

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

**“HIDRÓLISIS DE RESIDUOS DE LA  
VENTA DE VERDURAS Y HORTALIZAS  
PARA LA PRODUCCIÓN DE  
BIOETANOL”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**POR**

**ANA ISABEL DIAZ GONZÁLEZ**

**JULIO, 2015**



## ***Agradecimientos...***

*A la doctora Adriana Laca por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por la dedicación y las horas empleadas, por las ideas compartidas y sobre todo por la confianza depositada en mí.*

*A todo el personal del laboratorio, en especial a Jose Luis y Amanda, por ayudarme desinteresadamente en todo momento.*

*A mis compañeros de máster, sobre todo a LOS INCOMPRENDIDOS, por los buenos momentos compartidos a lo largo del curso, fuera y dentro de las aulas.*

*A María, por “arreglar el mundo” tomando un café, por esos largos días de laboratorio, por los buenos momentos y por ser, además de compañera, amiga.*

*A Sergio, por su apoyo incondicional tanto en lo académico como en terreno personal, por escucharme, animarme y brindarme su confianza cada día.*

*Y por supuesto a mi familia, que siempre han confiado en mí y me han apoyado, sacrificando su tiempo para que yo pudiera aprovechar el mío. En especial a mi hermano Juan, por aguantarme día a día, compartir mis inquietudes, confiar en mí y darme la fuerza necesaria para alcanzar cualquier meta.*

# ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT .....	II
LISTA DE FIGURAS .....	III
LISTA DE TABLAS .....	V
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	7
2.1- Bioetanol: .....	7
• 2.1.1- ¿Qué es el bioetanol? .....	7
• 2.1.2- Materias primas para la producción de bioetanol: .....	7
• 2.1.3- Fases de obtención: .....	11
• 2.1.4- Producción de biocombustibles en España .....	20
• 2.1.5- Aplicaciones del bioetanol: .....	22
2.2- Residuos agroindustriales.....	24
• 2.2.1- Problemática de los residuos .....	24
• 2.2.3- Alternativas.....	26
2.3- Producción de bioetanol de segunda generación. ....	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	31
3.1- Material de laboratorio:.....	31
• 3.1.1- Equipos:.....	31
• 3.1.2- Reactivos: .....	31
3.2- Residuos empleados.....	32
• 3.2.1- Material de partida .....	32
• 3.2.2- Preparación de materiales no sometidos a hidrólisis: .....	32

3.3- Pretratamientos de hidrólisis .....	33
• 3.3.1- Hidrólisis térmica.....	33
• 3.3.2- Hidrólisis ácida-térmica .....	35
• 3.3.3- Hidrólisis enzimática.....	37
• 3.3.4- Hidrólisis térmico-enzimática: .....	39
3.4- Métodos para la cuantificación de azúcares .....	39
• 3.4.1- Método Fenol-Sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales .....	40
• 3.4.2- Método ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) para la cuantificación azúcares reductores .....	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
4.1- Caracterización del material de partida .....	43
4.2- Hidrólisis ácida-térmica .....	46
4.3- Hidrólisis hidrotérmica.....	48
• 4.3.1- Tratamiento térmico A: .....	48
• 4.3.2- Tratamiento térmico B: .....	49
4.4- Hidrólisis enzimática.....	51
4.5- Hidrólisis térmico-enzimática.....	53
4.6- PRODUCCIÓN TEÓRICA DE BIOETANOL.....	55
6. CONCLUSIONES .....	59
7. BIBLIOGRAFÍA .....	61

# RESUMEN

---

Tanto los países desarrollados como aquellos que se encuentran aún en vías de desarrollo basan su economía y su bienestar en crecientes consumos de energía. Frente a este aumento de la demanda energética, nos encontramos por un lado con el previsible agotamiento a medio plazo de los combustibles fósiles, y por otro con impacto ambiental que generan, en especial su efecto invernadero. Por otra parte, las sociedades más desarrolladas producen grandes cantidades de residuos cuyo almacenamiento y posterior tratamiento supone grandes costes económicos y riesgos medioambientales.

Este proyecto forma parte de una línea de trabajo que busca alternativas que sean capaces de reducir ambos problemas. En este caso se propone el uso de residuos alimentarios para la producción de bioetanol, un combustible renovable. Para alcanzar este propósito los residuos deben de ser sometidos a un pretratamiento de hidrólisis con la finalidad de maximizar la producción del biocombustible. En este trabajo se han empleado residuos procedentes de la venta de verduras y hortalizas, en concreto pimientos, tomates y patatas, a los que se les han aplicado pretratamientos de hidrólisis ácida, térmica y enzimática con el fin de seleccionar el más adecuado. El objetivo es extraer la máxima cantidad posible de azúcares reductores que puedan ser fermentados en la etapa siguiente a la hidrólisis. Finalmente, a partir de los mejores resultados, se ha evaluado la producción de etanol a partir de estos residuos.

# ABSTRACT

---

Developed and developing countries base their economy and their wellness in increasing energy consumption. Along with this increasing energy demand, there is a foreseeable medium-term exhaustion of fossil fuels, and also the environmental impact generated, especially the greenhouse effect. In addition, the most developed societies generate large amounts of waste whose storage and subsequent treatment involve major economic costs and environmental risks.

This project is included in a researching line focused on alternatives that are able to reduce both problems. In this case, the use of food wastes for the production of bioethanol, a renewable fuel, is proposed. To achieve this purpose, the wastes must be treated by a hydrolysis process in order to achieve the maximum production of biofuel. In this work, wastes coming from the sale of vegetable were used, in particular; peppers, tomatoes and potatoes. Acid, thermal and enzymatic hydrolysis pretreatments were assessed with the aim of selecting that most suitable for these wastes. The objective is to extract the maximum amount of reducing sugars that can be fermented in the subsequent step. Finally, according with the best results, the production of ethanol from these wastes has been evaluated.

# LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Perspectivas de la demanda mundial de energía. Fuente: IDAE, 2011. ....	1
<b>Figura 2.</b> Clasificación de los carbohidratos. ....	8
<b>Figura 3.</b> Participación del grupo aldehído en disacáridos reductores y no reductores. (WEB.1) .....	9
<b>Figura 4.</b> Estructura de la celulosa. (WEB.2) .....	12
<b>Figura 5.</b> Ruptura de la matriz lignocelulósica. (WEB.3).....	14
<b>Figura 6.</b> Reacción de hidrólisis. Degradación un disacárido en monosacáridos susceptibles de ser fermentados.....	16
<b>Figura 7.</b> Reacción de fermentación de la glucosa .....	18
<b>Figura 8.</b> Proceso para la obtención del bioetanol (WEB.4) .....	20
<b>Figura 9.</b> Aporte de bioetanol por empresas frente a la producción total de bioetanol en España. ....	22
<b>Figura 10.</b> Ciclo del carbono en la producción de bioetanol (WEB.6).....	23
<b>Figura 11.</b> Batidora (Princess Royal Blender) empleada en la experimentación.....	33
<b>Figura 12.</b> Resultado de la fase de deshidratación a 55°C durante 24 horas en las muestras de pimiento verde.....	34
<b>Figura 13.</b> Resultado de la fase de triturado de patata después del secado .....	34
<b>Figura 14.</b> pH-metro (Crison Basic 20+) empleado en la experimentación .....	35
<b>Figura 15.</b> Pimiento y patata durante el proceso de deslignificación .....	36
<b>Figura 16.</b> Incubadora (New Brunswick C24KC Refrigerated Incubator Shaker) empleada durante el proceso de hidrólisis enzimática .....	38
<b>Figura 17.</b> Equipo de espectrofotometría (ThermoScientific Heλios γ) empleado en la experimentación.....	39
<b>Figura 18.</b> Recta de calibrado obtenida para el método fenol-sulfúrico. ....	40
<b>Figura 19.</b> Recta de calibrado obtenida para el método DNS .....	41
<b>Figura 20.</b> Azúcares totales y azúcares reductores obtenidos a partir de residuos tratados por hidrólisis ácida-térmica y a partir de los residuos sin tratar.....	47
<b>Figura 21.</b> Azúcares totales y azúcares reductores obtenidos a partir de residuos tratados por hidrólisis térmica a 110°C y a partir de los residuos sin tratar. ....	49
<b>Figura 22.</b> Azúcares totales y azúcares reductores obtenidos a partir de residuos tratados por hidrólisis térmica a 135°C y a partir de los residuos sin tratar. ....	51

<b>Figura 23.</b> Azúcares totales y azúcares reductores obtenidos a partir de residuos tratados por hidrólisis enzimática y a partir de los residuos sin tratar. ....	52
<b>Figura 24.</b> Azúcares totales y azúcares reductores obtenidos a partir de residuos tratados por hidrólisis térmico-enzimática y a partir de los residuos sin tratar .....	55
<b>Figura 25.</b> Reacción de fermentación alcohólica.....	55
<b>Figura 26.</b> Concentración de bioetanol frente a la demanda energética en el proceso de destilación.....	57

# LISTA DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Producción mundial de bioetanol en 2010.....	3
<b>Tabla 2.</b> Producción actual de bioetanol en España.....	21
<b>Tabla 3.</b> Residuos generados en función de la materia prima procesada.....	25
<b>Tabla 4.</b> Contenido en gramos de hidratos de carbono por cada 100 gramos de alimento.....	43
<b>Tabla 5.</b> Contenido de azúcares totales y reductores en los caldos obtenidos de la partida 1 de residuos (empleada en la hidrólisis ácida).....	44
<b>Tabla 6.</b> Contenido de azúcares totales y reductores en los caldos obtenidos de la partida 1 de residuos (empleada en la hidrólisis térmica a 110°C).....	44
<b>Tabla 7.</b> Contenido de azúcares totales y reductores en los caldos obtenidos de la partida 2 de residuos (empleada en la hidrólisis térmica a 135°C).....	44
<b>Tabla 8.</b> Contenido de azúcares totales y reductores en los caldos obtenidos de la partida 2 de residuos (empleada en la hidrólisis enzimática). ....	45
<b>Tabla 9.</b> Contenido de azúcares totales y reductores en los caldos obtenidos de la partida 2 de residuos (empleada en la hidrólisis térmico-enzimática).....	45
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la hidrólisis ácida con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5% durante 15 min a 125°C y 2 atm.....	46
<b>Tabla 11.</b> Resultados de la hidrólisis térmica a 110°C durante 5 minutos y 1,5 atm. ....	48
<b>Tabla 12.</b> Resultados de la hidrólisis térmica a 135°C durante 5 minutos y 3 atm.....	50
<b>Tabla 13.</b> Resultados de la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 75°C y tratamiento enzimático a 60°C durante 60 minutos. ....	51
<b>Tabla 14.</b> Resultados de la hidrólisis térmico- enzimática con pretratamiento a 135°C y tratamiento enzimático a 60°C durante 60 minutos. ....	53

# **INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

El uso de la energía para poder llevar a cabo las actividades cotidianas, hace que su consumo sea uno de los indicadores más fiables del grado de bienestar y desarrollo económico de una sociedad. La demanda energética crece constantemente, un 5% en 2010 y con tendencia a un tercio en 2035, básicamente en países que no pertenecen a la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE), según la Agencia Internacional de la Energía (AIE) (IDAE, 2011).

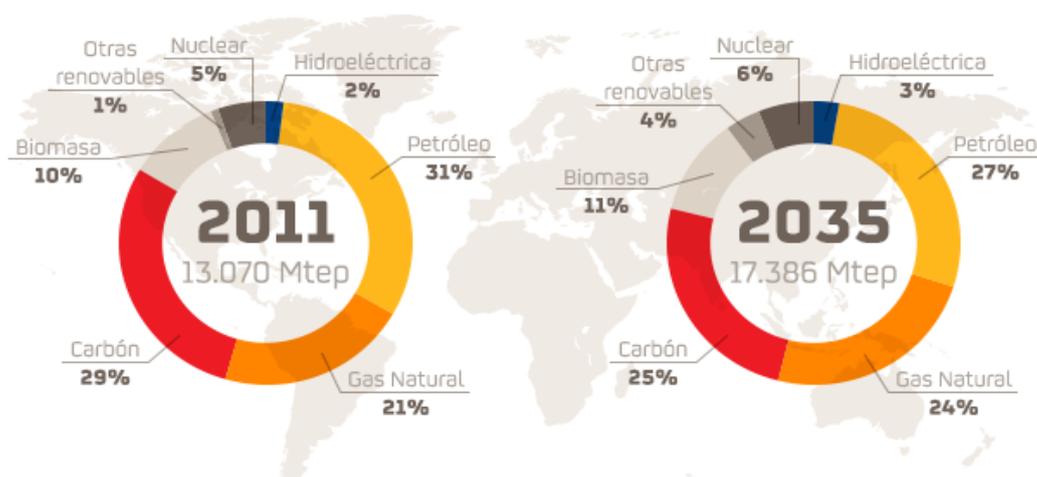


Figura 1. Perspectivas de la demanda mundial de energía. Fuente: IDAE, 2011.

Hoy en día, los combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural) constituyen aproximadamente el 80% de la energía primaria consumida en el mundo, de la cual el 58% corresponde exclusivamente al sector del transporte (Nigam et al., 2010). Esta gran dependencia con respecto al uso de los combustibles fósiles ha generado dos tipos de preocupaciones. Por un lado, la preocupación por el impacto ambiental y, en especial, sus efectos en el cambio climático, y por otro lado la limitación y el agotamiento de las reservas debido a un consumo acelerado (Salaet et Roca., 2010).

Los combustibles fósiles, son fuentes no renovables de energía, que se enfrentan a una demanda cada vez mayor. Según los expertos se alcanzará un “pico de producción de petróleo”, a partir del cual no se podrá hacer frente a la demanda por parte de los consumidores. A todo esto hay que añadir el hecho de que los yacimientos se

encuentran en zonas políticamente muy inestables (Sivakumar et al., 2010). Estos problemas se ven reflejados en el precio del combustible, que a pesar de pequeñas fluctuaciones, tiende a la alza.

Por otro lado, el empleo de combustibles fósiles como fuente de energía tiene un gran impacto ambiental. Las actividades que generan gases de efecto invernadero son diversas, aun así, la principal fuente de emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera está asociada a la quema de este tipo de combustibles (Salaet et Roca., 2010). En la Unión Europea (UE) el transporte es responsable del 21% de las emisiones de gases de efecto invernadero.

La obtención de nuevas fuentes de energía es por tanto, uno de los principales desafíos a los que el sector energético se enfrenta continuamente. Con el fin de hacer frente a estos problemas y ante el deseo por parte de muchos países de limitar su dependencia energética, se han desarrollado fuentes alternativas de energía, renovables y respetuosas con el medio ambiente, como los biocombustibles (Brunschwig et al., 2012).

La utilización de la energía procedente de recursos renovables constituye una parte muy importante en la estrategia de las políticas energéticas y medioambientales. Para la Unión Europea, que tiene una fuerte dependencia energética, es primordial aumentar el grado de autoabastecimiento energético, lo cual sólo es posible con la implantación progresiva de este tipo de energías. Para España, con una dependencia aún mayor, resulta todavía más importante avanzar en este campo.

El marco legal entorno a los biocombustibles, también es protagonista del impulso de estas nuevas tecnologías. El Parlamento Europeo y el Consejo pretenden, mediante la Directiva Europea 2009/28/CE, establecer un marco común relativo a la producción y el fomento de la energía procedente de las fuentes renovables. Uno de los objetivos es que cada estado miembro logre que la cuota de energía procedente de las fuentes renovables en todos los tipos de transporte en 2020 sea como mínimo equivalente al 10% del consumo final de energía en el transporte.

El término biocombustible hace referencia a combustibles sólidos, líquidos o gaseosos que se producen a partir de fuentes renovables. Incluyen el bioetanol, el

biobutanol, el biodiésel, los aceites vegetales, el biometanol, los aceites de pirólisis, el biogás, y el biohidrógeno (Dermirbas, 2009). Dentro de los biocombustibles, el bioetanol y el biodiésel, han adquirido gran importancia y aplicabilidad, siendo sustitutos directos e inmediatos para el gasóleo y la gasolina, respectivamente.

Al igual que el biodiésel, el bioetanol ha sido catalogado por algunos autores, como uno de los biocombustibles más respetuosos con el medio ambiente, defendiendo que el balance de emisiones de CO<sub>2</sub> es cero, ya que, la combustión del bioetanol produce una cantidad de CO<sub>2</sub> igual a la que absorbió la biomasa durante su crecimiento (García-Camús., 2006). Los beneficios medioambientales asociados al uso de bioetanol, han sido documentados y demostrados por entidades reconocidas a nivel mundial, como son el Panel Internacional contra el Cambio Climático (IPCC) de la ONU, la Agencia Internacional de la Energía (AIE) o la misma Comisión Europea. Su uso, promueve el avance tecnológico, la innovación y nuevas oportunidades de empleo y mejora regional, especialmente en zonas rurales y aisladas (Nigam et al., 2010).

La producción mundial de bioetanol ha crecido notablemente en la última década. EEUU, Brasil y la UE conjuntamente, representan el 90% de la producción y del consumo mundial.

Tabla 1. Producción mundial de bioetanol en 2010. Adaptada de IDAE, 2011.

