification – Mechanisms and terminology. *Pap Puu –Pap Tim* 80(2), 110–115.
- Zhang Y., Nypelö T., Salas C., Arboleda J., Hoeger I. C. and Rojas O. J. **2013**. Cellulose nanofibrils: From strong materials to bioactive surfaces. *J Renew Mater* 1 (3), 195-211, DOI: 10.7569/JRM.2013.634115.
- Zhao M., Li J., Mano E., Song Z., Tschaen D. M., Grabowski E. J. and Reider P. J. **1999**. Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with sodium chlorite catalyzed by TEMPO and bleach. *J Org Chem* 64, 2564–2566. DOI: 10.1021/jo982143y.

Capítulo

II

MATERIALES Y
MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

Sección 1. Materiales

Sección 2. Producción de pastas celulósicas y papel.

Sección 3. Obtención de oligómeros y bioetanol de segunda generación.

Sección 4. Producción de nanofibras de celulosa y nanopapeles.



1. MATERIALES

1.1. MATERIA PRIMA

En la presente Tesis Doctoral la materia prima sobre la que se ha centrado la atención ha sido la paja de cebada (*Hordeum vulgare*), siendo otras materias primas estudiadas en menor profundidad (maíz (*Zea mays*), colza (*Brassica napus*) y avena (*Avena sativa*)).

La paja de maíz y colza fue proporcionada por una empresa local situada en Écija (Sevilla, España). Por último, la paja de cebada y avena fue amablemente cedida por agricultores de Alcalá La Real (Jaén, España) y Sevilla, respectivamente.

Tras la recolección de las balas de los diferentes materiales lignocelulósicos, estos se esparcieron para permitir su completo secado y posteriormente se almacenaron en bolsas opacas para conseguir la homogeneidad de la materia prima de los diferentes lotes (figura 1).



Figura 1: Imágenes del proceso de recogida y almacenado de paja.

1.2. EQUIPAMIENTO PARA EL ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

Para una correcta caracterización química de la materia prima es necesario triturar previamente la misma empleando un molino.

1.2.1. Molino de materia prima

Se utiliza un molino convencional que consigue tamaños de partícula menor de 8 mm (figura 2).



Figura 2: Molino de materia prima Retsch 2000.

1.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA

La composición química de la materia prima empleada ha sido determinada siguiendo los siguientes estándares de la *Technical Association of Pulp and Paper Industry* (TAPPI).

1.3.1. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD: TAPPI T257 cm-02 (2002)

Se coloca una cantidad conocida del material lignocelulósico (MLC), entre 1-2 g, en un recipiente de peso conocido (previamente secado en la estufa hasta peso constante) y se mete en la estufa a 105°C hasta alcanzar un peso constante, aproximadamente a las 24 h. A continuación se enfría en un desecador que contiene gel de sílice y finalmente se pesa. El porcentaje de humedad, en gramos de agua por cada gramo de MLC húmedo, se calcula usando la siguiente ecuación (ec.1):

$$H = \frac{PRMH - PRMS}{PRMH - PRS} \quad (1)$$

donde:

- ✚ PRMH es el peso en gramos del recipiente seco con la muestra húmeda inicial.
- ✚ PRS es el peso en gramos del recipiente seco.
- ✚ PRMS es el peso en gramos del recipiente con la muestra seca.

1.3.2. EXTRAÍBLES CON ETANOL/CONTENIDO EN EXTRACTOS (CE): VARIANTE DE TAPPI T204 cm-97 (1997)

Se pesan entre 5-20 gramos de MLC y se introducen en el Soxhlet. Posteriormente, en el balón de extracción (de peso conocido) se introducen aproximadamente 100 mL de etanol al 96%. A continuación, se realiza la extracción a reflujo durante 6-12 h. Transcurrido dicho tiempo, se retira el disolvente y se deja el extracto hasta que se tenga un pequeño volumen en el balón de extracción, dejándolo un tiempo a temperatura ambiente para su evaporación, e introduciéndolo en una estufa a 105°C durante 24 h para acabar de secar el extracto. Finalmente se enfría en un desecador que contiene gel de sílice y se pesa. El CE, en gramos de extractos/100 gramos de MLC, en base seca, se calcula empleando la siguiente ecuación (ec.2):

$$CE = \frac{PRMS - PRS}{PMH * (1 - H)} * 100 \quad (2)$$

donde:

- ✚ PRMS es el peso en gramos del balón conteniendo el residuo seco de los extractos (tras extracción, evaporación en rotavapor y secado en estufa).
- ✚ PRS es el peso en gramos del balón seco.
- ✚ PMH es el peso en gramos de la muestra húmeda inicial.
- ✚ H es la humedad de la muestra.

1.3.3. SOLUBILIDAD EN SOSA AL 1%: TAPPI T212 cm-98 (1998)

El porcentaje de solubilidad en sosa al 1% de la muestra es inversamente proporcional al rendimiento en un proceso de pasteado. En un vaso de precipitado se pesan aproximadamente 2 g de muestra añadiendo 100 mL de sosa al 1%; se tapa con un vidrio de reloj y se calienta en baño maría durante 1 hora, con agitación esporádica. Se filtra en una placa del número 1 ó 2, lavando con 50 mL de ácido acético 2 N y con agua caliente. Después se seca en estufa a 105°C y se pesa. El resultado es expresado en % sobre base seca.

1.3.4. SOLUBILIDAD EN AGUA CALIENTE: TAPPI T207 cm-99 (1999)

Para determinar la solubilidad en agua caliente se pesan 2 g aproximadamente de muestra en un vaso de precipitados añadiendo 100 mL de agua. En baño maría de glicerina se calienta a 100°C durante 3 horas, tapando con vidrio de reloj y agitando esporádicamente. Se filtra con placa del número 2 tarada y se lava con agua caliente, secándose en estufa a 105°C durante 24 h y se pesa. El resultado se expresa en % sobre base seca.

1.3.5. HOLOCELULOSA: T9M-54 (1998)/WISE *et al.* (1946)

Se basa en que el dióxido de cloro que se desprende en los sucesivos tratamientos con clorito sódico, ataca y disuelve la lignina, permaneciendo inalterables los hidratos de carbono.

Se llevan aproximadamente 5 g de muestra a un Erlenmeyer, añadiendo 160 mL de agua. Una vez calentado en baño maría a 75-80°C se añaden 1,5 g de clorito sódico y 10 gotas de acético glacial concentrado. Se agita periódicamente y cada hora se añade otra dosis de clorito y acético, hasta 3 tratamientos. Se continúa si no se blanquea. Después se enfría y filtra en una placa del número 2, previamente tarada, se añade un poco de acetona y se lava con agua fría. Se seca en estufa a 105°C durante 24 h y se pesa. Los resultados se expresan en % sobre base seca y sin extraer. Siempre se ha de adicionar el acético antes que el clorito.

1.3.6. α -CELULOSA: TAPPI T203 cm-99 (1999)

En un vaso de precipitado se añaden aproximadamente 3 g de muestra, calentando al baño maría a 20°C. Se miden 75 mL de sosa al 17,5%, que se añaden de la siguiente forma:

- ✚ 15 mL y agitar durante 1 minuto.
- ✚ 10 mL y agitar durante 45 segundos.
- ✚ 10 mL y agitar durante 15 segundos.

Se deja reposar durante 1 minuto, y se continúa de la siguiente manera:

- ✚ 10 mL y agitar durante 2,5 minutos.
- ✚ A los 2,5 minutos añadir 10 mL.
- ✚ A los 2,5 minutos añadir 10 mL.
- ✚ A los 2,5 minutos añadir 10 mL y agitar 2,5 minutos.

Después se cubre con un vidrio de reloj y se deja reposar 30 minutos. Se añaden 100 mL de agua y se agita rápida y vigorosamente. Se deja reposar durante 30 minutos y se filtra en placa del número 2 sobre un kitasato limpio; se lava el vaso con 25 mL de sosa al 8,3% y se filtra, durante 5 minutos. Después de lavar 5 veces con porciones de 50 mL agua, nuevamente se lava con 400 mL de agua sobre otro kitasato. Sin vacío, se llena la placa con ácido acético 2N y se deja 5 minutos, antes de aspirar. Se lava con agua hasta que no dé reacción ácida. Finalmente se seca, enfría y pesa. El resultado se expresa en % sobre materia seca, previa deducción de las cantidades de lignina y cenizas. Durante todo el procedimiento debe mantenerse la disolución de sosa, el agua destilada y el ácido acético a 20°C.

1.3.7. CENIZAS: TAPPI T211 om-12 (2012)

En un crisol se pesan 2 g aproximadamente de muestra y se llevan a una mufla a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ durante 3 horas, hasta pesada constante. La expresión empleada es la siguiente (ec. 3):

$$\text{Cenizas, \%} = \frac{A * 100}{B} \quad (3)$$

—donde:

- ✚ A es el peso de las cenizas, en g.
- ✚ B es el peso de la muestra inicial, g en base seca.

1.3.8. HIDROLISIS ÁCIDA CUANTITATIVA (HAC): TAPPI T249 cm-09

El material libre de extractos se somete a HAC. Esta se realiza en dos etapas: una primera, en la que en un tubo de ensayo se pesan 0,5 g de muestra y se le añaden 5 mL de H_2SO_4 al 72%, manteniéndolo durante 1h en un baño a 30°C con agitación periódica. En esta primera etapa se rompen los polisacáridos a oligómeros. En la segunda etapa, el contenido de la primera se vierte en un frasco diluyendo con agua destilada hasta alcanzar una concentración de ácido del 4%, sometiéndolo durante 1 h a 2 atm de presión en autoclave. En esta segunda etapa los oligómeros se transforman en monómeros. Finalmente, se filtra todo el contenido del frasco a través de un crisol Gooch (tamaño de poro nº3) de peso conocido. La fracción sólida que queda retenida en el crisol es la Lignina Klason (LK), mientras que el líquido filtrado se analiza en HPLC según lo descrito en el apartado de caracterización química de la materia prima (contenido en hidratos de carbono por HAC) para la determinación de la concentración en azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa), ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF). Así, mediante la determinación de la concentración de estos monómeros puede calcularse el contenido en polisacáridos de la muestra inicial. Partiendo de los datos de concentraciones se puede calcular el contenido en los polímeros que se hidrolizaron para dar lugar a los monómeros medidos de la muestra analizada. El contenido en polímeros (CPs), en gramos de polímeros/100 gramos MLC en base seca, se puede calcular mediante la fórmula (ec.4):

$$\text{CP}_s = F * C_{\text{Est}} * \frac{[A]}{\rho} * \frac{P + PMH * H}{PMH * (1 - H)} * (100 - \text{CE}) \quad (4)$$

donde:

- ✚ F es un factor que corrige la degradación de azúcares.
- ✚ C_{Est} es un factor de corrección estequiométrica (para tener en cuenta el aumento de peso molecular durante la hidrólisis).
- ✚ [A] es la concentración del monómero en g/L.
- ✚ ρ es la densidad de la disolución analizada en g/L, dado que las muestras suelen diluirse en agua para su análisis en HPLC, el valor de ρ es aproximadamente 1000 g/L
- ✚ P es el peso en gramos añadido corregido para tener en cuenta las pérdidas durante la segunda etapa de HAC.
- ✚ PMH es el peso total del MLC en gramos.
- ✚ H es la humedad del MLC en g de agua/g MLC húmedo.
- ✚ CE es el contenido en extractos (este último término se incluye para referir los resultados al MLC antes de eliminar los extractos).

Los valores habituales de los parámetros F y C_{Est} para las distintas fracciones del MLC se muestran en la tabla 1:

| Fracción | Abreviatura | Especie medida | F | C_E |
|-----------------------|-------------|----------------|-------|---------|
| Glucano | CGn | Glucosa | 1,040 | 162/180 |
| Xilano | CXn | Xilosa | 1,088 | 132/150 |
| Arabinano | CArn | Arabinosa | 1,088 | 132/150 |
| Grupos acetilo | CGA | Ac. acético | 1,000 | 43/60 |

Tabla 1: Valores habituales de los F y C_{Est} en la HAC.

1.3.9. LIGNINA KLASON (LIGNINA INSOLUBLE EN ÁCIDO): TAPPI T222 om-98 (1998)

El crisol empleado para filtrar el producto de las HAC se introduce en la estufa a 105°C durante 24h hasta alcanzar peso constante. Se enfría en un desecador conteniendo gel de sílice y se pesa. El contenido en Lignina Klason se calcula (en g de lignina Klason/ 100 g MLC, en base seca) mediante la fórmula (ec.5):

$$CLK = \frac{PRMS - PRS}{PMH * (1 - H)} * (100 - CE) \quad (5)$$

donde:

- ✚ PRMS es el peso en gramos del crisol con la muestra seca.
- ✚ PRS es el peso en gramos del crisol seco.
- ✚ PMH es el peso en gramos del MLC húmedo inicial que se sometió a HAC.
- ✚ H es la humedad del MLC en g de agua/g MLC húmedo.
- ✚ CE es el contenido en extractos.

2. PRODUCCIÓN DE PASTAS CELULÓSICAS Y PAPEL

2.1. EQUIPAMIENTO

2.1.1. DIGESTOR PARA LA OBTENCIÓN DE PASTAS

Consta de un reactor cilíndrico discontinuo de 15 litros de capacidad, envuelto por una camisa constituida por un sistema de resistencias eléctricas para la calefacción, diseñado para alcanzar hasta 15 kg/cm^2 de presión (figura 3). El conjunto está calorifugado adecuadamente. El sistema anterior está unido, mediante un eje rotativo, a la unidad de control donde existe un motor para accionar la agitación del reactor, y los instrumentos de medida y control de la temperatura de calefacción. Completa el conjunto una válvula de seguridad acoplada al reactor, y una válvula convencional de expansión. La forma de proceder es añadiendo en el interior del reactor la materia prima, en el caso que nos ocupa, la paja de cereal sin triturar, junto con los reactivos químicos, hidróxido sódico y agua (atendiendo a la relación líquido/sólido) y antraquinona (en los experimentos en los que procede), dejándolo reaccionar a las temperaturas y tiempos prefijados.



Figura 3: Digestor para obtención de pastas.

2.1.2. REFINADOR-DESINTEGRADOR

Se utiliza un refinador de discos de laboratorio *Sprout-Bauer* (figura 4). Esta unidad puede utilizarse no sólo en el refinado de cualquier tipo de fibras sino también en la preparación de la materia prima y en el desfibrado de materiales cocidos. El sistema de discos refinadores es accionado mediante un motor de 25 CV.

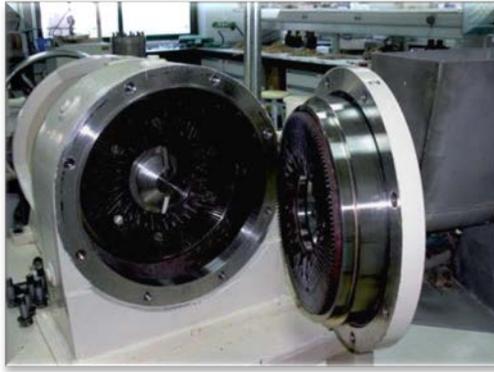


Figura 4: Sprout-Bauer.

2.1.3. SEPARADOR DE FIBRAS E INCOCIDOS

El separador de fibras e incocidos *Sommerville* (figura 5) consta de un recipiente cilíndrico de 40 cm de diámetro y 20 litros de capacidad, cuya base inferior es un filtro constituido por una placa metálica circular con ranuras longitudinales rectas de 0,4-1 mm de espesor, distribuidas paralelamente en dos secciones semicirculares. La parte inferior del sistema termina en una tubuladora que puede conectarse a vacío o simplemente al desagüe. El material cocido y desfibrado se vierte en la parte superior del cilindro, adicionando abundante agua y manteniendo una agitación adecuada para evitar el taponamiento del filtro. Las paletas del agitador tienen una forma especial para evitar el refinado y la rotura de fibras celulósicas. Durante la operación, las fibras pasan al filtrado, mientras que los incocidos y otras impurezas se retienen sobre el filtro, que habrá de ser limpiado para su posterior utilización.



Figura 5: Separador de fibras e incocidos.

2.1.4. SEPARADOR DE FIBRAS Y AGUA

Las fibras procedentes del separador de fibras e incocidos, portando gran cantidad de agua, se vierten sobre el separador de fibras y agua (figura 6). Este consta de un tamiz fino, luz de malla de 0,16 mm, sobre el que quedan las fibras, mientras que el agua pasa al desagüe.



Figura 6: Separador de fibras y agua.

2.1.5. CENTRÍFUGA PARA ELIMINACIÓN DE EXCESO DE HUMEDAD

Se emplea una centrífuga *Williams* (figura 7) para disminuir la humedad de las pastas. Consta de una cesta donde se alberga lateralmente una tela metálica que retendrá la pasta y deja pasar el líquido clarificado.



Figura 7: Centrífuga *Williams*.

2.1.6. DESINTEGRADOR DE PASTAS CELULÓSICAS

Este aparato se utiliza para la preparación de pastas de papel previamente a sus ensayos o a la formación de hojas de papel. Básicamente es un mezclador de suspensión acuosa de la pasta, pero diseñado adecuadamente para no alterar el estado dimensional de las fibras celulósicas. Consta de un vaso y un eje rotor, de dimensiones estandarizadas, y un motor que hace girar el rotor adecuadamente (figura 8).



Figura 8: Desintegrador de pastas celulósicas.

2.1.7. REFINÓMETRO SCHOPPER-RIEGLER

Con este equipo se mide el grado de refinado de las pastas siguiendo la norma UNE 57-025. El refinómetro consta de una cámara de desgote provista de una tela metálica, un cono de cierre y un embudo dispuesto en un soporte adecuado (figura 9).

El fundamento del método consiste en que un volumen conocido de suspensión de pasta en agua desgote, a través de la torta de pasta formada durante el ensayo sobre la tela metálica, en el embudo. El filtrado que se sale por la salida lateral se recoge en una probeta especial, graduada en unidades °SR. Una descarga de un litro corresponde a 0°SR, mientras que una descarga de cero litros corresponde a 100°SR.



Figura 9: Refinómetro Schopper-Riegler.

2.1.8. FORMADOR DE HOJAS

Se compone de una tolva superior de metacrilato transparente, abatible para la extracción de las hojas, y una tela metálica montada sobre un disco taladrado, que hace de soporte de las hojas. Completa la instalación un sistema de aspiración formando sifón y un depósito para el desagüe (figura 10). En la manera de proceder, el desagüe y la tolva se cierran y ésta se llena de agua a través de una entrada de agua que se encuentra situada debajo de la tela metálica. A continuación se le añade la suspensión de pasta celulósica y se homogeniza. Para formar la hoja se abre de golpe la válvula de desagüe efectuando así un perfecto sifón de vacío. El formador de hojas es el modelo *ENJO-F-39.71* de la marca *Metrotec*. Permite la elaboración de hojas de 215 mm de diámetro.



Figura 10: Formador de hojas.

2.1.9. PRENSA PARA HOJAS

Se utiliza una prensa modelo *PR.03-402* (figura 11) con el fin de reducir la humedad de las hojas de ensayo de papel fabricadas en el formador de hojas de ensayo. Las hojas se prensan entre dos superficies circulares. La superficie superior es accionada manualmente, mediante una manivela, para ajustar la probeta de papel, mientras que la inferior presiona al accionar un mecanismo constituido por un cilindro lleno de aceite mineral.

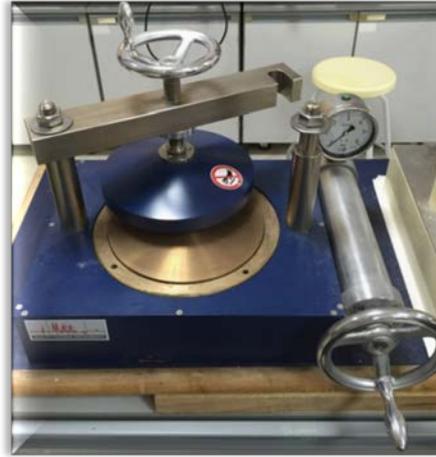


Figura 11: Prensa para hojas.

2.1.10. SECADOR DE HOJAS

Una vez que las hojas han sido prensadas, se utiliza un juego de placas y aros secadores (figura 12), donde se intercalan las hojas de papel hasta que se secan completamente a temperatura ambiente.



Figura 12: Secador de hojas.

2.2. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PASTAS CELULÓSICAS Y PAPEL

2.2.1. COCCIÓN O PASTEADO

En el reactor descrito en el apartado 2.1.1 se introduce la materia prima con un tamaño determinado, añadiendo a continuación los reactivos de cocción adecuados (sosa y antraquinona) y el agua necesaria para conseguir la relación líquido/sólido deseada. Tras la cocción a las temperaturas y tiempos fijados, los sólidos obtenidos se filtran y se lavan con agua para eliminar las lejías negras. Estos sólidos se dejan en agua durante 12-24h para eliminar los posibles restos de lejías negras. Tras este tiempo se vuelven a lavar y se pasan por el Sprout-Bauer para separar-refinar las fibras. A continuación, la mezcla de agua y fibras obtenida se pasa por el separador de fibras e incocidos, obteniendo la pasta celulósica que queda retenida en el separador de fibras y agua (apartado 2.1.4). Por último, las pastas se someten a centrifugación para eliminar el exceso de agua y se dejan secar a temperatura ambiente hasta disminuir su humedad.

2.2.2. FORMACIÓN DE HOJAS DE PAPEL

Para la formación de las hojas, las pastas se procesan en el desintegrador durante 30 minutos a 3.000 r.p.m., añadiendo el agua necesaria para alcanzar una consistencia del 1,5%.

A continuación, se coge el volumen necesario de la suspensión obtenida en el desintegrador para formar hojas de 60 g/m² y se lleva al formador de hojas, obteniéndose una hoja circular húmeda, que se despega de la malla del formador mediante papel de filtro. Seguidamente la hoja se prensa para eliminar el exceso de humedad. Las hojas húmedas formadas se dejan secar a temperatura ambiente en el secador de hojas (apartado 2.1.10).

2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS PASTAS CELULÓSICAS Y PAPEL

2.3.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS PASTAS CELULÓSICAS

La caracterización físico-química de las pastas celulósicas se ha llevado a cabo acorde a los estándares TAPPI y UNE que se indican en los siguientes apartados.

2.3.1.1. Viscosidad: TAPPI T230 om-99 (1999)

La viscosidad intrínseca de las pastas se determina en una disolución de cupriletildiamina con un viscosímetro de *Oswald*. En un frasco de disolución de 50 mL se pesan aproximadamente 0,1 g de pasta seca. Se añaden cuatro barritas de cobre y 25 mL de agua destilada. Se tapa el frasco y se agita con un agitador *Vibromatic* durante 5 minutos. Se para la agitación y se añaden 25 mL de cupriletildiamina 1 N previamente filtrada, expulsado

el aire remanente oprimiendo el frasco. Se cierra y se agita durante 15 minutos. Después se introduce el frasco en un baño maría a 25°C. Cuando está ambientada la muestra, se quita el tapón del frasco y la disolución se introduce en un vaso de 50 mL, succionando una porción de ésta a través del viscosímetro. Se determina el tiempo de efusión a 25°C, t . Es necesario realizar un ensayo en blanco mediante una disolución de 25 mL de agua destilada y 25 mL de cuprietilendiamina 1N obteniendo un tiempo t_0 .

La viscosidad intrínseca η_i , se determina dividiendo el producto $\eta \cdot C$ (presente en una tabla en la norma, en función de la relación t/t_0) entre C (gramos secos de muestra/50 cm³).

2.3.1.2. Número Kappa: TAPPI T236 om-99 (1999)

Este método tiene como objeto la determinación de la aptitud al blanqueo o grado de deslignificación de las pastas.

El número Kappa, K , es el volumen (en mililitros) de disolución de permanganato potásico 0,1 N consumidos por gramo de pasta seca bajo las condiciones especificadas en esta norma.

Se disgregan 0,5-1 g de muestra en 500 mL de agua destilada. El contenido del desintegrador y el agua de lavado del mismo junto con 295 mL de agua se vierten en un vaso de reacción de 1,5L. En un Erlenmeyer de 250 mL se mezclan 100 mL de una disolución de permanganato potásico 0,1 N y 100 mL de ácido sulfúrico 4N, que se añaden a la muestra de ensayo desintegrada, poniendo en marcha un cronómetro. El Erlenmeyer se enjuaga con 5 mL de agua destilada que se añade a la mezcla de reacción. A los 10 minutos la reacción se para con 20 mL de yoduro potásico 1N. Inmediatamente se valora el yodo liberado con tiosulfato sódico 0,1N, añadiendo disolución de almidón para detectar el punto final. La temperatura se mide a los 5 minutos de reacción.

El número Kappa viene dado por la expresión (ec. 6):

$$K = \frac{(a \cdot d) \cdot [1 + 0,013 \cdot (25 - t)]}{m} \quad (6)$$

donde:

-  a es el volumen, en mL, de permanganato potásico 0,1N consumido por la muestra
-  d es un factor de corrección que depende de a
-  m es el peso de la muestra seca, en gramos
-  t es la temperatura efectiva de reacción.

2.3.1.3. Rendimiento: método gravimétrico

El rendimiento representa el porcentaje de materia prima que se transforma en pasta. Se calcula empleando la siguiente ecuación (ec. 7):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{\text{gramos de pasta obtenidos (en base seca)}}{\text{gramos de materia prima (en base seca)}} \right) * 100 \quad (7)$$

2.3.1.4. Grado de refino: Método Schopper-Riegler, UNE 57-025.

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado el aparato *Schopper-Riegler*. El grado de refino se mide en °SR.



Figura 7: Pastas celulósicas.

2.3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS HOJAS DE PAPEL

A continuación se muestran las normas TAPPI e ISO (*International Organization for Standardization*) seguidas para la caracterización de las hojas de papel.

2.3.2.1. Formación de las hojas de papel: TAPPI T205 sp-02

El proceso de formación de hojas de papel se ha descrito en el apartado 2.2.2.

2.3.2.2. Preparación y acondicionamiento de las hojas de papel: TAPPI T220 sp-01 y T402 sp-03 (2003)

Las hojas de papel fabricadas y secas han de acondicionarse durante al menos 24 h en una atmósfera del $50,0\% \pm 2,0\%$ de humedad relativa y $23,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, llevando a cabo los ensayos también bajo las citadas condiciones.

Las hojas se cortaron para los diferentes ensayos como se muestra en la figura 8.

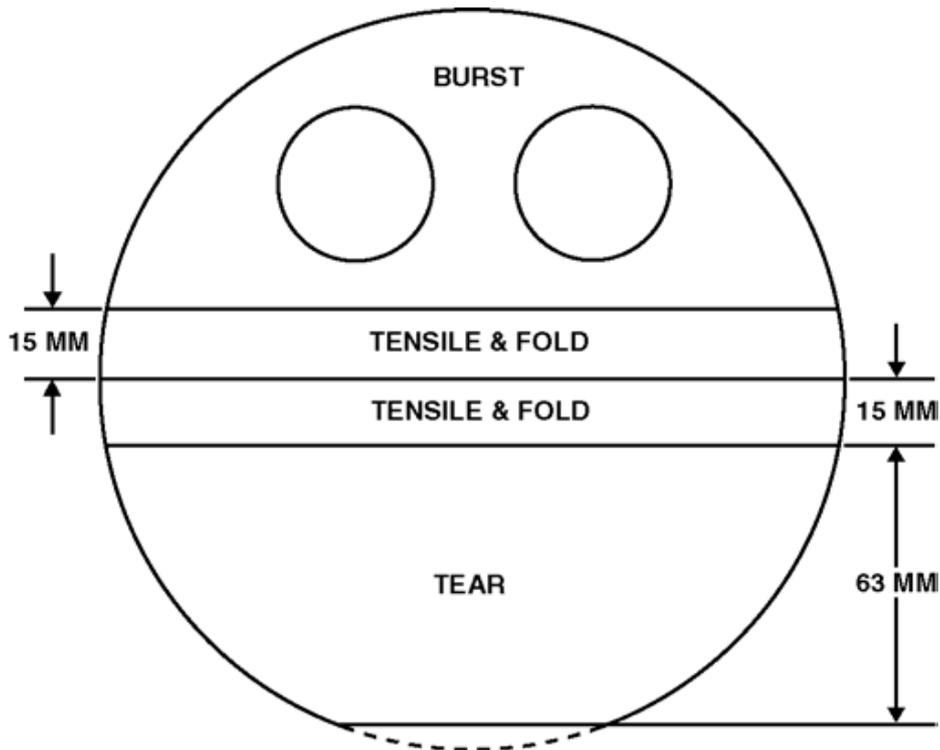


Figura 8: División de las hojas para los ensayos.

Fuente: TAPPI T220 sp-01.

2.3.2.3. Gramaje: TAPPI T410 om-02 (2002)

Consiste en medir el área de una probeta de papel y su masa. Conocida por pesada la masa de la probeta de papel, y la superficie de la misma, el gramaje viene expresado en g/m^2 (ec. 8).

$$G = \frac{K * m}{A} \quad (8)$$

donde:

- ✚ G es el gramaje de la hoja, en g/m^2 .
- ✚ K es un factor de corrección proporcionado en la norma según las unidades empleadas en el área, 10.000.
- ✚ m es la masa, en gramos.
- ✚ A es el área de la probeta, en cm^2 .

2.3.2.4. Longitud de ruptura (*Breaking length*) e índice de alargamiento (*Stretch index*): TAPPI T494 om-96 (1996)

La longitud de ruptura se define como la longitud limitante calculada de una probeta de ancho uniforme, a partir de la cual, si dicha probeta fuese suspendida por uno de los extremos se rompería debido a su propio peso. Se expresa en mm.

Para calcular el índice de alargamiento, en %, se emplea la siguiente ecuación (ec. 9):

$$I_a = \frac{A_r}{L} * 100 \quad (9)$$

donde:

- ✚ I_a es el índice de alargamiento, en %.
- ✚ A_r es el alargamiento a la rotura, en mm.
- ✚ L es la distancia entre mordazas, en mm.

2.3.2.5. Índice de tracción (*Tensile index*): TAPPI T494 om-96 (1996)

Cuando una tira o probeta de papel fijada por ambos extremos, se somete a un esfuerzo de tracción, se rompe. La fuerza necesaria para ello se denomina carga de ruptura. Dado que esta carga depende del gramaje, es más práctico expresarla como índice de ruptura o tracción (ec. 10):

$$I_t = \frac{F_t}{a \cdot G} \quad (10)$$

donde:

- ✚ I_t es el índice de tracción, en N·m/g.
- ✚ F_t es la fuerza o carga de ruptura, en N.
- ✚ a es el ancho de la probeta de papel, en m.
- ✚ G es el gramaje de la probeta, en g/m².

2.3.2.6. Índice de estallido (*Burst index*): TAPPI T403 om-97 (1997)

La fuerza de estallido de un material se define como la presión hidrostática máxima requerida para producir la ruptura del material cuando se aplica una presión creciente constante y controlada mediante un diafragma de goma a un área circular, de 30,5 mm de diámetro. Sobre dicho diafragma se coloca la hoja de papel que se sujeta rígidamente en su periferia, dejando libre la parte central, para que pueda expandirse, combándose. Se bombea

entonces el fluido hidráulico, expandiéndose el diafragma hasta que se rompa el papel. Como el estallido depende del gramaje, se utiliza más frecuentemente el índice de estallido (I_E), que se define como la relación entre la presión de estallido y el gramaje (ec. 11).

$$I_E = \frac{E}{G} \quad (11)$$

donde:

- ✚ I_E es el índice de estallido, kN/g.
- ✚ E es la resistencia al estallido, en kN/m².
- ✚ G es el gramaje, en g/m².

2.3.2.7. Índice de desgarro (*Tear index*): TAPPI T414 om-98 (1998)

La resistencia al desgarro se define como la fuerza media requerida para continuar, una vez iniciado, el desgarro o rasgado de una hoja de papel.

Para llevar a cabo este ensayo se realiza un corte inicial en la probeta de papel y se desgarra ésta a lo largo de una distancia fija, utilizando un aparato de la firma *Metrotec* previsto de un péndulo para aplicar la fuerza de desgarro. El trabajo efectuado para desgarrar la probeta viene dado por la pérdida de energía potencial del péndulo. La escala del péndulo está calibrada de forma que indica la fuerza media ejercida (trabajo efectuado dividido por la distancia desgarrada). Las muestras de papel se ajustan por medio de dos mordazas: una unida al bastidor del aparato y la otra al péndulo (figura 9).

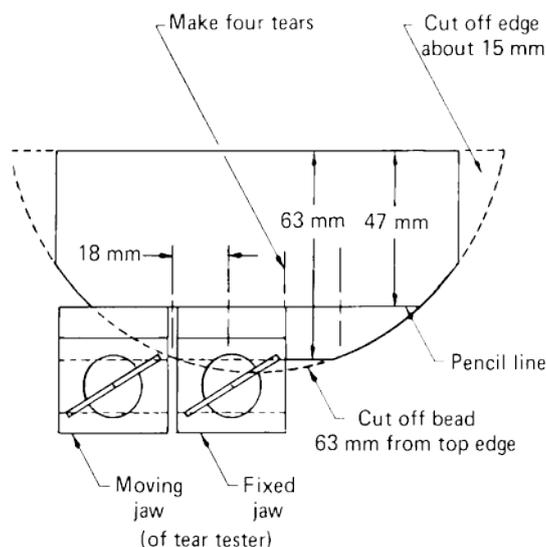


Figura 9: Detalle del ensayo de resistencia al desgarro

Fuente: TAPPI T414 om-98 (1998)

La resistencia al desgarro se expresa como tal o como índice de desgarro según la siguiente expresión (ec. 12):

$$I_d = \frac{F_d}{G} \quad (12)$$

donde:

- ✚ I_d es el índice de desgarro, en $\text{mN}\cdot\text{m}^2/\text{g}$.
- ✚ F_d es la resistencia al desgarro, en mN.
- ✚ G es el gramaje, en g/m^2 .

2.3.2.8. Blancura ISO: ISO 2470-2 (2008)

El término blancura es un parámetro óptico definido como el factor de reflectancia de una luz azul de 547 nm de longitud de onda producida por el papel y sólo en la región azul visible del espectro. Cuando la iluminación es difusa, se mide la blancura ISO, expresada en porcentaje de reflectancia.

Para la medida de la blancura ISO de las hojas de papel se ha empleado un espectrofotómetro de medición de color, modelo 360-740 nm/CM-3630 de *Konica Minolta*, calibrado con estándares ópticos siguiendo la norma ISO 2470-2.

3. OBTENCIÓN DE OLIGÓMEROS Y BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

3.1. EQUIPAMIENTO EMPLEADO PARA LA OBTENCIÓN DE OLIGÓMEROS Y BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

3.1.1. REACTORES DE ALTA PRESIÓN PARA EL FRACCIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

Reactores *Parr* de alta presión (*Parr Instruments Company, Moline, Illinois, USA*) de 0,6 y 3,75 L de capacidad (figura 10). Este tipo de reactor es discontinuo, envuelto por una camisa constituida por un sistema de resistencias eléctricas para la calefacción, diseñado para alcanzar presiones máximas de 1900 psi (131 bar) y/o temperaturas de 350°C. En el reactor se introduce la materia prima con agua, si se trata de autohidrólisis, o con una mezcla de agua/etanol, si lo que se quiere llevar a cabo es una deslignificación. Se fijan condiciones de temperatura y presión, así como la Relación Líquido Sólido (RLS) según los experimentos diseñados.



Figura 10: Reactor Parr de alta presión.

3.1.2. AUTOCLAVE

El uso del autoclave es importante para la esterilización de todos los materiales, nutrientes y sustratos intervinientes en los procesos de hidrólisis enzimática y sacarificación y fermentación simultánea. Los matraces Erlenmeyer empleados conteniendo el sustrato y agua y tapados con algodón y una lámina de aluminio, así como los nutrientes y las puntas de pipetas automáticas se introdujeron en autoclave a 121°C durante 15 minutos (figuras 11 y 12).



Figura 11: Autoclave.

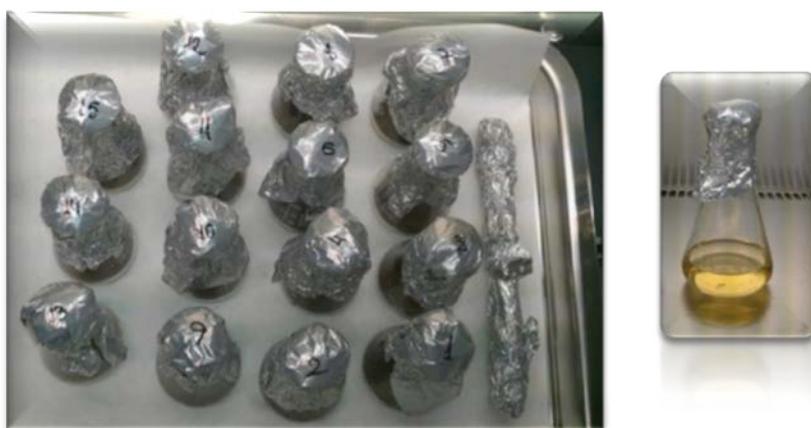


Figura 12: Matraces y materiales esterilizados

3.1.3. CAMPANA DE FLUJO LAMINAR Y AGITADOR ORBITAL

Tanto los experimentos de hidrólisis enzimática como los de sacarificación y fermentación simultánea se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL colocados en un agitador orbital controlando velocidad de agitación y temperatura. Fijando en 150 r.p.m. y 48,5 °C para las hidrólisis enzimáticas y 120 r.p.m. y 35°C para los experimentos de sacarificación y fermentación simultánea. El crecimiento de las levaduras empleadas en las SSF, *Saccharomyces cerevisiae* CECT-1170, se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, colocando los mismos en un agitador orbital a 200 rpm a 32°C durante 24 h, conteniendo 10 g glucosa/L, 5 g peptona/L, 3 g extracto de malta/L y 3 g de extracto de levadura/L. La manipulación de los Erlenmeyer siempre se llevó a cabo en campana de flujo laminar previa activación durante 30 minutos de luz UV para evitar la contaminación de los materiales (figuras 13 y 14).



Figura 13: Campana de flujo laminar.



Figura 14: Agitador orbital.

3.1.4. CENTRÍFUGA

Tanto para los experimentos de hidrólisis enzimática como para los de sacarificación y fermentación simultánea se tomaron alícuotas de 1 mL a distintos tiempos, y fueron centrifugadas a 5.000 r.p.m durante 10 minutos para su posterior cuantificación (figura 15a). La figura 15b muestran la preparación del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*, para el que también fue necesario el uso de una centrifuga de mayor capacidad.



Figura 15a. Centrifugación de alícuotas.