<b>Año 2010</b>	<b>Producción de Bioetanol (en miles de m<sup>3</sup>)</b>
Estados Unidos	49.100
Brasil	26.200
Unión Europea	4.445
China	2.050
Canadá	1.350
Tailandia	410
Colombia	394
Otros	1.675
<b>Total</b>	<b>85.634</b>

En España, el consumo de bioetanol en 2009 alcanzó los 300.000 m<sup>3</sup>, llegó a su punto álgido en 2010 con 468.00 m<sup>3</sup> y comenzó a declinar en 2012 con 395.615 m<sup>3</sup>. En 2013, esa tendencia se ha consolidado con 334.000 m<sup>3</sup>, lo que supone un 15,61% menos que en 2012. Aun así, la importante disminución de la demanda de biodiesel hizo que la participación del bioetanol en el mercado español de biocarburantes se situara en 2013 en el 24,8%, casi el doble de la alcanzada el año anterior (APPA, 2013).

A pesar de ser una tecnología impulsada, sostenible y con positivas consecuencias medioambientales, la producción de bioetanol no está exenta de polémicas. El inconveniente surge cuando su obtención a partir de materias primas como la caña de azúcar o el maíz, pone en peligro la utilización de estos cultivos como alimento. La posibilidad de utilizar estos recursos tanto para alimentación como para la producción de biocombustibles ha generado, entre otras cosas, mayores ingresos para los productores que han encarecido los precios.

En este mismo año, la UE ha establecido una nueva ley que limita el empleo de plantas y semillas para la producción de biocombustibles con el objetivo de liberar las tierras de cultivo para alimentos y recortar las emisiones de gases de efecto invernadero causadas por el aumento del uso de tierra para producir biocombustibles. Esta nueva ley establece que los carburantes obtenidos a partir de cultivos agrícolas no deberían sumar más del 7% del consumo energético del transporte en 2020. En un plazo máximo de 18 meses tras la entrada en vigor de la directiva, los estados miembros tendrán que fijar un objetivo nacional al respecto.

Considerando los beneficios de los biocombustibles frente a los combustibles fósiles, los conflictos a raíz de la materia prima empleada para su obtención y en vista a la nueva legislación europea, se ha planteado el siguiente proyecto, donde se investiga el uso de residuos de venta de verduras y hortalizas como materia prima alternativa para la producción de bioetanol.

De este modo, obtendríamos un biocombustible con potencial para contribuir a la sustitución de los combustibles fósiles sin afectar a las reservas de alimentos, con un balance positivo de energía y un impacto ambiental mínimo, tres características necesarias y deseables para el desarrollo de los biocombustibles (Johnson et al., 2007).

Además, permitiría la revalorización de estos residuos, reduciendo la cantidad depositada en vertedero o destinada a incineración.

La producción de bioetanol a partir de residuos de verduras y hortalizas implica el desarrollo de tres etapas fundamentales; el pretratamiento de los residuos, el proceso fermentativo y la destilación. Este proyecto se centra en la primera etapa de pretratamiento, en concreto en el desarrollo y aplicación de procesos de hidrólisis necesarios en el caso de sustratos que contengan carbohidratos no fermentables de manera directa. Los residuos empleados para llevar a cabo la experimentación han sido tomates, pimientos y patatas, seleccionados en base al volumen de los mismos que se convierten en residuo.

Los objetivos concretos del proyecto se resumen a continuación:

1. Ensayar diversos pretratamientos de hidrólisis para los residuos considerados y analizar los resultados obtenidos.
2. Seleccionar el mejor pretratamiento para los residuos de verduras y hortalizas mezclados.
3. Evaluar la utilización de estos residuos para la producción de bioetanol.

# **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

## 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

---

### 2.1- Bioetanol:

#### ✚ 2.1.1- ¿Qué es el bioetanol?

El bioetanol se define como el etanol generado a partir de la fermentación de los azúcares presentes en la biomasa o en la fracción biodegradable de los residuos, no pudiendo obtenerse a partir del petróleo (Nigam et al., 2010). Es un compuesto volátil, inflamable, que en condiciones ambientales se encuentra en estado líquido, incoloro, miscible en agua y en solventes no polares.

#### ✚ 2.1.2- Materias primas para la producción de bioetanol:

Cualquier material que contenga hidratos de carbono fermentables, puede servir como materia prima para la obtención de bioetanol.

Los hidratos de carbono, también denominados glúcidos, azúcares o carbohidratos, son moléculas orgánicas ternarias formadas por carbono, hidrógeno y oxígeno, en una proporción aproximada de  $C_nH_{2n}O_n$ , cuya misión principal es la de aportar energía al organismo para que pueda desarrollar de forma adecuada todas sus funciones. Se encuentran en productos vegetales (cereales y derivados, legumbres, tubérculos, frutas, verduras) y animales (leche, carne e hígado).

Atendiendo al número de moléculas que los constituyen, los hidratos de carbono pueden clasificarse en monosacáridos (formados por una única molécula), oligosacáridos (formados por la unión entre 2 y 10 monosacáridos) y polisacáridos (formados por la unión de más de 10 monosacáridos). Los monosacáridos a su vez, también se clasifican en dos grandes grupos dependiendo de la posición del grupo funcional o carbonilo ( $C=O$ ) que los caracteriza. Si el grupo carbonilo está localizado en un carbono terminal se trata de polihidroxialdehídos y si éste grupo está localizado sobre un carbono secundario se trata de polihidroxicetonas.

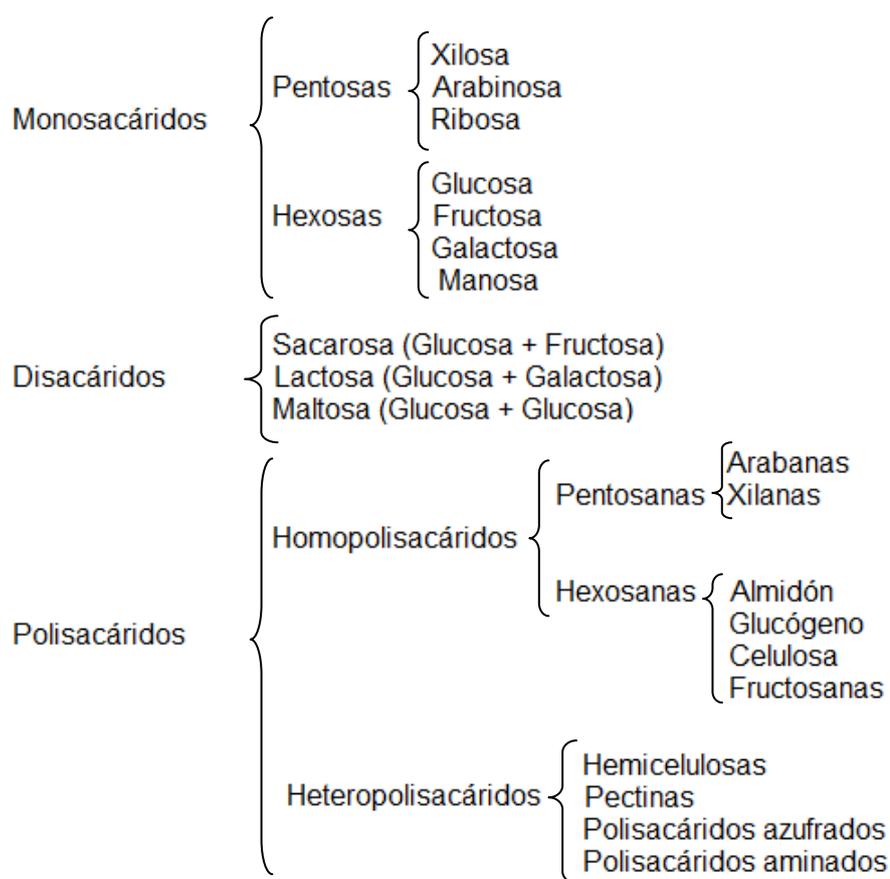


Figura 2. Clasificación de los carbohidratos.

La Figura 2 recoge una clasificación de los diferentes tipos de carbohidratos. Para que resulten directamente fermentables deben de poseer un carácter reductor. Los azúcares reductores son aquellos cuyo grupo funcional no está involucrado en la unión de dos monosacáridos y por tanto conservan el carácter reductor de la molécula.

Los monosacáridos y los disacáridos, a excepción de la sacarosa, poseen su grupo carbonilo intacto y a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas en procesos de fermentación. Los polisacáridos como el almidón, la celulosa y la hemicelulosa, tienen el grupo carbonilo involucrado en el enlace de los distintos monosacáridos para la formación de la molécula y por tanto pierden el carácter reductor.

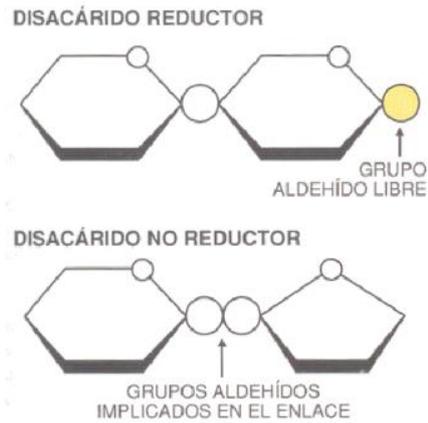


Figura 3. Participación del grupo aldehído en disacáridos reductores y no reductores. (WEB.1)

De acuerdo a su composición, la materia prima puede clasificarse en tres grupos:

- a) **Material azucarado:** Ricos en azúcares fermentables directamente, como la remolacha, la caña de azúcar, el sorgo azucarado, mostos y jugos de frutas.
- b) **Material amiláceo:** Ricos en almidón, no fermentable directamente y que por tanto requieren un tratamiento previo de hidrólisis, tales como cereales (maíz, trigo, cebada, avena, centeno, etc.) y tubérculos (patatas y boniatos).
- c) **Material lignocelulósico:** Ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina, no fermentables directamente y que por tanto requieren un tratamiento previo de hidrólisis. Forman parte de este grupo los residuos agrícolas, los restos de poda, papel, tableros, hojas etc.

Los azúcares extraídos de la materia azucarada son directamente accesibles por la fermentación alcohólica. Sin embargo, la materia amilácea y lignocelulósica debe someterse previamente a una hidrólisis que degrade el almidón, la celulosa y la hemicelulosa en azúcares directamente asimilables.

Los materiales azucarados y amiláceos, son los más empleados actualmente y de los que se posee un mayor conocimiento a nivel industrial. El empleo de material lignocelulósico, está aún en fase de desarrollo, considerándose una buena alternativa debido a la facilidad y bajo coste con la que puede obtenerse el material de partida, ya sea de residuos agrícolas, forestales o industriales.

La necesidad de encontrar nuevas fuentes para la producción de bioetanol ha hecho que durante la última década en Europa, se haya despertado el interés por el empleo de lactosuero u otros residuos alimentarios como materia prima. Estas materias, son desechos con muy bajo o nulo valor económico que se generan en grandes cantidades ocasionando problemas de gestión y contaminación ambientales. La puesta a punto de métodos que permitan su valorización produciendo biocombustibles ha dado lugar a numerosos trabajos de investigación como los desarrollados por Aimarretti et al., (2012.a) y Gupta et al., (2015), empleando en ambos casos residuos agroindustriales, y los llevados a cabo por Fonseca et al., (2010) y por Hafid et al., (2015); a partir de residuos vegetales procedentes de una central de abastos y de desechos orgánicos procedentes de cocinas, respectivamente.

En función de la materia prima seleccionada, el bioetanol obtenido se clasifica en dos grupos:

- **Bioetanol de primera generación (bioetanol 1G):** la fuente de azúcares proviene de biomasa con valor alimenticio, principalmente materiales azucarados y amiláceos, como la caña de azúcar y el maíz.
- **Bioetanol de segunda generación (bioetanol 2G):** las fuentes de azúcares fermentables son materiales que no compiten en la generación de alimentos con alta disponibilidad y escaso coste, principalmente de tipo lignocelulósico.

La selección de la materia prima más apropiada para la producción de bioetanol, depende fuertemente de las condiciones locales. América del Norte y los países de Europa, principales productores, basan la industria del bioetanol en materiales amiláceos debido a que sus condiciones agroindustriales no son adecuadas para el cultivo de caña de azúcar (Aimaretti et al., 2012.a). Por el contrario, Brasil, emplea la caña de azúcar principalmente como materia prima y como consecuencia, a nivel global, la producción de bioetanol de primera generación es muy superior.

Sin embargo, la viabilidad de la producción de bioetanol de primera generación es cuestionable. La creciente demanda de productos básicos agrícolas para la producción de biocombustibles está teniendo importantes repercusiones, tanto a nivel

económico en los mercados agrícolas, encareciendo el precio de los productos, como a nivel social aumentando las preocupaciones acerca del efecto negativo para la seguridad alimentaria de millones de personas en todo el mundo. Los precios mundiales del bioetanol aumentaron más del 30% en 2010 debido al encarecimiento de las materias primas, sobre todo el azúcar y el maíz (OCDE-FAO, 2011).

Por este motivo, la producción de bioetanol de segunda generación a partir de materiales lignocelulósicos o de residuos está siendo profundamente estudiada. Su producción requiere de un pretratamiento de la materia prima, ya que se tratan de materiales de partida con altas cantidades de azúcares no fermentables directamente, lo que va a encarecer el proceso, compensado por el escaso o nulo coste de la materia prima inicial (Nigam et al., 2010).

### 2.1.3- Fases de obtención:

El proceso para la obtención de bioetanol consta de varias fases: pretratamiento, hidrólisis, fermentación, destilación y deshidratación.

#### ***I. Pretratamiento:***

En función del material de partida, es necesario un acondicionamiento previo que facilite los procesos posteriores y que elimine cualquier sustancia que pueda interferir con los mismos. Todo pretratamiento debe cumplir una serie de requisitos (Barroso., 2010):

1. Aumentar el área superficial del material.
2. Evitar la degradación de los carbohidratos.
3. Evitar la formación de subproductos inhibidores de la hidrólisis y de la fermentación.
4. Disminuir la cristalinidad de la celulosa y disociar el complejo lignina-celulosa.
5. Bajo consumo energético.
6. Reactivos baratos y a ser posible recuperables.
7. Aplicable a diversos sustratos.

Los materiales azucarados prácticamente no necesitan pretratamiento debido a su alto contenido inicial en azúcares directamente fermentables. Un lavado que elimine el polvo y los restos de suciedad adheridos a su superficie es suficiente. Posteriormente se prensan, troceándose en algunos casos para facilitar el prensado. El jugo obtenido pasa directamente a la fase de fermentación. Sin embargo, para los materiales amiláceos y lignocelulósicos que poseen entre un 20-50% de azúcares no fermentables directamente (celulosa, hemicelulosa y almidón), el pretratamiento se convierte en una fase crítica para que el proceso sea rentable permitiendo que la hidrólisis posterior tenga rendimientos mayores.

La celulosa es un polisacárido formado por la unión de monómeros D-glucosa mediante enlaces  $\beta$ -(1,4)-glucosídicos. Las cadenas lineales de celulosa se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno formando una estructura cristalina resistente e insoluble (Haghighi et al., 2013). La estructura de la celulosa no es el único factor que limita su accesibilidad ya que otros componentes íntimamente vinculados a la celulosa en el vegetal, como son la lignina y las hemicelulosas, también juegan un importante papel.

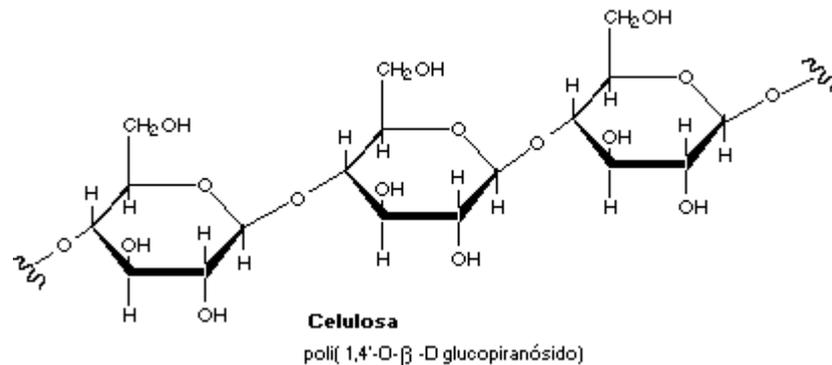


Figura 4. Estructura de la celulosa. (WEB.2)

La hemicelulosa, es un polisacárido formado principalmente por pentosas como D-xilosa y L-arabinosa y por hexosas como D-glucosa, D-manosa y D-galactosa, y que además contiene pequeñas cantidades de ácidos orgánicos. Está presente en la pared celular de las plantas y en ella actúa como puente de unión entre la lignina y los polisacáridos formando un gel acuoso en el cual están embebidas las fibras de celulosa. Este polímero no es cristalino y es fácilmente hidrolizado (Cunningham et al., 1994).

La lignina por su parte es un polímero no carbohidrato que se entremezcla con la celulosa y la hemicelulosa y es responsable de la rigidez de los materiales lignocelulósicos. Tiene que retirarse mediante el pretratamiento para romper la matriz lignocelulósica y que la celulosa y la hemicelulosa queden libres para ser hidrolizadas.