Figura 15b. Preparación del inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

Las muestras centrifugadas fueron diluidas en una relación 1:10, filtradas por una membrana de 0,20 μm y cuantificadas en un HPLC *Agilent Technologies 1100 Series* HPLC con Detector de Índice de Refracción y una columna *BioRad Aminex HPX-87H*, con fase móvil H_2SO_4 0,006 mol/L a 60°C. Se determinó concentración de azúcares (glucosa, xilosa, arabinosa) y ácido acético en las hidrólisis enzimáticas y azúcares, ácido acético, etanol y glicerol en las SSF (figura 16).



Figura 16: HPLC y cromatograma.

3.2. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE OLIGÓMEROS Y BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

3.2.1. AUTOHIDRÓLISIS

Los experimentos de autohidrólisis (AH) se llevaron a cabo en un reactor discontinuo de mezcla completa con agitación (*Parr Company, Illinois, USA*) de 3,75 L que permite operar tanto en régimen isoterma como no isoterma.

3.2.1.1. Variables de operación

3.2.1.1.1. Temperatura y tiempo de operación

Para la realización de estos experimentos se seleccionaron procesos de AH en condiciones no isotermas, puesto que se pueden conseguir severidades del tratamiento y resultados similares a los que se alcanzan en operación isoterma, pero en menor tiempo. La temperatura de operación es dependiente del tiempo según el perfil de calentamiento.

3.2.1.1.2. Velocidad de agitación

Esta variable se fijó en 150 r.p.m. Este valor es lo bastante elevado como para asegurar una buena mezcla y evitar problemas de difusión.

3.2.1.1.3. Relación líquido/sólido (RLS)

La RLS mide la concentración inicial del material lignocelulósico en la suspensión sometida al tratamiento. Sus unidades son g líquido/g material lignocelulósico, y se expresa en base seca (libre de humedad), considerando la humedad del material como agua a los efectos de su cálculo. Valores altos de RLS favorecen la mezcla y el proceso en general, pero son costosos (implican equipos grandes y se obtienen concentraciones bajas), mientras que valores bajos de RLS pueden presentar problemas de mezcla pero conducen a concentraciones más elevadas. En este trabajo se ha buscado como solución de compromiso, en base a experimentos previos, la RLS más baja que produce resultados satisfactorios, en este caso 8 g líquido/g MLC en base seca.

3.2.1.2. Tratamiento de autohidrólisis

El MLC y el agua se mezclan en las proporciones requeridas para conseguir la RLS deseada. Esta suspensión se introduce en el reactor y se pone en marcha el calentamiento. Al llegar a la temperatura deseada, se detiene la calefacción y se comienza a enfriar la suspensión, haciendo circular agua fría por el serpentín interno. Al bajar la temperatura interna a 60 °C el reactor se abre.

La suspensión obtenida tras el tratamiento de AH se filtra cuidadosamente con el fin de separar la totalidad de la fase sólida (que posteriormente se cuantificará gravimétricamente) de la fase líquida o licores. La fase sólida se utiliza para la determinación gravimétrica del rendimiento en sólido. Posteriormente, una alícuota se deja secar a temperatura ambiente, se muele hasta tamaño de partícula menor de 1 mm y se utiliza para la determinación de la composición de esta fase sólida, mediante hidrólisis ácida cuantitativa (ver apartado 1.3.8).

Una primera alícuota de la fase líquida se utiliza para su análisis directo mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (ver apartado 3.1.5), una segunda alícuota se utiliza para la determinación del contenido seco (ver apartado 3.3.2.1), y otra alícuota se somete a una posthidrólisis con ácido sulfúrico para determinar su contenido en oligómeros (ver apartado 3.3.2.4).

3.2.1.3. Detoxificación de los licores de autohidrólisis

En dos etapas: en la primera se acidifica el licor con ácido fosfórico al 10% (m/m), y en la segunda se basifica con óxido de calcio hasta conseguir un pH final de 5,0. Para conseguir una buena disolución del óxido de calcio es necesario calentar a 60°C. A continuación se añade un polímero al 0,1% (m/m) a 200 mL de licor y se deja enfriar en una probeta hasta precipitar todo el sólido. Finalmente se filtra y se cuantifica el sólido total precipitado por gravimetría.

3.2.1.4. Hidrólisis ácida del licor de autohidrólisis en reactor de alta presión para conversión de xilooligosacáridos a xilosa

Se colocan 535 mL de licor de autohidrólisis, detoxificado o no, en el interior del reactor Parr, y se lleva a la temperatura de trabajo extrayendo 35 mL de muestra (muestra a tiempo 0). A continuación, se le añaden 50 mL de H₃PO₄ de una concentración previamente calculada para alcanzar una concentración final de ácido fosfórico en el interior del reactor de entre un 2% y un 4% dependiendo del experimento. El ácido fosfórico se va introduciendo en el interior del reactor por medio de una bomba a razón de 10 mL/min durante 5 minutos tras alcanzar la temperatura máxima de trabajo prefijada para cada uno de los casos del diseño experimental. Se extraen muestras cada 5 minutos durante un total de 40 minutos, sin abrir el reactor, mediante un condensador, evitando así la pérdida de presión y temperatura. Las muestras se caracterizan con el HPLC determinando azúcares, ácido fórmico, ácido acético, HMF y furfural.

3.2.2. DESLIGNIFICACIÓN

En la presente Tesis Doctoral, el disolvente orgánico seleccionado para llevar a cabo el proceso de deslignificación ha sido el etanol, mediante el empleo de mezclas agua/etanol con el MLC.

Se añade el material lignocelulósico, el agua y el etanol en las proporciones deseadas dentro del reactor. La mezcla se lleva a la temperatura de operación prefijada (momento en el que se toma tiempo cero) y se mantiene la temperatura durante el tiempo previamente acordado. Una vez transcurrido dicho tiempo el reactor es enfriado y abierto solo cuando su temperatura ha disminuido hasta la temperatura ambiente.

La suspensión resultante se filtra a vacío para separar la fase líquida (denominada “lejías negras”) de la fase sólida (que queda empapada en las mismas). Tras retirar la fase líquida para su posterior análisis, la fase sólida se lava inicialmente con una disolución de agua y etanol (de la misma concentración que la empleada en la deslignificación) y calentada en un baño a aproximadamente 40°C. Este procedimiento de lavado con la mezcla agua/disolvente se lleva a cabo con la finalidad de eliminar la mayor cantidad posible de materia disuelta, evitando que precipite sobre la fase sólida. Posteriormente, se hace un segundo lavado con agua hasta acercarse a pH neutro.

A la fase líquida se le añade H_2SO_4 al 0,1% para que precipite la lignina y el sobrenadante se analiza mediante HPLC. La fracción sólida se deja secar a temperatura ambiente. Se coge una muestra para su caracterización y el resto se guarda en bolsas con el fin de homogeneizar su humedad y emplear el material en un posterior proceso.

La fracción sólida se deja secar a temperatura ambiente. Se coge una muestra para su caracterización y el resto se guarda en bolsas con el fin de homogeneizar su humedad y emplear el material en un posterior proceso de hidrólisis enzimática o sacarificación y fermentación simultánea (SSF).

3.2.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Para llevar a cabo este proceso se emplean enzimas celulásicas y celobiásicas, proporcionadas por la empresa *Novozymes*.

Se define la relación enzima sustrato (RES) como la cantidad de enzima celulásica que se añade por gramo de MLC, y se expresa en FPU/g MLC, en base seca. La actividad celulásica del preparado *Celluclast 1,5 L* fue de 70 FPU/mL enzima, donde FPU son unidades de papel de filtro (*Filter Paper Units*), medidas de acuerdo a metodología estándar para medir la actividad celulásica (Ghose, 1987). Es necesario añadir celobiasa, para hidrolizar la celobiosa a glucosa, para lo que se emplea el preparado enzimático *Novozym 188*, cuya actividad (medida en UI, unidades internacionales, de acuerdo al protocolo de Paquot y Thonart (1982), es de 630 UI/mL).

Los cálculos se realizan de acuerdo a la RES, a la RLS fijando el volumen final. Una vez conocidas las cantidades a emplear de sustrato, agua, disolución tampón citrato 1N, celulosa y celobiasa, estas se introducen en los matraces *Erlenmeyer*. La disolución tampón citrato se emplea en concentración 1N para conseguir 0,05 N en el volumen final de 40 mL y poder mantener así el pH constante. A continuación se ajusta el pH a 4,85 empleando en caso necesario disoluciones de ácido clorhídrico y de hidróxido sódico 2N. Posteriormente, se añaden las enzimas correspondientes y también unos cristales de timol que tienen como función reducir el riesgo de contaminación. Los matraces *Erlenmeyer* preparados y tapados con un algodón y aluminio se trasladan al incubador orbital termostataado manteniendo constante la velocidad de agitación y la temperatura, 150 r.p.m. y 48,5°C, respectivamente.

3.2.4. FERMENTACIÓN

El microorganismo seleccionado para los experimentos de fermentación es *Saccharomyces cerevisiae* *CECT-1170*, proveniente de la Colección Española de Cultivos Tipo, ubicada en Valencia (España).

En primer lugar, se realiza el inóculo partiendo de la cepa liofilizada administrada por la CECT, cultivándola para su crecimiento en una placa y a continuación en un medio de cultivo líquido. Cuando la cantidad de biomasa obtenida es la deseada se almacena en crioviales a -80°C.

Se ha partido directamente de crioviales de *Saccharomyces cerevisiae* disponibles en los laboratorios de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Vigo, teniendo que proceder directamente a la activación y crecimiento del microorganismo en cultivo líquido durante 36h en dos pasos.

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se preparan 100 mL del medio de cultivo conteniendo 10 g glucosa/L, 5 g peptona/L, 3 g extracto de levadura/L y 3 g extracto de malta/L, se esteriliza en autoclave a 121°C (2 atm) durante 15 min y se deja enfriar en la campana de flujo laminar. Una vez enfriado, se vierte en el Erlenmeyer el contenido de un criovial de *Saccharomyces cerevisiae* y se deja crecer en el agitador orbital a 32°C y 200 r.p.m. durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se vuelven a preparar tantos matraces Erlenmeyer con medio de cultivo como sean necesarios para obtener el volumen de biomasa requerido para las fermentaciones siguiendo el procedimiento explicado anteriormente. Para ello, a las 24h se traspanan 10 mL del Erlenmeyer inicial a los nuevos medios de cultivo y se deja crecer el microorganismo bajo las mismas condiciones durante 12h más, guardando también algunos crioviales a -80° del inóculo crecido en el Erlenmeyer inicial con glicerol al 30% (figura 17). La función del glicerol es procurar una correcta conservación y congelación y evita la formación de cristales de hielo que puedan afectar al microorganismo.

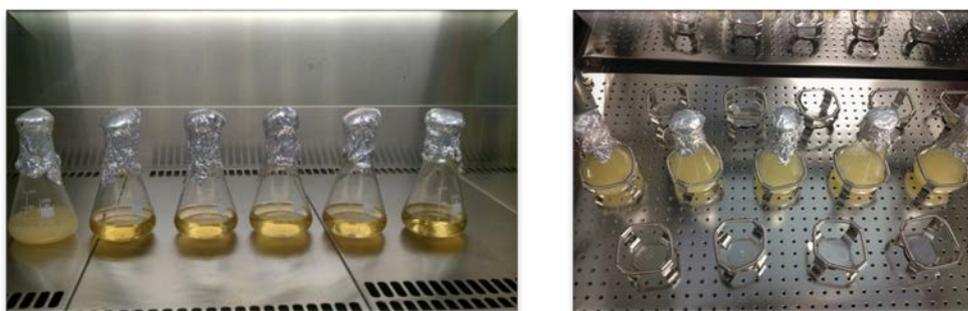


Figura 17: Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Una vez transcurridas las 12 h, es necesario separar la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* del medio de cultivo. Para ello el contenido de los matraces *Erlenmeyer* se vierte en botes de 50 mL y se centrifugan a 3.500 r.p.m. durante 10 minutos. Una vez centrifugados, se retira el sobrenadante, quedando la biomasa depositada en el fondo. A continuación se añade agua destilada esterilizada, se agita para lavar bien y se vuelve a centrifugar. De nuevo, se elimina el sobrenadante. Finalmente, la biomasa se resuspende en agua destilada esterilizada en un volumen final calculado que permita emplear 10 mL de suspensión en cada una de las fermentaciones que se lleven a cabo (figura 18).



Figura 18: Lavado de la biomasa.

3.2.4.1. Experimentos de sacarificación y fermentación simultánea (*Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF*)

En el proceso de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) se añaden las enzimas (celulasa y celobiasa) así como el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* al mismo tiempo. A medida que las enzimas van hidrolizando la celulosa a glucosa, la levadura *Saccharomyces* va fermentando dicha glucosa produciendo etanol.

La SSF se puede llevar a cabo en dos modos de operación: *batch* y *fed-batch*. En el modo *batch*, todo el sustrato previamente autohidrolizado o autohidrolizado-deslignificado esterilizado se añade en el matraz junto con el agua esterilizada, los nutrientes (peptona, extracto de levadura y extracto de malta), las enzimas y el inóculo. En el modo *fed-batch*, tanto el sustrato como las enzimas y/o los nutrientes pueden ser añadidos en diferentes cargas, siendo solamente el agua esterilizada y el inóculo añadidos en su totalidad al principio de los experimentos, por lo que tras cada carga la RLS va disminuyendo. Muestras de 1 mL fueron tomadas cada 3 horas en las 12 primeras horas y después espaciadas cada 24h y tomadas antes y después de cada una de las cargas. Estas muestras fueron caracterizadas según el apartado 3.6.

Para preparar los nutrientes se realizó una disolución esterilizada con la cantidad necesaria para obtener una concentración final en el medio de 5 g/L de peptona, 3 g/L de extracto de levadura y 3 g/L de extracto de malta.

El inóculo añadido siempre se fijó en un volumen total de 10 mL preparado de acuerdo al apartado anterior.

Toda la preparación y toma de muestras fue realizada siempre en una campana de flujo laminar con previa activación de luz UV de acuerdo a lo explicado en el apartado 3.1.3.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES SÓLIDA Y LÍQUIDA OBTENIDAS EN EL PRETRATAMIENTO DE AUTOHIDRÓLISIS

3.3.1. FRACCIÓN SÓLIDA

3.3.1.1. Rendimiento

Tras someter al sólido obtenido en el tratamiento hidrotérmico (apartado 4.2.1) a un lavado con agua destilada, filtrado y centrifugado, éste se pesa y se mide la humedad. De este modo, se determina el rendimiento del proceso de autohidrólisis, definido como gramos de fase sólida autohidrolizada/100 gramos de materia prima, en base seca.

3.3.1.2. HAC del sólido en dos etapas

Como explicada en el apartado 1.3.8. (figura 19).

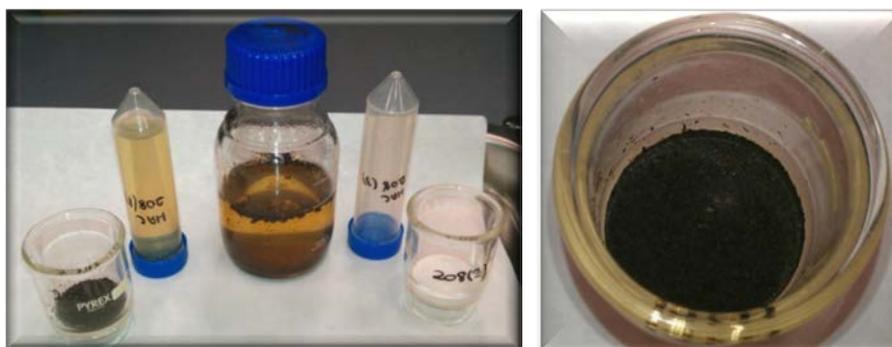


Figura 19: Hidrólisis ácida cuantitativa y lignina klason

3.3.1.3. Contenido en sólidos no volátiles (cenizas)

Siguiendo el método ya referido en el apartado 1.3.7 de caracterización química de la materia prima.

3.3.2. FRACCIÓN LÍQUIDA

3.3.2.1. Determinación del contenido seco

Se obtiene secando una alícuota de licor de entre 1-5 g en una estufa hasta peso constante. Se define como los gramos de contenido no volátil presentes en cada gramo de licor.

3.3.2.2. Determinación del contenido en sólidos no volátiles (cenizas), del contenido seco

Tras obtener el residuo seco del licor de autohidrólisis, se determina el contenido en cenizas de dicho residuo siguiendo la norma TAPPI T211 om-12 (2012).

3.3.2.3. Análisis directo en HPLC de los licores de autohidrólisis para la determinación de azúcares, ácido acético, HMF y furfural

Una alícuota de los licores procedentes del tratamiento hidrotérmico es filtrada a través de una membrana de 0,45 μm y analizada por cromatografía líquida (HPLC) con un equipo *Agilent Technologies 1100 Series HPLC* con Detector de Índice de Refracción y una columna *BioRad Aminex HPX-87H*, con fase móvil H_2SO_4 0,006 mol/L a 60°C.

3.3.2.4. Posthidrólisis

En la fase líquida obtenida en los tratamientos hidrotérmicos se encuentran los productos de solubilización de las hemicelulosas, que son mayoritariamente oligómeros de composición heterogénea. Su cuantificación directa por cromatografía o técnicas similares es complicada, por lo que se lleva a cabo una hidrólisis de esta fase líquida con H_2SO_4 al 4% para determinar, por el aumento de la concentración de los monómeros, la cantidad de oligómeros presentes en el licor de autohidrólisis. La forma de proceder es pesando en un frasco con tapa roscada una alícuota de la fase líquida de entre 10-20 g y añadir H_2SO_4 (96-98%) hasta lograr una concentración de ácido del 4%. EL frasco roscado cerrado se somete a 121°C (2atm) durante 40 minutos en autoclave. Al finalizar, las muestras se pasan a través de filtros de 0,45 μm y se analizan mediante un equipo HPLC *Agilent Technologies 1100 Series* con Detector de Índice de Refracción y una columna *BioRad Aminex HPX-87H*, con fase móvil H_2SO_4 0,006 mol/L a 60°C.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES SÓLIDA Y LÍQUIDA OBTENIDAS EN EL TRATAMIENTO DE DESLIGNIFICACIÓN (ORGANOSOLV)

Tras llevar a cabo el proceso de deslignificación, las fases sólida y líquida se separan por filtración.

3.4.1. FRACCIÓN SÓLIDA

3.4.1.1. Rendimiento

La fase sólida se lava con una mezcla de etanol/agua de la misma concentración que la empleada en el tratamiento, y después se vuelve a lavar con agua destilada. A continuación, se centrifuga para eliminar el exceso de agua y se pesa el sólido (figura 20), determinando la humedad para así poder obtener el rendimiento, definido como g de fase sólida autohidrolizada-deslignificada/100 g de sólido autohidrolizado, en base seca. También se puede referir en base a 100 g de materia prima.



Figura 20: Sólido autohidrolizado-deslignificado.

3.4.1.2. HAC en dos etapas y contenido en sólidos no volátiles (cenizas)

Descritos anteriormente en el apartado caracterización de las fracciones sólida y líquida obtenidas en el pretratamiento de autohidrólisis.

3.4.2. FRACCIÓN LÍQUIDA

3.4.2.1. Determinación del contenido seco

Descrito en el apartado 3.3.2.1.

3.4.2.2. Determinación del contenido en sólidos no volátiles (cenizas) del contenido seco

Tras obtener el residuo seco del licor organosolv, se determina el contenido en cenizas de dicho residuo siguiendo la norma TAPPI correspondiente.

3.4.2.3. Análisis directo en HPLC de los licores obtenidos en los tratamientos de deslignificación para la determinación de azúcares, ácido acético, HMF y furfural previa precipitación de la lignina

Para este análisis es necesario realizar una dilución previa de la muestra en una relación 1:10. Dado que son licores con un alto contenido en lignina (figura 21), para llevar a cabo el análisis en HPLC de estas muestras, previamente es necesario precipitar la lignina. Para ello, cuando se realiza la dilución de la muestra se añaden entre 0,05 y 0,1 g de H_2SO_4 al 98% y, posteriormente, se deja reposar la muestra en frío durante 8-12h. Discurrido este tiempo, la muestra se filtra por membranas de $0,45 \mu m$ y se analiza en HPLC.



Figura 21: Licores obtenidos en el tratamiento organosolv.

3.5. CUANTIFICACIÓN DE LOS AZÚCARES OBTENIDOS EN EL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL SÓLIDO AUTOHIDROLIZADO/AUTOHIDROLIZADO-DESLIGNIFICADO

Las hidrólisis enzimáticas duraron hasta 120 horas. De forma general, se tomaron muestras de 1 mL cada 3 horas durante las primeras 12 horas del ensayo, después, una muestra a las 24 h y las sucesivas muestras cada 24h hasta completar el experimento. El motivo por el que las muestras se tomaron con mayor frecuencia al inicio se debe a que la cinética de transformación en azúcares es mucho mayor dentro de las primeras 24 h, ralentizándose posteriormente. Dichas muestras fueron centrifugadas a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos (figura 22), diluidas en proporción 1:10, filtradas por membranas de 0,20 μ m y analizadas con HPLC para la determinación de azúcares y ácido acético.



Figura 22: Muestras centrifugadas de hidrólisis enzimática.

3.6. CUANTIFICACIÓN DEL BIOETANOL OBTENIDO EN LA FERMENTACIÓN DE LA FRACCIÓN SÓLIDA AUTOHIDROLIZADA/AUTOHIDROLIZADA-DESLIGNIFICADA

Al igual que en el apartado anterior, se tomaron muestras del mismo volumen a tiempos prefijados, siendo más frecuentes durante las primeras 12 horas de los experimentos, ya que la cinética de conversión de azúcares a etanol es mucho mayor dentro de dicho periodo de tiempo. La forma de proceder es la misma que la descrita en el apartado 3.5. determinando, además, concentración de etanol.

4. PRODUCCIÓN DE NANOFIBRAS DE CELULOSA Y NANOPAPELES

INFORMACIÓN NO DISPONIBLE PARA PUBLICACIÓN

5. BIBLIOGRAFÍA

Ghose T. K. 1987. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl Chem* 59, 257-268. DOI: 10.1351/pac198759020257.

ISO 2470-2 (2008): Paper, board and pulps- Measurements of diffuse blue reflectance factor (D65 brightness). International Organization for Standardization (ISO).

Microfluidics Inc.: www.microfluidicscorp.com

Paquot M. and Thonart P. H. 1982. Hydrolyse enzymatique de la cellulose regeneree. *Holzforschung* 36, 177-181. DOI: 10.1515/hfsg.1982.36.4.177.

Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI) Standards. TAPPI Test Methods:

TAPPI T9m-54: Holocellulose in Wood.

TAPPI T203 cm-99: Alpha-, Beta-, and Gamma- cellulose in pulp.

TAPPI T204 cm-97: Solvent extractives of Wood and pulp.

TAPPI T205 sp-02: Forming handsheets for physical test of pulp.

TAPPI T207 cm-99: Water solubility of Wood and pulp.

TAPPI T211 om-12: Ash in Wood, pulp, paper and paperboard: Combustion at 525°C.

TAPPI T212 om-98: One percent sodium hydroxide solubility of Wood and pulp.

TAPPI T220 sp-01: Physical Testing of pulp handsheets.

TAPPI T222 om-98: Acid-insoluble lignin in Wood and pulp.

TAPPI T230 om-99: Viscosity of pulp (capillary viscosimeter method).

TAPPI T236 om-99: Kappa number of pulp.

TAPPI T249 cm-09: Carbohydrate composition of extractive-free Wood and Wood pulp by Gas-Liquid Chromatography.

TAPPI T257 cm-02: Sampling and preparing Wood for analysis.

TAPPI T402 sp-03: Standard conditioning and testing atmospheres for paper, board, pulp handsheets and related products.

TAPPI T403 om-97: Bursting strength of paper.

TAPPI T410 om-02: Grammage of paper and paperboard (weight per unit area).

TAPPI T414 om-98: Internal tearing resistance of paper.

TAPPI T494 om-96: Tensile properties of paper and paperboard (using constant rate of elongation apparatus).

UNE 57-025 (1999): Método *Schopper- Riegler*. Normas UNE. Instituto Nacional de Racionalización del Trabajo. Madrid.

Wise L. E., Murphy M. and Addieco A. A. D. **1946**. Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative Wood analysis and studies on the hemicelluloses. *Pap Trade J* 122 (2), 35-43.

Capítulo



ARTÍCULOS
CIENTÍFICOS

RESEARCH
ARTICLES



ARTÍCULO / ARTICLE

I

Cellulosic pulps of cereal straws as raw material for the manufacture of ecological packaging

Fátima Vargas, Zoilo González, Rafael Sánchez,
Luis Jiménez and Alejandro Rodríguez.

BioResources, 2012, 7(3), 4161-4170.

Índice de Impacto/JCR Impact Factor (2015): 1,334/ 1.334
Posición/Rank (2015): 5/21, Q1, in Materials Science, Paper &
Wood area

CELLULOSIC PULPS OF CEREAL STRAWS AS RAW MATERIAL FOR THE MANUFACTURE OF ECOLOGICAL PACKAGING

Fátima Vargas,^a Zoilo González,^a Rafael Sánchez,^b Luis Jiménez,^a and Alejandro Rodríguez^{a,*}

The aim of this work was to study the potential application of four types of cereal straws: oats, maize, rapeseed, and barley, in order to obtain cellulose pulp through the Specel® process for use in the manufacture of 100% biodegradable and ecological packaging. Raw materials were chemically characterized to determine alcohol-extractives, ash, lignin, holocellulose, and α -cellulose. Cellulosic pulps obtained from raw materials were characterized to determine yield, Kappa number, and viscosity. Paper sheets made from cellulosic pulps were characterized to determine beating degree, tensile index, stretch, burst index, tear index, and brightness. Finally, the results were compared to the raw material used in the industrial manufacturing of packaging (wheat). The four studied raw materials (oats, maize, rapeseed, and barley) were judged to be suitable for use in the Specel® process to obtain cellulosic pulp suitable for production of ecological containers.

Keywords: Cereal straws; Packaging; Cellulosic pulp; Sodium hydroxide; Industrial

Contact information: a: Chemical Engineering Department, Campus de Rabanales, Building Marie Curie (C-3), University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain. b: Ecopapel, S.L. Sedesa Industrial Park, 41400 Écija, Seville, Spain; * Corresponding author: a.rodriguez@uco.es;

INTRODUCTION

The concept of a sustainable economy is increasingly being put into practice in all social aspects and, of course, in the industrial production. An example of a sustainable economy is that based on a proper use of natural resources, such that one takes advantage of all of their components. One way of achieving this goal is through the valorization of byproducts or waste generated in agricultural or industrial activities. One of the aims of any industrial activity is to produce products that can satisfy new market needs. In these products, the ecological commitment is a very important factor; society is becoming aware and convinced of the need to consume products that have been obtained through environmentally respectful processes.

Europe produced 96.5 million tons of paper and cardboard in 2010, of which approximately 17% wt. came from non-wood fibers (Confederation of European Paper Industries, CEPI). The cellulosic fibers of non-wood species, such as residues of agricultural and agri-food industry, are very appropriate for the manufacture of papers with special characteristics due to their favorable morphology, composition, and heterogeneity (García Hortal 2007; González-García *et al.* 2010). So, to date, several residues of agricultural and agri-food industry have been studied (orange tree pruning, vine shoots, cereal straws, palm oil waste (EFB), *etc.*) (Berrocal *et al.* 2004; Navaee-Ardeh *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006; Rodríguez *et al.* 2008; Jiménez *et al.* 2009;

Hosseinpour *et al.* 2010; Jiménez *et al.* 2010; Rodríguez *et al.* 2010; Chen *et al.* 2011; Ferrer *et al.* 2011; González *et al.* 2011; Hou *et al.* 2011; Fatehi *et al.* 2010).

Among all these non-wood raw materials, cereal straws are a very important source of raw material, since the world production of wheat, barley, maize, oats, and rapeseed was 1,742 million tonnes in 2009 (FAO). Considering that one kilogram of cereals generates approximately one kilogram of residue (straws) (Rodríguez *et al.* 2010), this agricultural activity creates a large quantity of residue each year. Such materials are used, nowadays, at best and in small quantities, as organic amendment and food for cattle, but mostly they are burned directly in the field, which causes pollution and fire risk.

Ecopapel S.L. company, which is located in Écija, Spain, manufactures cellulosic pulps from wheat straw that are used to produce packaging for various products, especially for the food and clinical industries. The pulping process, called Specel®, is versatile, allowing feedstock to consist of different types of cereal straws and other non-wood agricultural and/or forest waste. In this process, part of the lignin and hemicelluloses are solubilized from the straw, leaving a yield of about 65% to 70% by mass of dry straw. This is done through a reaction with sodium hydroxide as the only reactive chemical, without using either sulfur- or chlorine-containing compounds.

The production of wheat in Spain in 2009 was 4,724 t. Considering that the factory produces 20 t per day of cellulosic pulp, and the yield of the pulping is about 70% wt., it follows that 10,428 t per year of wheat straw would be required in order to guarantee the continuous operation of the plant and its economic viability. Taking into account that the Specel® process is adequate for all kind of cereal straws, and the annual production of oats, barley, rapeseed, and maize in 2009 in Spain was 11,775 t, it is really interesting to investigate the viability of the use of these raw materials in order to produce cellulosic pulps to obtain the above-mentioned packaging material.

In the present study, oats, maize, rapeseed, and barley straws were chemically characterized to determine their ash, holocellulose, α -cellulose, and lignin content. These raw materials are subjected to the Specel® process too, operating under the same conditions as those used for wheat straw. The following characteristics were evaluated: the degree of refining (*i.e.* freeness), the Kappa number, the viscosity of cellulose in the pulps, and the tensile index, stretch index, burst index, tear index, and brightness of the obtained sheets from the pulps. Finally, the observed results were compared with those obtained from wheat straw in order to determine their potential application in the production of cellulose pulps for the manufacturing of containers.

EXPERIMENTAL

Raw Material

Oats, maize, rapeseed, and barley straws were provided by Ecopapel S.L. company from cooperatives of Écija, Sevilla, Spain. Because of the way in which these raw materials are harvested, it is necessary to sift and perform a manual screening in order to separate undesirable elements such as stones, plastic bags, seeds, dust, wires, *etc.*

Once these elements had been separated, the straw was dried to an approximate value of dryness, close to 90 %, and stored in plastic bags for proper conservation.

Raw Material and Pulp Characterization

The chemical properties of cereal straws and pulps obtained from these were determined in accordance with the respective TAPPI©1997 standards for the different components, namely: T-222 for lignin, T-203 0S-61 for α -cellulose, T-9m-54 for holocellulose, T-204 for ethanol-benzene extractives, and T-211 for ash.

Pulping of Raw Material

The cellulosic pulp of wheat straw, which is used as a standard for comparison of the results of other raw materials, was provided by the Ecopapel S. L. company and obtained under the following operating conditions: 7% sodium hydroxide, 100 °C, a 10 liquid/solid ratio, and a processing time of 150 minutes.

Pulps from other straws were obtained by using a 15-L batch cylindrical reactor that was heated by means of an electrical wire and linked through a rotary axle – to ensure proper agitation – to a control unit including a motor actuating the reactor and the required instruments for measurement and control of the pressure and temperature.

The raw materials were cooked using 7% NaOH, 100 °C, a 10 liquid/solid ratio, and a processing time of 150 minutes. These operating conditions are the same as those used in the Specel® process. Next, the cooked material was fiberized in a wet disintegrator at 1200 rpm for 30 min, and the screenings were separated by sieving through a screen of 0.14 mm mesh size. The pulp obtained was beaten in a Sprout-Bauer refiner.

Specel® Process

In Fig. 1, an outline of the process is shown. The bale of wheat straw is placed in a conveyor belt where strings are removed and slightly cleared.

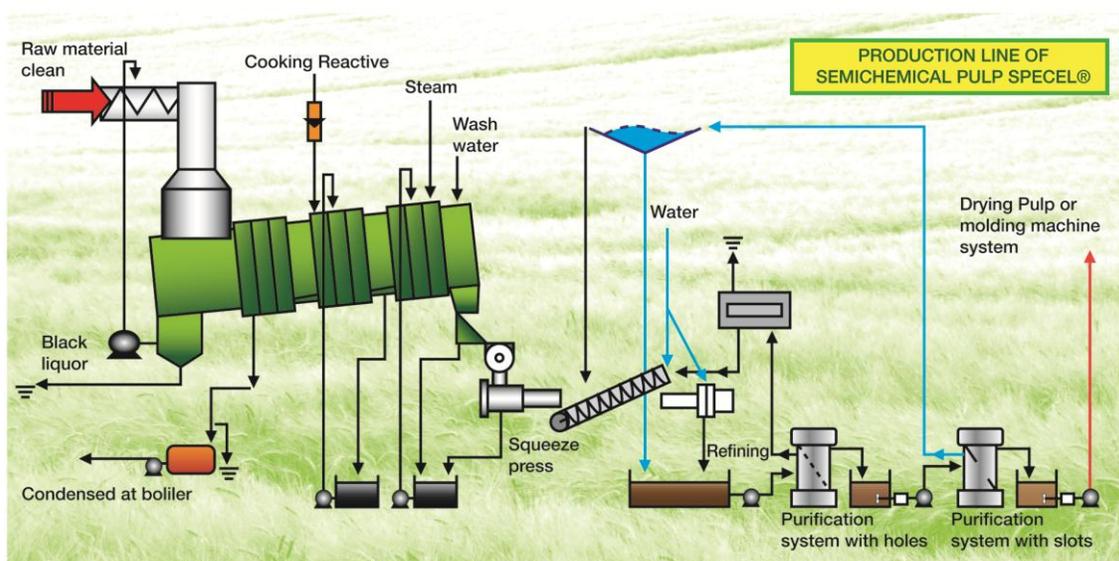


Fig. 1. The Specel® process

Then, by blowing, the undesirable elements that may accompany the straw are removed and, subsequently, wheat straw is put into the digester through the conveyor belt. Wheat straw moves through the digester crosscurrent to the cooking liquor, reducing its volume until one sixth of the initial one. Cooked pulp leaves the digester through a mechanical conveyor, which leads it to a twin screw press in order to extract the cooking liquor, which is passed forward to the digester to recover the alkali and fibers that it contains.

The cooked and pressed straw is diluted to 8% to 10%, refined, and then purified. After the addition of a biocide to ensure its microbial stability, the obtained pulp is dried and stored for subsequent use in the manufacture of containers.

Pulp Properties

Treated pulp samples were characterized in terms of Kappa number, brightness, and viscosity according to TAPPI T236cm-85, TAPPI T525om-92, and TAPPI T230om-94, respectively. The Kappa number and viscosity were measured five times, and ten measurements of brightness were obtained in order to calculate a relative standard deviation, which was found to be ≤ 0.1 for the three properties mentioned.

Paper Sheets Characterization

Paper sheets were prepared on an ENJO-F-39.71 sheet machine according to TAPPI T205ps-95.

Paper sheets were characterized in terms of tensile index (TAPPI T494om-96), burst index (TAPPI T403om-97), and tear index (TAPPI T414om-98). Two measurements were obtained for each test from ten sheets. The total number of data points was 20 for each cellulosic pulp obtained.

Manufacture of Containers

Oven dry manufacturing process

In Fig. 2, an outline of the oven dry manufacturing process of packaging is shown. The pulp slurry with a consistency of 1.5% is placed in a cast in which the highest quantity of water is separated by gravity and subsequently moved by a conveyor belt to the oven, where it is dried. The production capacity of this molding machine is 2 t of cellulosic pulp per day.

Thermoformed process

Figure 3 shows a diagram of the thermoformed process. In the first stage of molding, a slurry of pulp with a consistency of 0.8% is poured over the cast, in which the greatest quantity of water is drained by gravity. Then it goes through two continuous thermoformed stages by applying pressure and temperature in order to remove the water from the container. The capacity of production of this molding machine is 1 t of cellulosic pulp per day.

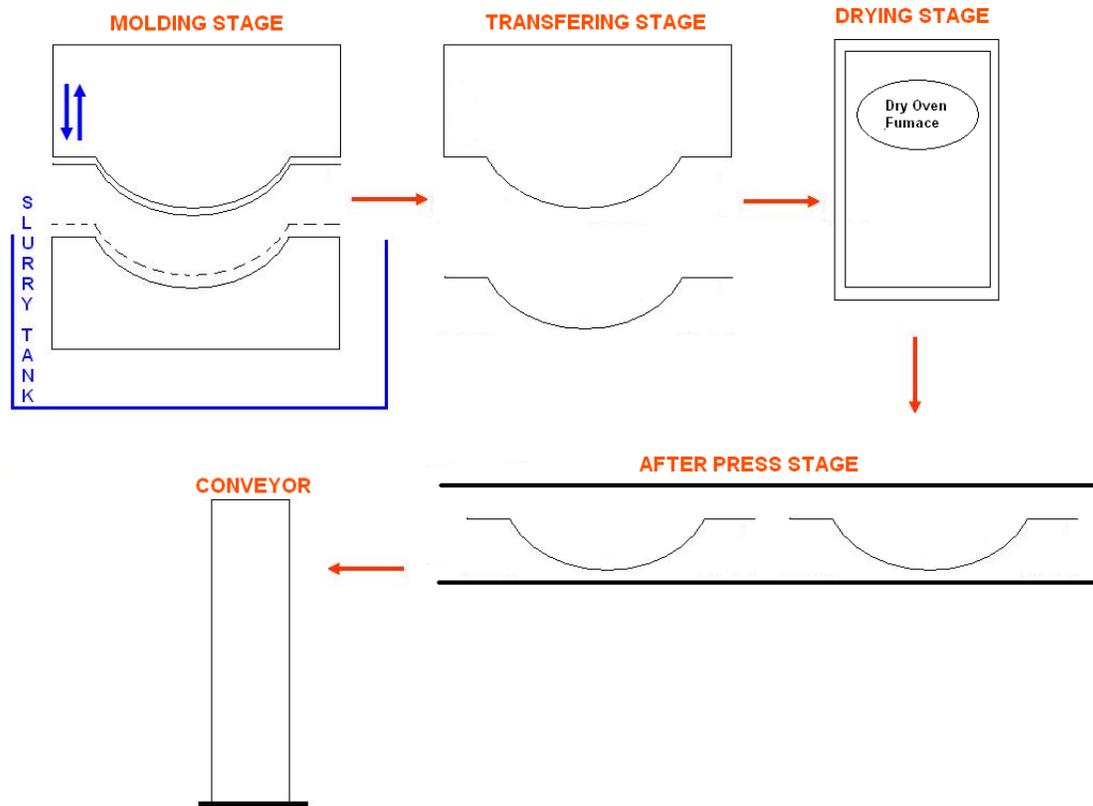


Fig. 2. The oven dry manufacturing process of containers manufactured from cellulosic pulps from cereal straw

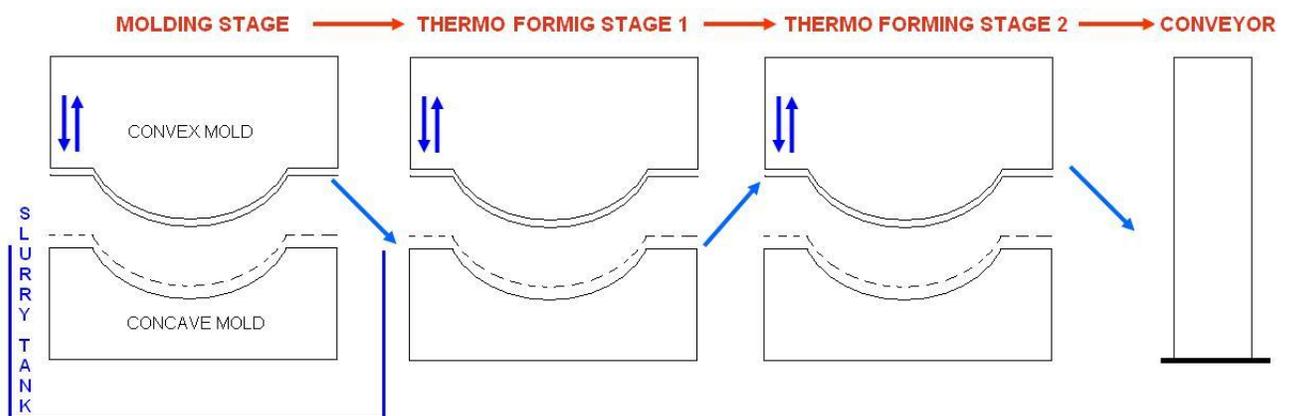


Fig. 3. The thermoformed process of containers manufactured from cellulosic pulps from cereal straw

RESULTS AND DISCUSSION

Raw Material

Table 1 shows the results obtained from the characterization of the raw materials under study as well as wheat straw samples. Ash can cause abrasion and inlays in the system. For that reason, it is very interesting to work with raw materials that have a low content in ash. It can be observed that the measured ash contents were similar or lower than the corresponding value for wheat straw (7.72%) except for the case of barley (9.49%), which value has the same order of magnitude as rice straw (9.2%) (Rodríguez *et al.* 2010), which can be used in the Specel® process without having any problem of abrasion.