Por otro lado, el almidón, mayoritario en los materiales amiláceos, es un polímero formado por amilosa y amilopectina, dos polisacáridos muy similares constituidos por glucosa y que solo difieren en el enlace de unión entre las moléculas. La amilosa es un polímero esencialmente lineal formado por un promedio de 500 a 600 unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4); la amilopectina sin embargo, contiene ramificaciones unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,6) y constituye el 75% de los almidones (Torres, 2007). Estas estructuras también han de romperse mediante el pretratamiento adecuado para que la fase de hidrólisis sea efectiva.

Los pretratamientos no son excluyentes y pueden combinarse entre sí. Se clasifican según sean tratamientos físicos, térmicos, químicos o biológicos. A continuación se detallan algunos de los pretratamientos más empleados actualmente:

#### **a) Físicos:**

- **Secado del material:** Se realiza un secado previo del material hasta una pérdida aproximada del 80% de su contenido en agua, con la finalidad de facilitar la molienda posterior. Ambos pretratamientos van siempre unidos.

- **Molienda:** Su finalidad es reducir la cristalinidad de la celulosa, aumentar la superficie específica y la densidad aparente, y facilitar la hidrólisis posterior (Haghighi et al., 2013). Existen diferentes tipos de molinos (molino de bolas, martillos, cuchillas, rodillos). Se recomienda un tamaño de partícula de no superior a 2 mm. El principal inconveniente de este pretratamiento es que requiere de un elevado consumo energético.

- **Extrusión:** La biomasa se calienta, se mezcla y se corta produciéndose cambios físicos y químicos en el material durante el paso por la extrusora. La velocidad del tornillo y la temperatura de la extrusora rompen la estructura del material lignocelulósico.

## b) Térmicos:

- **Explosión por vapor:** El material de partida se somete a rangos de temperatura entre 160-260°C, inyectándose directamente vapor saturado, en breves intervalos de tiempo (1-10 minutos) y a altas presiones. A continuación se produce una rápida descompresión hasta presión atmosférica. El resultado es una biomasa alterada física y químicamente. Las variables a controlar en este tipo de procedimiento son la temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula, y la humedad (Sánchez et al, 2010). Esta técnica es la empleada a día de hoy por Abengoa, empresa dedicada a la producción de bioetanol. En este proceso logra separar la lignina y romper la estructura del material para aumentar la accesibilidad de los sustratos empleados en la hidrólisis posterior.

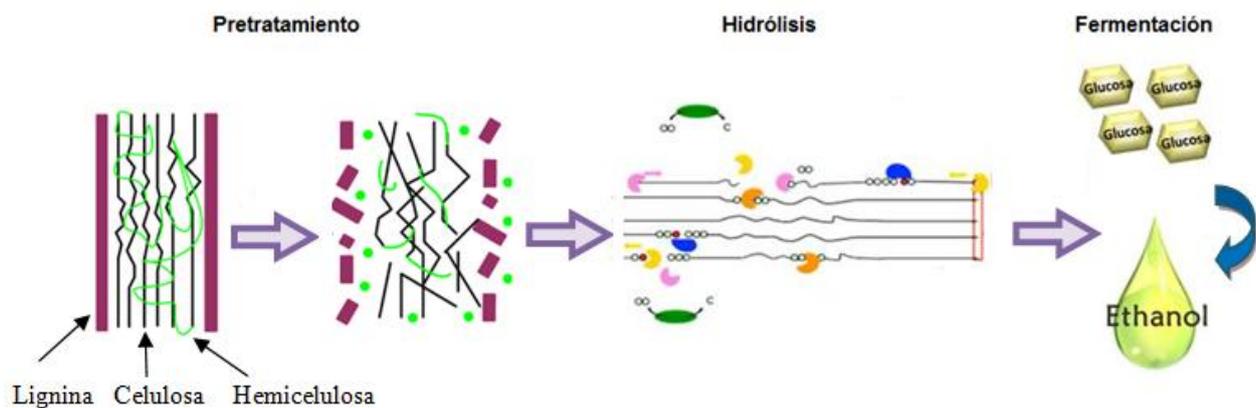


Figura 5. Ruptura de la matriz lignocelulósica. (WEB.3)

- **Agua caliente líquida:** Puede considerarse una hidrólisis térmica, ya que al producirse a altas temperaturas (110-200°C) y altas presiones no sólo se rompe la estructura del material sino que comienza la descomposición de los polisacáridos en los monosacáridos correspondientes. Si bien, suele emplearse combinada con una hidrólisis posterior normalmente de carácter enzimático.

## c) Químicos:

- **Oxidación húmeda:** Un pretratamiento oxidativo consiste en la adición de un compuesto oxidante, como el oxígeno o el peróxido de hidrógeno a la biomasa, que está

sumergida en el agua y sometida a alta presión y temperatura. Durante el pretratamiento oxidativo pueden tener lugar reacciones como sustitución o ruptura de los enlaces estructurales. La oxidación húmeda fracciona el material inicial en una fracción sólida rica en celulosa y otra fracción líquida rica en azúcares hemicelulósicos, presentando bajas concentraciones de compuestos inhibidores. La celulosa obtenida presenta un alto grado de desestructuración, lo cual conduce a altos rendimientos de hidrólisis enzimática (Pérez, 2008).

- **Ozonólisis:** El ozono ha sido utilizado para degradar la lignina y la hemicelulosa. Se lleva a cabo bajo condiciones de presión y temperatura ambientales. A diferencia de otros pretratamientos no genera subproductos tóxicos y puede eliminarse fácilmente lo que significa que los procesos pueden ser diseñados para reducir al mínimo la contaminación del medio ambiente. Un inconveniente de la ozonólisis es que se requiere una gran cantidad de ozono que puede hacer el proceso caro y menos aplicable (Xu et al., 2014).

- **Líquidos iónicos:** Se emplean como disolventes. Estos líquidos están normalmente compuestos por cationes orgánicos y aniones inorgánicos, los cuales existen en estado líquido a relativamente bajas temperaturas. Se forman enlaces de hidrógeno entre los líquidos iónicos y los azúcares desencadenando la ruptura de la estructura de celulosa, hemicelulosa y lignina (Haghighi et al., 2013).

- **Empleo de álcalis y sulfato cálcico:** Se emplea para separar la lignina y romper los puentes de hemicelulosa.

#### **d) Biológicos:**

Este tipo de pretratamientos se emplean principalmente para degradar la lignina y se basan en el empleo de enzimas. No son rentables económicamente ya que son procesos lentos y menos efectivos que los anteriores.

## II. Hidrólisis:

Es la fase complementaria al pretratamiento e imprescindible para materiales lignocelulósicos y amiláceos. La hidrólisis se efectúa por vía hidrotérmica, ácida, básica o enzimática y su objetivo es la degradación de los carbohidratos complejos para dar lugar a otros azúcares simples que sufrirán la fermentación alcohólica (Damien., 2010). La hidrólisis completa del polisacárido celulosa da exclusivamente el monómero D-glucosa, al igual que la hidrólisis del almidón mientras que a partir de las hemicelulosas se obtienen un conjunto de pentosas y hexosas, como manosa, glucosa, xilosa, etc (Dagnino., 2012).

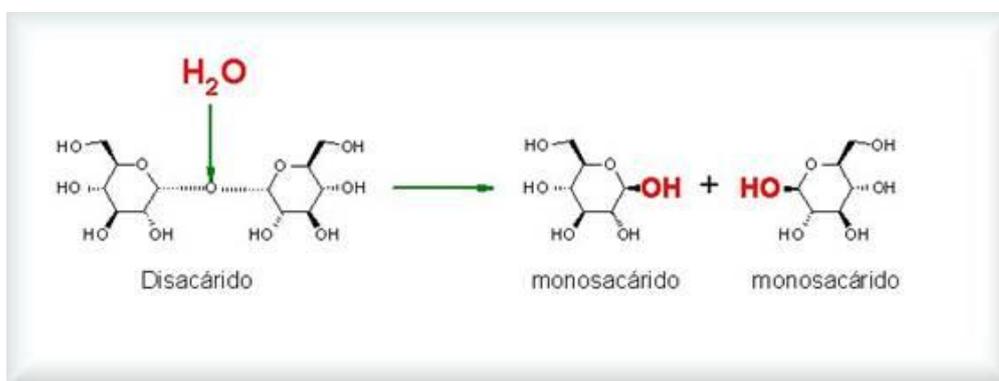


Figura 6. Reacción de hidrólisis. Degradación un disacárido en monosacáridos susceptibles de ser fermentados.

### a) Hidrólisis ácida:

Se emplean diferentes clases de ácidos; sulfuroso, fosfórico, nítrico, fórmico, clorhídrico y sulfúrico, siendo estos dos últimos los más empleados a nivel industrial. Este tipo de hidrólisis puede llevarse a cabo empleando los ácidos concentrados y trabajando a bajas temperaturas, o bien, empleando ácidos diluidos como por ejemplo  $H_2SO_4$  al 5%, a mayores temperaturas y menores tiempos de reacción. Son muchos los autores que emplean este tipo de hidrólisis para la producción de bioetanol variando entre ellos la concentración del ácido, la relación peso/volumen con el material de partida y los tiempos de reacción (Sánchez et al., 2010).

El principal inconveniente en este tipo de hidrólisis es la formación de subproductos como el hidroximetilfurfural (HMF) o el furfural, resultado de una degradación excesiva de los azúcares y que inhiben los procesos de fermentación y la actividad enzimática (Da Silva et al., 2015).

#### **b) Hidrólisis básica o alcalina:**

Consiste en el tratamiento del material con una base a una temperatura elevada. Entre las bases utilizadas en este tipo de pretratamiento están los hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio. La base más empleada es el NaOH, que provoca un hinchamiento del material, aumentando la superficie interna y accediendo a la celulosa. Además de romper la lignina aún presente, continua la degradación rompiendo los polisacáridos. Se emplea sobre todo en materiales lignocelulósicos.

#### **c) Hidrólisis enzimática:**

Se fundamenta en el uso de enzimas que degraden los polisacáridos presentes en la materia prima. Se utilizan celulasas para la degradación de la celulosa y amiloglucosidasas y amilasas de forma conjunta para la degradación del almidón. La hidrólisis enzimática presenta ventajas frente a la hidrólisis química y alcalina, como menores costes de equipamiento, mayores rendimientos y la ausencia de agentes químicos. Si bien, el precio de las enzimas es elevado y los resultados tienen que valorarse para que a nivel industrial su uso sea rentable (García-Camús et al., 2006).

#### **d) Hidrólisis hidrotérmica:**

En este caso, el material de partida se mezcla con agua y se somete a altas temperaturas y presiones. Los resultados de la degradación varían en función de la proporción masa/volumen empleada. Este tratamiento no suele emplearse de forma aislada en la industria sino que se emplea, a pesar de ser un tipo de hidrólisis, como pretratamiento ante una hidrólisis posterior, normalmente enzimática.

Es un modelo de hidrólisis con grandes ventajas ya que al no contener ácidos ni bases se generan cantidades muy bajas o nulas de subproductos inhibidores o de

precipitados de lignina. Sin embargo, el empleo de altas presiones y temperaturas hace que este tipo de procesos sean caros desde el punto de vista industrial.

Dada la importancia del pretratamiento y de la hidrólisis para la obtención de bioetanol, y la variedad en la composición de la materia prima utilizada, este proyecto se ha centrado en ensayar distintos procesos con la finalidad de encontrar aquel que permita obtener una mayor concentración de azúcares reductores antes de la fermentación para el caso de los residuos de la venta de hortalizas.

### **III. Fermentación**

El tercer paso para la producción de bioetanol es la fermentación de las hexosas y las pentosas obtenidas tras el proceso de hidrólisis. Fermentación es un término general que indica la degradación aeróbica o anaeróbica de un sustrato orgánico a diversos productos, por la acción de levaduras ó bacterias que producen enzimas para realizar dicha función y obtener energía en forma de ATP (Garzón et al., 2009).

Para la producción de bioetanol se lleva a cabo una fermentación alcohólica, proceso anaeróbico exotérmico que libera moléculas de ATP, necesarias para el metabolismo de las levaduras. Debido a que el proceso es anaeróbico, la respiración celular de la cadena del ADP en ATP queda completamente bloqueada, siendo la única fuente de energía para las levaduras la oxidación de la glucosa. El balance energético global es la degradación de la glucosa para generar etanol y CO<sub>2</sub>:



Figura 7. Reacción de fermentación de la glucosa

La ruptura de la celulosa y de la hemicelulosa que proviene de los materiales lignocelulósicos tiene como resultado hexosas y pentosas, mientras que la ruptura del almidón genera exclusivamente hexosas. Los microorganismos más empleados son levaduras, principalmente del género *Saccharomyces*, siendo la más empleada *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, este tipo de levaduras solamente fermentan hexosas y no degradan las pentosas. Para solucionar este problema, la industria se está planteando el uso de otras bacterias como *Zymomona mobilis* (Garzón et al., 2009). Un

ejemplo es el estudio llevado a cabo por Montañez et al., (2011) que publicó los resultados obtenidos en la formación de bioetanol a partir del *Agave Tequilana* empleando *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomona mobilis*. Llegaron a la conclusión de que la segunda bacteria degradaba una mayor cantidad de azúcares reductores y por lo tanto producía una mayor cantidad de bioetanol. A pesar de que son varios los autores que afirman el incremento en la producción de bioetanol, el uso de *Zymomona mobilis* en la industria es minoritario.

#### **IV. Destilación y deshidratación**

El bioetanol resultante de la fermentación está mezclado con grandes cantidades de agua, que se separa mediante un proceso de destilación. La clave de este proceso es la diferencia en el punto de ebullición de los componentes de la mezcla. El etanol tiene un punto de ebullición menor que el agua, 78.3°C y 100°C respectivamente, es por ello que se evapora antes pudiendo separarse por destilación (García-Camús et al., 2006). Sin embargo, no es posible obtener etanol absoluto mediante esta técnica ya que el etanol forma un azeótropo con el agua. Esto hace necesario un proceso posterior de deshidratación que permita obtener etanol de alta pureza (Pedraza., 2012).

Esta última fase de obtención de bioetanol anhidro, puede llevarse a cabo mediante distintos métodos entre los que destacan la destilación azeotrópica y la adsorción sobre tamices moleculares. En la destilación azeotrópica, se añade un tercer componente que modifica los coeficientes de actividad de los compuestos en la dirección oportuna y hace posible separar el azeótropo. La adsorción sobre tamices moleculares basa su fundamento en la diferencia de afinidad de las moléculas del etanol y del agua con respecto al adsorbente y al tamaño de las mismas, el agua queda atrapada en el lecho mientras el etanol pasa a través del mismo aumentando su concentración en la corriente de salida del equipo. Es un método con bajo coste y muy utilizado (Pedraza., 2012).

En la página siguiente se muestra una figura que resume las distintas etapas de procesado de las materias primas para la producción de bioetanol:

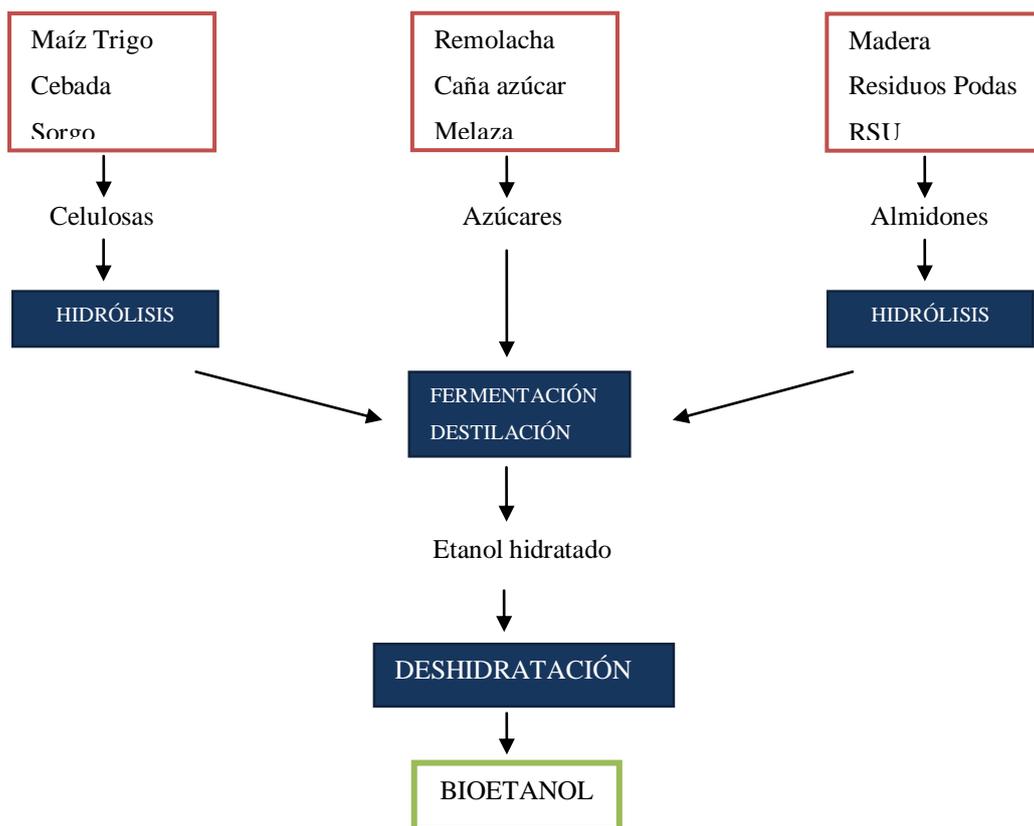


Figura 8. Proceso para la obtención del bioetanol (WEB.4)

#### 🚦 2.1.4- Producción de biocombustibles en España

España es un país líder en la producción de bioetanol dentro de la Unión Europea, con una producción aproximada de 570 millones de litros anuales. La principal empresa productora es Abengoa, que ha creado la sociedad Abengoa Bioenergía para operar y desarrollar el negocio de biocarburantes a escala internacional.