Lignin is a hydrophobic constituent, which is the reason why a high proportion in pulp would inhibit the water absorption, making the refining difficult. However, a small quantity of lignin in pulps confers upon them relatively high values of specific volume, dimensional stability, and stiffness (García Hortal 2007), which are very valuable properties in the manufacturing of packaging. The lignin contents of the considered raw materials were similar to that of the wheat straw (17.7%). The hemicelluloses, unlike lignin, are very hydrophilic, favoring the swelling of fibers, increasing the plasticity, flexibility, and ability to link, and resulting in an improvement of the density of the sheet and of all the physical-mechanical properties (García Hortal 2007). The hemicelluloses content of the considered raw materials were of the same order of magnitude as the content presented by wheat straw (30.6%).

Table 1. Chemical Characterization of Oats, Maize, Rapeseed, Barley, and Wheat Straw

| Raw Material | Alcohol Extractives, % | Ash, % | α -cellulose, % | Hemicellulose, % | Lignin, % |
|--------------|------------------------|--------|------------------------|------------------|-----------|
| Oats | 6.4 | 7.00 | 37.9 | 37.7 | 16.6 |
| Maize | 6.8 | 5.95 | 44.0 | 30.7 | 18.2 |
| Rapeseed | 7.9 | 6.38 | 37.0 | 36.5 | 17.2 |
| Barley | 8.1 | 9.49 | 34.0 | 27.7 | 16.3 |
| Wheat | 5.2 | 7.72 | 39.7 | 30.6 | 17.7 |

In view of the results obtained, the compositions of these four types of raw materials were judged to be suitable for pulping by means of the Specel® process. The materials considered were found to have similar values of alcohol extractives, ash, α -cellulose, holocellulose, and lignin in comparison to wheat straw. The Specel® process was successfully used with this raw material, so it could be concluded that these raw materials (oats, maize, rapeseed, and barley), from the point of view of its chemical composition, are suitable to be used with the Specel® process.

Cellulose Pulp

Table 2 shows the results of the chemical characterization of the obtained cellulosic pulps. Note that the rapeseed does not seem to be sufficiently delignified, since it gave the lowest value of α -cellulose and the highest one for lignin (even higher than the initial percentage of the raw material).

Table 2. Chemical Characterization of Cellulosic Pulps from Oats, Maize, Rapeseed, Barley, and Wheat Straw

| Raw Material | Alcohol Extractives, % | Ash, % | α -cellulose, % | Hemicellulose, % | Lignin, % |
|--------------|------------------------|--------|------------------------|------------------|-----------|
| Oats | 0.89 | 2.50 | 69.2 | 16.4 | 13.1 |
| Maize | 0.86 | 1.36 | 71.0 | 20.0 | 8.9 |
| Rapeseed | 0.82 | 2.33 | 62.7 | 10.5 | 21.6 |
| Barley | 1.31 | 2.64 | 69.9 | 18.3 | 10.9 |
| Wheat | 3.37 | 10.90 | 73.0 | 16.3 | 2.8 |

Table 3 shows the values of yield, beating degree, Kappa number, and viscosity. Rapeseed gave the worst results of the four raw materials studied. The yield of wheat straw (70%) was higher than the values that other raw materials present, while the rapeseed raw material showed the lowest yield (63.1%). This data can be compensated by the low price of this feedstock (30€ / t) (Ecopapel S. L.).

Table 3. Characteristics of Cellulosic Pulps from Oats, Maize, Rapeseed, Barley, and Wheat Straw

| Raw Material | Yield, % | Beating Degree, °SR | Kappa number | Viscosity, mL/g |
|--------------|----------|---------------------|--------------|-----------------|
| Oats | 66.9 | 36 | 71.5 | 465 |
| Maize | 65.5 | 47 | 56.7 | 996 |
| Rapeseed | 63.1 | 29 | 115.1 | 184 |
| Barley | 65.6 | 61 | 57.5 | 468 |
| Wheat | 70.0 | 51 | 38.6 | 536 |

The kappa number is a measure of delignification that the raw material has experienced. High values of kappa number imply that the pulp may not be well suited for carrying out bleaching of the pulps because of high cost; however, if whiteness is not fundamental in the container, the highest numbers of kappa which have been tested would not matter. Thus, the best value of kappa number for production of a bleached product was that of wheat straw (38.6), while the worst value was that shown by rapeseed straw.

The beating degree ranged between the lowest value, 29 °SR, for the pulp of rapeseed straw and the highest value, 61 °SR for the pulp of barley straw. The value of wheat straw pulp was between the previously cited values (51 °SR). A higher °SR value is often correlated to higher bonding strength of the resulting package, so in this case, rapeseed straw is not considered suitable for the packaging manufacturing process.

The viscosity values for the cellulose component in the obtained pulps were lower in all the cases, except for the obtained pulp from maize straw (996 mL/g), than that of wheat pulp (536 mL/g), noting the low value of the pulp obtained from rapeseed (184 mL/g). These low values of viscosity may be an inconvenience in cases where the brightness degree is an important feature in the packaging manufacture process (because in a bleaching processes there will be further degradation of the cellulose in the fiber, with a consequent further decrease in the viscosity value).

Paper Sheets

The values of the properties of the paper sheets (tensile index, stretch index, burst index, tear index, and brightness) (Table 4), were similar to those of the reference sheets, made by wheat straw pulp. The value of brightness in all the cases was not very high, but it is not a decisive property for manufacturing containers with these pulps because of the characteristics and uses that these have. All raw materials studied, except for rapeseed, yielded similar values of tensile index, stretch index, burst index, and tear index to the values obtained from the papersheets made from wheat straw. Therefore it can be said that oats, maize, and barley can be employed with the Specel® process for obtaining cellulosic pulps intended for the manufacture of packaging. The rapeseed, on the other hand, does not seem appropriate due to the significantly lower values of certain physical properties of the paper sheets.

Table 4. Characteristics of the Paper Sheets

| Raw Material | Tensile Index, Nm/g | Stretch Index,% | Burst Index, kN/g | Tear Index, mNm ² /g | Brightness, % |
|--------------|---------------------|-----------------|-------------------|---------------------------------|---------------|
| Oats | 64.0 | 1.84 | 2.966 | 2.049 | 57.1 |
| Maize | 68.2 | 1.85 | 3.284 | 2.837 | 60.2 |
| Rapeseed | 42.8 | 1.21 | 1.630 | 2.207 | 64.3 |
| Barley | 63.9 | 1.75 | 3.169 | 2.300 | 55.7 |
| Wheat | 43.5 | 2.71 | 2.330 | 2.620 | 60.0 |

CONCLUSIONS

The four studied raw materials (oats, maize, rape, and barley) were judged to be suitable to be utilized in the Specel® process in order to obtain cellulosic pulp for its use in the production of ecological containers. The obtained yields in the four cases were very similar to the reference case, which was wheat straw. Since the costs per ton of raw material were similar, the utilization of these materials can be recommended.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Spain's MICINN and Junta de Andalucía for funding this research within the framework of the Projects CTQ 2010-19844-C02-01, TEP-6261 and TRA-2009_0064, and ECOPAPEL S.L for their support.

REFERENCES CITED

- Berrocal, M. M., Rodríguez, J., Hernández, M., Pérez, M. I., Roncero, M. B., Vidal, T., Ball, A. S., and Arias, M. E. (2004). "The analysis of handsheets from wheat straw following solid substrate fermentation by *Streptomyces cyaneus* and soda cooking treatment," *Bioresource Technol.* 94(1), 27-31.
- Chen, X., Yu, J., Zhang, Z., and Lu, C. (2011). "Study on structure and thermal stability properties of cellulose fibers from rice straw," *Carbohyd Polym.* 85(1), 245-250.
- Ecopapel, S. L. www.ecopapel.es, Accessed November 2011.
- Fatehi, P., Latibari, A. J., Ni, Y., and Javad Sepiddehdam, S. (2010). "Canola straw chemimechanical pulping for pulp and paper production," *Bioresource Technol.* 101(11), 4193-4197.
- Ferrer, A., Vega, A., Ligeró, P., and Rodríguez, A. (2011). "Pulping of empty fruit bunches (EFB) from the palm oil industry by formic acid," *BioRes.* 6(4), 4282-4301.
- García Hortal, J. A. (2007). "Fibras papeleras," Universidad Politécnica Cataluña.
- González, Z., Rosal, A., Requejo, A., and Rodríguez, A. (2011). "Production of pulp and energy using orange tree prunings," *Bioresource Technol.* 102, 9330-9334.
- González-García, S., Moreira, M. T., Artal, G., Maldonado, Ll., and Feijoo, G. (2010). "Environmental impact assessment of non-wood based pulp production by soda-anthraquinone pulping process," *J. Clean Prod.* 18(2), 137-145.
- Hou, Q., Yang, B., Liu, W., Liu, H., Hong, Y., and Zhang, R. (2011). "Co-refining of wheat straw pulp and hardwood kraft pulp," *Carbohyd Polym.* 86(1), 255-259.
- Huang, G., Zhang, C., and Chen, Z. (2006). "Pulping of wheat straw with caustic potash-ammonia aqueous solutions and its kinetics," *Chinese J. Chem. Eng.* 14(6), 729-733.
- Jiménez, L., Angulo, V., Rodríguez, A., Sánchez, R., and Ferrer, A. (2009). "Pulp and paper from vine shoots. Neural fuzzy modelling of ethylene glycol pulping," *Bioresource Technol.* 100, 756-762.

- Navaee-Ardeh, S., Mohammadi-Rovshandeh, J., and Pourjoozi, M. (2004). "Influence of rice straw cooking conditions in the soda-ethanol-water pulping on the mechanical properties of produced paper sheets," *Bioresource Technol.* 92(1), 65-69.
- Rodríguez, A., Sánchez, R., Requejo, A., and Ferrer, A. (2010). "Feasibility of rice straw as a raw material for the production of soda cellulose pulp," *J. Clean Prod.* 18, 1084-1091.
- Rodríguez, A., Serrano, L., Moral, A., and Jiménez, L. (2008). "Pulping of rice straw with high-boiling point organosolv solvents," *Biochem. Eng. J.* 42, 243-247.
- www.cepi.org , key statistics 2010. Accessed November 2011.
- www.fao.org , Accessed November 2011.

Article submitted: Jan. 17, 2012; Review done: May 23, 2012; Accepted: July 16, 2012;
Published: July 20, 2012.

ARTÍCULO / ARTICLE

II

Barley straw (*Hordeum vulgare*) as a supplementary raw material for *Eucalyptus camaldulensis* and *Pinus sylvestris* kraft pulp in the paper industry

Fátima Vargas, Zoilo González, Orlando Rojas, Gil Garrote and Alejandro Rodríguez.

BioResources, 2015, 10(2), 3682-3693.

Índice de Impacto/JCR Impact Factor (2015): 1,334/1.334
Posición/Rank (2015): 5/21, Q1, in Materials Science, Paper & Wood area.

Barley Straw (*Hordeum vulgare*) as a Supplementary Raw Material for *Eucalyptus camaldulensis* and *Pinus sylvestris* Kraft Pulp in the Paper Industry

Fátima Vargas,^a Zoilo González,^a Orlando Rojas,^b Gil Garrote,^c and Alejandro Rodríguez^{a,*}

The present study shows that barley straw (*Hordeum vulgare*) can be a supplementary raw material of softwoods and hardwoods such as *Pinus sylvestris* and *Eucalyptus camaldulensis*, respectively, for the production of cellulose and paper, reducing an agricultural residue that has no added value. Barley straw has a lower content of cellulose at 36.4% than *P. sylvestris* and *E. camaldulensis*, but it contains a lower quantity of lignin, 15.9%. After pulping with soda anthraquinone (AQ), high contents of cellulose (56.5 to 67.5%) and holocellulose (>80%) were attained. Paper sheet properties were able to reach, and even improve upon, those of wood species (*Pinus* and *Eucalyptus*) pulped with kraft. Better values of total yield (56.5%), Kappa number (8.9), and ISO brightness (36.4%), were attained for paper sheets from barley straw pulp versus *E. camaldulensis* and *P. sylvestris*, respectively, and comparable values for viscosity, tensile, and burst index were obtained.

Keywords: Barley straw; Agrifood residue; Biomass resources; Cellulose; Paper

Contact information: a: Chemical Engineering Department, Campus of Rabanales, Marie Curie Building (C-3), University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; b: Department of Forest Products Technology, School of Chemical Technology, Aalto University, Espoo, Finland; c: Department of Chemical Engineering, University of Vigo (Campus of Ourense), 32004 Ourense, Spain;

* Corresponding author: a.rodriiguez@uco.es

INTRODUCTION

Nowadays, the sustainability concept is being widely applied in all aspects of life, especially regarding biomass resources to produce energy and different types of materials such as cellulose, for paper production. Traditionally, two very well-known wood families are used in the paper industry, Pinaceae and Myrtaceae. *Pinus* and *Eucalyptus* are the most used genera because of their fast growth rate. However, demand for wood for different uses has increased considerably, and trees are felled faster than forests can recover. As a consequence, deforestation and desertification are affecting a large area of forests, becoming an important problem to face.

Because of this (deforestation and desertization), it would be interesting to use alternative sources such as non-wood biomass. In this way, straw can be suggested as a supplementary raw material to be studied in the paper industry for the production of pulp and paper and other derivatives. Usually, when cereals are harvested, straw has no added value other than animal feed. As a result, straw is generally burned, *in situ*, by farmers, releasing black smoke that contributes to air pollution. It is estimated that biomass burning produces 40% of the carbon dioxide (CO₂), 32% of the carbon monoxide (CO), 20% of the particulate matter, and 50% of the polycyclic aromatic hydrocarbons released to the

environment on a global scale (Kambis and Levine 1996). It is also important to note that the production of dioxins due to incomplete burning causes the release of highly toxic and carcinogenic compounds (Lemieux *et al.* 2004; CEC 2014). On top of that, it can cause pollution of the soil as emissions of nitrous oxide from the decomposition of crop residues on cultivated soils is common; in 2012, a total of 192,581 gigagrams of CO₂ equivalents were released to the atmosphere. In particular, barley straw (*Hordeum vulgare*) could be a good option to be considered as a raw material in the pulp and paper industries, taking into account that in 2012, due to barley residues, 10¹³ grams of CO₂ equivalents were released to the atmosphere in the world (5.2% of total emissions). A total of 57.9% of these emissions were from Europe, and Spain was among the 10 top emitters in 2012 with 465.82 time 10¹⁰ grams of CO₂ equivalents. In addition, in 2013, the production of barley (cereal) over the world was 144 M tons; 59.3% of the production was carried out in Europe, and 10 Mtons were produced in Spain (12% of the total production of Europe). Moreover, Spain is fifth on the list of top producers of the world, preceded by Russia, Germany, France, and Canada. Barley is the fifth most produced commodity in Europe and the most produced in Spain, followed by olives, wheat, maize, and sugar beets (FAOSTAT 2014).

In a preliminary study, it was shown that the pulping of barley straw and other kinds of straws under weak conditions (100 °C, 7% NaOH oven dry matter (o.d.m), 10 liquid/solid ratio (LSR), and 150 min of cooking) results in very good paper properties for packaging products and can be used at an industrial scale (Vargas *et al.* 2012). For this reason, as a complement to the previous study, it has been considered important to study the use of barley straw under not very harsh conditions in order to produce pulp to manufacture cellulose destined for paper uses. In the present study, the aim was to find the optimal condition to produce cellulose and paper from barley straw in order to give value to this residue and transform it into a byproduct of agriculture activity, reducing the negative effects of its decomposition on the environment. Besides, the additional goal of this work was to demonstrate that in comparison to some wood species used in the paper industry such as pine and eucalyptus pulped by kraft processes, paper made from barley straw through a soda-anthraquinone (soda-AQ) process presents great potential to be an additional raw material for use by paper industries.

For this goal, the soda-anthraquinone pulping process has been studied for the previously mentioned raw material. Usually, pulping processes produce pollutant effluents, especially when sulfur compounds are used as delignificant agents, as in the kraft process. On the contrary, for the soda-anthraquinone pulping process, recovery of black liquors is well known. In that pulping process, anthraquinone produces an acceleration of the alkaline delignification as well as carbohydrate stabilization (Jiménez *et al.* 2005). Moreover, it shows advantages such as a good rate of pulp production, high yields, reduction of cooking times, and medium values of Kappa number (Sánchez *et al.* 2010).

In this work, *Hordeum vulgare* was characterized in terms of its contents in holocellulose, α -cellulose, and lignin. Also, an experimental factor design was used to examine the influence of operational variables in the soda-AQ pulping of it (*viz.* soda concentration, cooking temperature, and time) on the contents in holocellulose, α -cellulose, lignin, yield, viscosity, and kappa number of the resulting pulps, and also on the breaking length, stretch, burst index, tear index, and brightness of paper sheets made from it.