En España, Abengoa cuenta con tres plantas de producción: Ecocarburantes Españoles, en Cartagena (Murcia), Bioetanol Galicia en Teixeiro (La Coruña), y Biocarburantes Castilla y León en Babilafuente (Salamanca) que tienen una capacidad total instalada de 150, 196 y 200 millones de litros anuales, respectivamente. Todas ellas emplean como materia prima cereales y producen, además de bioetanol de primera generación, materiales proteicos para alimentación animal (DGS) en cantidades de 110.000, 130.000 y 120.000 toneladas anuales que comercializan como piensos (Martínez-Alcalá., 2012). Existe una cuarta planta integrada en la planta de

Biocarburantes Castilla y León que produce bioetanol de segunda generación a partir de material lignocelulósico, concretamente de pajas de cereal siendo la primera planta en el mundo que opera con la tecnología de hidrólisis enzimática a este nivel de producción. El etanol producido se destila hasta el 42% y posteriormente es concentrado y deshidratado. La operación en esta planta tiene como finalidad mejorar el diseño de las plantas a escala comercial que se construirán en los próximos años, evaluar los costes de operación, identificar cuellos de botella y optimizar su operación.

En Alcázar de San Juan (Ciudad Real) se sitúa la quinta planta de producción de bioetanol Bioetanol de la Mancha, perteneciente a la empresa Acciona Energía y con una producción de 26 millones de litros anuales empleando como materia prima alcoholes brutos procedentes de la subasta de alcoholes de origen vínico.

A día de hoy, están en construcción otras tres plantas en Badajoz, Zamora y Cantabria con una capacidad de 110, 145 y 126 millones de litros anuales respectivamente. Además se han lanzado tres nuevos proyectos en Ciudad Real, Vizcaya y Burgos, que en conjunto con todas las plantas anteriores alcanzaría una producción total aproximada de 1.360 millones de litros anuales (Web.5).

En el Tabla 2 se muestra un resumen de las plantas que actualmente están en funcionamiento y la producción anual de cada una de ellas. Todas generan bioetanol de primera generación, salvo la planta de Biomasa que como muestra la Figura 9, únicamente contribuye en un 1% a la producción total.

Tabla 2. Producción actual de bioetanol en España

Planta de Bioetanol	Millones de litros/año
Ecocarburantes Españoles	150
Bioetanol Galicia	196
Biocarburantes Castilla y León	200
Planta de Biomasa	5
Bioetanol de la Mancha	26
TOTAL	577

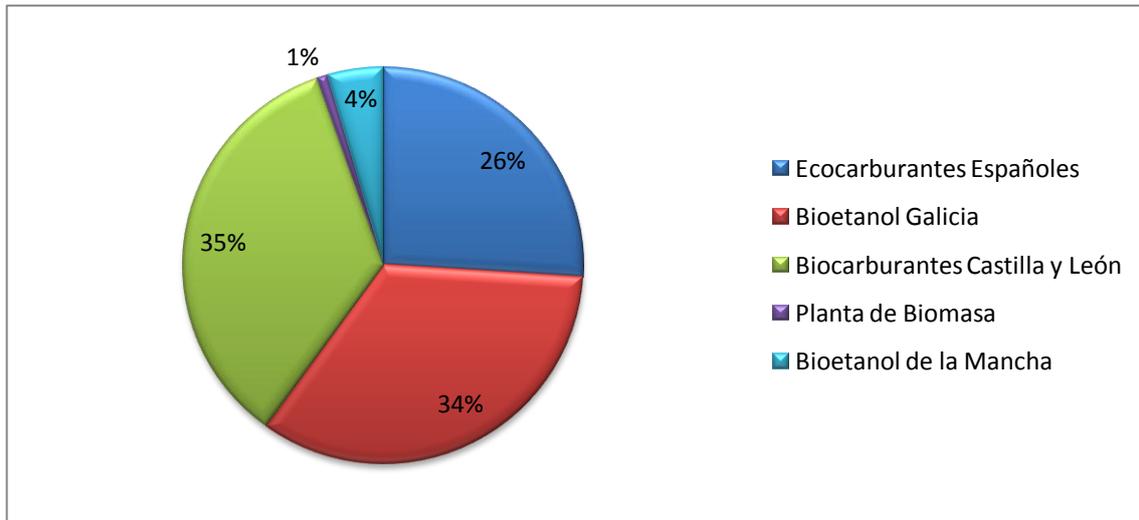


Figura 9. Aporte de bioetanol por empresas frente a la producción total de bioetanol en España.

#### 🚦 2.1.5- Aplicaciones del bioetanol:

El bioetanol se puede emplear como ingrediente en alimentación, excipiente de medicamentos y cosméticos, disolvente, desinfectante, antiséptico, componente de pinturas y perfumes. Sin embargo su principal aplicación reside en su uso como carburante de automoción.

El uso de etanol como combustible ha pasado por varias etapas a través de los años. En los orígenes de la industria automovilística fue el principal combustible. En 1876 se diseñaron los motores de ciclo Otto, capaces de utilizar el etanol mezclado con gasolina para su funcionamiento, no obstante, no fue hasta 1906 cuando Henry Ford empleó el etanol para mover sus famosos Modelos T. Sin embargo, el desarrollo de la industria basada en el petróleo, junto con la abundancia y el bajo precio de este combustible en la época, hizo que los fabricantes consideraran el etanol como segunda opción.

Cuando se temió por la estabilidad de estos mercados en los años 20 y tras el embargo petrolífero del año 1973, se volvió a invertir en el desarrollo de etanol. Brasil inició un programa en 1975, denominado PROALCOOL, cuya finalidad era reducir su dependencia de los recursos fósiles, aumentando la producción de alcohol producido a

partir de caña de azúcar (Martínez-Alcalá., 2012). Poco después, EEUU desarrolló también programas para producir etanol, fundamentalmente a partir de maíz, y hoy en día son los dos países que más producen y exportan este alcohol.

En 1979, Brasil diseñó los primeros coches capaces de funcionar con alcohol hidratado, 95% de etanol y 5% de agua. Más tarde se diseñaron vehículos impulsados exclusivamente por etanol (García-Camús et al., 2006). A día de hoy, se usa en mezclas con la gasolina en concentraciones del 5, 10, 15 y 85%, denominándose E5, E10, E15 y E85, respectivamente. A partir de los años 80, la producción bioetanol tuvo una gran expansión en el resto del mundo, cuando Europa y otros países se unieron a la búsqueda de combustibles alternativos.

Actualmente, el bioetanol es considerado uno de los biocombustibles con mayor potencial tanto a nivel industrial como a nivel medioambiental y destaca frente al petróleo por las siguientes razones (García-Camús et al., 2006):

- Es una fuente de energía renovable.
- Es biodegradable.
- Proporciona una independencia frente al uso del petróleo.
- Mayor octanaje
- Contribuye al crecimiento de las economías locales y a la redistribución de la renta, generando puestos de trabajo en áreas rurales.
- Fácil de obtener y de almacenar.
- Disminuye las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) ya que el balance de emisiones de CO<sub>2</sub> es cero (Ver Figura. 10).
- Reduce las emisiones de óxido de azufre principal componente de la lluvia ácida y perjudicial para los seres humanos (Nigam et al., 2010).



Figura 10. Ciclo del carbono en la producción de bioetanol (WEB.6)

## 2.2- Residuos agroindustriales

### ✚ 2.2.1- Problemática de los residuos

La generación y gestión de los residuos es uno de los retos ambientales más complejos a los que se enfrenta la sociedad actual. Tanto la prevención como la gestión correcta de los residuos son esenciales para evitar impactos negativos como la contaminación del agua, del suelo, del aire, potenciar el cambio climático y afectar a la salud humana. En cambio, cuando los residuos se gestionan de forma adecuada se pueden convertir en recursos que contribuyan al ahorro de materias primas y garantizan la sostenibilidad económica. El sector de la recogida y del tratamiento (valorización y eliminación) de residuos está en crecimiento y constituye una de las fuentes reconocidas de empleo verde.

Según la Agencia Europea del Medio Ambiente, casi una tercera parte de los alimentos que se producen en el mundo se desperdician. Son muchos los datos que nos alertan de la gravedad de la situación y de la necesidad de actuar, por ello cada vez cobran más importancia aquellas políticas que tratan de disociar el crecimiento económico de la generación de residuos. Desde hace varias décadas los residuos agroindustriales han sido un foco de atención para los investigadores a nivel mundial, debido a que parte de sus constituyentes pueden ser materia prima para generar diversos productos de interés.

En el sector de la industria alimentaria se produce un volumen elevado de estos residuos, que proceden del procesado de la materia prima y del descarte. La cantidad generada puede suponer un 20-40% de toda la materia prima introducida en la industria. Algunos datos que proporcionan una idea del volumen de residuos que generan diferentes tipos de industrias son los siguientes: la industria de la cerveza solamente utiliza el 8% de los componentes del grano, la industria del aceite de palma utiliza el 9%, la industria del café utiliza el 9.5%, y la industria del papel utiliza menos del 30%, el resto es un residuo (Saval., 2012) En concreto, el sector de los transformados vegetales (conserva, congelados, zumos, concentrados y néctares de frutas y hortalizas) genera cantidades importantes de residuos y subproductos orgánicos. Por un lado están

los restos orgánicos, cuya cantidad generada oscila entre un 13% y un 65% de la materia prima inicial, y por otro los lodos de depuración (Ros et al., 2012).

Tabla 3. Porcentajes de residuos generados en función de la materia prima procesada (Adaptada de Ros et al., 2012)

Materia prima	Tipo de restos	% de materia prima convertida en residuo
Tomate	Piel, pepita, podridos	15
Espárrago	Piel, trozos	51
Alcachofa	Brácteas, tallos	60-65
Puerro	Hojas, raíces	47
Acelga	Pencas, hojas	48
Espinacas	Hojas secas	13
Melocotón	Piel, huesos	22-28
Judía verde	Puntas	28
Pera	Piel, peciolo, corazón	42-45
Pimiento piquillo	Corazones, piel	53
Pimiento morrón	Corazones, piel	50-60

El porcentaje de restos orgánicos generados en la elaboración de transformados vegetales es muy variable, ya que está determinado principalmente por la materia prima a procesar (tamaño, forma, partes aprovechables...) y su proceso de transformación, lo que implica que los niveles de residuos sean distintos en cada caso (Ver Tabla 3).

El problema al que se enfrentan los residuos agroindustriales es que no existe una clara conciencia ambiental para su manejo, además de que falta capacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final, así como una legislación específica para promover la gestión de este tipo de residuos, que asegure un buen manejo desde su generación hasta su disposición final (Saval., 2012).

A nivel europeo existen políticas en materia de residuos. Una de sus piedras angulares es la “Hoja de ruta hacia una Europa eficiente en el uso de los recursos”, desarrollada en 2011, cuyo objetivo es estimular el crecimiento económico y garantizar que éste sea sostenible. Define además un objetivo intermedio para 2020, en el que los

residuos se gestionarán como recurso, estableciendo el reciclado y la reutilización como las mejores opciones económicas para los operadores públicos y privados (SGAPC, 2014).

A nivel nacional, el Programa Estatal de Prevención de Residuos 2014-2020, desarrolla la política de prevención de residuos, conforme a la normativa vigente para cumplir el objetivo de reducción de los residuos generados en 2020 en un 10 % respecto del peso de los residuos generados en 2010. El Programa Estatal describe la situación actual de la prevención en España, realiza un análisis de las medidas de prevención existentes y valora la eficacia de las mismas (Web.7).

### 2.2.3- Alternativas

Los residuos generados en la industria agroalimentaria, y en concreto los provenientes de verduras y hortalizas, tanto restos orgánicos como lodos de depuración, contienen compuestos potencialmente útiles para su reutilización en la industria alimentaria humana y animal, industria farmacéutica, cosmética, la industria química y en la agricultura. Así mismo, son susceptibles de ser sometidos a procesos fermentativos o tratamientos de biometanización. Actualmente, se están desarrollando técnicas que permiten el empleo de estos residuos con fines energéticos (biogás, bioetanol, biohidrógeno y biomasa) y agrícolas mediante la obtención de compost (Ros et al., 2012)

La revalorización de residuos agroindustriales es un factor muy importante debido a la cantidad de residuos tan grande que se genera y al coste que supone su gestión. En España se han puesto en marcha distintos proyectos en relación a la producción de bioetanol a partir de residuos. Dos de los proyectos más importantes para la generación de bioetanol de segunda generación son el Proyecto Atenea y el Proyecto Perseo, ambos desarrollados por la empresa valenciana Imecal y el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (Ciemat).

El Proyecto Atenea tiene como objetivo la obtención de bioetanol a partir de residuos cítricos valorizando todos los subproductos del proceso. Tiene una gran importancia, ya que en la Comunidad Valenciana se producen alrededor de dos millones

de toneladas de excedentes de cítricos lo que supone grandes problemas de gestión y almacenamiento. Por otro lado, el Proyecto Perseo basa la obtención de bioetanol en el aprovechamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos. El Centro Nacional de Energías Renovables (Cener) también investiga la obtención de bioetanol a partir de residuos no aprovechables de la industria conservera y de la agricultura (restos de pimientos, kiwis, zanahorias y melocotones).

Mejorar las técnicas de pretratamiento y poner a punto procesos para la obtención de bioetanol es la clave para obtener grandes beneficios tanto económicos como medioambientales. Es necesario desarrollar técnicas que permitan un aprovechamiento máximo de los recursos para que el proceso sea rentable. En este proyecto, se han escogido residuos de la venta de verduras y hortalizas, en concreto, pimiento, patata y tomate, para la producción de bioetanol y se han ensayado distintos procesos de pretratamiento para mejorar el rendimiento final.

### **2.3- Producción de bioetanol de segunda generación.**

La producción de bioetanol a partir de residuos agroalimentarios está siendo estudiada por muchos autores desde hace varios años. La facilidad para obtener bioetanol de primera generación hace que la mayor parte de las publicaciones centren su atención en materias primas de tipo amiláceo o azucarado, dejando bien documentados los procesos de pretratamiento y centrándose en cómo mejorar procesos de fermentación para obtener una mayor rentabilidad.

En los últimos años ha crecido el interés general por la obtención de bioetanol de segunda generación siendo objeto de investigación por parte de muchos autores. Los materiales lignocelulósicos son considerados una fuente importante y valiosa de bioetanol, autores como Chen et al., (2010), Balat., (2011), Conde-Mejía et al., (2012) y Tejada et al., (2011) destacan su potencial debido a su abundancia, disponibilidad y bajo coste. Los distintos pretratamientos que se utilizan para la obtención del bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos generan un gran debate entre los autores, que combinan las distintas técnicas y modifican diferentes parámetros en busca de un método apropiado.

Chen et al., (2010) realizó un estudio comparativo de los diferentes pretratamientos a los que pueden someterse los materiales lignocelulósicos, asegurando que una buena combinación de pretratamiento, hidrólisis y fermentación, es esencial para optimizar el proceso de obtención. Este autor destaca también la importancia de los subproductos de alto valor generados durante el proceso de obtención del bioetanol a partir de estos materiales

Balat., (2011) aporta una visión general de las materias primas para la obtención del bioetanol y la disponibilidad de los materiales lignocelulósicos concluyendo que se trata de una materia prima abundante y barata. Destaca que la conversión bioquímica de estos materiales a través de la sacarificación y la fermentación constituyen una importante vía de producción de bioetanol a partir de biomasa.

Conde-Mejía., (2012) también realizó un análisis de los distintos pretratamientos para la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos. Los clasifica según su consumo energético, la producción de inhibidores o el consumo de productos químicos y agua concluyendo que los pretratamientos con ácidos diluidos y la explosión de vapor tienen los requerimientos energéticos más bajos.

Tejeda et al., (2011) estudió el aprovechamiento de residuos de poda como materia prima para la producción de bioetanol. Comparó los resultados obtenidos sometiendo la materia prima a una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico diluido y una hidrólisis enzimática con enzimas celulasas. Los resultados obtenidos mostraban mayores rendimientos en la hidrólisis ácida (entre 10 y 30g/L de glucosa) que en la hidrólisis enzimática (8,83 g/L de glucosa). En un mismo contexto, Asgher., (2014), utilizó la paja de trigo tratada enzimáticamente obteniendo resultados positivos y destacando la misma como una materia prima con alto valor para la producción de bioetanol. Más recientemente Vargas., (2015) empleó paja de cebada aplicando un pretratamiento hidrotérmico y una posterior sacarificación y fermentación simultáneas. Este último autor destaca la importancia del pretratamiento gracias al cual obtuvo una conversión de celulosa en glucosa del 95%.

Las implicaciones medioambientales y socioeconómicas de la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos también han sido estudiadas por varios

autores. Recientemente, Morales et al., (2015), publicaba un estudio acerca del impacto ambiental y del balance energético del bioetanol procedente de materiales lignocelulósicos destacando que su empleo reduce considerablemente la cantidad de gases de efecto invernadero, hasta 10% si se emplea bioetanol E10 y hasta una 40% empleando E85.

La obtención de bioetanol a partir de residuos agroalimentarios, sobre todo de residuos orgánicos procedentes de la alimentación, está mucho menos estudiada dejando una línea abierta a la investigación interesante y de gran valor. Si nos centramos exclusivamente en el empleo de verduras y hortalizas, las publicaciones son escasas. Hafid et al., (2015) que hace referencia al empleo de residuos de cocina, dentro de los cuales se incluyen verduras y hortalizas, para la producción de bioetanol. Estudió la influencia de forma individual y combinada de distintos pretratamientos obteniendo los mejores resultados tras aplicar una hidrólisis combinada con ácido clorhídrico diluido y glucosamilasas. Por otro lado, Aimaretti et al., (2012b) publicó la obtención de bioetanol a partir de residuos de zanahoria, obteniendo resultados positivos tras aplicar una hidrólisis enzimática.

En semejanza con la finalidad de este proyecto destacan dos publicaciones, Fonseca et al., (2010) hace referencia al aprovechamiento de residuos vegetales procedentes de una central de abastos mediante hidrólisis ácida, obteniendo 47,5 litros de etanol bruto por cada tonelada de residuos vegetales tratados. Fonseca et al., (2010) lleva a cabo un análisis de la influencia del ácido en distintas concentraciones y tiempos de reacción estudiando la concentración de etanol después de la fermentación y obteniendo los mejores resultados para una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico al 4% durante 4 horas. Del Campo et al., (2006), también obtuvo resultados positivos para la producción de bioetanol empleando residuos agroalimentarios entre los que se incluyen el tomate y el pimiento objetos de estudio en este proyecto. Llegó a la conclusión de que aplicando un tratamiento hidrotérmico a 110°C conseguía aumentar en un 40.3 y en un 50.2% el peso de azúcares solubles de los residuos de tomate y pimiento rojo, respectivamente frente al material de partida sin tratar.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

# 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---

## 3.1- Material de laboratorio:

### ✚ 3.1.1- Equipos:

- Balanza de alta precisión COBOS (Max:220g, Min:0.01g, e=0.001g, d=0.0001g)
- Balanza analítica CB Complex COBOS (Max:1200g, e=0.1g, d=0.01g)
- Agitador magnético IKA RCT Standard
- Batidora PRINCESS ROYAL BLENDER TURBO 10-Speed (Potencia:500W)
- Robot Trituradora MOULINEX MINIROBOT D81 (potencia:280W)
- Autoclave RayPA Trade System Steam Sterilizer
- pH-metro CRISON BASIC 20+
- Centrífuga KUBOTA 6500 High Speed Refrigerated Centrifuge
- Campana de extracción: F+ VALLES
- Baño hidrotérmico MEMMERT Typ:WNB 10
- Incubadora New Brunswick C24KC Refrigerated Incubator Shaker
- Estufa Heidolph Unimax 2010
- Equipo de espectrofotometría ThermoScientific Helios  $\gamma$

### ✚ 3.1.2- Reactivos:

- Fenol (Sigma-Aldrich. Pureza 96%)
- Ácido Sulfúrico (Sigma-Aldrich. Pureza 95-98%)
- Tartrato de Sodio y Potasio tetrahidratado (Fluka Analytical. Pureza 99%)
- Glucosa (Fluka Analytical. Pureza 99%)
- Hidróxido sódico (Sigma-Aldrich. Pureza 98%)
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (Panreac. Pureza 99%)

## 3.2- Residuos empleados

### ✚ 3.2.1- Material de partida

Para el desarrollo de este proyecto se han empleado residuos agroalimentarios procedentes de la venta de verduras y hortalizas. Para la selección de los residuos empleados se hizo referencia al trabajo publicado por Montes., (2014), donde se analizaron los residuos producidos por un supermercado durante dos meses. En base a la cantidad de alimento que se destinaba a residuo y a su contenido en carbohidratos complejos, se escogieron los materiales empleados para llevar a cabo la experimentación siendo éstos: tomates, pimientos verdes y patatas.

Los materiales residuales empleados como sustrato fueron suministrados por un supermercado de la región siendo utilizadas diferentes partidas (recogidas en diferentes fechas). Tras un lavado con agua destilada, los materiales se almacenaron en una cámara frigorífica (4-6°C), por un periodo máximo de tres días hasta el momento del tratamiento.

### ✚ 3.2.2- Preparación de materiales no sometidos a hidrólisis:

Para poder comparar la eficacia de los tratamientos realizados a los diferentes residuos, es necesario tener un conocimiento previo de la cantidad de azúcares, tanto totales como reductores, que pueden ser extraídos de la muestra sin tratar. Para ello se homogenizó el material de partida con agua destilada en una relación 1:2 (p/v), tomando 100 g de residuo y añadiendo 200 ml de agua destilada en una batidora (Princess Royal Blender Turbo) durante 3 minutos a velocidad 4 (Figura 12). Los sólidos se retiraron empleando un tamiz tipo colador y la fracción líquida se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 20°C en una centrífuga (Kubota 6500 High Speed Refrigerated Centrifuge). El sobrenadante se conservó congelado hasta el momento de los análisis.



Figura 11. Batidora (Princess Royal Blender Turbo) empleada en la experimentación.

### 3.3- Pretratamientos de hidrólisis

Se llevaron a cabo distintos pretratamientos de hidrólisis con la finalidad de obtener la mayor cantidad de azúcares reductores posibles antes de la fase de fermentación. Cada método de hidrólisis se ensayó en cada tipo de residuo y por triplicado, con el fin de tener en cuenta las posibles variaciones del material de partida.

#### ✚ 3.3.1- Hidrólisis térmica

Se realizaron dos tratamientos térmicos a distintas temperaturas y relaciones peso/volumen. En ambos casos la hidrólisis se desarrolló en un autoclave (Raypa Trade Steam Sterilizer) a temperatura y presión constante.

##### ***Tratamiento A: 110°C, 5 min, 1.5 atm***

Para la realización de este tratamiento se tomó como referencia el artículo publicado por Del Campo et al., (2010). Se partió de 100 g de residuo que fueron troceados con un cuchillo en tamaños menores de 2 cm. A continuación, el material se secó a 55°C durante 24 horas en una estufa (Heidolph Unimax 2010). Una vez seco, se trituró hasta obtener un tamaño de partícula menor a 2 mm en un robot trituradora (MOULINEX MINIROBOT D81). En la Figura 13 puede observarse el estado de las

muestras de pimiento antes y después del proceso de secado y en la Figura 14 el resultado del proceso de triturado en la patata.



Figura 12. Resultado de la fase de deshidratación a 55°C durante 24 horas en las muestras de pimiento verde. En la figura de la izquierda se muestra el pimiento verde troceado y pesado en una balanza analítica (CB Complect COBOS), en la figura de la derecha el resultado después de secar la muestra.



Figura 13. Resultado de la fase de triturado de patata después del secado

Se colocó la muestra en botellas de pyrex de 250 ml y se añadió agua destilada hasta una relación peso/volumen del 5%. Las botellas se cerraron dejando el tapón con

cierta holgura y se introdujeron en un autoclave para un tratamiento térmico de 110°C durante 5 minutos.

La fracción líquida obtenida se separó, mediante un tamiz tipo colador, de la parte sólida que fue desechada. La muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente y se neutralizó con NaOH 6M y HCl 1M hasta alcanzar un pH entre 6.5 y 7. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 20°C. El sobrenadante se congeló para el análisis de azúcares totales y reductores.



Figura 14. pH-metro (Crison Basic 20+) empleado en la experimentación

### ***Tratamiento B: 135°C, 5 min, 3 atm***

La hidrólisis térmica en este caso siguió la metodología descrita por Correa et al., (2012). Se partió de 10 g de residuo que fueron homogenizados en una batidora con 10 ml agua de acuerdo a una relación 1:1 (p/v). El material obtenido se vertió en botellas pyrex de 250 ml que se cerraron dejando el tapón con cierta holgura y se introdujeron en un autoclave para un tratamiento térmico a 135°C durante 5 minutos. A partir de aquí se procedió de igual manera que en el caso anterior.

### **3.3.2- Hidrólisis ácida-térmica**

Tanto para la hidrólisis ácida como para la hidrólisis enzimática se llevó a cabo un proceso previo de deslignificación del material de partida a partir del método descrito por Gerena., (2013).

### ***Eliminación de la lignina***

Se lavó el material de partida y se troceó en la picadora hasta obtener un tamaño de partícula menor a 2 mm. Posteriormente se sumergió la muestra en 20 ml de NaOH 0,1N durante 15 minutos. Pasado ese tiempo se añadieron 0.816 g de sulfato de calcio ( $\text{CaSO}_4$ ) pesado en una balanza de alta precisión, y se dejó reposar durante 3 horas.

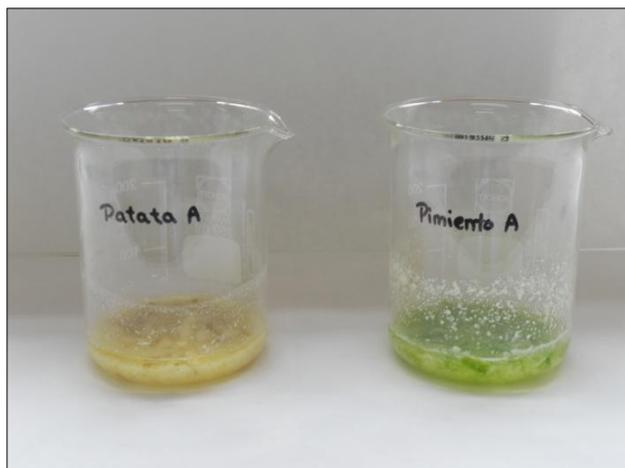


Figura 15. Pimiento y patata durante el proceso de deslignificación

### ***Proceso de hidrólisis***

El material resultante del proceso de deslignificación se tamizó desechando la parte líquida y recuperando la parte sólida para el proceso de hidrólisis. Esta fracción sólida, se lavó dos veces con agua destilada para eliminar los productos residuales de la deslignificación que pudieran interferir en el proceso de hidrólisis.

Para llevar a cabo la hidrólisis ácida se empleó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5% en relación 2:1 p/v, es decir, 50 g de material de partida por cada 25 ml de disolución ácida. La muestra se vertió en botellas de pyrex de 250 ml y se introdujo en el autoclave para un tratamiento a  $125^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. A partir de aquí se procedió de igual manera que en el caso de los tratamientos térmicos.

### 3.3.3- Hidrólisis enzimática

#### *Enzimas empleadas:*

Las características de las enzimas empleadas son las siguientes:

- **$\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae* A8220-50ML:** Solución acuosa con una temperatura de almacenamiento entre 2-8°C, y una densidad de 1.10-1.30 g/ml. Estas enzimas poseen una actividad enzimática entorno a 800 FAU. Un FAU (Unidad de Alfa-Amilasa Fúngica) corresponde a la cantidad de enzima que descompone 5.26 g de almidón soluble por hora, bajo condiciones estandar: Tiempo de reacción (7-20 min), temperatura (37°C), pH de 4,7 (Ruiz et al., 2001) La alfa amilasa rompe las cadenas del almidón convirtiéndolas en disacáridos y proporciona gran cantidad de maltosa (dextrinas).
- **Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* A7095-50ML:** Solución acuosa con una temperatura de almacenamiento entre 2-8°C, y una densidad de 1.20 g/ml. Tiene una actividad enzimática entorno a 300 U/ml. Una unidad de actividad enzimática (U) es igual a la cantidad de enzima que en una reacción enzimática cataliza la conversión de 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto. La amiloglucosidasa hidroliza los enlaces 1,4 y 1,6 del almidón (tanto amilosa como amilopectina) desde los extremos no reductores de las cadenas con separación de unidades sucesivas de glucosa.
- **Cellulase from *Trichoderma reesei* C2730- 50 ML:** Solución acuosa con una temperatura de almacenamiento entre 2-8°C, y una densidad de 1.10-1.30 g/ml. Posee una actividad enzimática entorno a 700 EGU. Una unidad de Endo-Glucanasa (EGU) es la cantidad de enzima que bajo condiciones estándar (temperatura entre 50-60°C, pH entre 4.5-6.0, tiempo de reacción de 20 minutos) reduce la viscosidad a la mitad y degrada la celulosa. Se trata de un complejo de enzimas, que en conjunto son capaces de degradar la celulosa hasta glucosa.

## Proceso de hidrólisis

Se partió de 10 g de materia inicial y se trató siguiendo el método de deslignificación descrito por Gerena., (2013) y explicado para la hidrólisis ácido-térmica (Ver apartado 3.3.2). La torta obtenida se trató siguiendo el proceso de hidrólisis enzimática descrito por Ruiz et al., 2001, seleccionado por ser una referencia en la combinación de enzimas tanto para materiales amiláceos como celulósicos, idóneo para nuestra experimentación debido a la mezcla de productos. Tras el proceso de deslignificación la muestra se resuspendió en agua destilada hasta una relación p/v del 6%, (a 10 g de muestra iniciales se adicionaron 167 ml de agua destilada). Se ajustó el pH a 4,7 y se trató térmicamente a 75°C durante 5 minutos en un baño hidrotérmico.

Una vez terminado el pretratamiento térmico, se midió el pH con el fin de comprobar que era de 4,5 y se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron las enzimas a la suspensión de 167 ml en las siguientes cantidades: 83 µl de Cellulase from *Trichoderma reesei* C2730- 50 ML, 50 µl de α-amylase from *Aspergillus oryzae* A8220-50ML y 8 µl de Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* A7095-50ML.

La muestra conteniendo la mezcla de enzimas se incubó a 60°C durante 60 minutos sin agitación (Ver Figura. 16). Posteriormente, se trató térmicamente la muestra a 95°C durante 5 minutos para inhibir la acción enzimática en un baño hidrotérmico. A continuación se procedió de igual manera que en los casos anteriores.



Figura 16. Incubadora "New Brunswick C24KC Refrigerated Incubator Shaker" empleada durante el proceso de hidrólisis enzimática

### ✚ 3.3.4- Hidrólisis térmico-enzimática:

Finalmente se ensayó un nuevo método combinando la hidrólisis térmica descrita por Correa et al., (2012) y la hidrólisis enzimática descrita por Ruiz et al., 2001. Se partió de 10 g de producto inicial que fue deslignificado mediante el método descrito por Gerena., (2013) (descrito anteriormente).

La torta obtenida se homogenizó con agua destilada en una relación 1:1 (10 ml de agua destilada para 10 g de residuo) y se sometió a tratamiento térmico 135°C durante 5 minutos en autoclave. Una vez terminado el pretratamiento térmico se adicionó agua destilada hasta una relación 6% p/v, se ajustó el pH a 4,5 y se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente. A partir de este pasó la hidrólisis realizada igual al procedimiento anteriormente descrito para la hidrólisis enzimática.

### 3.4- Métodos para la cuantificación de azúcares

Tanto para la cuantificación de azúcares totales como para la cuantificación de azúcares reductores se emplean métodos espectrofotométricos. Las medidas correspondientes se han realizado en el equipo de espectrofotometría ThermoScientific Helios  $\gamma$  (Figura 17). Los análisis se realizaron por triplicado para cada medida y para cada experimento escogiendo el valor medio para el cálculo de la concentración de azúcares presentes en la muestra.



Figura 17. Equipo de espectrofotometría ThermoScientific Helios  $\gamma$  empleado en la experimentación

### ✚ 3.4.1- Método Fenol-Sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales

La determinación de carbohidratos totales presentes en la muestra se realizó a través de una adaptación del método del fenol sulfúrico descrito por Dubais et al., 1956.

Se mezcló 1 mL de muestra con 0.5 mL de fenol al 5% y 2.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se agitó inmediatamente. Se dejó reposar durante una hora y se analizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm. La concentración de azúcares totales se determinó a través de una curva de calibración preparada con patrones de glucosa de distintas concentraciones (Figura 18). Para el blanco se utilizó agua destilada en lugar de las muestras.

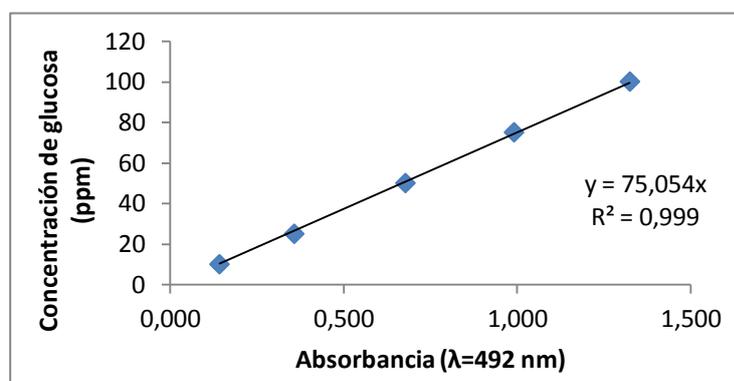


Figura 18. Recta de calibrado obtenida para el método fenol-sulfúrico.