EXPERIMENTAL

Materials

Barley straw was collected from a local farm in Alcalá la Real (Jaén, Spain). The first task was to spread the bales of straw in order to homogenize the moisture of the material. Second, it was necessary to sift and perform a manual screening in order to separate undesirable elements such as stones, plastic bags, seeds, dust, and wire. After that, the straw was dried at room temperature and stored in plastic bags for proper conservation.

Methods

Raw material and pulp characterization

The chemical properties of barley straw and pulps obtained in these experiments were determined in accordance with the respective standards for the different components of ethanol extractives (TAPPI T204 cm-97 (1997)), 1% NaOH solubles (TAPPI T212 om-98 (1998)), hot water solubles (TAPPI T207 cm-99 (1999)), α -cellulose (TAPPI T203 cm-99 (1999)), holocellulose (TAPPI T9m-54 (1998)), Klason lignin (TAPPI T222 om-98 (1998)), ash (TAPPI T211 om-93 (1993)), yield (gravimetrically), viscosity (TAPPI T230 om-99 (1999)), and Kappa number (TAPPI T236 om-99 (1999)).

Paper sheet properties

Paper sheets obtained from the pulping process of barley straw under different conditions were characterized according to the following standard methods: breaking length (TAPPI T494 om-96 (1996)), tensile index (TAPPI T494 om-96 (1996)), stretch index (TAPPI T494 om-96 (1996)), burst index (TAPPI T403 om-97 (1997)), tear index (TAPPI T414 om-98 (1998)), and ISO brightness (ISO 2470-2 (2008)). Five measures of brightness on both sides of each sheet were made, getting a standard deviation lower than 3 for 93% of the measurements. For the rest of the properties, two measures in ten sheets were carried out.

Pulping of raw material

Pulps from barley straw were produced using a 15-L batch cylindrical reactor that was heated by means of an electrical wire linked through a rotary axle to ensure proper agitation and to a control unit including a motor actuating the reactor, and the required instruments for measurement, control of pressure, and temperature.

The experimental conditions of work in the reactor were given by three independent variables as follows: temperature (100, 130, and 160 °C), time (90, 120, and 150 min), and soda concentration (o.d.m) (8, 11, and 14%), with a constant liquid/solid ratio of 10 and 1% of anthraquinone (o.d.m). These operating conditions were selected based on previous works and experiments in order to obtain proper values of yield, cellulose content in the pulps, and good values for the properties of the sheets. After pulping, the pulped material was washed with water, fiberized in a wet disintegrator at 1200 rpm for 30 min, and beat in a Sprout-Bauer defibrator (Germany). Finally, the screenings were separated by sieving through a 0.14 mm mesh, and the pulps were dried at room temperature and stored in bags until used.

Experimental design

As in previous works (Rodríguez *et al.* 2011), a second order factorial design was used, and the experimental data was fit to the following second-order polynomial (Eq. 1),

$$Y = a_0 + a_1X_T + a_2X_t + a_3X_S + \dots + a_{11}X_T^2 + a_{12}X_TX_t + a_{13}X_TX_S + \dots + a_{22}X_t^2 + a_{23}X_tX_S + \dots + a_{33}X_S^2 \quad (1)$$

where Y denotes a characteristic or property of the pulp (pulp yield, viscosity, Kappa number) or a paper sheet property (tensile, stretch, burst or tear index, brightness), and coefficients a_0, a_1, a_2, \dots are unknown characteristic constants estimated from the experimental data. The independent variables X_T, X_t , and X_S represent the normalized values of the pulping process: temperature, time, and soda concentration.

The independent variables are normalized from -1 to +1 according to Eq. 2:

$$X_{(T,t,S)} = 2 \frac{X - \bar{X}}{X_{max} - X_{min}} \quad (2)$$

In this way, it becomes easier to compare the coefficients and the individual effects of the independent variables on the response variable, improving the estimation of regression coefficients and decreasing interrelations between lineal and quadratic terms. Using experimental data for each one of the dependent variables of the pulping process for the different experiments of the experimental design, proceeding with a multiple regression analysis by using the Biomedical Computer Programs BMDP[®] Statistical Software (Dixon 1988), considering all the terms of Eq. 1 and driving out all those terms in which F-Snedecor is lower than 3, and by using the Stepwise method (Draper and Smith 1981), equations that connect the dependent and independent variables were found.

RESULTS AND DISCUSSION

Raw Material

Chemical characterization of barley straw was carried out according to the TAPPI standards, giving the results shown in Table 1. All the experiments were carried out in triplicate.

Table 1. Chemical Characterization of Barley Straw as a Raw Material versus Wood Species *Eucalyptus camaldulensis* and *Pinus sylvestris*

| Chemical characterization | Content (%) | | | |
|------------------------------|------------------------|---|---|---|
| | <i>Hordeum vulgare</i> | <i>Eucalyptus camaldulensis</i> I (Khristova et al. 2006) | <i>Eucalyptus camaldulensis</i> II (Dharm and Tyagi 2011) | <i>Pinus sylvestris</i> (Sable et al. 2012) |
| 1% NaOH extractives | 40.9±0.5 | - | - | - |
| α-cellulose | 36.4±0.1 | 44.1* | - | 49* |
| Holocellulose | 73.8±0.2 | - | 55.6 | - |
| Klason Lignin | 15.9** ±0.2 | 20 | 33.2 | 27.1 |
| Ash | 8.3±0.25 | 0.7 | 1.26 | 0.3 |
| *Kürschner-Hoffer cellulose | | | | |
| **Considered as total lignin | | | | |

For *Hordeum vulgare*, the value obtained for the 1% NaOH solubles predicts average pulping yield values of around 40 to 50%. These values, not high in comparison with conventionally raw materials used in the paper industry, allowed the use of at least 50% of the total quantity of the raw material. When comparing barley straw content of cellulose and lignin to some examples of softwoods and hardwoods used in the paper industry such as pine (*Pinus sylvestris*) (Sable *et al.* 2012), and eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) (Khristova *et al.* 2006; Dharm and Tyagi 2011), lower cellulose values can be observed in barley straw composition (36.4%) compared to pine (49%) and eucalyptus I (44.1%). Despite this fact, lignin content in barley straw has the lowest value at 15.9%. This can be considered total lignin as acid soluble lignin content for untreated barley straw is lower than 1.5% (Iroba *et al.* 2014) versus 27.1% in the case of pine (Sable *et al.* 2012), and 20% and 33.2% for eucalyptus I (Khristova *et al.* 2006) and eucalyptus II (Dharm and Tyagi 2011), respectively. It can also be seen that holocellulose content is higher for barley straw (73.8%) than for *Eucalyptus camaldulensis* II (55.6%). Barley straw ash content is higher than that of pine and eucalyptus. It is known that a high content of ash can cause abrasion and inlay in pipes systems. However, it has been demonstrated that this raw material can be used in industrial processes without causing further problems of clogging (Vargas *et al.* 2012).

Soda Process and Polynomial Design

In this process, barley straw was subjected to pulping at given sodium hydroxide concentrations, temperatures, cooking time, and a liquid/solid ratio of 10, according to the experimental design, as shown in Table 2. These operational conditions were chosen taking into account previous works (Vargas *et al.* 2012). With this pulping process, it is possible to eliminate most of the lignin content of raw materials and further reduce degradation of hemicelluloses and cellulose (Vargas *et al.* 2012). Additional advantages of this process compared to kraft, the most used process for industrial pulping. The residual liquors are free of sulfur components; it is possible to use this process with different raw materials - wood and non-wood- as cereal straw, olive tree prunings, *etc.*, obtaining good yield values and pulp and papersheets properties.

Table 2 shows the operational conditions and experimental values for chemical characterization of barley straw pulps with Soda-AQ as reagent, which differed less than 5% from their means as obtained in triplicate measures.

It can be observed that after pulping, the content of cellulose obtained had increased up to high values between 56.5% and 67.5%, reaching the maximum at the strictest conditions in experiment 2. Moreover, as can be noted from experiments 6, 10, 11, 12, and 14 in Table 2, under different pulping conditions, very similar contents of cellulose were obtained. Besides, the content of holocellulose was over 80% in all the experiments, reaching almost 93% in experiment 6. In addition, a good delignification was achieved. Lignin decreased from 15.9% to values lower than 7.8% in all experiments except for those in which soda concentration applied was the minimum (8%). Additionally, it is worthy to mention that ash content after pulping process decreased drastically. As can be seen from chemical composition after the pulping process, it seems to be that pulps must have a good chemical composition in order to manufacture paper.

In Table 3, experimental values of total yield after pulping process, and paper sheets properties from soda-AQ pulping of barley straw are shown.

Table 2. Experimental Values for Chemical Characterization

| Experiment | Temperature (°C), Time (min), Soda conc. (%) | Normalized values (X_T , X_t , X_s) | α - cellulose, (%) | Holocellulose, (%) | Klason Lignin, (%) | Ash, (%) |
|------------|--|--|---------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------|
| 1 | 130,120,11 | 0, 0, 0 | 59.4±0.1 | 82.8±0.1 | 5.7±0.2 | 1.28±0.17 |
| 2 | 160,150,14 | 1, 1, 1 | 67.5±0.2 | 91.9±0.3 | 2.9±0.7 | 1.08±0.01 |
| 3 | 100,150,14 | -1, 1, 1 | 59.9±0.2 | 85.7±0.5 | 6.1±0.4 | 1.55±0.08 |
| 4 | 160,150,8 | 1, 1, -1 | 60.1±0.1 | 86.5±0.2 | 11.5±0.2 | 2.52±0.10 |
| 5 | 100,150,8 | -1, 1, -1 | 56.5±0.1 | 83.8±0.7 | 11.4±0.7 | 1.35±0.05 |
| 6 | 160,90,14 | 1, -1, 1 | 66.7±0.1 | 92.8±0.4 | 0.7±0.2 | 1.42±0.10 |
| 7 | 100,90,14 | -1, -1, 1 | 59.5±0.2 | 84.0±0.5 | 7.8±0.2 | 0.99±0.43 |
| 8 | 160,90,8 | 1, -1, -1 | 57.8±0.2 | 80.9±0.1 | 11.2±0.5 | 3.07±0.01 |
| 9 | 100,90,8 | -1, -1, -1 | 57.7±0.1 | 84.7±0.7 | 12.3±0.6 | 0.78±0.48 |
| 10 | 130,150,11 | 0, 1, 0 | 64.9±0.4 | 91.5±0.5 | 5.7±0.1 | 1.16±0.02 |
| 11 | 130,90,11 | 0, -1, 0 | 64.8±0.1 | 90.7±0.1 | 6.7±0.4 | 1.12±0.01 |
| 12 | 130,120,14 | 0, 0, 1 | 63.9±0.1 | 88.8±0.5 | 3.6±0.3 | 1.11±0.12 |
| 13 | 130,120,8 | 0, 0, -1 | 57.1±0.2 | 82.7±0.4 | 9.9±0.9 | 1.58±0.26 |
| 14 | 160,120,11 | 1, 0, 0 | 64.8±0.1 | 89.7±0.2 | 7.1±0.1 | 1.35±0.04 |
| 15 | 100,120,11 | -1, 0, 0 | 59.5±0.5 | 86.5±0.1 | 7.8±0.3 | 1.26±0.06 |

Table 3. Experimental Values of the Paper Sheets Properties

| Experiment | Total Yield (%) | Viscosity (mL/g) | Kappa Number | Tensile Index (Nm/g) | Stretch Index (%) | Burst Index (kN/g) | Tear Index (mNm ² /g) | ISO Brightness (%) |
|------------|-----------------|------------------|---------------|----------------------|-------------------|--------------------|----------------------------------|--------------------|
| 1 | 41.5 | 669.6 ±2.5 | 37.9 ±1.0 | 73.9 ±1.2 | 2.46 ±0.07 | 3.92 ±0.14 | 2.52 ±0.09 | 28.1 ±0.4 |
| 2 | 41.9 | 770.7 ±0.1 | 13.6 ±0.25 | 52.3 ±3.0 | 2.40 ±0.30 | 3.06 ±0.08 | 2.72 ±0.04 | 37.1 ±0.9 |
| 3 | 46.7 | 655.7 ±2.3 | 42.5 ±0.2 | 68.6 ±1.8 | 1.99 ±0.11 | 3.66 ±0.18 | 2.53 ±0.05 | 33.3 ±0.1 |
| 4 | 45.8 | 668.9 ±4.4 | 78.4 ±0.5 | 41.6 ±3.0 | 1.68 ±0.22 | 2.16 ±0.17 | 2.60 ±0.05 | 17.1 ±0.1 |
| 5 | 54.7 | 484.7 ±0.1 | 63.9 ±1.3 | 62.9 ±1.7 | 1.67 ±0.18 | 3.19 ±0.09 | 2.39 ±0.08 | 27.4 ±0.1 |
| 6 | 37.5 | 765.9 ±0.1 | 10.1 ±0.1 | 56.4 ±4.2 | 2.28 ±0.30 | 3.46 ±0.37 | 2.57 ±0.06 | 37.2 ±0.2 |
| 7 | 51.4 | 531.1 ±2.3 | 52.6 ±1.2 | 72.4 ±2.2 | 2.09 ±0.12 | 4.01 ±0.16 | 2.51 ±0.07 | 30.7 ±0.1 |
| 8 | 45.6 | 606.3 ±3.8 | 73.7 ±1.3 | 43.8 ±2.1 | 1.84 ±0.19 | 2.11 ±0.13 | 2.46 ±0.05 | 17.8 ±0.1 |
| 9 | 56.2 | 474.8 ±0.1 | 75.1 ±0.2 | 64.1 ±4.9 | 1.47 ±0.30 | 3.16 ±0.20 | 2.44 ±0.10 | 27.4 ±0.1 |
| 10 | 47.9 | 683.7 ±0.1 | 39.0 ±0.2 | 68.2 ±4.3 | 2.32 ±0.23 | 3.57 ±0.13 | 2.41 ±0.07 | 27.5 ±2.4 |
| 11 | 43.6 | 632.7 ±4.3 | 35.5 ±0.2 | 75.7 ±2.6 | 2.37 ±0.17 | 4.05 ±0.18 | 2.45 ±0.05 | 30.0 ±0.4 |
| 12 | 43.3 | 699.8 ±0.1 | 21.3 ±0.26 | 67.2 ±1.5 | 2.07 ±0.13 | 3.59 ±0.20 | 2.58 ±0.05 | 37.0 ±0.1 |
| 13 | 49.2 | 519.1 ±2.3 | 64.1 ±1.1 | 59.6 ±2.8 | 1.89 ±0.15 | 3.07 ±0.11 | 2.37 ±0.07 | 21.3 ±0.1 |
| 14 | 40.4 | 688.3 ±3.9 | 47.8 ±0.1 | 55.6 ±3.3 | 1.84 ±0.23 | 2.87 ±0.18 | 2.58 ±0.09 | 20.8 ±0.1 |
| 15 | 50.5 | 601.4 ±3.9 | 49.9 ±0.3 | 73.2 ±3.5 | 1.73 ±0.27 | 3.83 ±0.30 | 2.46 ±0.09 | 31.5 ±0.1 |

In the experiments that were carried out, the total yield fluctuated between 37.5% and 56.2%, corresponding this maximum to the weakest operational conditions. The highest viscosity value, 770.7 mL/g, was not achieved under the least stringent condition, but instead under the strictest one, and the lowest, 474.8 mL/g under the least stringent one. The lowest Kappa number that was obtained in the experimental design was 10.1, at the maximum temperature and soda concentration, but minimum cooking time (experiment 6). This Kappa number differs very little from the 13.6 value resulting from the most severe conditions (experiment 2). In terms of energetic efficiency, it would be better to minimize the cooking time, which may allow reduction in capital expenses. The maximum values obtained for tensile, stretch, burst, and tear indexes and ISO brightness, under different operational conditions, were 75.7 Nm/g, 2.46%, 4.05 kN/g, 2.72 mNm²/g, and 37.2%, respectively. These are considered very good mechanical properties in handsheets.

In order to adjust the experimental data shown in Table 3, a multiple regression analysis was carried out by considering the independent variables to be temperature, cooking time, and soda concentration.

The selection of the statistically significant terms of the polynomial model was determined according to the F-Snedecor and had to be higher than 3, and a Student t-test that had to be higher than 1.75. Additionally, confidence intervals at 95% for the coefficients of each variable or parameter constant of models, did not include the zero.

The equations for the different dependent variables, in relation to pulp characteristics and the obtained paper sheets, are shown in Eqs. 3 through 10:

$$\text{Yield} = 44.78 + 1.35 X_T X_t + 2.45 X_S^2 - 3.07 X_S - 4.83 X_T \quad (3)$$

$$\text{Viscosity} = 655.13 - 37.45 X_S^2 + 25.29 X_t + 66.94 X_S + 75.22 X_T \quad (4)$$

$$\text{Kappa Number} = 39.56 + 3.69 X_T X_t - 6.04 X_T + 11.20 X_T^2 - 10.56 X_S X_T - 21.51 X_S \quad (5)$$

$$\text{Tensile Index} = 72.02 + 1.16 X_S X_T - 1.88 X_t - 6.76 X_T^2 - 7.72 X_S^2 + 4.49 X_S - 9.15 X_T \quad (6)$$

$$\text{Stretch Index} = 2.15 + 0.17 X_t^2 + 0.11 X_T - 0.39 X_T^2 + 0.23 X_S \quad (7)$$

$$\text{Burst Index} = 3.79 - 0.34 X_T^2 - 0.36 X_S^2 + 0.41 X_S - 0.42 X_T \quad (8)$$

$$\text{Tear Index} = 2.46 + 0.04 X_T X_t + 0.06 X_T^2 + 0.06 X_T + 0.06 X_S \quad (9)$$

$$\text{Brightness} = 28.28 - 2.03 X_T + 3.78 X_S X_T + 6.43 X_S \quad (10)$$

where X_T , X_t , and X_S represent normalized values for temperature, time, and soda concentration, respectively.

From Eqs. 3 to 10, it can be observed that time (X_t), temperature (X_T), and soda concentration (X_S) have influence on all the dependent variables except for burst index and ISO brightness, where cooking time does not have an important effect.

The values for multiple-R, R^2 , and adjusted- R^2 of the corresponding Eqs. 3 through 10, as well as the highest values for p, and the lowest for Student t-test (for a 95% of confidence interval), are shown in Table 4.

Table 4. Values of Statistical Parameters for the Equations that Relate the Considered Dependent Variables of the Paper Sheet Properties to the Operation Variables during the Pulping of *Hordeum vulgare* Straw with Soda-AQ

| Equation | Multiple R | R ² | Adjusted R ² | p < | t > |
|---|------------|----------------|-------------------------|--------|------|
| Yield | 0.9577 | 0.9172 | 0.8840 | 0.0690 | 2.11 |
| Viscosity | 0.9609 | 0.9233 | 0.8927 | 0.0492 | 2.24 |
| Kappa Number | 0.9898 | 0.9797 | 0.9684 | 0.0238 | 2.72 |
| Tensile Index | 0.9937 | 0.9875 | 0.9782 | 0.0713 | 2.08 |
| Stretch Index | 0.8955 | 0.8019 | 0.7227 | 0.1116 | 1.75 |
| Burst Index | 0.9513 | 0.9051 | 0.8671 | 0.0263 | 2.60 |
| Tear Index | 0.9137 | 0.8348 | 0.7687 | 0.0341 | 2.45 |
| Brightness | 0.9581 | 0.9180 | 0.8956 | 0.0124 | 2.99 |
| p = p-value t = Student t-test value | | | | | |

A good fitting of the experimental data was obtained for the calculation of all the response variables, as multiple R, R², adjusted R², p, and Student t-test (Table 4). The data achieved multiple-R and R² values superior to 0.90 for all the dependent variables, except for stretch index and tear index (R²), with a Kappa number and tensile index superior to 0.96. The estimated values through the previous equations reproduced the experimental results of the considered dependent variables for the paper sheets with errors lower than 3.3% for yield and 8.56% for stretch index in 87% of the experiments; 6.1% for viscosity, 6.71% for burst index, and 9.9% for brightness in 93% of the experiments; and, finally, 2.8% for tensile index and 2.53% for tear index in all the experiments.

Equations 3 through 10 make it possible to predict results of any of the dependent values, as long as they are in the range of the normalized values. To determine the values of the independent variables that result in the optimal values for each one of the dependent variables of the pulp and paper sheets (yield, viscosity, Kappa number, tensile, stretch, burst and tear index, and brightness), a non-lineal programming, following More and Toraldo's method (1983), was applied.

In Table 5, optimal values of dependent variables, and the corresponding required values for operation variables are shown. From results shown in the table it can be noted that by working with the minimum cooking time (90 min), the optimal values for dependent variables are reached, except for viscosity, and tear index which need 150 min to get the best results. Working at reduced times involves power efficiency as well as a higher production rate and a reduction of the costs. Soda concentration has an important effect over all the dependent variables with values of X_S close to 1, except for the tensile index of 0.24 and the burst index of 0.57, which present values closer to $X_S=0$ and -1, to get the optimal yield. Finally, temperature (X_T) has an essential influence over viscosity, Kappa number, tear index, and brightness.

The optimal values obtained for barley straw through soda-AQ pulping process in the present work are compared in Table 6 to those obtained in previous works for wood species also used in the paper industry, such as *Eucalyptus camaldulensis* (Khrstova *et al.* 2006; Dharm and Tyagi 2011) and *Pinus sylvestris* (Sable *et al.* 2012), that have been pulped through the kraft process.

Table 5. Values of Operations Variables for Barley Straw Soda-AQ Pulping Process to Get the Optimal Values for the Dependent Variables Related to Paper Sheets

| Dependent variables | Optimal value for dependent variable (maximum or minimum*) | Values of independent variables to achieve optimal values for dependent variables | | |
|----------------------------------|--|---|-------|-------|
| | | X_T | X_f | X_S |
| Total Yield (%) | 56.5 | -1 | -1 | -1 |
| Viscosity (mL/g) | 785.6 | 1 | 1 | 0.89 |
| Kappa Number | 8.9* | 0.91 | -1 | 1 |
| Tensile Index (Nm/g) | 77.4 | -0.66 | -1 | 0.24 |
| Stretch Index (%) | 2.56 | 0.14 | -1 | 1 |
| Burst Index (kN/g) | 4.03 | -0.62 | -0.6 | 0.57 |
| Tear Index (mNm ² /g) | 2.72 | 1 | 1 | 1 |
| Brightness (%) | 36.4 | 1 | -0.6 | 1 |

Table 6. Experimental Values Obtained for Eucalyptus and Pine versus Barley Straw Optimal Values

| | Total Yield (%) | Viscosity (mL/g) | Kappa Number | Tensile Index (Nm/g) | Stretch Index (%) | Burst Index (kN/g) | Tear Index (mNm ² /g) | Brightness (%) |
|--|-----------------|------------------|--------------|----------------------|-------------------|--------------------|----------------------------------|----------------|
| <i>E. camaldulensis</i> I (Khristova et al. 2006) | 44 | 908 | 24.4 | 79.4 | n/a | 4.7 | 8.7 | 25.9 |
| <i>E. camaldulensis</i> II (Dharm and Tyagi 2011) | 52.44 | n/a | 22.18 | 53.9 | n/a | 3.49 | 5.49 | n/a |
| <i>P. sylvestris</i> (Sable et al. 2012) | 45.9* | n/a | 27.5** | 33.5 | 1.1 | 1.57 | n/a | n/a |
| <i>Hordeum vulgare</i> | 56.5 | 785.6 | 8.9 | 77.4 | 2.56 | 4.03 | 2.72 | 36.4 |
| *Screened yield **Estimated data from Klason lignin value n/a: not available | | | | | | | | |

From Table 6 it can be seen that total yield is found to be similar or even higher for barley straw than for eucalyptus. The screened yield of barley straw, 47.4%, is very close to the screened yield for *P. sylvestris*, 45.9%. It can be seen that if *Hordeum vulgare* viscosity is compared to the one for *E. camaldulensis* I, the value is lower, 785.6 mL/g, but still high and considered a good value. Furthermore, as an unusual behavior and due to the nature and composition of the raw material, the highest viscosity coincides with the most severe operational conditions, the maximum quantity of cellulose at 67.5%, a high quantity of holocellulose at 91.9% and low lignin content of 2.9%, would lead to better mechanical properties in the formation of paper sheets. For the Kappa number, it can be seen that a low

value of 8.9 can be obtained through the soda-AQ pulping process *versus* the kraft process. It is worthy to mention that from a non-wood raw material like barley straw, a very good tensile index in paper sheets of 77.4 Nm/g has been attained, compared to *E. camaldulensis* I tensile index of 79.4 Nm/g, and higher than 53.9 and 33.5 Nm/g for *E. camaldulensis* II and *P. sylvestris*, respectively. The optimal value of burst index accomplished for barley straw of 4.03 kN/g is also comparable to that obtained for *E. camaldulensis* I at 4.70 kN/g, slightly superior to *E. camaldulensis* II, and much higher than for *P. sylvestris* at 1.57 kN/g. The best value of tear index of barley straw was the worst among the studied species. However, ISO brightness was higher at 36.4%, compared to *E. camaldulensis* I at 25.9%.

Taking into consideration that the harvested area of barley over the world was about 50 Mha in 2013, the production yield was 2.908 tons of cereal per hectare in that year. The ratio of harvested barley straw/produced cereals is 0.53 (MAGRAMA 2014), and the amount of residue per hectare was 1.541 tons. If an average yield of pulping of 50% is considered, more than 38 Mtons of pulp could be produced from this residue, thereby avoiding pollution of the atmosphere and soils and reducing the cutting of trees (up to 20% of the total produced wood pulp).

As mentioned in the previous paragraph, if an average yield of pulping of 50% is taken into account, and considering the average values of holocellulose that pulps present, around 43 g of holocellulose can be obtained from 100 g of barley straw. From this quantity of holocellulose, around 60% is alpha cellulose, which implies about 26 g of pure cellulose, with diverse applications, being hemicelluloses of commercial interest. Hemicelluloses are applicable as gels, films, coatings, adhesives, and stabilizing and viscosity-enhancing additives in food and pharmaceuticals, as well as in other industrial branches. Some of them serve as biodegradable components in composites with synthetics or pre-polymers for production of new functionalized polymeric materials (Ebringerová 2006).

CONCLUSIONS

1. Barley straw has a lower content of cellulose compared to *Pinus sylvestris* and *Eucalyptus camaldulensis*, but a lower quantity of lignin.
2. High contents of cellulose and holocellulose were attained through the soda-AQ pulping process of barley straw.
3. In order to get optimal results for paper sheets, it is necessary to apply the highest concentration of soda, except for tensile and burst index.
4. Temperature has a low influence on total yield, tensile, and burst index, while having a relevant impact on the rest of the dependent variables.
5. Paper sheet properties can equalize, and even improve upon, those for *Pinus*, and *Eucalyptus* pulped with kraft.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Spain's DGICyT, MICINN, and Junta of Andalucía for funding this research within the framework of the Projects CTQ2010-19844-C02-0 and P10-TEP-6261.

REFERENCES CITED

- CEC. (2014). *Burning Agricultural Waste: A Source of Dioxins*. Montreal, Canada. Commission for Environmental Cooperation. pg. 6, <http://www3.cec.org>, Accessed on October, 2014.
- Dharm, D., and Tyagi, C. H. (2011). "Comparison of various eucalyptus species for their morphological, chemical, pulp and paper making characteristics," *Indian J. Chem. Technol.* 18, 145-151.
- Dixon, W. J. (1988). *BMDP Statistical Software Manual*, University of California Press, Berkeley, California.
- Draper, N., and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, Wiley, New York.
- Ebringerová, A. (2006). "Structural diversity and application potential of hemicelluloses," *Macromol. Symp.* 232, 1-12. DOI: 10.1002/masy.200551401
- FAOSTAT. (2014). *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division*, <http://Faostat3.fao.org>. Accessed October, 2014.
- ISO 2470-2. (2008). "Paper, board and pulps - Measurement of diffuse blue reflectance factor - Part 2: Outdoor daylight conditions (D65 brightness)," *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland.
- Iroba, K. L., Tabil, L. G., Sokhansanj, S., and Dumonceaux, T. (2014). "Pretreatment and fractionation of barley straw using steam explosion at low severity factor," *Biomass Bioenerg.* 66, 286-300. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.02.002
- Jiménez, L., Torre, M. J., and Gutiérrez, J. C. (2005). "Pasteado "a la sosa"," in: *Pastas Celulósicas de Materias Primas Alternativas a las Convencionales*, L. Jiménez (ed.), Gráficas Sol, Spain, pp. 141-162.
- Kambis, A.D., and Levine, J. S. (1996). "Biomass burning and the production of carbon dioxide: A numerical study," in: *Biomass burning and global change*, J. S. Levine (ed.), Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, EU, vol. 1, pp. 170-177.
- Khristova, P., Kordsachia, O., Patt, R., and Dafaalla, S. (2006). "Alkaline pulping of some eucalypts from Sudan," *Bioresour. Technol.* 97, 535-544. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.04.006
- Lemieux, P. M., Lutes, C. C., and Santoianni, D. A. (2004). "Emissions of organic air toxics from open burning: A comprehensive review," *Prog. Energy Combust. Sci.* 30, 1-32. DOI: 10.1016/j.peccs.2003.08.001
- MAGRAMA (2012). "Crops areas and production," <http://www.magrama.gob.es>, Accessed October 2014.
- More, A., and Toraldo, A. (1983). "Algorithms for bound constrained quadratic programming problems," *Numer. Math.* 55, 377-400.
- Rodríguez, A., Sánchez, R., Requejo, A., and Ferrer, A. (2011). "Simulation of *Hesperaloe funifera* diethanolamine pulping by polynomial and neural fuzzy models," *Chem. Eng. Res. Des.* 89, 648-656. DOI:10.1016/j.cherd.2010.10.001

- Sable, I., Grinfelds, U., Jansons, A., Vikele, L., Irbe, I., Verovkins, A., and Treimanis, A. (2012). "Comparison of the properties of wood and pulp fibers from Lodgepole pine (*Pinus contorta*) and Scots Pine (*Pinus sylvestris*)," *BioResources* 7(2), 1771-1783. DOI: 10.15376/biores.7.2.1771-1783
- Sánchez, R., Rodríguez, A., Navarro, E., Conesa, J. A., and Jiménez, L. (2010). "Use of *Hesperaloe funifera* for the production of paper, and extraction of lignin for synthesis and fuel gases," *Biomass Bioenerg.* 34, 1471-1480. DOI: 10.1016/j.biombioe.2010.04.019
- TAPPI T9 m-54. (1998). "Holocellulose in wood," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- TAPPI T203 cm-99. (1999). "Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- TAPPI T204 cm-97. (1997). "Solvent extractives of wood and pulp," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- TAPPI T207 cm-99. (1999). "Water solubility of wood and pulp," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- TAPPI T211 om-93. (1993). "Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525 °C," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- TAPPI T212 om-98. (1998). "One percent sodium hydroxide solubility of wood and pulp," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- TAPPI T222 om-98. (1998). "Acid-insoluble lignin in wood and pulp," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- TAPPI T230 om-99. (1999). "Viscosity of pulp (capillary viscometer method)," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- TAPPI T236 om-99. (1999). "Kappa number of pulp," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- TAPPI T403 om-97. (1997). "Bursting strength of paper," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- TAPPI T414 om-98, (1998). "Internal tearing resistance of paper (Elmendorf type method)," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- TAPPI T494 om-96. (1996). "Tensile properties of paper and paperboard (using constant rate of elongation apparatus)," *TAPPI Press*, Atlanta, GA.
- Vargas, F., González, Z., Sánchez, R., Jiménez, L., and Rodríguez, A. (2012). "Cellulosic pulps of cereal straw as raw material for the manufacture of ecological packaging," *BioResources* 7(3), 4161-4170. DOI: 10.15376/biores.7.3.4161-4170

Article submitted: December 10, 2014; Peer review completed: April 19, 2015; Revisions received and accepted: April 22, 2015; Published: April 29, 2015.

DOI: 10.15376/biores.10.2.3682-3693

ARTÍCULO / ARTICLE

III

Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production

Fátima Vargas, Elena Domínguez, Carlos Vila,
Alejandro Rodríguez and Gil Garrote.

Bioresource Technology, 2015, 191, 263-270.

Índice de Impacto/JCR Impact Factor (2015): 4,917/4.917
Posición/Rank (2015): 1/14, Q1, in Agricultural Engineering
area; 11/88, Q1, in Energy & Fuels area.



Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production



Fátima Vargas^a, Elena Domínguez^{b,c}, Carlos Vila^{b,c}, Alejandro Rodríguez^a, Gil Garrote^{b,c,*}

^a Department of Chemical Engineering, Faculty of Science, University of Cordoba, Campus of Rabanales, Marie-Curie Building (C-3), N-IV Road, km. 396, 14071 Cordoba, Spain

^b Department of Chemical Engineering, Faculty of Science, University of Vigo (Campus Ourense), As Lagoas, 32004 Ourense, Spain

^c CITI (Centro de Investigación, Transferencia e Innovación), University of Vigo, Tecnopole, San Cibrao das Viñas, Ourense, Spain

HIGHLIGHTS

- An environmentally friendly process for barley straw valorization has been developed.
- High amounts of xylooligomers have been obtained.
- Fed batch simultaneous saccharification and fermentation was optimized.
- 52 g ethanol/L was obtained working at high solids loading (4 g liquid/g solid).

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 April 2015

Received in revised form 11 May 2015

Accepted 12 May 2015

Available online 15 May 2015

Keywords:

Bioethanol

Barley straw

Autohydrolysis

Fed-batch simultaneous saccharification and fermentation

Oligosaccharides

ABSTRACT

In the present work, the hydrothermal valorization of an abundant agricultural residue has been studied in order to look for high added value applications by means of hydrothermal pretreatment followed by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation, to obtain oligomers and sugars from autohydrolysis liquors and bioethanol from the solid phase. Non-isothermal autohydrolysis was applied to barley straw, leading to a solid phase with about a 90% of glucan and lignin and a liquid phase with up to 168 g kg⁻¹ raw material valuable hemicellulose-derived compounds. The solid phase showed a high enzymatic susceptibility (up to 95%). It was employed in the optimization study of the fed-batch simultaneous saccharification and fermentation, carried out at high solids loading, led up to 52 g ethanol/L (6.5% v/v).

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During this century, due to depletion of traditional energy sources, and the need of an environmentally sustainable economy, structural changes in the global economy will be mandatory. According to the analysis of the Energy Watch Group (Zittel et al., 2013) it is quite likely that, in 2030, world oil production will have declined by 40% compared to 2012. This situation will be a problem for the supply of energy and materials, and requires a transition to an economy based on renewable sources. By 2030, the European Union expects an increase up to the 30% of heat and power generated from biomass (Star-COLIBRI, 2011). One of the most promising options is the second generation bioethanol.

The bioethanol production from biomass is an important alternative to fossil fuels that will ensure the supply, reduce the greenhouse emissions and dependence on imports and can be easily implemented in current vehicles with few modifications (Cook and Devoto, 2011).

Biomass can be obtained from several sectors, but agricultural residues are expected to play a major role in the future biorefineries (Star-COLIBRI, 2011). There is a considerable interest in using straw, a byproduct, for industrial fiber or biofuel (ethanol) production (Soon and Lupwayi, 2012). Cereal straw is a residue of harvesting obtained in important amounts that constitutes a considerable biomass resource which could be used as an important byproduct for bioethanol production. A part of these residues is burnt *in situ*, producing non-desirable emissions, or used as animal feed, but it presents a low nutritional value and digestibility (López et al., 2005). Barley is an abundant cereal with a yearly world production of 142 ± 2 million tons (average value of the last 20 years, according to FAO). Spain is the fifth largest world producer, with an

* Corresponding author at: Department of Chemical Engineering, Faculty of Science, University of Vigo (Campus Ourense), As Lagoas, 32004 Ourense, Spain. Tel.: +34 988387075; fax: +34 988387001.

E-mail address: gil@uvigo.es (G. Garrote).

ARTÍCULO / ARTICLE

IV

Biorefinery scheme for residual biomass using autohydrolysis and organosolv stages for oligomers and bioethanol production

Fátima Vargas, Elena Domínguez, Carlos Vila,
Alejandro Rodríguez and Gil Garrote.

Energy & Fuels, 2016, 30, 8236-8245.

Índice de Impacto/ JCR Impact Factor (2015): 2,835/ 2.835

Posición/Rank (2015): 25/135, Q1, in Chemical Engineering area.

Biorefinery Scheme for Residual Biomass Using Autohydrolysis and Organosolv Stages for Oligomers and Bioethanol Production

Fátima Vargas,[†] Elena Domínguez,^{‡,§} Carlos Vila,^{‡,§} Alejandro Rodríguez,[†] and Gil Garrote^{*,‡,§}

[†]Department of Chemical Engineering, Faculty of Science, University of Cordoba, Campus of Rabanales, Marie-Curie building (C-3), N-IV road, km. 396, 14071 Cordoba, Spain

[‡]Department of Chemical Engineering, Faculty of Science, University of Vigo (Campus Ourense), As Lagoas, 32004 Ourense, Spain

[§]CITI (Centro de Investigación, Transferencia e Innovación)—University of Vigo, Tecnopole, San Cibrao das Viñas, 32002 Ourense, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Straw is one of the main lignocellulosic wastes produced during cereal crop cultivation. The abundance of barley straw makes it a good candidate for bioethanol production. This work deals with barley straw pretreatment by means of autohydrolysis in order to get xylooligosaccharides in the liquid phase, followed by an organosolv treatment using ethanol to increase the solid phase enzymatic susceptibility. Up to 17.4 g oligomers/L were obtained in the hydrothermal stage, in which practically all the cellulose and lignin remained in the solid phase. The solid phase from the hydrothermal-delignification was subjected to an experimental design in order to study the effect of pretreatment conditions on the bioethanol production, with values of solids concentrations in the range 7.7–20 wt % and values of enzyme loading in the range 14 FPU/g to 6 FPU/g. In the experiments carried out at a liquid to solid ratio = 4 g/g, it is possible to obtain 31.6 g ethanol/L in just 9 h (corresponding to 100% ethanol conversion), with optimum results of 44.5 g ethanol/L in 46 h (90–93% glucose to ethanol conversion) and with a maximum concentration of 48.7 g ethanol/L in 89 h (79% conversion). The combination of a hydrothermal pretreatment (under conditions that lead to the recovery of high amounts of hemicellulosic byproducts), followed by an organosolv treatment under mild conditions, turns out to be suitable for second generation bioethanol production, applying a high solids loading, by means of fed-batch simultaneous saccharification and fermentation.