### ✚ 3.4.2- Método ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS) para la cuantificación azúcares reductores

Para la medición de los azúcares reductores se empleó la metodología descrita por Bello Gil et al., (2006), basada en el método del DNS.

Se mezcló 0.5 ml de muestra y 0.5 ml de reactivo DNS. Se calentó en un baño de agua a 95°C durante 5 minutos e inmediatamente después se introdujo en hielo durante 5 minutos. Pasado ese tiempo se añadió 5 ml de agua destilada a cada muestra, se agitó y se analizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. La concentración de azúcares reductores se determinó a través de una curva de calibración

preparada con patrones de glucosa a distintas concentraciones (Figura 18). Para el blanco se utilizó agua destilada en lugar de las muestras.

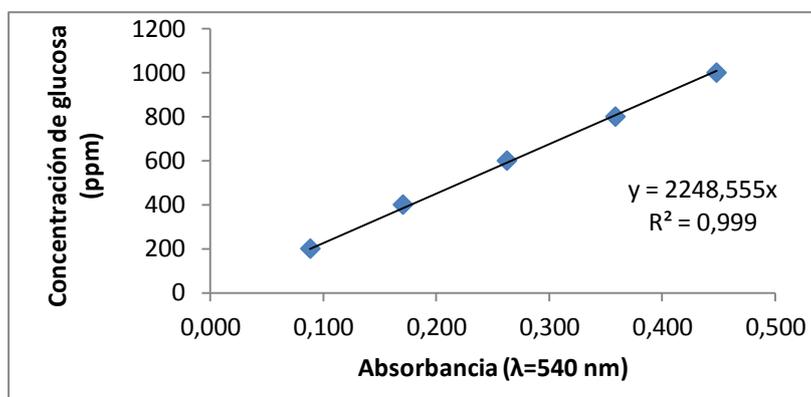


Figura 19. Recta de calibrado obtenida para el método DNS

***Para preparar el reactivo DNS:***

Se disolvieron 0.8 g de NaOH, 15 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 0.5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en agua destilada. La mezcla se aforó 50 ml en un matraz y se guardó en nevera envuelto en papel de aluminio, ya que es un reactivo fotosensible. El reactivo así preparado puede ser utilizado durante 30 días.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 4.1- Caracterización del material de partida

Los sustratos empleados como material de partida para la realización de los experimentos han sido el pimiento verde, tomate y patata. Han sido seleccionados en base a la cantidad de residuos de la venta de estos productos que se generan y a su contenido en carbohidratos complejos que no pueden ser directamente fermentados. En la Tabla 5 se muestra su contenido en carbohidratos según la base de datos española de la composición de alimentos (BEDCA):

Tabla 4. Contenido en gramos de hidratos de carbono por cada 100 gramos de alimento. (WEB.6)

Componente	Cantidad (gramos)		
	Pimiento verde	Tomate	Patata
Azúcar	1,53	3,39	0,70
Fructosa	0,69	1,82	0,17
Glucosa	0,76	1,45	0,24
Sacarosa	0,08	0,11	0,30
Almidón	0,07	0,10	14,10
Celulosa	0,60	0,40	0,00
Lignina	0,20	0,30	0,44

Hay que tener en cuenta que estos resultados son del alimento apto para el consumo, por lo que puede haber ligeras variaciones cuando se trata del residuo. En primer lugar se procedió a hacer una medida de la cantidad de azúcares totales y reductores que pueden ser extraídos del material sin tratamiento de hidrólisis, simplemente por batido con agua (Ver apartado 3). De esta manera se dispone de una referencia para poder determinar las mejoras obtenidas con los pretratamientos de

hidrólisis. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 5, 6, 7, 8 y 9. Nótese que estos ensayos se repitieron para todas las partidas de materiales empleados para los posteriores tratamientos de hidrólisis, y en cada caso los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Tabla 5. Contenido de azúcares totales y reductores en los caldos obtenidos de la partida 1 de residuos (empleada en la hidrólisis ácida).

	Azúcares Totales			Azúcares Reductores		
	Pimiento	Tomate	Patata	Pimiento	Tomate	Patata
Experimento 1	1,57	2,19	0,42	1,27	1,72	0,07
Experimento 2	1,59	2,25	0,37	1,35	1,69	0,05
Experimento 3	1,61	2,08	0,35	1,29	1,35	0,05
Media	1,59 ± 0,02	2,17 ± 0,09	0,38 ± 0,04	1,30 ± 0,04	1,59 ± 0,21	0,06 ± 0,01

Tabla 6. Contenido de azúcares totales y reductores en los caldos obtenidos de la partida 1 de residuos (empleada en la hidrólisis térmica a 110°C).

	Azúcares Totales			Azúcares Reductores		
	Pimiento	Tomate	Patata	Pimiento	Tomate	Patata
Experimento 1	1,56	2,21	0,36	1,25	1,7	0,05
Experimento 2	1,57	2,19	0,41	1,42	1,7	0,08
Experimento 3	1,59	2,24	0,32	1,38	1,1	0,03
Media	1,57 ± 0,02	2,21 ± 0,03	0,36 ± 0,05	1,35 ± 0,09	1,50 ± 0,35	0,05 ± 0,03

Tabla 7. Contenido de azúcares totales y reductores en los caldos obtenidos de la partida 2 de residuos (empleada en la hidrólisis térmica a 135°C).

	Azúcares Totales			Azúcares Reductores		
	Pimiento	Tomate	Patata	Pimiento	Tomate	Patata
Experimento 1	1,95	2,78	0,4	1,72	1,75	0,02
Experimento 2	1,89	2,72	0,38	1,78	1,62	0,02
Experimento 3	1,92	2,81	0,39	1,69	1,79	0,03
Media	1,92 ± 0,03	2,77 ± 0,05	0,39 ± 0,01	1,73 ± 0,05	1,72 ± 0,09	0,02 ± 0,01

Tabla 8. Contenido de azúcares totales y reductores en los caldos obtenidos de la partida 2 de residuos (empleada en la hidrólisis enzimática).

	Azúcares Totales			Azúcares Reductores		
	Pimiento	Tomate	Patata	Pimiento	Tomate	Patata
Experimento 1	1,85	2,78	0,3	1,52	1,62	0,01
Experimento 2	1,92	2,69	0,41	1,57	1,75	0,02
Experimento 3	1,87	2,72	0,39	1,63	1,58	0,02
Media	1,88 ± 0,04	2,73 ± 0,05	0,37 ± 0,06	1,57 ± 0,06	1,65 ± 0,09	0,02 ± 0,01

Tabla 9. Contenido de azúcares totales y reductores en los caldos obtenidos de la partida 2 de residuos (empleada en la hidrólisis térmico-enzimática).

	Azúcares Totales			Azúcares Reductores		
	Pimiento	Tomate	Patata	Pimiento	Tomate	Patata
Experimento 1	1,94	2,76	0,41	1,71	1,72	0,02
Experimento 2	1,9	2,72	0,37	1,79	1,65	0,02
Experimento 3	1,91	2,83	0,38	1,64	1,78	0,03
Media	1,92 ± 0,02	2,77 ± 0,06	0,39 ± 0,02	1,71± 0,08	1,72 ± 0,07	0,02 ± 0,01

Al analizar los resultados obtenidos experimentalmente puede observarse que la cantidad de azúcares extraídos de los sustratos sin tratar. Las variaciones detectadas se deben a que el material de partida no siempre ha sido el mismo y se ha recogido en distintas ocasiones. Muestra de ello es la similitud en los datos obtenidos en la Tabla 5 y 6, en comparación con los obtenidos en las tablas 7, 8 y 9 que se tomaron de una partida distinta y que presentan ligeramente una mayor cantidad de azúcares totales en pimiento y tomate y un menor contenido de azúcares reductores en la patata.

Para comparar los resultados obtenidos con la composición de los alimentos en fresco ofrecida por la BEDCA, se establecen unos valores medios de 1.78, 2.53 y 0.38 g de azúcares totales y 1.53, 1.64, 0.03 g de azúcares reductores por cada 100 g de residuo de pimiento, tomate y patata respectivamente. La cantidad de azúcares totales extraídos del pimiento son aproximadamente las tres cuartas partes de lo que contiene (Ver

Tabla.4). En el caso del tomate se extrae más de la mitad y por el contrario en la patata apenas llega al 2.5%.

En lo que respecta a los azúcares reductores, se logró extraer la totalidad de los del pimiento, la mitad de los del tomate y tan solo un 4% de los de la patata. En este último caso, el alto contenido en almidón, poco soluble, dificulta la extracción de los azúcares.

A la vista de los resultados, resulta interesante someter, especialmente a la patata, a un pretratamiento de hidrólisis con el fin de aumentar el contenido de azúcares reductores que puedan ser extraídos.

#### 4.2- Hidrólisis ácida-térmica

El proceso de hidrólisis ácida-térmica consistió en un tratamiento en autoclave de los residuos de partida con  $H_2SO_4$  al 5% a  $125^\circ C$  y 2 atm durante 15 minutos, descrito en el apartado 3.3.2. En la Tabla 10 se recogen los datos relativos a la cantidad de azúcares presentes en el caldo obtenido tras el tratamiento y en la Figura 20 se comparan los valores medios con los azúcares extraídos sin tratamiento.

Tabla 10. Resultados de la hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$  al 5% durante 15 min a  $125^\circ C$  y 2 atm. Se indican los gramos de azúcares obtenidos por cada 100 gramos de residuo inicial.

	Azúcares Totales			Azúcares Reductores		
	Pimiento	Tomate	Patata	Pimiento	Tomate	Patata
Experimento 1	1,12	1,98	0,23	0,95	1,36	0,03
Experimento 2	1,32	1,75	0,21	0,84	1,45	0,02
Experimento 3	1,23	1,95	0,41	0,91	1,05	0,02
Media	$1,22 \pm 0,10$	$1,89 \pm 0,13$	$0,28 \pm 0,11$	$0,90 \pm 0,06$	$1,29 \pm 0,21$	$0,02 \pm 0,01$

Tras someter los distintos residuos al tratamiento ácido, se obtuvo a nivel general una pérdida tanto de azúcares totales como de azúcares reductores. En el caso del pimiento, se produjo aproximadamente una reducción de azúcares totales del 23% y de azúcares reductores del 30%. Para el tomate la reducción fue de 13% de azúcares

totales y un 18% para azúcares reductores. Finalmente se advierte una mayor caída de azúcares totales y reductores para la patata, en un 26% y un 66% respectivamente.

Los resultados obtenidos no se asemejan a los reportados por otros autores que experimentan incrementos importantes de azúcares reductores. Gerena., (2013), empleó la misma metodología para obtener jarabes azucarados a partir de residuos de papa y cáscara de naranja. Los resultados obtenidos por este autor muestran un gran incremento en azúcares reductores a partir de papa y un menor incremento a partir de cáscara de naranja, utilizando concentraciones de  $H_2SO_4$  de hasta el 20%. Por el contrario, Cortinez (2010), indicó que concentraciones de ácido sulfúrico superiores al 1% no son útiles para la obtención de azúcares reductores a partir de materiales lignocelulósicos y que producen subproductos como el furfural y el 5-hidroximetil furfural, que inhiben procesos posteriores de fermentación. Así mismo, Gerena., (2013) obtuvo mediante hidrólisis ácida un contenido bajo de azúcares reductores debido una escasa eliminación de la lignina.

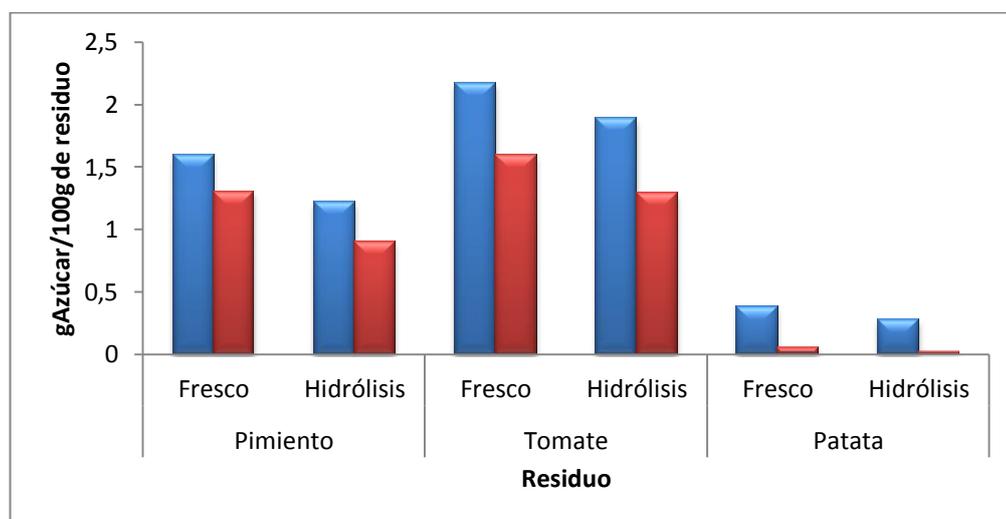


Figura 20. Azúcares totales (azul) y azúcares reductores (rojo) obtenidos a partir de residuos tratados por hidrólisis ácida-térmica y a partir de los residuos sin tratar. En ambos casos se expresan como gramos de azúcar extraídos por cada 100 gramos de residuo inicial.

En nuestro caso, la pérdida de azúcares se produjo en todos los residuos tratados independientemente, puede ser debido a un tiempo de exposición demasiado elevado y/o al empleo de una concentración de ácido demasiado alta. Una posibilidad sería

repetir la hidrólisis variando estas condiciones. Sin embargo, en este trabajo, teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos en otros métodos se optó por descartar esta alternativa.

### 4.3- Hidrólisis hidrotérmica

#### 4.3.1- Tratamiento térmico A:

Los residuos experimentaron un tratamiento hidrotérmico en un autoclave a 110°C, 5 minutos y 1,5 atm. En la Tabla 11 se recogen las cantidades de azúcares presentes en el caldo obtenido tras el tratamiento y en la Figura 21 se comparan los valores medios con los azúcares extraídos sin tratamiento.

Tabla 11. Resultados de la hidrólisis térmica a 110°C durante 5 minutos y 1,5 atm. Se indican los gramos de azúcares obtenidos por cada 100 gramos de residuo inicial

	Azúcares Totales			Azúcares Reductores		
	Pimiento	Tomate	Patata	Pimiento	Tomate	Patata
Experimento 1	1,46	2,18	0,4	1,1	1,6	0,03
Experimento 2	1,39	2,09	0,49	0,95	1,54	0,05
Experimento 3	1,54	1,98	0,41	0,85	0,86	0,01
Media	1,46 ± 0,08	2,08 ± 0,10	0,43 ± 0,05	0,97 ± 0,13	1,33 ± 0,41	0,03 ± 0,02

Los residuos sometidos a un tratamiento térmico a 110°C también experimentaron una pérdida de azúcares, aunque menor que en el caso de la hidrólisis ácida, de un 7 y 6% respectivamente, para los azúcares totales del pimiento y del tomate. En el caso de la patata, se observó un incremento del contenido de azúcares totales de un 19% respecto al material sin hidrolizar, aunque los azúcares reductores disminuyeran en un 40%.

A diferencia de los resultados aquí obtenidos, Del Campo et al. (2006), encontraron empleando el mismo método un incremento de azúcares totales solubles de 20.88 a 35.46% para tomate y de 41.36 a 50.20% para pimiento. Si bien no se indica el contenido final de azúcares reductores. Una diferencia posible entre el proceso seguido por estos autores y el empleado en este trabajo, está en el tiempo empleado en la deshidratación inicial a 45°C, ya que no se indica. En este trabajo, se dejó secar durante 24 horas tiempo suficiente para obtener una pérdida del 80% de su contenido en agua.

Durante esta fase pueden ocurrir reacciones de Mallard, donde las proteínas y los lípidos presentes en los alimentos reaccionan con los hidratos de carbono reductores presentes en la muestra, esto podría explicar la pérdida de azúcares reductores que experimentan los residuos. Para que las reacciones de Mallard ocurran se necesita deshidratación, tiempo y temperatura, tres condiciones que se dan en este proceso de hidrólisis. En vista de los resultados obtenidos, este método también fue descartado.

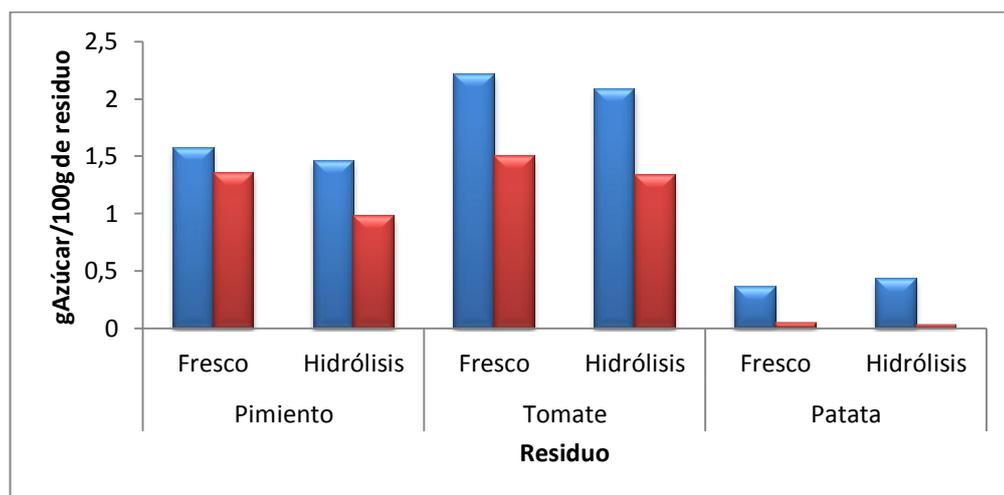


Figura 21. Azúcares totales (azul) y azúcares reductores (rojo) obtenidos a partir de residuos tratados por hidrólisis térmica a 110°C y a partir de los residuos sin tratar. En ambos casos se expresan como gramos de azúcar extraídos por cada 100 gramos de residuo inicial.

#### ✚ 4.3.2- Tratamiento térmico B:

En vista a los malos resultados obtenidos en la hidrólisis hidrotérmica a 110°C se decidió realizar otra hidrólisis siguiendo una metodología diferente y evitando la etapa previa de deshidratación. Se siguió la metodología descrita por Correa et al., (2012) que directamente somete el residuo a un tratamiento en autoclave a 135°C y 3 atm durante 5 minutos. En la Tabla 12 se recogen las concentraciones de azúcares presentes en el caldo obtenido tras el tratamiento y en la Figura 22 se comparan los valores medios con los azúcares extraídos sin tratamiento de hidrólisis.

Tabla 12. Resultados de la hidrólisis térmica a 135°C durante 5 minutos y 3 atm. Se indican los gramos de azúcares obtenidos por cada 100 gramos de residuo inicial.

	Azúcares Totales			Azúcares Reductores		
	Pimiento	Tomate	Patata	Pimiento	Tomate	Patata
Resultado 1	2,56	2,78	10,62	2,41	2,21	0,05
Resultado 2	2,51	2,85	10,54	2,49	1,92	0,04
Resultado 3	2,49	2,79	10,61	2,39	2,19	0,04
Media	2,52 ± 0,04	2,81 ± 0,04	10,59 ± 0,04	2,43 ± 0,05	2,11 ± 0,16	0,04 ± 0,01

Tras el tratamiento de los residuos con la hidrólisis térmica a 135°C se obtuvieron resultados favorables en el contenido de azúcares tanto reductores como totales. El pimiento y el tomate sufrieron un incremento de azúcares totales del 31 y 1,4% y de azúcares reductores del 40% y 22% respectivamente. Se advierte el mayor incremento de azúcares en la patata aumentando hasta 22 veces su contenido inicial en azúcares totales. El contenido de azúcares reductores se consiguió duplicar, si bien los valores siguen siendo muy bajos y suponen tan solo el 0,4 de los azúcares totales.

Estos resultados se corresponden con el incremento descrito por Correa et al., (2012), si bien, los contenidos finales de azúcares reductores publicados por el autor son mayores. Hay que tener en cuenta que el material empleado en este proyecto posee un alto contenido en celulosa, hemicelulosa y almidón que dificulta la extracción de los azúcares, a diferencia de la fruta del banano empleada por Correa et al., (2012), que se trata de una materia prima azucarada. En comparación con la hidrólisis hidrotérmica a 110°C se logra un incremento significativo tanto de azúcares totales como de azúcares reductores, lo cual también concuerda con los resultados de Correa et al., (2012) que repitió el experimento a diferentes temperaturas describiendo un incremento de la cantidad de azúcares a consecuencia del aumento de la temperatura.

El caso más llamativo es la patata donde se obtienen 10.59 g de azúcares totales mediante la hidrólisis a 135°C frente a los 0.43 g obtenidos por la hidrólisis a 110°C. Sin embargo, a pesar del aumento de azúcares totales el contenido en azúcares reductores no experimenta gran variación. Esto puede deberse a la influencia de la temperatura en la solubilidad del almidón. La absorción de agua por parte del almidón aumenta a temperaturas superiores y como consecuencia los gránulos de almidón se degradan dando lugar a la solubilización de la amilosa y de la amilopectina para formar una

solución coloide (WEB. 7). Como resultado puede incrementarse el contenido de azúcares totales presentes en la fracción líquida pero no el de reductores al no ser una temperatura suficiente para lograr la hidrólisis del almidón.

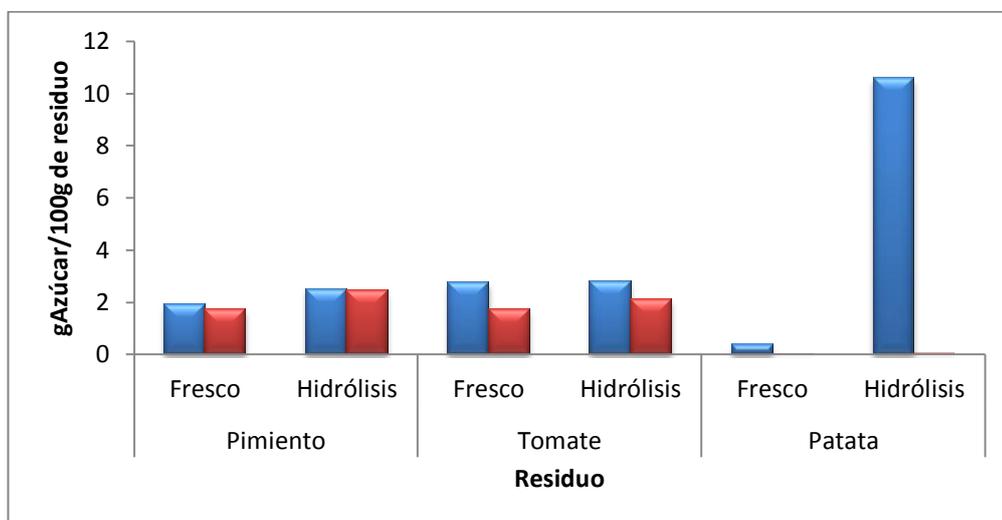


Figura 22. Azúcares totales (azul) y azúcares reductores (rojo) obtenidos a partir de residuos tratados por hidrólisis térmica a 135°C y a partir de los residuos sin tratar. En ambos casos se expresan como gramos de azúcar extraídos por cada 100 gramos de residuo inicial.

#### 4.4- Hidrólisis enzimática

Los residuos se sometieron a un tratamiento hidrotérmico a 75°C durante 5 minutos y a continuación un tratamiento enzimático a 60°C durante 60 min. En la Tabla 13 se recogen las cantidades de azúcares presentes en el caldo obtenido tras el tratamiento y en la Figura 23 se comparan los valores medios con los azúcares extraídos sin tratamiento.

Tabla 13. Resultados de la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 75°C y tratamiento enzimático a 60°C durante 60 minutos. Se indican los gramos de azúcares obtenidos por cada 100 gramos de residuo inicial.

	Azúcares Totales			Azúcares Reductores		
	Pimiento	Tomate	Patata	Pimiento	Tomate	Patata
Resultado 1	2,51	2,95	7,91	2,37	1,85	1,12
Resultado 2	2,68	2,84	7,65	2,32	1,72	1,25
Resultado 3	2,53	2,86	7,82	2,41	1,76	1,15
Media	2,57 ± 0,09	2,88 ± 0,06	7,79 ± 0,13	2,37 ± 0,05	1,78 ± 0,07	1,17 ± 0,07

Los distintos residuos sometidos al tratamiento enzimático experimentaron a nivel general un incremento tanto de azúcares totales como de azúcares reductores. En el caso del pimiento, se produjo aproximadamente un aumento del 37% de azúcares totales y del 51% de azúcares reductores. Para el tomate, el incremento fue del 5% para los azúcares totales y un 8% para azúcares reductores. Finalmente el mayor incremento de azúcares se observa en la patata con 7.79 g de azúcares totales y 1.17 g de azúcares reductores por cada 100 g de residuo. Los datos obtenidos en la experimentación son acordes a lo que Ruiz et al., (2001) obtuvieron a partir de la hidrólisis enzimática de restos de umarí y yuca que lograron incrementos del 48.95 y 48.76%.

En comparación con la hidrólisis térmica a 135°C, se consigue un mayor rendimiento en cuanto a la obtención de azúcares reductores frente al material sin tratar, destacando la mayor extracción de azúcares reductores del residuo de patata.

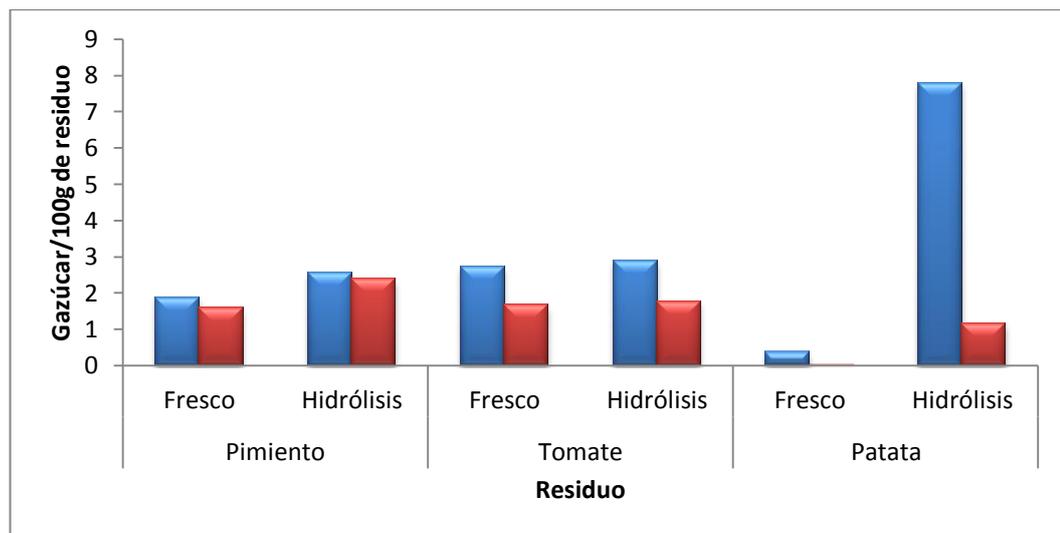


Figura 23. Azúcares totales (azul) y azúcares reductores (rojo) obtenidos a partir de residuos tratados por hidrólisis enzimática y a partir de los residuos sin tratar. En ambos casos se expresan como gramos de azúcar extraídos por cada 100 gramos de residuo inicial.

A pesar de esta mejora, el contenido de azúcares reductores obtenidos para la patata frente al número de totales continúa siendo muy bajo. Ruiz et al., (2001) que estudió la hidrólisis de los carbohidratos de yuca y umarí señala la existencia de un

almidón resistente al ataque enzimático que se origina como consecuencia de la formación de complejos de amilosa-lípidos.

#### 4.5- Hidrólisis térmico-enzimática.

En vista a los resultados obtenidos a partir de los pretratamientos anteriores se concluyó que la hidrólisis enzimática era el mejor pretratamiento en cuanto a la conversión final de azúcares totales a azúcares reductores. Ahora bien, la hidrólisis hidrotérmica a 135°C era el pretratamiento que había logrado una mayor cantidad de azúcares totales, teniendo en cuenta para ambos casos, los tres residuos. Esto puede deberse a que un aumento en la temperatura del pretratamiento provoca una mayor degradación del material de partida (eliminación de lignina, exposición de celulosas y hemicelulosa, solubilización del almidón) incrementando los azúcares totales solubles.

Partiendo de estos resultados se propuso este último método, sustituyendo la temperatura de pretratamiento enzimático por 135°C y no 75°C como describe Ruiz et al., (2001), con la finalidad de conseguir una mayor proporción de materia prima susceptible a ser degradada enzimáticamente. Los resultados en cuanto a las cantidades de azúcares presentes en el caldo obtenido se recogen en la Tabla 14. En la Figura 24 se comparan los valores medios de los azúcares extraídos sin tratamiento.

Tabla 14. Resultados de la hidrólisis térmico- enzimática con pretratamiento a 135°C y tratamiento enzimático a 60°C durante 60 minutos. Se indican los gramos de azúcares obtenidos por cada 100 gramos de residuo inicial.

	Azúcares Totales			Azúcares Reductores		
	Pimiento	Tomate	Patata	Pimiento	Tomate	Patata
Resultado 1	2,64	2,98	21,51	2,59	2,84	19,39
Resultado 2	2,59	2,85	21,42	2,48	2,79	19,59
Resultado 3	2,67	2,91	20,89	2,57	2,57	19,39
Media	2,63 ± 0,04	2,91 ± 0,07	21,27 ± 0,34	2,55 ± 0,06	2,73 ± 0,14	19,45 ± 0,14

El tratamiento de los residuos por la hidrólisis térmico-enzimática fue el que proporcionó mejores resultados, extrayéndose una mayor cantidad de azúcares totales y reductores en comparación con los métodos de hidrólisis anteriores. Los azúcares totales

obtenidos para el pimiento y el tomate no varían mucho en cuanto a los obtenidos por la hidrólisis enzimática y la hidrotérmica a 135°C, alcanzándose un incremento de un 37% y un 5% respectivamente. Los azúcares reductores extraídos del pimiento son similares a los conseguidos en hidrólisis anteriores, logrando mejorar la cantidad extraída del tomate, que en este caso concreto se incrementa en un 59% respecto a lo que se extrae del residuo no tratado. El caso donde se consigue una mejora más significativa es nuevamente la patata, de la que se consigue extraer 21 g de azúcar por cada 100 g de residuo, valor superior al total de carbohidratos encontrado en la bibliografía (ver Tabla 4.) No obstante, hay que tener presente que los datos proporcionados por la BEDCA son valores medios y la cantidad exacta de carbohidratos depende del material de partida específico (tipo de residuo, estado, variación de la especie, etc.)

En el caso de la patata, los azúcares reductores obtenidos son, a nivel general, mucho mayores que los obtenidos por los métodos de hidrólisis anteriores. Para el tomate y el pimiento se logra que el 90% de los azúcares extraídos sean reductores, y considerando los valores de azúcares totales recogidos en la tabla 4, se consiguen extraer como azúcares reductores el total de los presentes en el pimiento verde y el 64% de los del tomate. En caso de la patata, se obtienen incrementos en los azúcares totales y reductores muy superiores a los obtenidos anteriormente mediante la hidrólisis enzimática y la hidrólisis hidrotérmica. Así, se logra extraer 19 g de azúcares reductores por cada 100 g de residuo, siendo el 90% de los azúcares extraídos. Si comparamos estos resultados con la hidrólisis enzimática con pretratamiento a 75°C, observamos que un pretratamiento a 135°C logra aumentar 18 veces la cantidad de azúcares reductores obtenidos. Ante estos resultados, de los métodos ensayados, la hidrólisis térmico-enzimática ha sido seleccionada como la más idónea para la conversión de estos productos.

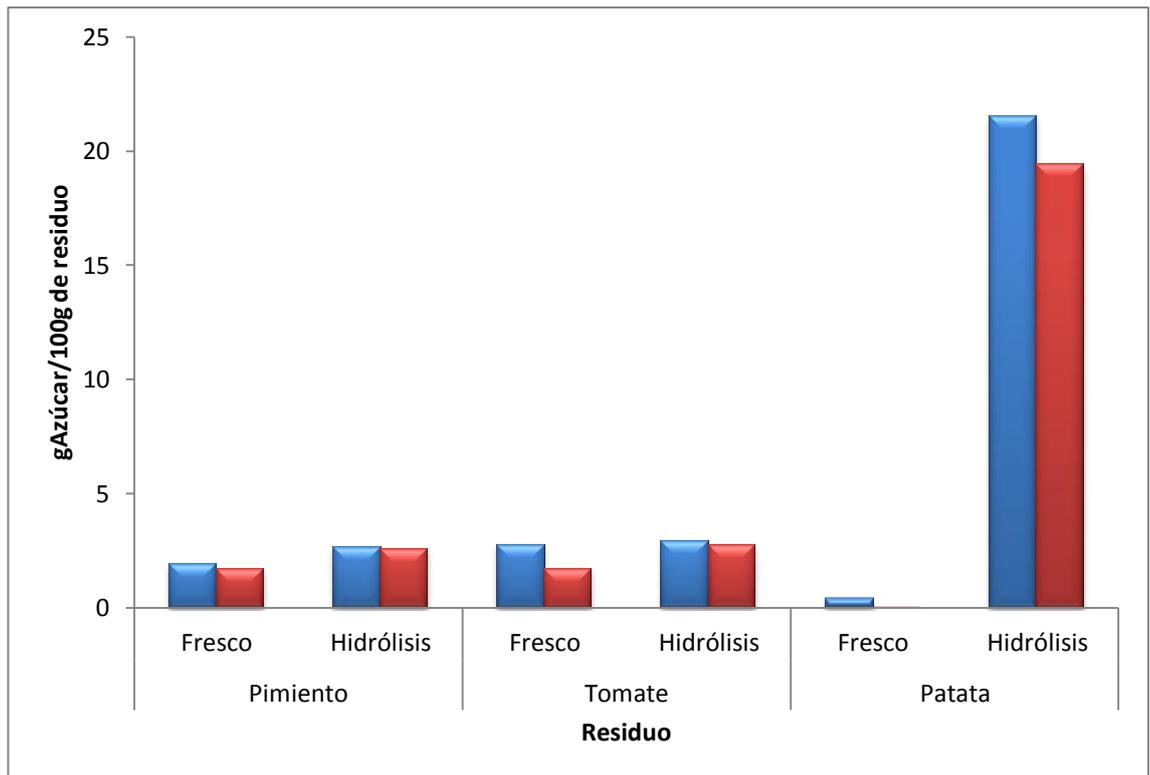


Figura 24. Azúcares totales (azul) y azúcares reductores (rojo) obtenidos a partir de residuos tratados por hidrólisis térmico-enzimática y a partir de los residuos sin tratar. En ambos casos se expresan como gramos de azúcar extraídos por cada 100 gramos de residuo inicial.