INTRODUCTION

Ethanol is nowadays the most widely used liquid biofuel alternative to fossil fuels.¹ Biomass resources such as lignocellulosic materials could be used to provide large-scale biomass to the energy industry.² Ethanol from lignocellulosic materials (LCM) is called second generation bioethanol.³ Second generation bioethanol would mean a net reduction of up to 85% of emissions of greenhouse gases.⁴

Straw is one of the main lignocellulosic wastes produced during cereal crop cultivation. The principal constituents of LCM are cellulose, hemicelluloses, and lignin. Barley straw is an abundant byproduct from barley production. The abundance of barley straw and its high carbohydrates content make it a good candidate for the production of bioethanol.⁴ Barley straw is the second most abundant agricultural residue in Europe, after wheat straw.⁵ 144 million metric tons of barley were produced in the world in 2013. Europe (59.7%), Asia (15.2%), and America (14.7%) are the main producing regions.⁶ The main byproduct of barley is straw, with a ratio of up to 530 kg straw/metric ton grain.⁷

During the conversion of the LCM to bioethanol, the main task is the pretreatment step, which is necessary to break the tight lignocellulosic structure cellulose, hemicelluloses, and lignin, allowing, among many other things, the easier conversion into fermentable sugars.⁸ An ideal pretreatment should comply with the following conditions: (1) simple and inexpensive operation, (2) reduction of particle size easily, (3) low consumption of energy, water, and chemicals, (4) little

corrosion, (5) capability to alter the LCM structure, (6) minimal polysaccharides losses, (7) possibility to produce large quantities of hemicelluloses that result in high added value compounds, (8) generation of low quantities of furans and phenolic acids. (9) obtaining a solid fraction with high cellulose content and high enzyme susceptibility, (10) production of lignin and/or derivatives of high quality, and (11) low waste. Taking this into account, autohydrolysis seems to be an ideal pretreatment.

In the autohydrolysis or hydrothermal process (compressed hot water treatment), an aqueous suspension of LCM, without the addition of foreign chemicals, is heated, causing hydrolytic degradation of hemicelluloses (through reactions catalyzed by hydronium ions, first generated from water autoionization and in subsequent reaction steps coming from organic acids generated in situ, as acetic acid). When autohydrolysis is conducted under suitable conditions, the obtained liquid phase is rich in hemicelluloses as xylooligomers, useful in several industries (food, pharmaceutical, etc.), while the solid phase (composed mainly of cellulose and lignin) is suitable for conversion to ethanol and can be previously subjected to an organosolv delignification stage in order to increase its enzymatic susceptibility and removal of lignin.⁹

Received: February 3, 2016

Revised: August 26, 2016

Published: August 30, 2016

ARTÍCULO / ARTICLE

V

Nanofibrillar cellulose from oat and barley straws: Rheological behavior and nanopapers reinforced with xylans

Fátima Vargas, Alejandro Rodríguez and Orlando Rojas.

Nanofibrillar cellulose from oat and barley straws: Rheological behavior and nanopapers reinforced with xylans

Fátima Vargas^a, Alejandro Rodríguez^a and Orlando J. Rojas^{b, c}.

^a Department of Chemical Engineering, Faculty of Science, University of Córdoba, Campus of Rabanales, Marie-Curie Building (C-3), N-IV Road, KM. 396, 14071 Cordoba, Spain.

^b Department of Bioproducts and Biosystems, School of Chemical Engineering, Aalto University, FI-00076 Aalto, Finland

^c Departments of Forest Biomaterials and Chemical and Biomolecular Engineering, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina 27695, United States

This research article is not available for publication yet.

Capítulo

IV

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS



ARTÍCULO I

Conclusiones objetivo 1

I. 1) La caracterización química de las diferentes materias primas empleadas (cebada, avena, maíz, trigo y colza) reveló una composición química muy similar de todas ellas, presentando valores en el rango de: 5,2% (trigo) y 8,1% (cebada), para extractos en etanol; 34% (cebada) y 44% (maíz) para α -celulosa; 27,7% (cebada) y 37,7% (avena) para la hemicelulosas; 16,3% (cebada) y 18,2% (maíz) para lignina; y, 5,95 (maíz) y 9,49% (cebada) para cenizas. Considerando la paja de trigo como material de referencia en el proceso Specel[®], cuyos valores obtenidos para extractos en etanol, α -celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas fueron 5,2%, 39,7%, 30,6%, 17,7%, 7,72%, respectivamente, se puede concluir que todas las materias primas mencionadas, desde el punto de vista de su composición química pueden ser empleadas a nivel industrial en el proceso Specel[®].

Conclusiones objetivos 2 y 3

I.2) La pasta celulósica obtenida a nivel industrial a partir de la paja de trigo mediante el proceso Specel[®] presentó los valores más altos para los datos de extractos en etanol (3,37%), cenizas (10,90%) y α -celulosa (73%), siendo su contenido en lignina el valor más bajo (2,8%) de entre todas las pastas celulósicas estudiadas, con un valor de hemicelulosa intermedio (16,3%). De las pastas celulósicas obtenidas en el laboratorio (avena, maíz, colza y cebada), las obtenidas a partir de paja de colza presentaron los peores resultados (alto contenido en lignina, 21,6% y bajo en hemicelulosa, 10,5%), siendo muy parecidas químicamente entre sí el resto de pastas obtenidas.

I.3) El rendimiento del proceso de pastado fue muy similar tanto para la pasta de trigo (70%) como para la cebada, avena y maíz, presentando la colza el menor de los valores (63,1%). De nuevo este material presentó los peores resultados en cuanto a grado de refinado, número Kappa y viscosidad, siendo los mejores para las pastas obtenidas a partir de paja de cebada.

Conclusiones objetivo 4

I.4) Las hojas obtenidas a partir de los materiales estudiados, excepto las hechas a partir de fibras celulósicas procedentes de paja de colza, presentaron valores muy similares a los de las hojas hechas de celulosa de paja de trigo en cuanto a índice de tracción, alargamiento, estallido, desgarrado y blancura, incluso mejorando los índices de tracción y estallido.

I.5) Se puede afirmar que la paja de avena, maíz y cebada son susceptibles de ser empleadas como materia prima para el proceso Specel®, obteniendo pastas celulósicas destinadas a la producción de envases ecológicos de celulosa moldeada, siendo la paja de colza la menos recomendada.

ARTÍCULO II

Conclusiones objetivo 5

II.1) La materia prima empleada, paja de cebada, presentó un contenido menor de α -celulosa (36,4%) y lignina (15,9%) que las especies madereras *Pinus sylvestris* y *Eucalyptus camaldulensis*.

II.2) Se obtuvieron elevados contenidos de celulosa (56,5%-67,5%) y holocelulosa (>80%) mediante el pasteado a la sosa-AQ en las pastas celulósicas producidas a partir de paja de cebada, consiguiendo un buen grado de deslignificación para todos los experimentos, excepto para aquellos en los que la concentración de sosa aplicada fue la mínima (8%).

II.3) Para obtener unos resultados óptimos en las hojas de papel hechas a partir de fibras celulósicas de paja de cebada, es necesario trabajar con la máxima concentración de sosa, excepto cuando se desean obtener valores óptimos para los índices de tracción y estallido.

II.4) La temperatura tiene una baja influencia en el rendimiento total del proceso, los índices de tracción y de estallido, influyendo más notablemente en el resto de las variables dependientes.

II.5) Las pastas celulósicas obtenidas del pasteado a la sosa-AQ de la paja de cebada tienen una adecuada composición química para la manufactura de papel y envases. Las propiedades de las hojas de papel hechas a partir de fibras celulósicas de paja de cebada obtenidas mediante un pasteado sosa-AQ pueden igualar o incluso mejorar las propiedades de aquellas obtenidas a partir del pasteado Kraft de especies madereras como son pino y eucalipto.

ARTÍCULO III

Conclusiones objetivo 6

III.1) El rendimiento del sólido disminuyó a medida que aumentó la severidad del pretratamiento de autohidrólisis. El contenido en compuestos no volátiles aumentó desde $226 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a la severidad más baja ($S_0=3,15$) hasta $329 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a $S_0=3,91$. El contenido en hemicelulosas (xilano, arabinano y grupos acetilo) disminuyó con la severidad, solubilizándose aproximadamente el 80-90% de hemicelulosas, sin disolver de manera significativa el glucano o la lignina, que mantuvieron sus valores en un 90% en la fase sólida resultante del tratamiento hidrotérmico.

III.2) Respecto a la fase líquida, los azúcares monoméricos se encontraron en bajas concentraciones. Como tendencia general, la concentración de glucosa y xilosa aumentó con la severidad, especialmente la xilosa, debido a la descomposición de los oligómeros hemicelulósicos. Por otro lado, la concentración de arabinosa mostró un valor máximo a una severidad intermedia para luego disminuir a severidades mayores. La concentración de ácido acético aumentó con la severidad. Los compuestos furánicos (HMF y F) se encontraron en bajas concentraciones, aumentando también con la severidad. Se concluye que los xilooligómeros son la principal fracción de oligómeros, mostrando una proporción molar de xilosa: arabinosa: grupos acetilo 10:1,5:1,3.

Conclusiones objetivo 7

III.3) El sólido autohidrolizado incrementó su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática con la severidad, aumentando desde $CG_{MAX}=50,7\pm 0,3\%$ bajo las condiciones más suaves hasta prácticamente una conversión cuantitativa del 94-95% bajo las condiciones más severas. De igual modo, la conversión máxima a xilosa, CX_{MAX} , aumentó desde $42,1\pm 0,3\%$ hasta el $88,0\pm 0,2\%$. El valor de $t_{1/2}$ aumentó hasta $S_0= 3,45$, donde se mantuvo estable en valores de $t_{1/2G}$ de 18,5 h y $t_{1/2X}$ de 10,4 h.

Conclusiones objetivo 8

III. 4) El sólido autohidrolizado sometido a $S_0= 4,21$ fue elegido para llevar a cabo las SSF en modo *fed-batch*. La estrategia de *fed-batch* en 3 cargas fue más favorable que en 4. También se puede afirmar que resultó más apropiado añadir la totalidad de enzimas al inicio del proceso que en diferentes *batches*.

III.5) La máxima concentración de etanol (51,7 g etanol/L a las 96 h, 6,5 % v/v) se obtuvo en el ensayo 3-2, en el que se realizaron 3 cargas de sólidos y nutrientes, añadiendo la total cantidad de enzimas al inicio de la sacarificación y fermentación simultánea en modo *fed-batch* (FBSSF), consiguiendo una conversión de glucano a etanol del 77%.

ARTÍCULO IV

Conclusiones objetivo 9

IV.1) Los resultados de la composición química del sólido autohidrolizado-deslignificado mostraron que casi toda la celulosa quedó retenida en la fase sólida (más del 98%), disminuyendo el contenido en hemicelulosas y lignina respecto al sólido autohidrolizado en las 3 severidades.

Conclusiones objetivo 10

IV.2) Las condiciones óptimas para la FBSSF se encontraron al emplear el sólido autohidrolizado a $S_0=3,94$ y deslignificado a las condiciones fijadas (concentración de etanol= 40%; $T= 170^\circ\text{C}$ y $t= 1$ h); con una alta carga en sólidos, siendo la RLS= 4 g/g, y 10 FPU/g. Bajo estas condiciones se obtuvo una concentración de etanol de 48,7 g/L (con una conversión de etanol del 78,8%) tras 90 h de fermentación. Bajo las mismas condiciones, se obtuvieron 44,5 g etanol/L (con una conversión de etanol del 93,3%) tras 46 h de fermentación.

ARTÍCULO V

Conclusiones no disponibles para publicación

RESEARCH ARTICLE I

Conclusions from objective 1

I.1) The chemical characterization of the different studied raw materials (barley, oat, maize, wheat and rapeseed) revealed a very similar chemical composition. The obtained values ranged between: 5.2% (wheat)- 8.1% (barley) for ethanol extractives; 34% (barley)- 44% (maize) for α -cellulose; 27.7% (barley) and 37.7% (oat) for hemicelluloses; 16.3% (barley) and 18.2% (maize) for lignin; and 5.95 (maize) and 9.49% (barley) for ash content. Wheat straw was considered as the reference raw material in the Specel[®] process, for which values of 5.2%, 39.7%, 30.6%, 17.7%, 7.72% were obtained for ethanol extractives, α -cellulose, hemicellulose, lignin and ashes, respectively. Then, it can be concluded that all the studied raw materials, from the point of view of its chemical composition, are suitable to be used with the Specel[®] process.

Conclusions from objectives 2 and 3

I.2) The obtained cellulosic pulps from wheat straw at industrial scale by the Specel[®] process showed the highest values for ethanol extractives (3.37%), ash (10.90%) and α -cellulose (73%) contents, showing the lowest lignin content (2.8%) among the studied cellulosic pulps, with an intermediate hemicellulose value (16.3%). From all the cellulosic pulps obtained at the laboratory (oat, maize, rapeseed and barley), the worst results were got for the ones produced from rapeseed straw (with a high lignin content, 21.6% and a low content in hemicellulose, 10.5%). The chemical composition of the other pulps was very similar among them.

I.3) The yield of wheat pulping process (70%) was very similar to the one obtained for barley, oat and maize, showing the rapeseed the lowest yield (63.1%). Again, this latter material had the worst results in terms of beating degree, Kappa number and viscosity. By contrast, the best results were found to be ones obtained for barley straw.

Conclusions from objective 4

I.4) The paper sheets made from the studied raw materials, except for rapeseed, showed very close results to the ones produced from wheat straw in terms of tensile, stretch, burst and tear indexes as well as brightness, even improving wheat straw achieved values of tensile and burst indexes.

I.5) In general, it can be affirmed that oat, maize and barley straws are suitable raw materials to be used in the Specel® process in order to produce cellulosic pulps for the manufacture of ecological packaging of molded cellulose. In contrast, rapeseed straw does not seem to be so appropriated.

RESEARCH ARTICLE II

Conclusions from objective 5

II.1) The studied raw material, barley straw, had lower cellulose content (36.4%) compared to wood species of *Pinus sylvestris* and *Eucalyptus camaldulensis*, but also it showed a lower quantity of lignin (15.9%) what means an advantage.

II.2) High contents of cellulose (56.5%- 67.5%) and holocellulose (>80%) of the pulps were obtained by soda-AQ pulping process from barley straw. A substantial delignification was achieved in all experiments, except for those ones which were carried out under the mildest conditions of soda concentration (8%).

II.3) In order to get optimal results for paper sheets, it is necessary to apply the highest concentration of soda, except for tensile and burst indexes.

II.4) Temperature has a low influence on total yield, tensile and burst indexes, while having a relevant impact on the rest of the dependent variables.

II.5) As a general conclusion, soda-AQ barley straw cellulosic pulps have a proper chemical composition for the manufacture of paper and ecological packaging. Paper sheets made from these pulps can equalize, and even improve upon, those for pine and eucalyptus pulped with Kraft.

RESEARCH ARTICLE III

Conclusions from objective 6

III.1) Solid yield decreased with autohydrolysis severity. Non-volatile content increased from $226 \text{ kg}\cdot\text{g}^{-1}$ at the lowest severity ($S_0=3.15$) up to a maximum value of $329 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ at $S_0=3.91$. Content in hemicelluloses compounds (xylan, arabinan and acetyl groups) decreased with severity, solubilising the 80-90% of the hemicelluloses without dissolving significantly the glucan or the lignin, which kept their values in a 90% in the resulting solid phase of the hydrothermal pretreatment.

III.2) Regarding the liquid phase composition, monomeric sugars were found in low amounts. As general trend, glucose and xylose concentration increased with severity, especially xylose due to hemicelluloses oligomers decomposition. On the other hand, arabinose concentration showed a maximum value at an intermediate severity and then decreased at higher severities. It can be concluded that xylooligomers are the main fraction of oligomers, showing a xylose: arabinose: acetyl groups molar ratio of 10: 1.5: 1.3.

Conclusions from objective 7

III.3) The autohydrolyzed solid (barley straw) increased its susceptibility to enzymatic hydrolysis with severity, rising from $CG_{MAX}=50.7\pm 0.3\%$ under the lowest conditions to almost quantitative conversion of 94-95% under the harshest conditions. Likewise, CX_{MAX} increased from $42.1\pm 0.3\%$ to $88.0\pm 0.2\%$. The value of $t_{1/2}$ increased up to $S_0=3.45$, where it became stable at $t_{1/2G}$ values of about 18.5 h and $t_{1/2X}$ of about 10.4 h.

Conclusions from objective 8

III.4) The autohydrolyzed solid at $S_0=4.21$ showed the best characteristics to be fermented by the simultaneous saccharification and fermentation in fed-batch mode (FBSSF) technique. The 3 loads strategy was more favorable than the one in 4 loads, while adding the entire enzyme at the beginning of the process also resulted more appropriated.

III.5) The maximum ethanol concentration (51.7 g ethanol/L at 96 h; 6.5% v/v) was obtained in assay 3-2, in which 3 batches of solid and nutrients were carried out and where the entire enzyme was added at the beginning of the simultaneous saccharification and fermentation in fed-batch mode (FBSSF). A glucan to ethanol conversion of 77% was achieved.

RESEARCH ARTICLE IV**Conclusions from objective 9**

IV.1) The results of the chemical composition of the autohydrolyzed-delignified solid (barley straw) showed that almost all cellulose remained in the solid phase (more than 98%) and that the content in hemicelluloses and lignin decreased in the 3 studied severities in comparison with the autohydrolyzed solid.

Conclusions from objective 10

IV.2) Optimal conditions for carrying out FBSSF were found to be $S_0=3.94$ for the autohydrolysis and delignification under the prefixed conditions (ethanol concentration= 40%; $T= 170^\circ\text{C}$; $t= 1$ h), high solids loading with a liquid-to-solid ratio= 4 g/g and 10 FPU/g. Under these conditions, 48.7 g ethanol/L (with an ethanol conversion of 78.8%) was obtained after 90 h of fermentation. Under the same optimal conditions, 44.5 g ethanol/L (with an ethanol conversion of 93.3%) was attained after 46 h of fermentation.

RESEARCH ARTICLE V

Not available for publication yet.

ANEXO I.

Breve memoria de los resultados obtenidos en la estancia realizada en el Laboratorio Nacional de Ciencia y Tecnología del Bioetanol (CTBE) en Brasil.



ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA HIDRÓLISIS DE XILOOLIGOSACÁRIDOS OBTENIDOS A PARTIR DEL PRETRATAMIENTO HIDROTÉRMICO DEL BAGAZO DE LA CAÑA DE AZÚCAR

1. RESUMEN

Actualmente, para la producción de bioetanol de segunda generación es necesario llevar a cabo un pretratamiento de autohidrólisis del bagazo de la caña de azúcar para, mediante su fraccionamiento, obtener una fracción sólida, rica en celulosa (fracción C6) y una fracción líquida, llamada licor de autohidrólisis, con gran contenido en hemicelulosas (xilooligosacáridos) susceptibles de ser hidrolizados para su transformación en xilosa. Ambas fracciones son susceptibles de transformarse en etanol mediante el empleo de levaduras. Durante la estancia se trabajó con los licores generados en el pretratamiento del bagazo de la caña de azúcar. Sobre estos licores se realizaron experimentos preliminares de detoxificación y se estudió la cinética de la hidrólisis ácida de los mismos con el fin de hallar las condiciones óptimas de conversión de xilooligosacáridos a xilosa.

Se concluyó que el ácido fosfórico, a pesar de ser un ácido débil, es un buen catalizador para la reacción de hidrólisis de los xilooligosacáridos pudiéndose alcanzar conversiones prácticamente cuantitativas a temperaturas y concentraciones de ácido moderadas.

RESULTADOS NO DISPONIBLES PARA PUBLICACIÓN.