#### 4.6- PRODUCCIÓN TEÓRICA DE BIOETANOL

Como se ha descrito anteriormente en el apartado 2.1.3, el fin de pretratamiento de hidrólisis es obtener una fracción líquida fermentable, para producir bioetanol. El balance energético global es la degradación de la glucosa para generar etanol y CO<sub>2</sub>:



Figura 25. Reacción de fermentación alcohólica.

A partir de esta ecuación se deduce que por cada mol de glucosa consumido se producen dos moles de etanol, sin embargo, este rendimiento no es real, ya que no siempre toda la glucosa consumida es convertida en etanol, sino que un porcentaje será utilizado para la síntesis de las estructuras celulares y mantenimiento de la célula. Bajo condiciones ideales se ha estimado una eficacia del proceso de fermentación alcohólica

por *Saccharomyces cerevisiae* del 85%, publicado por Vázquez et al., (2007). La inoculación con *S. cerevisiae*, permite fermentaciones rápidas y fiables, lo que hace sean ampliamente utilizadas a nivel industrial.

Es necesario analizar los resultados que se han obtenido en cuanto a azúcares reductores que van a ser fermentados y así poder evaluar el empleo de los residuos procedentes de la venta de verduras y hortalizas para la producción de bioetanol. Para esta valoración se han seleccionado los resultados obtenidos en la hidrólisis térmico-enzimática, al ser el pretratamiento más favorable, y se ha calculado teóricamente la concentración de bioetanol que podría obtenerse tras el proceso de fermentación alcohólica con *S. cerevisiae*.

Los residuos empleados en este proyecto, a excepción de la patata, poseen un bajo porcentaje de hidratos de carbono con respecto a su composición total. Los caldos obtenidos tras un pretratamiento de hidrólisis térmico-enzimática presentaron concentraciones de azúcares reductores de 1.55 g/L para el pimiento, 1.66 g/L para el tomate y 11.88 g/L para la patata. Con estos residuos, empleando este método y considerando una eficacia en el proceso de fermentación del 85%, las concentraciones de bioetanol que se obtendrían son aproximadamente de un 1% en el caso de la patata y aproximadamente un 0.1% para pimiento y tomate. En ambos casos, se trata de un bioetanol demasiado diluido para el posterior proceso de destilación. La destilación es el proceso que más encarece el precio final del producto ya que supone un gran consumo energético. En la Figura 26 (Galbe et al., 2011), puede observarse la relación entre la concentración del bioetanol y la demanda energética del proceso de destilación llegando a la conclusión de que interesa partir de concentraciones superiores al 4%.

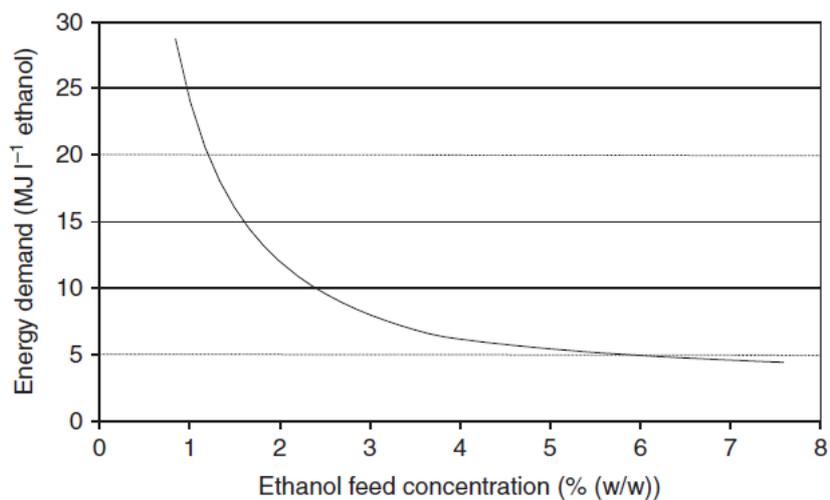


Figura 26. Concentración de bioetanol frente a la demanda energética en el proceso de destilación.

A la vista de estos resultados, la obtención a nivel industrial de bioetanol por esta vía, necesitaría continuar mejorando el método de hidrólisis con el fin de reducir el contenido de agua en el caldo final.

En lo que respecta la fermentación, se hace realmente interesante estudiar otras vías de fermentación diferentes a las proporcionadas por *Saccharomyces cerevisiae* que poseen una mayor eficacia en la conversión de la glucosa a etanol, como el empleo de *Zymomona mobilis* o de mutaciones *Escherichia coli*, como *E. coli* MS04, descrita recientemente por Martínez-Patiño et al., (2015), y que permite eficacias superiores al 90%.

# **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

---

A continuación se resumen las principales conclusiones que se obtienen del desarrollo de este trabajo.

- La hidrólisis térmica a 110°C y la hidrólisis termo-ácida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% no han demostrado, en ningún caso, ser eficaces para aumentar la extracción de azúcares reductores, produciéndose por el contrario una degradación de los azúcares a nivel general.
- La hidrólisis térmica, enzimática y la combinación de ambas han permitido aumentar el contenido de azúcares totales y reductores extraído en todos los casos.
- La hidrólisis térmico-enzimática ha resultado ser el pretratamiento más eficaz para la obtención de caldos con mayor contenido de azúcares reductores frente al material sin tratamiento, incrementándose en 54% para el pimiento y en un 59% para el tomate. El mayor incremento obtenido se observa en la patata aumentando de 0.02 g de azúcares reductores iniciales a 19.45 g de azúcares reductores extraídos por cada 100 g de residuo tras la hidrólisis.
- Las concentraciones de etanol que se obtendrían en el producto final empleando el método de hidrólisis aquí desarrollado son bajas, lo que supondría una alta demanda energética para la destilación. Sin embargo, los resultados son alentadores y el bajo coste de la materia prima hace que la investigación para optimizar aún más el tratamiento de hidrólisis resulte de gran interés.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Agsher, M., Bashir, F. and Nasir Iqbal, H.M. (2014). “*A comprehensive ligninolytic pretreatment approach from lignocelluloses green biotechnology to produce bioethanol*”. Chemical Engineering Research and Design. Vol. 92, pp. 1571-1578
- Aimaretti, N., Ybalo, C., Escorcía, M. and Codevilla, A. (2012a). “*Revalorización de descartes agroindustriales para la obtención de bioetanol*”. INVENIO. Vol. 15 (28), pp. 141-157.
- Aimaretti, N., Ybalo, C., Rojas, M.L., Plou, F.J and Yori, J.C (2012b). “*Production of bioethanol from carrot discards*”. Bioresource Technology. Vol. 123, pp. 727–732.
- APPA (2013). “*Estudio del Impacto Macroeconómico de las Energías Renovables en España*”.
- Balat, M. (2011). “*Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review*”. Energy Conversion and Management. Vol. 52, pp. 858–875
- Barroso Casillas, M. (2010). “*Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de bioetanol en el marco de una biorrefinería*”. Tesis de Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal.
- Bello Gil, D., Carrera Borcourt, E. et Díaz Maqueira, Y. (2006). “*Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico*”. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). N°2.

- Brunshwig, C., Moussavou, W., and Blin, J. (2012). “*Use of bioethanol for biodiesel production*”. *Progress in Energy and Combustion Science*, Vol. 38, pp. 283-301.
- Chen, H. and Qiu W. (2010). “*Key technologies for bioethanol production from lignocellulose*”. *Biotechnology Advances*. Vol. 28, pp. 556–562
- Conde-Mejía, C., Jiménez Gutiérrez, A. and El-Hawagi, M. (2012). “*A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials*”. *Process Safety and Environmental Protection*. Vol. 90, pp. 189–202
- Correa, J.F., Ruiz, A.A and Garrote, G. (2012). “*Estudio del tratamiento hidrotérmico de fruta de banano*”. *Afinidad LXIX*, Vol. 559, Julio – Septiembre
- Cunningham, R.E and López, G.D. (1994). “*Etanol de lignocelulósicos*”. Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de publicaciones e intercambio científico (Campus). Programa Cyted.
- Da Silva Martins, L.H., Candida Rabelo, S and Carvalho da Costa, A. (2015). “*Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse*”. *Bioresource Technology*. Vol. 191, pp. 312–321
- Dagnino, E.P., Roggero Luque, F.S., Morales, W.G., Chamorro, E.R., Felissia, E.E., Área, M.C and Romano, S. D. “*Hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada con ácido diluido para evaluar la eficacia de la etapa de pretratamiento*”. II Jornadas de Investigación e Ingeniería del Nea y países limítrofes.
- Damien, A. (2010). “*La biomasa: fundamentos, tecnologías y aplicaciones*”. AMV Ediciones – Mundiprensa.

- Del Campo, I., Alegría, I., Zazpe, M., Echevarría, M. et Echevarría, I. (2006). *“Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production”*. Industrial Crops and Products. Vol. 24, pp. 214–221.
- Dermirbas, A. (2009). *“Biofuels securing the planet’s future energy needs”*. Energy Conversion and Management. Vol. 50, pp. 2239–2249.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Robers, P.A.; Smith, F. (1956). *“Colorimetric method for the determination of sugars and related substances”*. Anal. Biochem. Vol. 28, pp. 350-356.
- Fonseca Santanilla, E.B. and Marutana Moreno, G.A. (2010). *“Aprovechamiento de los residuos vegetales de una central de abastos para la obtención de etanol”*. Revista Épsilon N.º 14 / Enero – Junio
- Galbe, M., Wallberg, O. and Zacchi, G. (2011). *“Techno-Economic Aspects of Ethanol Production from Lignocellulosic Agricultural Crops and Residues”*. Wastes from Agriculture, Forestry and Food Processing .Capítulo 6.47. Editorial Elsevier.
- García-Camús, J.M. and García Laborda, J.A. (2006). *“Biocarburantes líquidos: biodiésel y bioetanol”*. Informe de vigilancia tecnológica.
- Garzón Castaño, S.C and Hernández Londoño, C. (2009). *“Estudio comparativo para la producción de etanol entre Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y Candida utilis ATCC 9950”*. Tesis de la Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Escuela de Tecnología Química.
- Gerena Baron, F.M. (2013). *“Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscaras de naranja (Citrus sinensis l var valencia) y papa (Solanum tuberosum) variedad Diacol Capiro (R-12) para ser*

*empleados como edulcorantes en la industria de alimentos*". Trabajo de Grado. Universidad Nacional Abierta y a Distancia "UNAD". Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería. Duitama

- Gupta, A. and Prakash Verma, J. (2015). "*Sustainable bioethanol production from agro-residues: A review*". Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 41, pp. 550-567
- Hafit, H.S., Abdul Rahman, N., Md Shah, U.K. and Samsu Baharudin, A. (2015). "*Enhanced fermentable sugar production from kitchen waste using various pretreatments*". Journal of Environmental Management. Vol. 156, pp. 290-298
- Haghghi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G. Hassan Najafi, G., Gholami M and Adrijmand M. (2013). "*Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment*". Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 27, pp. 77-93
- IDAE, (2011). "*Plan de energías renovables 2011-2020*". Instituto para la diversificación y ahorro de la energía.
- Johnson, J., Russ Gesh, M.D.C., Jaradat, A., Mitchell, R., Reicosky, D. and Willhelm, W. (2007). "*Biomass-Bioenergy Crops in the United States: A changing Paradigm*". The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology. Vol. 1, pp. 1-28.
- Martínez-Alcalá Garcia, A. (2012). "*Producción de bioetanol: mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con steam explosión*". Tesis doctoral de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez Patiño, J.C., Romero García, J.M., Ruiz, E., Oliva, J.M., Álvarez, C., Romero, I., Negro, M.J et Castro, E. (2015). "*High Solids Loading Pretreatment of*

*Olive Tree Pruning with Dilute Phosphoric Acid for Bioethanol Production by Escherichia coli*". Energy and Fuels. Vol. 29, pp. 1735-1742.

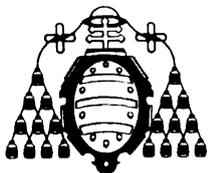
- Montañez, J.L., Victoria, J.C., Flores, R. and Vivar, M.A. (2011). "*Fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber Azul por Zymomonas mobilis y Saccharomyces cerevisiae en la producción de bioetanol*". Información Tecnológica. Vol. 22, núm. 6
- Montes Córdoba, D. (2014). "*Desarrollo de procesos para la obtención de combustibles y productos químicos a partir de biomasa: Producción de Bioetanol a partir de hortalizas residuales*". Proyecto fin de carrera. Universidad de Oviedo. Departamento de Ingeniería Técnica Industrial (Química Industrial).
- Morales, M., Quintero, J., Conejeros, R. and Aroca, G. (2015). "*Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance*". Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 42, pp. 1349–1361
- Nigam, P.S and Singh, A. (2010). "*Production of liquid biofuels from renewable resources*". Progress in Energy and Combustion Science. pp. 1-17
- OCDE-FAO (2011). "*Perspectivas agrícolas 2011-2020*". OECD Publishing y FAO. [http://dx.doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2011-es](http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2011-es)
- Pedraza Berenguer, R.M. (2012). "*Deshidratación de etanol mediante destilación azeotrópica con hidrocarburos componentes de la gasolina. Estudio de la viabilidad del proceso a escala semi-planta piloto*". Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Pérez Jiménez, J.A. (2008). "*Estudio del pretratamiento con agua caliente en fase líquida de la paja de trigo para su conversión biológica a etanol*". Tesis doctoral de la Universidad de Jaén. Departamento de Ingeniería Química Ambiental y de los Materiales.

- Ros, M., Pascual, J.A., Ayuso, M., Morales, A.B., Miralles, J.R and Solera, C. *“Valorización de residuos y subproductos orgánicos de la industria de transformados de frutas y hortalizas”*. Residuos, Vol. 130.
- Ruiz Paredes, R. (2001). *“Hidrólisis enzimática de desechos del umarí (Poraqueiba sericea Tulasne) y de la yuca (Manihot esculenta Crantz)”*. Revista Amazónica de Investigación Alimentaria, Vol.1, Núm.1, pp. 22 – 29
- Salaet Fernandez, S. and Roca Jusmet, J. (2010). *“Agotamiento de los combustibles fósiles y emisiones de CO<sub>2</sub>: algunos posibles escenarios futuros de emisiones”*. Revista Galega de Economía. Vol. 19, Núm. 1
- Sánchez Riaño, A. M., Gutiérrez Morales, A., Muñoz Hernández, J. A. and Rivera Barrero, C.A. (2010). *“Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos”*. Revista Tumbaga. Vol. 5, pp. 61-91
- Saval, S. (2012). *“Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro”*. Biotecnología. Vol. 26, Núm. 2
- SGAPC (2014). *“Diagnóstico del Sector de Residuos en España”*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Publicaciones de SGAPC, Núm. 7
- Sivamukar, G., Vail, D.R., Xu, J., Ge, X. and Weathers, P.J. (2010). *“Bioethanol and bio diesel: Alternative liquid fuels for future generations”*. Engineering in Life Sciences. Vol. 10, núm.1, pp. 8-18
- Tejeda, L., Quintana, Pérez, J and Young, H. (2011). *“Ethanol from waste of pruning by acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis”*. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. Vol. 14(1), pp. 111 – 116

- Torres Martínez, K. (2007). “*Optimización de la etapa de hidrólisis ácida en el proceso de fosfatación de almidón por extrusión para la encapsulación de aceite esencial de naranja*” Tesis doctoral de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería.
- Vargas, F., Domínguez, E., Vila, C., Rodríguez, A. and Garrote, G. (2015). “*Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production*”. Bioresource Technology Vol. 191, pp. 263–270
- Vázquez, H.J. et Dacosta, O. (2007). “*Alcoholic fermentation: An option for renewable energy production from agricultural residues*”. INGENIERÍA Investigación y Tecnología VIII. Vol. 4, pp. 249-259.
- Xu, Z. and Hueng, F. (2014). “*Pretreatment methods for bioethanol production*”. Appl Biochem Biotechnol Vol. 174, pp. 43-62

#### **REFERENCIAS WEB:**

- WEB1 (Marzo, 2015): <http://www.um.es/molecula/indice.htm>
- WEB2 (Abril, 2015): <http://www.biologia.edu.ar/>
- WEB3 (Mayo, 2015): <http://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/>
- WEB4 (Junio, 2015): <http://www.alconoa.com.ar>
- WEB5 (Junio, 2015): <http://www.biodieselpain.com/>
- WEB6 (Julio, 2015): <http://www.ecoserviciosybiomateriales.es>
- WEB7 (Julio, 2015): <http://www.magrama.gob.es>



*UNIVERSIDAD DE OVIEDO*  
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA