



**Centro Universitario de la Defensa
en la Escuela Naval Militar**

TRABAJO FIN DE GRADO

*Obtención de bioetanol de segunda generación a partir de
cáscara de naranja*

Grado en Ingeniería Mecánica

ALUMNO: Guillermo Litrán Rodríguez

DIRECTORES: Rocío Maceiras Castro
Víctor Alfonsín Pérez

CURSO ACADÉMICO: 2016-2017

Universida_{de}Vigo



**Centro Universitario de la Defensa
en la Escuela Naval Militar**

TRABAJO FIN DE GRADO

*Obtención de bioetanol de segunda generación a partir de
cáscara de naranja*

Grado en Ingeniería Mecánica
Intensificación en Tecnología Naval
Cuerpo General

Universida_{de}Vigo

RESUMEN

El uso de petróleo atraviesa una crisis energética sin precedentes no solo por la previsión de existencias, sino por los problemas medioambientales que éste origina. Como solución al problema de esta fuente de energía, surge la alternativa de los biocombustibles. Concretamente, el bioetanol de segunda generación obtenido a partir de residuos de origen alimentario supone una solución viable para el problema energético. Por tanto, en este Trabajo de Fin de Grado se estudia el proceso de obtención de bioetanol, partiendo de cáscara de naranja como materia prima. Además, se analizan los parámetros que afectan a sus diversas etapas, como el pretratamiento, la hidrólisis de carácter ácido y la fermentación utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los mejores resultados, se obtuvieron al realizar 90 minutos de hidrólisis con una relación sólido-líquido 1:4, una concentración de H₂SO₄ al 5%, y 24 horas de fermentación, para obtener 0,0194 mL de bioetanol puro por gramo de materia prima empleada. Finalmente, el bioetanol obtenido fue caracterizado con el fin de comprobar si cumplía las especificaciones para su uso como combustible.

PALABRAS CLAVE

Bioetanol, cáscara de naranja, deslignificación, hidrólisis ácida, fermentación, *Saccharomyces cerevisiae*

AGRADECIMIENTOS

Con el presente trabajo finalizan mis estudios del Grado de Ingeniería Mecánica y llegados a este momento me gustaría transmitir mis agradecimientos a aquellos a quienes considero, no solo durante este trabajo, sino durante todo el período de aprendizaje en la Escuela Naval Militar, que han sido mis fuertes pilares de apoyo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi madre, Pepa, y a mi novia, Cristina, todo el apoyo recibido durante estos años de instrucción y aprendizaje en la Escuela Naval Militar y que me han ayudado tanto en los buenos momentos, como en aquellos en los que los obstáculos parecían más difíciles de superar. Sin ellas, no tengo ninguna duda de que el camino, si no insuperable, habría sido mucho más complicado de lo que ha sido.

Por último y no menos importante, me gustaría agradecer a mis tutores en este trabajo, Rocío Maceiras Castro y Víctor Alfonsín Pérez, toda su ayuda en la realización del mismo. Su trabajo y dedicación a cualquier hora y en cualquier día de la semana, así como los conocimientos que me han transmitido, han hecho que no me encuentre sin rumbo en ningún momento y por ello les estoy muy agradecido.

Muchas gracias.

CONTENIDO

Contenido	1
Índice de Figuras	3
Índice de Tablas	4
1 Introducción y objetivos.....	5
1.1 Situación energética.....	5
1.2 Biocombustibles.....	6
1.3 Tipos de biocombustibles	7
1.3.1 Según su estado físico.....	7
1.3.2 Según su generación	7
1.4 Bioetanol.....	8
1.5 Bioetanol de segunda generación.....	10
1.5.1 Materias primas	10
1.5.2 Técnicas de obtención	11
1.5.2.1 Pretratamiento	11
1.5.2.2 Hidrólisis	11
1.5.2.3 Fermentación.....	12
1.6 Objetivos.....	13
2 Estado del arte	14
2.1 Estudios previos al presente trabajo.....	14
2.1.1 Materia prima	14
2.1.2 Pretratamiento.....	14
2.1.3 Hidrólisis	15
2.1.4 Fermentación	15
2.1.5 Resumen de experiencias realizadas.....	16
3 Desarrollo del TFG.....	18
3.1 Metodología.....	18
3.2 Materia y pretratamiento de la misma	18
3.3 Hidrólisis ácida	19
3.3.1 Centrifugado	20
3.4 Fermentación.....	21
3.4.1 Preparación de un medio inóculo	21
3.4.2 Preparación del concentrado de nutrientes	23
3.4.3 Fermentación	23

3.5 Destilación	23
3.6 Caracterización del bioetanol obtenido.....	25
3.6.1 Contenido en alcohol	25
3.6.2 Densidad	26
3.6.3 Acidez.....	26
3.6.4 Turbidez y coloración.....	27
3.7 Resumen de experimentos llevados a cabo.....	27
4 Resultados y discusión	28
4.1 Influencia de los parámetros de estudio sobre el proceso.....	28
4.1.1 Influencia de la deslignificación.....	28
4.1.2 Influencia del tiempo de hidrólisis	29
4.1.3 Influencia del volumen de ácido.....	29
4.1.4 Influencia de la concentración de ácido	30
4.1.5 Influencia del tiempo de fermentación	31
4.1.6 Influencia de la redestilación	32
4.2 Resumen de resultados.....	33
4.3 Caracterización del bioetanol.....	34
4.3.1 Densidad	34
4.3.2 Acidez.....	34
4.3.3 Turbidez y coloración.....	34
5 Conclusiones y líneas futuras.....	36
5.1 Conclusiones.....	36
5.2 Líneas futuras.....	37
6 Bibliografía.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Consumo mundial de energías primarias	6
Figura 1-2 Fórmula molecular del etanol	8
Figura 1-3 Producción mundial de bioetanol por países	9
Figura 1-4 Bioetanol producido en Estados Unidos desde 1980	10
Figura 3-1 Proceso de obtención del bioetanol	18
Figura 3-2 Analizador de humedad	19
Figura 3-3 Balanza analítica utilizada	20
Figura 3-4 Autoclave de esterilización por vapor	20
Figura 3-5 Centrífuga SIGMA	21
Figura 3-6 Agitador magnético usado	22
Figura 3-7 Agitador orbital	22
Figura 3-8 Airlock usado para fermentación	23
Figura 3-9 Esquema de destilación utilizado	24
Figura 3-10 Manta eléctrica Nahita	24
Figura 3-11 Refractómetro	25
Figura 3-12 Recta de calibrado realizada	26
Figura 4-1 Influencia de la deslignificación	28
Figura 4-2 Influencia del tiempo de hidrólisis	29
Figura 4-3 Influencia del volumen de ácido	30
Figura 4-4 Influencia de la concentración de ácido	31
Figura 4-5 Influencia del tiempo de fermentación	31
Figura 4-6 Influencia de la redestilación en el volumen obtenido	32
Figura 4-7 Influencia de la redestilación en la pureza obtenida	33
Figura 4-8 Test de turbidez y coloración	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Biocombustibles según su estado físico.....	7
Tabla 1-2 Propiedades fisicoquímicas del etanol.....	9
Tabla 1-3 Composición promedio en polímeros de interés de las materias primas.....	10
Tabla 2-1 Experimentos de obtención de bioetanol.....	17
Tabla 3-1 Resumen de experiencias llevadas a cabo.....	27
Tabla 4-1 Parámetros de la experiencia más adecuada.....	32
Tabla 4-2 Resumen de resultados.....	33

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Situación energética

Desde el preciso instante en que comienza la existencia del ser humano, la energía ha sido para éste uno de sus pilares más importantes, si no el que más. Ya en tiempos prehistóricos el hombre se servía del fuego para actividades de las que dependía sin lugar a duda su supervivencia y entre las que se encontraban desde alimentarse hasta la construcción de armas para su protección.

Ha pasado ya mucho tiempo desde entonces pero hoy en día, la energía, así como todo lo concerniente a sus tipos, medios de obtención y ventajas e inconvenientes derivados de su uso sigue siendo uno de los principales asuntos de interés y estudio.

En 1970 la población mundial era de 3.685 millones y desde entonces hasta el año 2015 ha aumentado de manera importante hasta registrarse en nuestro planeta un total de 7.347 millones de habitantes [1]. A lo largo de todo este período, la demanda energética mundial se ha, nada más y nada menos, que duplicado y se espera que para 2040, año en que la población mundial se situará en más de 9.000 millones, aumente otro 30% más [2].

Todo esto ha fomentado la ferviente necesidad por parte del hombre de aumentar el número de energías de las que aprovecharse, así como la forma de optimizarlas para obtener el máximo rendimiento. Esto ha llevado a que el principal sustento de la sociedad de hoy en día, hablando en términos de energía, sea el petróleo.

En la Figura 1-1 [3], se puede observar la matriz actual del consumo mundial de energías primarias, así como su previsión para el año 2040. En ella, a pesar del leve crecimiento que las energías renovables van a experimentar y del también leve decremento que sufrirá el petróleo, queda patente la importancia del papel que juega este último en el ámbito de la energía y que, además, seguirá teniendo en los próximos años. Por tanto, el petróleo continuará siendo, en un período a corto y medio plazo, el principal sustento energético.

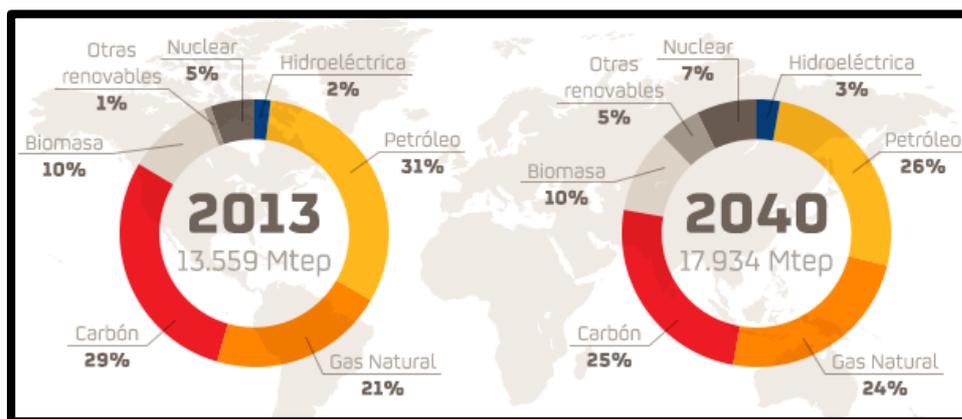


Figura 1-1 Consumo mundial de energías primarias

Por todo ello, resulta de vital importancia abordar los problemas energéticos que de igual forma trae consigo el uso de este recurso. Estos son principalmente tres: medioambientales, de agotamiento de recursos y el de incremento de consumo.

El primero, es el impacto medioambiental tan grande que el uso del petróleo supone. Además, el incremento del consumo de energía ya mencionado causará un aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero, a lo que contribuye de forma generosa el petróleo. Se espera que cerca del 80% del incremento de las emisiones en los próximos 20 años sea causado por los países en desarrollo. Tampoco se debe olvidar que las fuentes de energía como el petróleo, gas, y otros combustibles sólidos tienen una duración de 45, 65 y 200 años respectivamente, con los ritmos actuales de consumo [4, 5].

El problema del agotamiento de los recursos naturales se valora junto al del aumento en los niveles de consumo de energía de los países en desarrollo, teniendo en cuenta el gran incremento de la población del planeta, y junto al impacto ambiental de las fuentes de energía convencionales. Esta valoración, hace que resulte esencial profundizar en la investigación y uso de otro tipo de fuentes de energía que nos permitan resolver, o al menos minimizar estos problemas para alcanzar, en definitiva, un desarrollo mundial sostenible en materia de energía.

A la vista de todos estos problemas, se han tomado medidas en materia de política mundial, encabezadas por organizaciones como la Organización de las Naciones Unidas. Ejemplos de estas actuaciones son la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y Desarrollo de 1992 o la Conferencia sobre el Desarrollo Sostenible de 2012, ambas celebradas en Río de Janeiro [6]. Una de las medidas más conocidas, es la del Protocolo de Kioto. Dicho protocolo tiene lugar en la Conferencia anteriormente nombrada celebrada en 1992. Entre las medidas que se integran en él, está principalmente la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero como el dióxido de carbono (CO₂) o el óxido nitroso (N₂O) que tanto dañan la atmósfera [7].

En medio de esta situación, es donde tiene lugar la entrada en escena de alternativas como los biocombustibles que no solo reducen la dependencia de los países de un producto fuertemente monopolizado, sino que permiten el aprovechamiento de recursos como la biomasa además de suponer una reducción en los niveles de las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) a la atmósfera. Durante los apartados siguientes se tratará de abordar todo lo relativo a esta fuente de energía, en qué consiste, sus tipos y aplicaciones.

1.2 Biocombustibles

Biocombustible es el término con el cual se denomina a cualquier tipo de combustible que derive de la biomasa (nombre dado a cualquier materia orgánica de origen reciente que haya derivado de animales y vegetales). Algunos de estos materiales serían la madera de los bosques, los residuos de procesos agrícolas y forestales, de la basura industrial, humana o animal [8, 9].

La aparición de este material en la historia se remonta hasta finales del siglo XIX, prácticamente junto al uso de los hidrocarburos como fuente de energía. El pensamiento de utilizar aceites de origen vegetal como combustible para motores de combustión interna surge en 1895, año en que el Dr. Rudolf Diésel desarrolla el primer motor diesel. Tan solo unos años después, en 1908, Henry Ford realiza el primer diseño de su automóvil modelo T para el cual espera utilizar el etanol como combustible [10].

Se debería esperar, sin embargo, hasta 1938 para ver por primera vez la utilización de un biocombustible para el transporte público. En dicho año se utilizó biodiesel en la línea de autobús de Bruselas a Lovaina, en el curso de la Segunda Guerra Mundial. En el terreno bélico, los ejércitos no iban a quedarse atrás en este asunto, y los alemanes emplearon también en dicha guerra el biodiesel para mover sus flotas de guerra y los vehículos pesados en el norte de África [10].

Debido a la crisis del petróleo que se vivió en la década de los setenta disminuyó a oferta de biocombustibles y por este motivo aumentó su precio de forma desorbitada. A finales de 1979 es cuando se establece una mezcla de gasolina y etanol volviendo los biocombustibles, al presentarse como una alternativa al alza de los precios del crudo y posible agotamiento de los recursos no renovables. Hoy en día se sigue estudiando e investigando acerca de estos para lograr su máximo aprovechamiento.

1.3 Tipos de biocombustibles

En lo que respecta a esta clase de combustibles, se pueden hacer dos clasificaciones diferentes en cuanto a los tipos que componen la gran cantidad de biocombustibles existentes: en función del estado físico o de la generación. A continuación, se detalla en qué consisten dichas clasificaciones, así como algunos ejemplos dentro de las mismas.

1.3.1 Según su estado físico

La primera de las divisiones que se pueden encontrar de los biocombustibles, los agrupa en función del estado físico en el que se hallen una vez producidos. Estos estados serán el estado sólido, el líquido y por último el gaseoso. En la Tabla 1-1, se recogen algunos de los ejemplos más comunes que se engloban en dicha clasificación.

Sólido	Líquido	Gaseoso
Paja Leña sin procesar Triturados finos Carbón vegetal	Bioetanol Biodiesel Aceites vegetales Aceites de pirólisis	Biogás Gasógeno

Tabla 1-1 Biocombustibles según su estado físico

El uso de biocombustibles en estado sólido no es tan habitual como en los estados líquido y gaseoso. Ejemplo de ello son el bioetanol y el biogás respectivamente, cuyo uso está muy generalizado y son los biocombustibles predominantes hoy en día.

1.3.2 Según su generación

Una segunda clasificación depende del tipo de materia prima mediante la cual se obtiene dicho biocombustible. En ella se integran los distintos biocombustibles en función de las generaciones y es la clasificación más utilizada a la hora de referirse a los diferentes tipos de este material. Dentro de este apartado se engloban hasta cuatro diferentes tipos de generaciones de biocombustibles, que se describen a continuación [11]:

Los biocombustibles de **primera generación** son aquellos que se han producido directamente a partir de cosechas agrícolas, las mismas que se pueden destinar a la alimentación, ya sea del ser humano o de los animales. Esto último, hace que esta generación lleve consigo un alto grado de polémica, dado el problema de hambruna que azota de manera preocupante a un alto porcentaje de la población mundial.

Las principales fuentes de biocombustibles de esta generación son el almidón, el azúcar, las grasas animales y los aceites vegetales y para ello, los principales cultivos son los de maíz, la caña de azúcar y la soja.

Los biocombustibles de **segunda generación**, también conocidos con el nombre de biocombustibles avanzados, se diferencian de los de primera generación, en que los materiales utilizados para su producción no pueden destinarse para alimentación. Un ejemplo de ello serían los residuos alimenticios, tales como residuos de papel o la cáscara de naranja, materia prima objeto de este trabajo. Muchos de los materiales englobados en los biocombustibles de segunda generación tienen altas concentraciones de celulosa y lignina, por lo que se requieren algunos procesos previos a su fermentación con el objetivo de eliminar dicha lignina.

El término biocombustible de **tercera generación**, es algo más reciente que los dos anteriores. Se ha comenzado a aplicar desde hace poco tiempo a aquellos biocombustibles obtenidos a partir de algas o microalgas. Al principio, estos eran denominados también como de segunda generación, pero finalmente se les acabó otorgando una categoría propia ya que su rendimiento era mucho más elevado que los de segunda generación. Las algas pueden llegar a superar los 10.000 m³ de bioetanol producido por km² de materia prima, dato significativamente más elevado que el de la cantidad obtenida, por ejemplo, con la soja, que se encuentra alrededor de los 40 m³/km² [12].

Por último, se encuentran aquellos biocombustibles considerados de **cuarta generación**. Éstos, situarían a los de tercera generación un paso más allá. La clave de estos es la captación y almacenamiento de carbono, tanto a nivel de materia prima como de la tecnología de proceso. El objetivo es, no solo aumentar la eficiencia del proceso, sino también reducir las emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera y con ello ayudar a la reducción del efecto invernadero.

El presente trabajo profundiza en el bioetanol, concretamente, en el proceso de obtención de bioetanol de segunda generación. A continuación, se expondrán con más detalle en qué consiste el bioetanol, en concreto el de segunda generación, sus materias primas, técnicas de obtención y procesos utilizados en la consecución de dicho objetivo.

1.4 Bioetanol

El etanol (C₂H₅OH), es un alcohol primario que en condiciones normales de presión y temperatura se halla en estado líquido. Es obtenido a partir de la fermentación de los azúcares existentes en las diferentes materias primas y puede utilizarse como combustible, por sí solo, o bien mezclado en diferentes proporciones junto a la gasolina convencional. En su estructura presenta dos átomos de carbono unidos a cinco de hidrógeno y un hidroxilo (Figura 1-2).

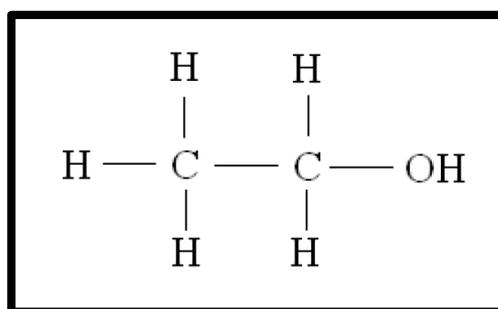


Figura 1-2 Fórmula molecular del etanol

En la Tabla 1-2 [10], se recogen a modo de resumen, algunas de las propiedades fisicoquímicas más importantes de este compuesto químico.

Propiedad	Cantidad
Masa molecular	47,07 g/mol
Densidad	0,789 kg/L
Tª de ebullición	78,5 °C
Punto de fusión	-117 °C
Temperatura de ignición	425 °C
Índice de refracción (25 °C)	1,36
Viscosidad	1.200 mPa·s

Tabla 1-2 Propiedades fisicoquímicas del etanol

La principal fuente de producción de este combustible es la biomasa y esto hace que sea denominado, por su origen, bioetanol. Este producto se encuentra en plena fase de aplicación, habiéndose conseguido ya grandes avances en la mezcla del bioetanol con la gasolina. Así, las dos mezclas más comunes son las denominadas E10 y E85, que poseen contenidos en bioetanol del 10% y 85% respectivamente [13].

La producción mundial de bioetanol está claramente dominada por un pequeño sector de países que casi la monopolizan. Estados Unidos es el mayor productor de bioetanol del mundo, con más de la mitad de la misma y más del doble respecto a Brasil, que se sitúa como el segundo competidor en dicha categoría. En el gráfico de la Figura 1-3 [14], se puede observar la distribución por países, medida en porcentaje, de la producción mundial de bioetanol.

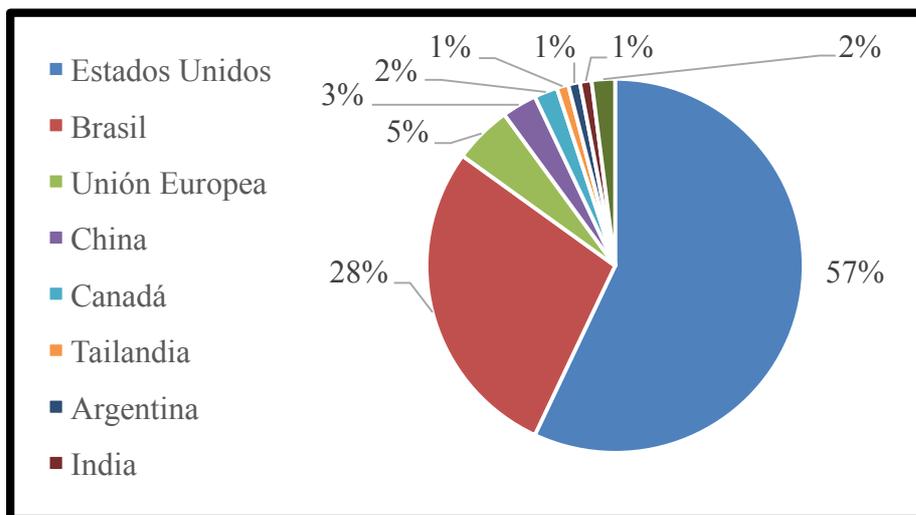


Figura 1-3 Producción mundial de bioetanol por países

Prueba del auge de esta nueva forma de combustible es la evolución de su producción a lo largo de toda la historia. Como se puede observar en la Figura 1-4 [14], la producción en Estados Unidos se ha visto incrementada de forma exponencial en los últimos años. En 2015, la primera potencia en la producción de bioetanol ha aumentado 80 veces la producción desde 1980 y doblado la misma desde el año 2008.

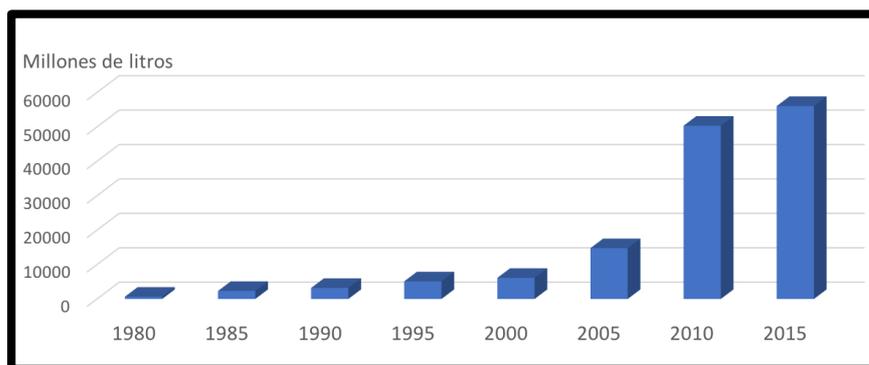


Figura 1-4 Bioetanol producido en Estados Unidos desde 1980

1.5 Bioetanol de segunda generación

1.5.1 Materias primas

La gran mayoría de las materias primas utilizadas para la obtención de bioetanol, se corresponden a productos de biomasa lignocelulósica rica en polímeros de celulosa y de hemicelulosa. Estos productos tienen una difícil degradación, pero gracias al empleo de procesos químicos, físicos y/o biológicos, es posible transformar la celulosa en azúcares monosacáridos para su posterior conversión a etanol.

Los materiales lignocelulósicos son uno de los materiales más abundantes en toda la Tierra. Están compuestos principalmente de tres tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa, con fórmula molecular $C_6H_{10}O_5$, es un componente básico de los materiales lignocelulósicos. Posee una estructura basada en subunidades de D-glucosa unidas por *b-1,4 glucosídicos* y constituye un monosacárido de vital importancia en la fermentación [15].

La hemicelulosa en cambio, $C_5H_8O_4$, es un carbohidrato complejo y heterogéneo, que posee una estructura a su vez formada por diferentes polímeros como pueden ser pentosas, hexosas, azúcares y ácidos. Este polímero sirve de unión y enlace entre la lignina y las fibras de celulosa, para dar así rigidez a toda la red compuesta por la hemicelulosa, celulosa, y lignina [16].

Por último, está la lignina, $C_6H_{11}O_2$, que es un heteropolímero amorfo, no soluble en agua y que tiene una degradación muy complicada. La lignina no puede ser transformada mediante hidrólisis en azúcares fermentables y además puede llegar a actuar como barrera contra la degradación enzimática. Es por esto que en ciertos procesos de obtención de bioetanol se requiera un proceso de deslignificación para optimizar la extracción del mismo.

En base a esto y debido a su composición en azúcares y sustancias lignocelulósicas, los principales productos usados como materia prima a la hora de obtener bioetanol de segunda generación, son la caña de azúcar, la cáscara de plátano, la cascarilla de arroz y desechos cítricos, tales como la cáscara de naranja. En la Tabla 1-3 se puede observar las cantidades promedio que los principales productos utilizados para la extracción de bioetanol contienen de estos tres polímeros.

Material lignocelulósico	%(w/w) Celulosa	%(w/w) Hemicelulosa	%(w/w) Lignina	Referencias
Cascarilla de arroz	39,05	18,1-21,35	22,80	[17]
Bagazo de caña	48,81	24,42	25,82	[18]
Desechos cítricos	20,63	10,86	2,62	[19]
Cáscara de banano	13,2	24,8	14,00	[20]

Tabla 1-3 Composición promedio en polímeros de interés de las materias primas

Como se puede observar, materias primas como el bagazo de caña tienen un alto porcentaje de celulosa, factor clave a la hora de extraer de ella el bioetanol. Si bien es cierto que no solo por este motivo debe ser la mejor materia prima para este objetivo ya que también posee mucha lignina, que como se expuso con anterioridad, dificulta en alto grado la hidrólisis. Desechos cítricos como la cáscara de naranja utilizada en las experiencias del presente trabajo poseen una cantidad moderada de celulosa, sin embargo, presenta la ventaja de su baja concentración en lignina.

1.5.2 Técnicas de obtención

El esquema general de obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos pasa siempre por las siguientes fases: pretratamientos, hidrólisis y fermentación. Ya de forma posterior y mediante un destilado, se recupera el bioetanol extraído. A continuación, se introducirán en qué consisten estas tres fases, así como los distintos tipos de procesos existentes en cada una de ellas.

1.5.2.1 Pretratamiento

Esta etapa es indispensable para acondicionar la materia prima obtenida de la biomasa y que será necesaria para su posterior hidrólisis.

El término pretratamiento no solo hace referencia a los procesos químicos previos que se pueden realizar con objeto de maximizar la extracción de bioetanol. También hace referencia a otro tipo de procesos como pueden ser el secado, donde se puede reducir la humedad de la muestra, o el triturado y molido para la reducción de su tamaño. De esta forma, se diferencian hasta cuatro tipos de pretratamientos a realizar sobre la materia prima: mecánicos, térmicos, químicos y biológicos.

El primero de ellos es el **pretratamiento mecánico**. Un ejemplo de este tipo de proceso podría ser la trituración de la materia prima. También se pueden utilizar ultrasonidos para conseguir extraer parte de la lignina de la muestra. Este tipo de tratamientos producen un efecto superficial en el rendimiento de la extracción de bioetanol [21].

Por otra parte, se tienen **pretratamientos térmicos** que consiguen solubilizar la lignina calentando la materia prima a altas temperaturas. Un ejemplo es la explosión a vapor, donde la materia prima es sometida a elevadas temperaturas (160-260 °C), mediante la inyección de vapor saturado por un intervalo de 1 a 10 minutos. Posteriormente se debe llevar el producto a una descompresión rápida. Con esto se logra una celulosa más accesible para una posterior hidrólisis [22].

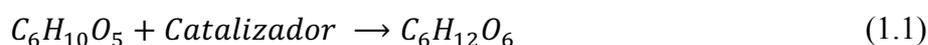
Entre los **pretratamientos químicos**, se encuentran por ejemplo los de deslignificación, que utilizan disoluciones de hidróxido de sodio para la eliminación de la lignina, por ser esta perjudicial debido a los motivos anteriormente expuestos.

Por último, se tienen los **pretratamientos biológicos** cuyo objetivo es el de degradar la lignina y hemicelulosa para de esta forma eliminar las barreras que protegen a la celulosa. Uno de los más utilizados es el tratamiento con hongos que utiliza algunos como los de podredumbre blanca, que son los más eficaces para materiales lignocelulósicos [23].

Una vez que la materia prima está debidamente pretratada, se puede someter a hidrólisis.

1.5.2.2 Hidrólisis

La hidrólisis es un proceso químico que utiliza catalizadores para transformar las cadenas de polisacáridos existentes en la biomasa lignocelulósica (hemicelulosa y lignina) en sus monómeros elementales y lograr así la degradación de la celulosa en azúcares para posteriormente fermentarlos. Este proceso tiene lugar según la siguiente reacción:



Existen además dos tipos de hidrólisis en función del tipo o naturaleza del catalizador:

HIDRÓLISIS ÁCIDA

En este caso, la naturaleza de los catalizadores utilizados es ácida. Este tipo de hidrólisis podría utilizar distintos tipos de ácidos: sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico. A nivel industrial, los únicos utilizados son el ácido sulfúrico y el clorhídrico.

Fundamentalmente existen dos ramas de trabajo en las que se agrupan los métodos para realizar una hidrólisis ácida: aquellos que utilizan ácidos concentrados, con concentraciones de entre el 10 y el 30%, que trabajan a bajas temperaturas (170-190 °C), y los que emplean ácidos más diluidos cuyas concentraciones oscilan entre el 1 y el 5% que requieren temperaturas de trabajo más altas (160-240 °C).

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Este proceso utiliza como catalizador enzimas, denominadas celulasas, para la degradación de la celulosa.

Las enzimas del complejo celulasa usadas para el mecanismo de hidrólisis enzimática son agrupadas en tres componentes diferentes [24]:

- Endo β -glucanasa ó 1,4- β -glucan glucanohidrolasas, que rompen los enlaces β -glucosídicos en forma aleatoria en el interior de las moléculas de celulosa.
- Exo β -glucanasas ó 1,4- β -glucan celobiohidrolasas, que atacan gradualmente las moléculas de celulosa de los terminales no reductores liberando subunidades de celobiosa.
- β -glucosidasas ó celobiosas, que hidroliza celobiosas y celodextrinas de bajo peso molecular (celotriosas y celotetrosas) en glucosa.

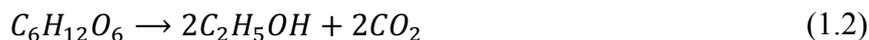
1.5.2.3 Fermentación

La fermentación alcohólica es un proceso biológico de fermentado en ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan hidratos de carbono. Se realiza sobre la celulosa, para posteriormente obtener como producto final etanol.

Existen diferentes tipos de microorganismos que pueden ser utilizados para producir la fermentación. El uso de un tipo u otro, dependerá de algunos factores como pueden ser la velocidad del proceso, temperatura óptima de trabajo y el tipo de sustrato a emplear. Estos tipos de microorganismos son bacterias y hongos, dentro de los segundos la levadura concretamente. Esta última es la más utilizada.

Dentro de las levaduras, la especie predominante responsable de la fermentación alcohólica industrial es la *Saccharomyces cerevisiae*. Este organismo, más comúnmente conocido como la *levadura del panadero o del cervecero*, es un microhongo unicelular que juega un papel fundamental en el mundo de la industria, el medioambiente y la medicina. Ha sido explotado durante miles de años en la fermentación de comida y bebida y es la clave fundamental de los procesos modernos de producción de bioetanol.

En términos de estequiometría, la conversión teórica de glucosa a etanol mediante la fermentación, es la que se puede ver en la ecuación (1.2) [10]:



La fermentación se puede clasificar, según la forma en la que la levadura se añade al proceso, en tres tipos:

De forma discontinua, donde se añade el inóculo al medio que se quiere fermentar y se deja hasta la finalización del proceso. Tiene la ventaja de que es simple y robusta y se consigue la total conversión del sustrato. No obstante, no se realiza el proceso a una tasa de conversión constante.

De forma alimentada, donde se va aumentando la cantidad de nutrientes a medida que se va desarrollando el proceso. Al igual que en la discontinua, no se consigue una conversión lineal del sustrato.

Por último, la fermentación en continuo, donde a diferencia de la alimentada simple, sí que consigue que la fermentación se realice de modo constante en cuanto a ritmo de conversión de la glucosa. El nutriente se añade y se extrae siempre manteniendo igual las tasas de entrada y salida.

1.6 Objetivos

Como objetivo principal de este trabajo, se pretende, de manera experimental en el laboratorio de química de la Escuela Naval Militar, estudiar y optimizar la obtención de bioetanol de segunda generación a partir de residuos de cáscara de naranja. Para la consecución de este objetivo se plantean los siguientes objetivos secundarios:

1. Adquirir un alto nivel de conocimiento, sobre la problemática actual acerca del bioetanol y en qué punto se encuentra la experimentación en este ámbito. Para ello se realiza una búsqueda bibliográfica para conocer las tecnologías disponibles, la metodología del proceso, y una vez seleccionada la tecnología a emplear, establecer las condiciones iniciales de trabajo.
2. Realizar experiencias para la obtención de bioetanol en las que se analizarán las variables que influyen en todas las etapas del proceso: pretratamiento, hidrólisis ácida y fermentación, para observar cómo las mismas afectan al rendimiento de dicho proceso. Se estudiarán dichos parámetros para comprobar cuáles tienen más influencia y los resultados obtenidos se compararán con los obtenidos por otros autores.
3. Realizar la caracterización del bioetanol obtenido, con el fin de determinar si éste cumple las condiciones para ser considerado un biocombustible adecuado, en base a la normativa vigente. Para ello se somete el bioetanol a diferentes ensayos y se comparan los resultados con los datos regulados por dichas normativas.

2 ESTADO DEL ARTE

2.1 Estudios previos al presente trabajo

A lo largo de los últimos años diversos autores han experimentado e investigado acerca de los procesos de obtención de bioetanol de segunda generación a partir de desechos de origen alimentario. Se han ensayado distintas materias primas para la obtención de bioetanol, todo ello con el objetivo investigar no solo su viabilidad, sino además de cómo hacer el proceso lo más óptimo posible.

En el presente capítulo, se expone la situación actual y los últimos avances acerca de proceso de obtención de producción de bioetanol. Esto permitirá sentar las bases de inicio para la fase experimental desarrollada en este trabajo. Los aspectos más importantes a tener en cuenta en la obtención de bioetanol son la selección de la materia, el tipo de pretratamiento, el proceso de hidrólisis y posteriormente la fermentación.

2.1.1 Materia prima

Como se ha descrito anteriormente, el primer paso en la obtención de bioetanol de segunda generación es la selección de la materia prima que se va a emplear para ello. Este parámetro, invariable durante todo el proceso, condicionará el mismo en términos tanto de bioetanol obtenido como de pureza y condiciones del mismo.

Muchas han sido las materias primas utilizadas para maximizar la obtención de bioetanol de segunda generación. Se ha podido comprobar entre diferentes estudios, que la mayor cantidad de etanol fue obtenida a partir del bagazo de la caña de azúcar. Entre los experimentos más importantes, se encuentra el realizado por Abo-State *et al.* [5], que obtuvo 24,9 g de etanol por cada 100 gramos de producto usado, cantidades considerablemente más altas que con otros tipos de materias primas.

Por otra parte, Tsukamoto *et al.* [25] llegó a obtener con la cáscara de naranja tan sólo 18 gramos de bioetanol por gramo de materia empleada mientras que en el realizado Shen *et al.* [26] apenas alcanza los 15 gramos empleando bagazo de sordo dulce como producto de partida.

Son numerosos los estudios de producción de bioetanol a partir de diversas materias primas. El mayor inconveniente de muchas de ellas es la complejidad asociada al pretratamiento de la materia prima, tanto por su naturaleza como por la composición de la biomasa lignocelulósica [27].

2.1.2 Pretratamiento

Como ya se ha descrito en apartados anteriores, la realización de un pretratamiento puede llegar a ser determinante en la obtención de resultados en los experimentos realizados. Así, los más utilizados por los diversos autores han sido los de secado y eliminación de lignina. El primero se realiza

generalmente mediante tratamientos térmicos y tiene como objetivo eliminar la humedad presente en la muestra. La deslignificación en cambio se realiza sumergiendo la materia prima en hidróxido de sodio (NaOH) y busca eliminar la lignina que, como ya se ha descrito, dificulta y en algunos casos impide, el proceso de hidrólisis.

Algunos autores como Emeka *et al.* [28] o Adela *et al.* [29], realizaron dichos pretratamientos consistentes en la deslignificación de diferentes materias primas. Para ello se ayudaron de diferentes disoluciones de hidróxido de sodio (NaOH) y analizaron la influencia de la concentración y tiempo de exposición a la misma y llegaron a la conclusión de que este proceso influye o no dependiendo de la materia prima con la que se trabaje.

Si bien en materias primas como el bagazo de caña o la cascarilla de arroz ha dado mejores resultados, la realización de este proceso no tiene tanta influencia en residuos cítricos como la cáscara de naranja. Por ejemplo, Singh [30] realizó este tipo de pretratamiento sobre cáscara de naranja sin apreciar ninguna mejora significativa en los resultados.

Los desechos cítricos tienen un contenido muy bajo en lignina en comparación con el resto de materias primas y es por esto por lo que es adecuada su selección, a efectos de evitar la etapa del pretratamiento para la eliminación de la lignina.

2.1.3 Hidrólisis

La hidrólisis se presenta como otro de los parámetros sometidos a estudio por muchos autores. El proceso ya descrito, que busca la transformación de la celulosa en glucosa mediante un catalizador, resulta de vital importancia a la hora de obtener bioetanol de productos lignocelulósicos.

No sólo se experimenta con el carácter ácido o enzimático del proceso, factor que resulta más determinante, sino también con factores como los tiempos de exposición a hidrólisis o volúmenes de ácido empleados en la misma.

En estos años, los estudios se han centrado en la hidrólisis enzimática debido a los buenos resultados obtenidos con ésta. Sin embargo, este tipo de hidrólisis presenta ciertos inconvenientes, por ejemplo, que requiere de tiempos mucho más amplios para hidrolizar la materia prima de los que se necesita en la hidrólisis ácida [10].

Hamley-Bennett *et al.* [31] y Khaleghian *et al.* [32] llegaron a alcanzar sus mejores resultados tras 72 horas de hidrólisis con remolacha de azúcar y paja de arroz, respectivamente. Sin embargo, Talebnia *et al.* [33] demostró que con la hidrólisis de carácter ácido se llegan a obtener resultados significativos con tan sólo 15 minutos de duración de proceso a 115 °C y con cáscara de naranja.

2.1.4 Fermentación

La fermentación de la biomasa hidrolizada puede llevarse a cabo de tres maneras descritas anteriormente. Son diversos los factores que afectan a la fermentación de azúcares, como son: el tipo de microorganismo utilizado, la cantidad de inóculo o el tiempo de fermentación.

En cuanto al tipo de microorganismo utilizado, los estudios se centran en determinar que sustancia es la más adecuada y da mejores resultados en este proceso. La fermentación con clara diferencia más utilizada en este tipo de proceso, es aquella llevada a cabo mediante la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. Así ha sido en la gran mayoría de los trabajos experimentales llevados a cabo hasta el momento. Empleando cáscara de naranja como materia prima y después de 24 horas de fermentación con este tipo de levadura, Tsukamoto *et al.* [25] obtuvo en su experiencia valores de pureza de bioetanol superiores al 17%.

Sin embargo y a pesar de esto, Khaleghian *et al.* [32] obtuvo un alto rendimiento de conversión de la glucosa mediante el uso de *Mucor hiemalis*, un microorganismo del reino de los hongos, pero algo

distinto de las levaduras. Sin embargo, el cultivo de este tipo de hongo es mucho más difícil de mantener que el realizado mediante *Saccharomyces cerevisiae*.

Debido a todos los datos acerca de estos estudios, se seleccionan la hidrólisis ácida y la fermentación mediante *Saccharomyces cerevisiae*, como los procedimientos a utilizar en las experiencias de laboratorio para la realización del desarrollo del presente trabajo. La materia prima, no obstante, será pretratada mediante su triturado y secado, procedimientos ya utilizados por Abo-State *et al.* [5], quien obtuvo cantidades de etanol superiores a 0,2 g por cada gramo de materia prima.

2.1.5 Resumen de experiencias realizadas

En la Tabla 2-1, se muestra a modo de resumen, los experimentos más significativos realizados en los últimos años, así como lo referente a sus parámetros de estudio, con el fin de comparar algunos como el pretratamiento, hidrólisis y fermentación para observar cómo se consiguen los mejores resultados en la obtención de bioetanol.

En lo que respecta al pretratamiento, se incluye en la tabla si éste se ha realizado o no y en caso afirmativo, en qué ha consistido el mismo. En la columna sobre la hidrólisis, se indica si es de carácter ácido o enzimático y en lo referente a la fermentación se destaca el microorganismo utilizado para la misma, así como parámetros de interés bajo los que se ha realizado. Por último, se recogen datos acerca del etanol que se ha obtenido, pureza en aquellos en los que ha accedido a dicho dato y referencia de la que se han obtenido cada uno de los experimentos.

A la vista de todos estos estudios y observando qué parámetros o factores tienen más repercusión o menos en la optimización del proceso de obtención de bioetanol de segunda generación, se decide en este trabajo estudiar en el laboratorio la influencia de los siguientes parámetros: existencia de lignina, tiempo de hidrólisis, volumen de ácido sulfúrico empleado en la misma, así como su concentración y el tiempo de fermentación. Para ello se realizarán una serie de experiencias que se describen en el siguiente capítulo, así como la metodología llevada a cabo para realizarlas.

OBTENCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN A PARTIR
DE CÁSCARA DE NARANJA

Materia prima	Pretratamiento	Hidrólisis	Fermentación	Etanol obtenido	Referencia
Rastrojos de maíz	Explosión de vapor	Enzimática usando enzimas termo-activas	<i>S. cerevisiae</i> al 11,50%, 35 °C, 96 h y 1,8 g de inóculo/ 100 mL	33,8 g·L ⁻¹	[34]
Desechos de tallo de Yuca	-	Ácida con ácido clorhídrico (HCl)	<i>S. cerevisiae</i> entre 40 y 50 °C, 8 h y 0,2 g de inóculo/100 mL	2,7 g por cada 15 g de materia prima. 32,4% de pureza	[28]
Caña de azúcar	Deslignificación usando NaOH 1M durante 2 h	Enzimática mediante celulasas	<i>S. cerevisiae</i> . 20 mL de medio por cada 1 g de materia prima. 5 días.	11,8 g·L ⁻¹	[35]
Bagazo de Caña de azúcar egipcia	Triturado y esterilización en autoclave 20 min a 121 °C	Enzimática con <i>Aspergillus terreus</i>	<i>S. cerevisiae</i> a 30 °C, 48 h y 10% en volumen de inóculo	0,249 g de etanol por 1 g de bagazo	[5]
Pulpa de remolacha de azúcar	Calentado con vapor entre 152 y 175 °C y a 4 -8 bar de presión	Enzimática usando celulasa comercial a 50 °C 24 h	<i>S. cerevisiae</i> a 30°C durante 24 h	0,5 g por 1 g de glucosa	[31]
Bagazo de Sorgo dulce	Calentamiento a 200 °C de la muestra impregnada en SO ₂ al 2,5% durante 7,5 min	Enzimática usando celulasa comercial a 50 °C durante 72 h	<i>S. cerevisiae</i> a 30 °C durante 48 h con 3 – 5 g·L ⁻¹ de inóculo	15,3 g por cada 100 g de bagazo	[26]
Paja de arroz	Pretratamiento con Na ₂ CO ₃ 0,5M a 100 °C durante 3 h	Enzimática usando celulasa comercial	<i>Mucor hiemalis</i> a 37 °C durante 72 h y con 1 g de inóculo por 1 L de biomasa	12,8 g·L ⁻¹ . 15,4 g de etanol/ 100 de paja de arroz	[32]
Fruta de palma	Deslignificación en NaOH 0,1M a 100 °C durante 60 min	Enzimática con celulasa a 50 °C durante 72 h	<i>S. cerevisiae</i> a 30 °C, 72 h y con el 10% en volumen de inóculo	12,1 g·L ⁻¹	[29]
Pulpa de café	-	Ácida con H ₂ SO ₄	<i>S. cerevisiae</i> , 30 °C durante 24 h	7,4 g·L ⁻¹	[36]
Cáscara de naranja	Calentamiento con vapor a 200 °C	Ácida con H ₂ SO ₄ , 5% en peso, 115 °C y 15 min	<i>S. cerevisiae</i> durante 24 h	11,9 g·L ⁻¹	[33]
Cáscara de naranja	Triturado. Deslignificación con NaOH 2% en volumen. Esterilizado a 121 °C	Enzimática con celulasa comercial	<i>S. cerevisiae</i> durante 24 h y a 75 rpm	16,3% de pureza	[30]
Cáscara de naranja	Esterilizado a 121 °C durante 15 min	Ácida con H ₂ SO ₄ al 5%	<i>S. cerevisiae</i> durante 15 h a 40 °C	12,97 g·L ⁻¹	[37]
Cáscara de naranja	Triturado en partículas de 2 mm x 2 mm	Ácida con 100 mL de H ₂ SO ₄ al 5%	<i>S. cerevisiae</i> durante 24 h a 30 °C	0,112 g por 1 g de materia prima. 10,7% de pureza	[25]
Cáscara de naranja	Triturado en partículas de 2 mm x 2 mm	Enzimática con mezcla de diferentes enzimas	<i>S. cerevisiae</i> durante 24 h a 30 °C	0,187 g por 1 g de materia prima. 17,9% de pureza	[25]

Tabla 2-1 Experimentos de obtención de bioetanol

3 DESARROLLO DEL TFG

3.1 Metodología

En el presente capítulo se desarrolla y detalla la metodología y procedimiento llevados a cabo con el objetivo de obtener bioetanol a partir de una materia prima consistente en cáscara de naranja.

El proceso de obtención de bioetanol consta de las siguientes fases: pretratamiento de la materia prima, hidrólisis de la celulosa, fermentación y recuperación del etanol (Figura 3-1). La materia prima es, en primer lugar, pretratada para reducir su contenido en humedad y su tamaño. La biomasa ya pretratada es hidrolizada con el fin de liberar las moléculas de azúcar que serán a continuación fermentadas dando lugar al bioetanol. Finalmente, el bioetanol es recuperado y purificado por destilación.

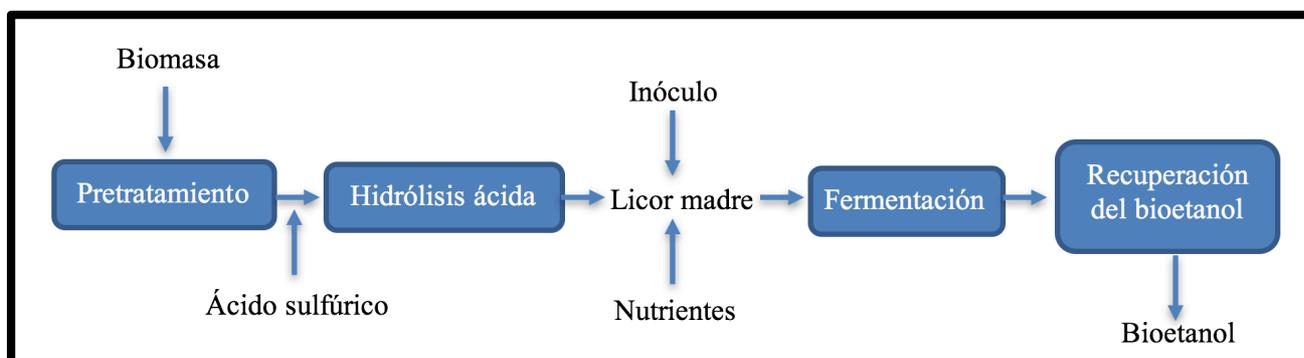


Figura 3-1 Proceso de obtención del bioetanol

A continuación, se explican dichos procesos, así como las etapas necesarias para llevarlos a cabo y los parámetros que en ellas se han variado dependiendo de la experiencia realizada.

3.2 Materia y pretratamiento de la misma

La materia prima necesaria para las experiencias se ha obtenido de los residuos alimenticios originados en la propia Escuela Naval Militar. Estos residuos de cáscara de naranja requieren de una serie de actuaciones previas antes de poder disponer de ellos para su uso en el objetivo de obtención de bioetanol.

Primero se debe proceder al pretratamiento térmico, que consiste en el secado de esta materia prima, con el fin de eliminar el máximo posible de la humedad existente en la misma. Para ello se introdujeron

las cáscaras de naranja durante 48 horas en una estufa marca INDELAB, modelo IDL.AI 36, a una temperatura de 70 °C.

Posteriormente y con el objetivo de aumentar la zona de contacto de la materia prima a la hora de someterla a hidrólisis ácida, es necesario reducir el tamaño de la ésta. Para ello se realiza un tratamiento mecánico mediante el cual se trituran dichas cáscaras con la ayuda de un mortero y una picadora comercial. El tamaño de los trozos utilizados es de aproximadamente 1 cm².

Dado que en todas las experiencias se parte de la misma cantidad de materia prima (50 g), falta por determinar la humedad que, aún después del secado de las cáscaras, queda presente en las mismas. Gracias a este dato se podrá calcular la cantidad de sólido seco existente en una determinada muestra de materia prima. Para ello se mide la humedad de una muestra de 2 g en un analizador de humedad de la marca RADWAG y modelo MA100R (Figura 3-2). Este equipo determina el peso seco que queda tras un proceso de secado con energía infrarroja, a una temperatura de hasta 160 °C, de la muestra previamente pesada y calcula así la humedad de la muestra húmeda introducida.



Figura 3-2 Analizador de humedad

Por otra parte, y con el objetivo de comprobar la influencia de la lignina, en algunas de las experiencias realizadas se ha procedido al pretratamiento de deslignificación. Para ello se introdujo una muestra de sólido previamente triturado en una disolución de 500 mL de NaOH con concentración 0,1 M durante 3 horas. Posteriormente dicha muestra se debe filtrar y lavar con agua para eliminar los restos de NaOH. Finalmente se deja secar durante 24 horas a 80 °C en la estufa.

3.3 Hidrólisis ácida

El tipo de hidrólisis realizada en las experiencias de laboratorio ha sido el de hidrólisis ácida, dadas las ventajas que esta aporta, como los bajos tiempos de proceso. Para crear el medio ácido se ha empleado ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 98% de concentración y densidad 1,03 g/mL de la marca Labkem. Por tanto, se diluirá el ácido sulfúrico en agua destilada hasta alcanzar las concentraciones deseadas, realizándose disoluciones al 5 y al 10% en peso en función de la experiencia realizada.

El siguiente paso será añadir el ácido sulfúrico a la cáscara de naranja. La cantidad de ácido variará según la experiencia realizada (200 mL y 300 mL) manteniéndose constante la cantidad de sólido que será de 50 g, excepto en la última, que se dobla esta cantidad con el fin de obtener una mayor cantidad de volumen, que permitirá su caracterización.

Para realizar tanto esta pesada como las del resto de experiencias, se han utilizado balanzas analíticas de la marca Blauscal (Figura 3-3). Se dispone de dos balanzas, una con precisión de 0,01 g y que puede pesar hasta 600 g y la otra de mayor precisión, 0,005 g, pero que solo puede pesar un máximo de 150 g.



Figura 3-3 Balanza analítica utilizada

Una vez realizada la pesada, se añade el ácido y el sólido a un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se tapa con un tapón de celulosa y se recubre con papel de aluminio, permitiéndose así la entrada y salida de vapor durante el proceso.

El proceso de hidrólisis, así como los de esterilizado llevados a cabo en las diferentes experiencias, se realizan en un autoclave para esterilización a vapor de la marca P Selecta y modelo MED20 (Figura 3-4), con capacidad máxima para 20 litros. En este dispositivo se pueden seleccionar dos temperaturas de trabajo, 121 °C o 134 °C, así como el tiempo deseado de esterilización que va desde 0 a 60 minutos. Para nuestras experiencias se utiliza 121 °C ya que 134 °C es recomendado para sustancias aceitosas. El tiempo de permanencia en este autoclave varía según la experiencia realizada.



Figura 3-4 Autoclave de esterilización por vapor

3.3.1 Centrifugado

Una vez finalizada la hidrólisis, se obtiene una disolución con un alto contenido en azúcares junto con un residuo sólido. La disolución de azúcares debe ser separada del residuo sólido para su posterior fermentación. Para esto, se usa una centrifuga de la marca SIGMA modelo 2-7 (Figura 3-5). Dicho

equipo permite centrifugar a 4000 rpm de velocidad máxima y tiene una capacidad de hasta 200 mL por operación de centrifugado, en cuatro recipientes de 50 mL cada uno. En este caso concreto se ha centrifugado a máxima velocidad durante un tiempo de 6 minutos. Tras esta operación se ha comprobado que el sistema de separación, así como el tiempo y velocidad seleccionados, han sido correctos, ya que sólido y líquido se separan sin dificultad por decantación. A la fase líquida que se separa se la denominará como licor madre. Este licor madre es sobre el que se debe producir la fermentación.



Figura 3-5 Centrifuga SIGMA

El líquido extraído se introduce de nuevo en un matraz de Erlenmeyer de 250 mL. Dado que se ha realizado una hidrólisis de carácter ácida, este licor madre extraído tiene un pH muy bajo (en torno a 1). Se debe entonces ajustar este pH hasta valores que oscilen entre 4,5 y 5, valores escogidos en base a estudios previos [19]. Un pH excesivamente bajo no permite que se produzca la fermentación. Para ajustar dicho pH se utiliza una disolución de 100 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 5M. Para ello, se va comprobando, a medida que se añade el hidróxido de sodio sobre la muestra, la evolución del pH. Este paso debe realizarse con especial cuidado para no convertir la muestra ácida en una excesivamente básica ya que esto sería igualmente perjudicial para el proceso de fermentación posterior.

3.4 Fermentación

En esta etapa, el licor madre obtenido, y en concreto los azúcares que lo forman, son transformados mediante el proceso de fermentación en etanol y dióxido de carbono.

Este proceso tiene lugar por medio de microorganismos, en este caso concreto por medio de la levadura. Para lograr la fermentación del licor madre, se debe crear un medio en el que se inocula la levadura para lograr que este proceso bioquímico se realice de forma satisfactoria. Esto es lo que se denomina medio inóculo. También son necesarios, además de este inóculo, un preparado de nutrientes con el fin de que la levadura pueda llevar a cabo de manera eficaz el proceso de conversión de glucosa a etanol.

Esta base concentrada de nutrientes, en combinación con el medio inóculo, cuya forma de realizarlos se describe a continuación, sientan las bases para conseguir la fermentación de forma adecuada.

3.4.1 Preparación de un medio inóculo

Es de vital importancia realizar el preparado de un inóculo que permita la creación de unas condiciones óptimas para que se produzca la fermentación. Esta disolución está compuesta por glucosa

($C_6H_{12}O_6$), peptona de caseína (Tryptona) y extracto de levadura. Todos estos reactivos son de la marca Labkem.

Para ello, se pesan por separado 3 g de glucosa, 2 g de peptona y 1 g de extracto de levadura que se añaden a 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitados. Para agitar la disolución se utiliza un agitador magnético con placa calefactora de la marca BIPEE, modelo SH-2 (Figura 3-6), que tiene posibilidad de agitar entre 0 y 1600 rpm.



Figura 3-6 Agitador magnético usado

Posteriormente se traspa la disolución a un matraz aforado de 100 mL donde se enrasa a dicha medida con agua destilada. Tras esto, se pasan los 100 mL de disolución a un matraz de Erlenmeyer de 250 mL que se procede a tapar con un tapón de celulosa y papel de aluminio. Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos en el autoclave.

Tras su esterilización y una vez en frío se añaden 2 g de levadura fresca (marca Levanova) y se vuelve a cerrar con tapón de celulosa. A continuación, se introduce durante 24 horas en un equipo agitador orbital de la marca OVAN modelo OL30-ME (Figura 3-7). Este equipo consta de un rango de velocidades de 30 a 220 rpm y posibilidad de establecer también una temperatura de trabajo determinada. Se fijan las condiciones de trabajo en 120 rpm y 30 °C, temperatura la cual se mantienen de forma adecuada los cultivos para su desarrollo.



Figura 3-7 Agitador orbital

Una vez realizado este inóculo, se debe añadir a la disolución que se va a fermentar, una cantidad equivalente al 10% de los mililitros de licor madre obtenidos del proceso de hidrólisis (medidos antes de la adición de NaOH para ajustar el pH.).

3.4.2 Preparación del concentrado de nutrientes

Es fundamental para la fermentación la creación de un medio que contenga los nutrientes que harán posible que ésta se produzca, disolución que estará compuesta por peptona y extracto de levadura.

Se pesan por separado en la balanza analítica 15 g de peptona y 7,5 g de extracto de levadura. Se añaden a un vaso de precipitado con 20 mL de agua destilada, se disuelve con ayuda del agitador magnético con placa calefactora y añadiendo la disolución a un matraz aforado de 50 mL se enrasa con agua destilada hasta alcanzar la marca de los 50 mL. Se traspasa a un matraz de Erlenmeyer de 250 mL y se tapa con un tapón de celulosa y papel de aluminio de la misma forma que en la preparación del medio inóculo para volver a esterilizar a 121°C durante 15 minutos en el autoclave.

Igual que con el inóculo, se añade a la disolución que posteriormente fermentará, una cantidad que ahora es de un 15% de la cantidad de licor madre obtenida en la hidrólisis ácida, también medida antes de la adición de NaOH.

3.4.3 Fermentación

Una vez preparados tanto el medio inóculo como el concentrado de nutrientes, ambos son añadidos al licor madre y mezclados para su posterior fermentación en un matraz de Erlenmeyer. Durante la fermentación se va a generar dióxido de carbono, y para permitir la salida de este gas, sin permitir la entrada de aire al proceso, se instalará una trampa de gas o airlock (Figura 3-8).



Figura 3-8 Airlock usado para fermentación

Una vez realizada la mezcla y cerrado el matraz, se introduce dicho matraz en el agitador orbital a una temperatura de 30 °C, con agitación constante a 150 rpm para que se produzca de forma adecuada la fermentación. El tiempo de duración de la fermentación en dicho orbital, se ha variado según la experiencia realizada.

3.5 Destilación

Una vez fermentado el licor en el interior del orbital, el producto obtenido tras la fermentación se debe destilar para finalmente obtener el bioetanol, objetivo de estas experiencias. Para ello se debe

montar un sistema de destilado (Figura 3-9), para separar el bioetanol del resto de fermentado y se calienta la muestra a una temperatura de entre 70 °C y 80 °C.

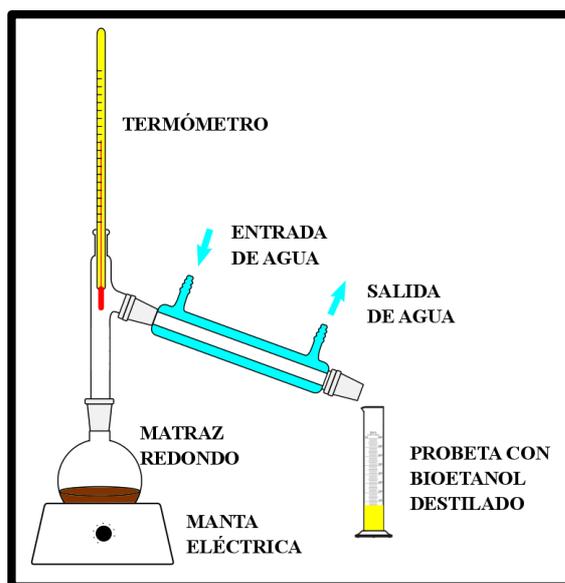


Figura 3-9 Esquema de destilación utilizado

A esta temperatura se evapora el bioetanol, cuya temperatura de ebullición es de aproximadamente 60 °C, quedando en el matraz el agua, que hierve en torno a los 100 °C. De esta forma el líquido resultante de la fermentación se introduce en un matraz de fondo redondo de 250 mL. El vapor de destilado se condensa y es recogido en una probeta.

Para el calentado de la muestra se ha utilizado una manta eléctrica marca Nahita modelo JDG003 (Figura 3-10), que entrega una potencia de 150 W y tiene una temperatura máxima de trabajo de 370 °C.



Figura 3-10 Manta eléctrica Nahita

Es preciso además el uso de un termómetro de mercurio para medir la temperatura de los gases a la entrada del enfriador con el objetivo de controlar en todo momento la temperatura del proceso, siempre teniendo en cuenta que la temperatura en ese punto es menor que en la superficie del líquido donde se está produciendo la evaporación.

Dado que se modificaron parámetros de trabajo en las diferentes experiencias, se procedió a realizar una segunda destilación a aquella cuyos parámetros se comprobaron más adecuados, con el objetivo de comprobar, qué influencia tiene una segunda destilación en el rendimiento del proceso.

Posteriormente, el bioetanol condensado se recoge en una probeta con un embudo y sobre éste, se procede a realizar las pertinentes comprobaciones acerca de la calidad del biocombustible.

3.6 Caracterización del bioetanol obtenido

Una vez extraído el bioetanol a partir de la celulosa residente en la cáscara de la naranja, resulta fundamental evaluar ciertos parámetros para comprobar la calidad del biocombustible obtenido.

No solo se evalúa el contenido en bioetanol que hay en la muestra extraída, sino que se evalúan algunas características del mismo como pueden ser la densidad, acidez, turbidez y coloración. Todo ello atendiendo a las normativas vigentes acerca de los biocombustibles.

3.6.1 Contenido en alcohol

Con el fin de determinar el porcentaje de alcohol obtenido en la muestra se procede a medir el índice de refracción. Para ello se utiliza un equipo refractómetro capaz de medir el mismo. El utilizado es de la marca PCE modelo ABBE-REF1 (Figura 3-11), que mide valores del índice de refracción de entre 1,300 y 1,700.



Figura 3-11 Refractómetro

Este equipo mide el nivel de alcohol existente en una solución acuosa. Sabiendo esto y conociendo que la variación del índice de refracción es linealmente proporcional a la variación de la glucosa, basta con elaborar una recta de calibrado que nos permita interpolar cualquier valor obtenido de dicho instrumento.

Para el cálculo de la recta de calibrado se realizan diferentes muestras con diferentes concentraciones de una disolución de etanol al 98% en agua destilada, con valores que van desde concentraciones del 98% a concentraciones del 0%. Se anotan los valores del índice de refracción para dichas concentraciones y se realiza la recta de calibrado utilizando la herramienta Microsoft Excel mediante el uso de una línea de tendencia.

Posteriormente y a partir de esta recta se puede obtener la pureza de cualquier muestra de bioetanol en función de su índice de refracción. Con el objeto de presentar una mayor precisión y debido a la importancia del cálculo de este parámetro, se ha realizado el cálculo de la recta de calibrado por triplicado, presentando el valor medio. A continuación, en la Figura 3-12, se presenta dicha recta de calibrado.

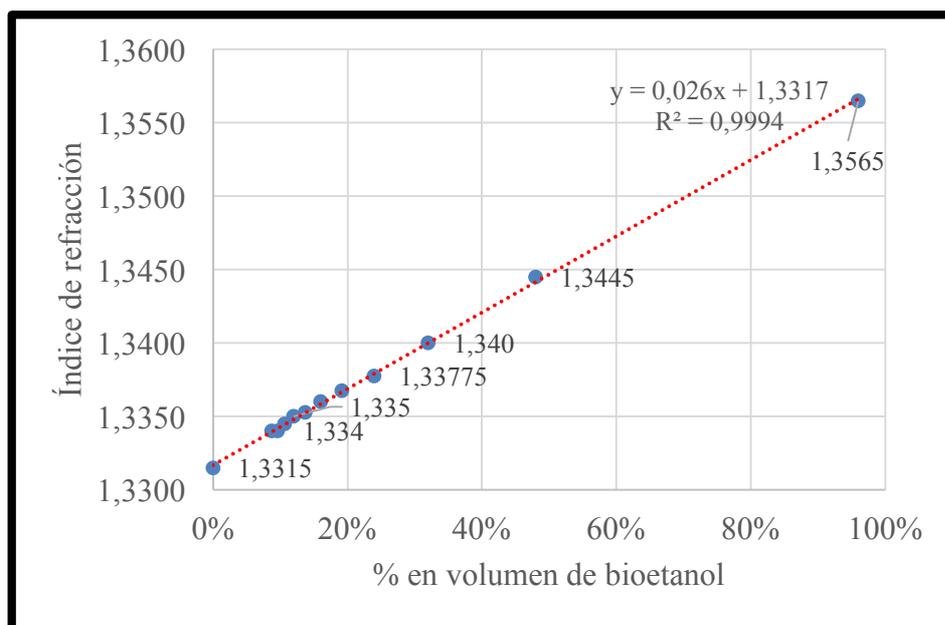


Figura 3-12 Recta de calibrado realizada

Se destaca la precisión de la recta resultante, que posee un coeficiente de variación (R^2) de 0,9994 muy cercano a 1 (valor para una recta perfecta).

3.6.2 Densidad

La densidad que posee el bioetanol obtenido es otro parámetro importante a la hora de determinar la calidad del bioetanol obtenido y cuyos valores están regulados. La densidad que tiene un biocombustible afecta por definición a lo pesado que es el mismo. Los combustibles más pesados hacen que aumente el consumo que el motor hace de los mismos, para obtener el mismo rendimiento.

La norma ASTM 4806 [38] especifica que la densidad del bioetanol no puede ser superior a 0,99 g/mL. Su densidad debe ser medida a una temperatura de 15 °C. Para ello se ha enfriado previamente hasta alcanzar dicha temperatura. Tras esto y para la medición de densidad, se utiliza un picnómetro de 10 mL. En primer lugar, este debe ser pesado y posteriormente se rellena con 10 mL del bioetanol extraído, realizando una nueva pesada en la balanza analítica.

Una vez conocido el peso del picnómetro, tanto vacío como con los 10 mL de bioetanol, resulta fácil calcular la densidad que esa cantidad de líquido posee. El resultado se expresará en gramos por mililitro (g/mL).

3.6.3 Acidez

Otro parámetro fundamental es el del índice de acidez, cuyos valores máximos que no debe superar están regulados en la norma UNE-EN 15491 [39]. Este factor es importante ya que un índice de acidez podría producir mayor corrosión, desgaste y depósitos en un motor.

Para la determinación de la acidez del bioetanol se utiliza la normativa UNE-EN 15491 [40]. En ella queda definida la acidez total como la calculada con ácido acético, determinada mediante valoración con indicador de color.

Siguiendo la norma, se añaden 5 mL de agua destilada a un matraz de Erlenmeyer de 25 mL, añadiendo además dos gotas de fenolftaleína para su valoración. Posteriormente se añaden al mismo matraz 5 mL de bioetanol. Se valora la muestra con una disolución de hidróxido de potasio (KOH) con una concentración de 0,01 mol/L. Cuando la muestra torna a un tono rosado indica que ha tenido lugar el final de la valoración. Una vez hecho esto, solo queda aplicar la ecuación 3.1 recogida en la norma y que se muestra a continuación.

$$A_s = \frac{VC \times 0,12}{\rho} \quad (3.1)$$

donde

C es la concentración, en moles por litro, de la solución de hidróxido de potasio.

V es el volumen, en mililitros, de la solución de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar la porción de ensayo.

ρ es la densidad a 15 °C, en gramos por mililitro, de la porción de ensayo.

Con esta ecuación se calcula el grado de acidez de la muestra y el resultado es expresado en tanto por ciento en peso.

3.6.4 Turbidez y coloración

Un indicativo más de la calidad de un combustible, resulta tanto su color como si presenta o no un aspecto turbio. Se trata de uno más de los parámetros de corte que debe superar un combustible, en concreto el bioetanol antes de ser aprobado como tal.

En la norma UNE-EN 15769 [41] se definen turbidez y coloración como el grado de opacidad de un fluido y la ausencia de turbidez del mismo respectivamente. Para medir estos dos parámetros se utiliza el método visual recogido en esta norma, la cual exige que los combustibles de automoción sean claros y transparentes, lo cual implica la ausencia de partículas y turbidez, respectivamente.

Para evaluar el color del combustible y su turbidez se utilizan dos tubos de ensayo, uno con bioetanol y otro con agua destilada. Se sitúan ambos cilindros sobre un fondo blanco y se compara del carburante con el agua, tanto su coloración como su turbidez. El proceso debe ser repetido sobre fondo negro y se expresa el resultado como muestra limpia o turbia, en referencia a la turbidez y como coloreada o incolora, en términos de coloración.

3.7 Resumen de experimentos llevados a cabo

En este trabajo y con el fin de analizar la influencia de varios factores en el proceso de obtención de bioetanol, se han realizado un total de 9 experiencias. En la Tabla 3-1, se puede observar, todas las experiencias realizadas en el presente Trabajo de Fin de Grado, así como las condiciones de cada una de ellas, clasificadas por el orden en que fueron realizadas.

Resumen de experiencias						
Número de experiencia	Materia prima (g)	Deslignificación	Tiempo de hidrólisis (min)	Volumen de ácido (mL)	Concentración de ácido (%)	Tiempo de fermentación (h)
1	50	Sí	15	200	5	24
2	50	No	15	200	5	24
3	50	No	30	200	5	24
4	50	No	60	200	5	24
5	50	No	90	200	5	24
6	50	No	90	300	5	24
7	50	No	90	200	10	24
8	50	No	90	200	5	48
9	100	No	90	400	5	24

Tabla 3-1 Resumen de experiencias llevadas a cabo

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Influencia de los parámetros de estudio sobre el proceso

En el presente capítulo se recogen todos los resultados obtenidos de las experiencias de laboratorio para el proceso de obtención de bioetanol a partir de cáscara de naranja. Los resultados obtenidos experimentalmente son tratados y analizados a continuación. Dichos parámetros fueron los siguientes: realización o no del pretratamiento de deslignificación, tiempo de hidrólisis, volumen de ácido y concentración del mismo y tiempo de fermentación. Por último y con los anteriores fijados, se estudió también la influencia que tendría una segunda destilación.

4.1.1 Influencia de la deslignificación

La presencia de lignina, debido a que puede formar una barrera en contra de la degradación de la celulosa, podría ser uno de los factores importantes en cuanto a la obtención de bioetanol. Por este motivo, se decide realizar estudiar la influencia que tiene la presencia de lignina en la obtención de bioetanol. Para ello, se realizaron dos las experiencias 1 y 2, cuyas condiciones se han mostrado en la Tabla 3-1. Ambas, exactamente en las mismas condiciones, con la excepción de que a una de ellas se le ha realizado un proceso de deslignificación. Tal y como se observa en la Figura 4-1, se obtuvieron resultados iguales, en ambos casos en torno al 3% de pureza, para las dos experiencias.

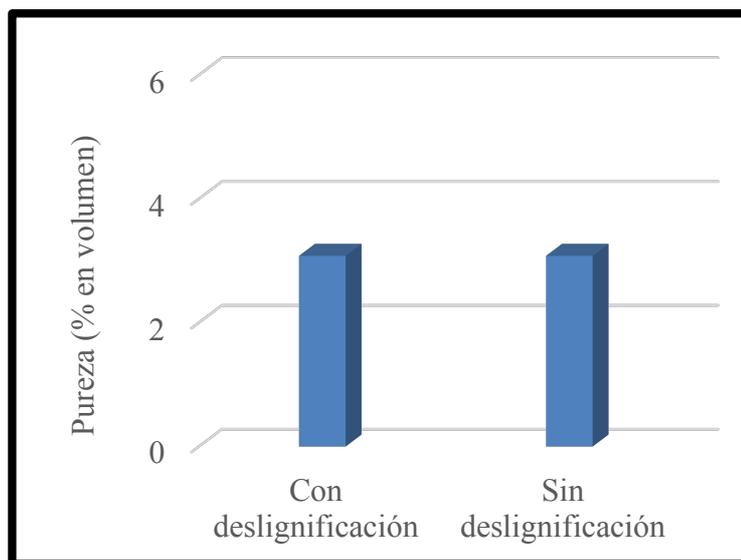


Figura 4-1 Influencia de la deslignificación

En base a esto, se determina que el pretratamiento de deslignificación en los desechos cítricos carece de influencia bajo las condiciones ensayadas. En base a los resultados obtenidos, se podría decir que, debido al bajo contenido en lignina de este tipo de materia prima, no supone mejora alguna la realización de este proceso.

Este resultado coincide con el de Singh [30], que realizó una serie de ensayos para estudiar la influencia de la lignina y determinó que no tiene ningún efecto debido a la baja presencia de lignina en la cáscara de naranja [19].

Por tal motivo, las experiencias realizadas para el estudio de las variables de hidrólisis y fermentación se realizan sin el pretratamiento de deslignificación.

4.1.2 Influencia del tiempo de hidrólisis

El tiempo al que se somete la muestra para hidrólisis resulta un factor determinante en la obtención de bioetanol. Talebnia *et al.* [33] comprobó que mejoraban los resultados obtenidos para tiempos de una hora de hidrólisis respecto a los obtenidos con tan solo 15 minutos de proceso.

Por este motivo se decidió estudiar la influencia que este factor tiene sobre el rendimiento del proceso. Para la consecución de este objetivo, se llevaron a cabo las experiencias 2, 3, 4 y 5, cuyas condiciones se recogen en la Tabla 3-1, y en las cuales se utilizaron 4 tiempos diferentes de hidrólisis: 15, 30, 60 y 90 minutos.

En la Figura 4-2, se pueden observar los resultados de la pureza del bioetanol obtenido para las diferentes experiencias realizadas en función del tiempo. En ella se puede ver que el tiempo de hidrólisis tiene una elevada influencia en la calidad del bioetanol producido.

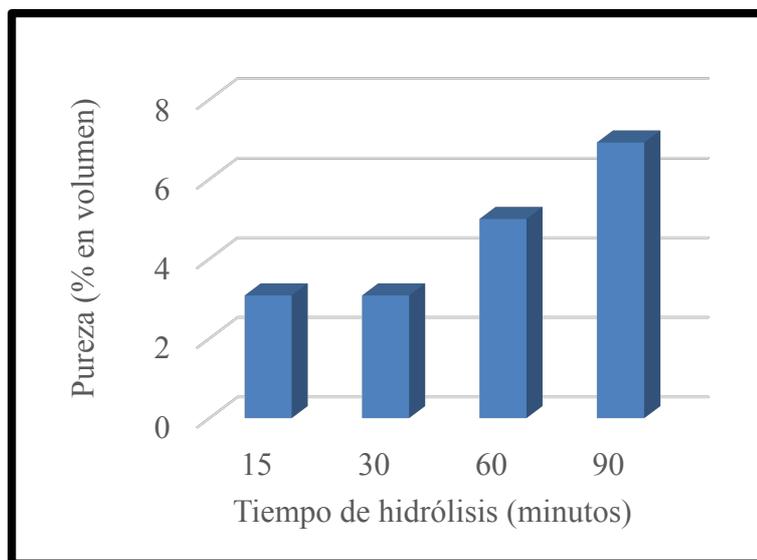


Figura 4-2 Influencia del tiempo de hidrólisis

A la vista de los resultados obtenidos, se puede decir que se alcanza el mayor porcentaje de pureza transcurridos 90 minutos de hidrólisis. Teniendo en cuenta estos resultados, las siguientes experiencias se realizarán fijando el parámetro del tiempo de hidrólisis en 90 minutos, con el objetivo de optimizar resultados.

4.1.3 Influencia del volumen de ácido

Una vez determinado el tiempo más adecuado para la hidrólisis, se analizó la influencia que podría tener el volumen de ácido sulfúrico en el rendimiento del proceso. Para ello se realizaron los experimentos 5 y 6, cuyas condiciones se detallan en la Tabla 3-1, en las que se varió el volumen de

ácido añadido para realizar la hidrólisis. En uno de los dos ensayos se añadieron 200 mL de ácido, y en el otro se aumentó esta cantidad hasta alcanzar los 300 mL.

En la Figura 4-3 se detallan los resultados de la pureza para el bioetanol obtenido, en función de la cantidad de ácido utilizado en dichas experiencias.

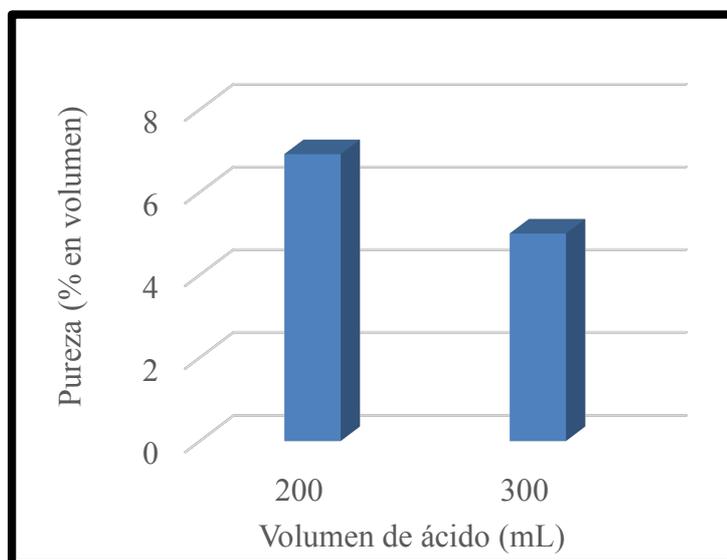


Figura 4-3 Influencia del volumen de ácido

Se observó que el aumento de la cantidad de ácido sulfúrico, no solo no repercute en la mejora del rendimiento, sino que produce una disminución en el mismo, haciendo que descienda ligeramente la pureza del bioetanol obtenido. Esto puede ser debido a que, superada una determinada cantidad de catalizador para la hidrólisis, y una vez que la conversión de celulosas en glucosas está completa, el sobrante de ácido conlleva la pérdida de propiedades en esta glucosa y por tanto la disminución del rendimiento [42].

Algunos autores como Jorgensen *et al.* [43] comprobaron que aumentando el volumen por encima de los 150 mL se mejora el rendimiento. En concreto este autor obtuvo sus mejores resultados con un volumen de 250 mL por cada 50 g de materia prima.

Debido a estos resultados, a partir de esta experiencia se fija la cantidad de H₂SO₄ utilizada en la hidrólisis en 200 mL.

4.1.4 Influencia de la concentración de ácido

Además de la cantidad de ácido empleado en la hidrólisis, se ha comprobado la influencia de la concentración en este proceso. Singh *et al.* [37] obtuvo los mejores resultados con cáscara de naranja para un 5% de concentración, por ello se decide partir de este dato en todas las experiencias y comprobar en la siguiente si el aumento de este parámetro conlleva una mejora en los rendimientos.

En base a esto, se realizaron se realizaron las experiencias 5 y 7, cuyas condiciones se recogen en la Tabla 3-1. El único parámetro en el que difiere una experiencia de la otra es la concentración del H₂SO₄, que mientras que para la primera es del 5%, para la segunda se eleva este valor hasta el 10%. En la Figura 4-4 se observan los resultados para estas dos experiencias.

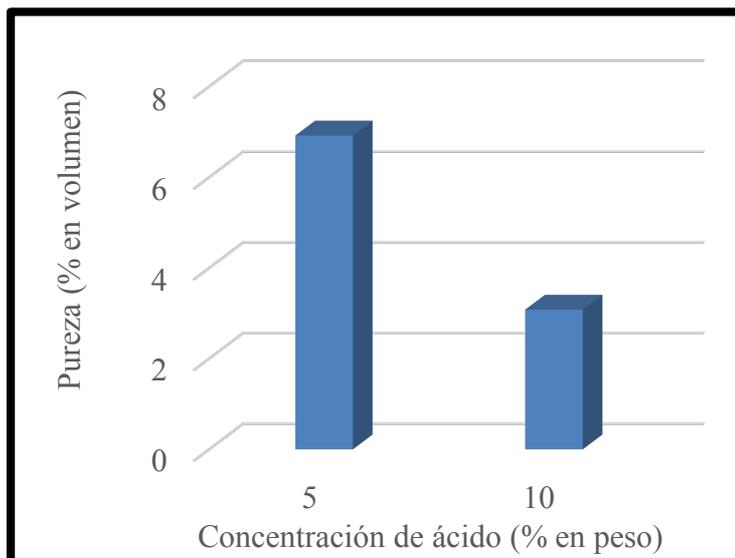


Figura 4-4 Influencia de la concentración de ácido

Al igual que lo ocurrido al aumentar la cantidad de ácido, aumentando la concentración del mismo, se redujo considerablemente la pureza del bioetanol obtenido. Como ocurre con el volumen de catalizador, su concentración también es susceptible de disminuir la calidad de los resultados, si ésta es demasiado alta o supera un valor determinado [42].

Debido a esto, para experiencias sucesivas, se fijó el valor de la concentración de ácido en 5%.

4.1.5 Influencia del tiempo de fermentación

Por último, una vez establecidas las condiciones referentes a la hidrólisis, se estudió la influencia del tiempo de fermentación con el fin de mejorar la calidad del bioetanol obtenido. Se conoce que, dependiendo de este parámetro, pueden variar los resultados de obtención de bioetanol. Singh *et al.* [37] realizó experiencias para 15 horas y Tsukamoto *et al.* [25] mejoró estos resultados aplicando 24 horas.

A partir de los resultados de estos autores, se realizó una experiencia para tiempo de fermentación de 24 horas y otra adicional de 48 horas. En la Figura 4-5 se muestran los resultados comparativos de ambos casos en lo referente a este factor y referidos a la pureza del biocombustible obtenido (experimentos 5 y 8, cuyas condiciones se pueden ver en la Tabla 3-1).

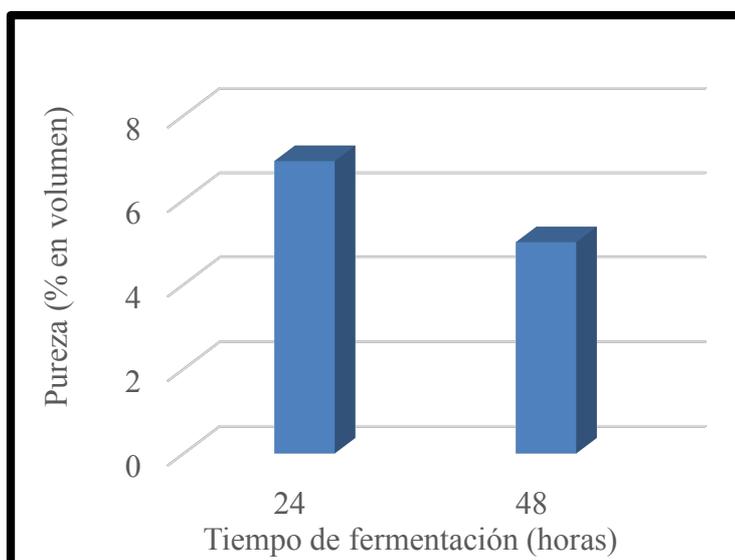


Figura 4-5 Influencia del tiempo de fermentación

Se observa que con 48 horas de produce una pérdida del rendimiento y por eso se decide utilizar 24 horas.

De esta forma, quedaron fijados todos los parámetros para conseguir el resultado más adecuado en la obtención de bioetanol en función de las variables analizadas. En la Tabla 4-1, se muestran a modo de resumen los resultados de la experiencia más favorable según los factores fijados, para la que finalmente se obtuvieron 0,114 gramos de bioetanol al 8,85% de pureza.

Deslignificación	Tiempo de hidrólisis	Volumen de ácido	Concentración de ácido	Tiempo de fermentación
No	90 min	200 mL	5%	24 h

Tabla 4-1 Parámetros de la experiencia más adecuada

4.1.6 Influencia de la redestilación

Con el fin de mejorar la concentración del bioetanol obtenido, se ha analizado la influencia de la redestilación con el fin de disminuir el contenido de agua de la muestra y con ello mejorar su calidad.

Debido a que las cantidades obtenidas en las experiencias anteriores no permiten la redestilación, se procedió a realizar una última experiencia (experimento 9, Tabla 3-1), bajo las mismas condiciones que en la primera destilación, pero en este caso duplicando la cantidad de materia prima utilizada (100 gramos) y por tanto la de ácido (400 mL), con el objetivo de obtener una cantidad mayor de volumen que posibilitara llevar a cabo la redestilación. Se lograron recoger tras 2 horas y media de destilación un volumen total 45 mL de bioetanol y aunque los primeros 10 mL eran de una pureza más alta, dado el gran tamaño de la muestra total, ésta contenía en su conjunto un 3,08% de pureza.

Tras llevar a cabo un proceso para redestilar el bioetanol obtenido, inevitablemente se produjo una disminución significativa en el tamaño de la muestra, como se puede observar en la Figura 4-6.

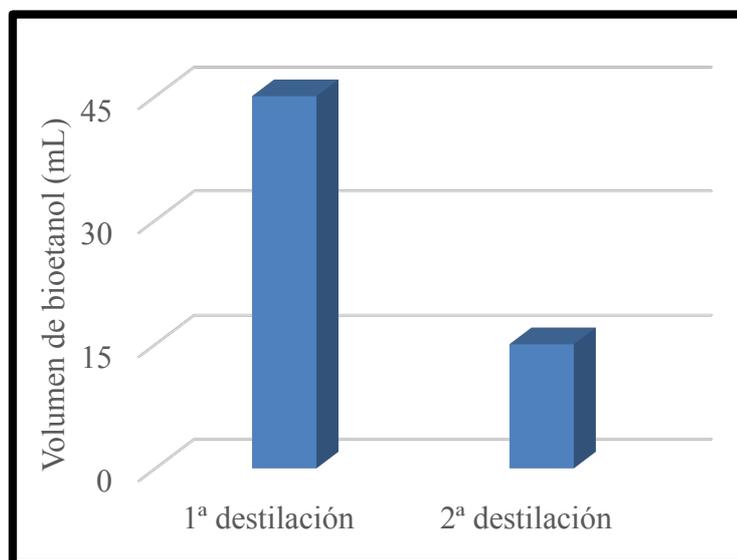


Figura 4-6 Influencia de la redestilación en el volumen obtenido

Sin embargo, de apreció un aumento significativo en la pureza. Se partía de un 3,08% y se consiguió una mejora en la misma de más de un 5%. En la Figura 4-7 se muestran los resultados comparativos de la pureza, antes y después del proceso de redestilación.

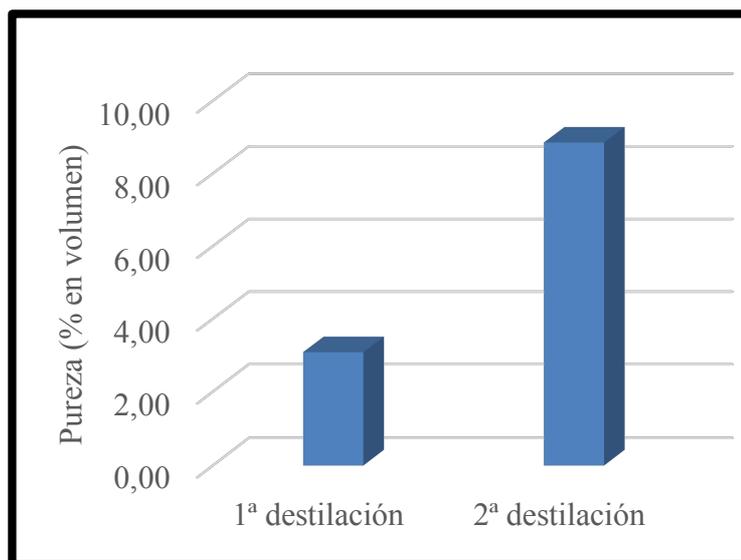


Figura 4-7 Influencia de la redestilación en la pureza obtenida

En resumen, tras el proceso de redestilación se consiguió obtener 15 mL de bioetanol con una pureza del 8,9%. Tras calcular la densidad del bioetanol y realizar la conversión del volumen, se comprueba que se obtuvieron 0,146 gramos de bioetanol por cada gramo de materia prima empleada, resultados muy similares a algunos de los experimentos expuestos en el apartado 2.1, como el realizado por Tsukamoto *et al.* [25], que obtuvo 0,112 g de bioetanol por gramo de materia prima con el 10,7% de pureza.

4.2 Resumen de resultados

En la Tabla 4-2, se pueden observar los datos de pureza y rendimiento volumétrico obtenidos de todos y cada uno de los experimentos. El volumen extraído por gramo seco de materia prima ha sido calculado conociendo la humedad presente en la muestra usada en cada una de las experiencias.

Número de experiencia	Pureza (% en volumen)	Cantidad extraída (mL de bioetanol puro/g materia prima seca)
1	3,08	0,0163
2	3,08	0,0177
3	3,08	0,0178
4	5,00	0,0178
5	6,92	0,0176
6	5,00	0,0176
7	3,08	0,0176
8	5,00	0,0176
9	8,85	0,0194

Tabla 4-2 Resumen de resultados

Se observa que los mejores resultados en cuanto a la extracción de bioetanol se dieron en el experimento número 9, que fue el realizado en condiciones óptimas y efectuando segunda destilación.

4.3 Caracterización del bioetanol

Una vez analizada la influencia de los diferentes parámetros para la obtención de bioetanol, se ha procedido a la caracterización del mismo para el caso óptimo. La caracterización del bioetanol ha consistido en realizar comparaciones con los valores de la normativa acerca de la densidad, acidez, turbidez y coloración.

A continuación, se presentan los resultados de esas mediciones, así como el análisis de los mismos, atendiendo a la norma UNE-EN 15376 [39], que regula y limita las características que el bioetanol utilizado para la automoción debe tener.

4.3.1 Densidad

La densidad es un factor importante a la hora de ver la calidad de un combustible ya que afecta al rendimiento del motor. Según la norma ASTM 4806 [38], la densidad del bioetanol no debe superar nunca los 0,99 g/mL.

Se ha calculado la densidad mediante el proceso descrito en el apartado 3.6.2, obteniendo el valor de 0,9784 g/mL, y por tanto se puede concluir que, al estar dentro de los márgenes, cumple la normativa vigente.

4.3.2 Acidez

La acidez resulta un dato importante para un biocombustible, ya que un elevado valor del mismo podría producir desgastes, como la corrosión, en el motor que lo utilice.

Se calculó la acidez del bioetanol mediante el procedimiento recogido en la norma UNE-EN 15491 [40]. Se calculó su valor aplicando la fórmula descrita en la ecuación 3.1 del apartado 3.6.3, y el resultado fue del 0,00596%.

Atendiendo a la norma [39], que indica que el valor de la acidez del bioetanol nunca deberá ser superior al 0,007%, se determina que el bioetanol extraído cumple con las especificaciones fijadas por la normativa, en términos de acidez.

4.3.3 Turbidez y coloración

Se realizó el ensayo con el método visual recogido en el apartado 3.6.4, que utilizaba la comparación del bioetanol con agua destilada sobre fondos blanco y negro, para la determinación de estos dos parámetros. En la Figura 4-8 se pueden observar las muestras de bioetanol y agua destilada sobre los fondos blanco y negro respectivamente.



Figura 4-8 Test de turbidez y coloración

A la vista de los resultados de este test y en comparación con el agua destilada se concluye que, aunque la muestra de bioetanol es limpia y que no contiene partículas en suspensión, presenta una ligera coloración. Por esto se concluye que cumple el requisito de turbidez, pero no el de la coloración, de acuerdo con la normativa vigente.

5 CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

5.1 Conclusiones

En el presente trabajo, se ha llevado a cabo el estudio del proceso de obtención de bioetanol de segunda generación utilizando cáscara de naranja como materia prima. Se han analizado de forma individualizada las etapas implicadas en el proceso, que corresponden a: pretratamiento del material lignocelulósico, hidrólisis ácida con ácido sulfúrico, fermentación final del licor madre utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, destilación del bioetanol y su posterior caracterización.

Las principales conclusiones obtenidas, para cada una de las etapas son las siguientes:

Etapas de pretratamiento:

1. Se han estudiado los efectos de la eliminación de la lignina mediante hidróxido de sodio en una posible etapa de pretratamiento. Se ha determinado que este tipo de proceso no es influyente en el rendimiento de proceso estudiado, posiblemente debido al bajo contenido en lignina de la materia prima objeto de estudio.

Etapas de hidrólisis ácida:

2. Se ha analizado la influencia del tiempo de hidrólisis en la calidad del bioetanol obtenido. En función de los resultados obtenidos, se puede concluir que el tiempo más adecuado para someter a hidrólisis la cáscara de la naranja es de 90 minutos.
3. En cuanto a la cantidad de ácido añadida para llevar a cabo el proceso, se concluye que la cantidad óptima para el barrido de experiencias realizadas, es de 200 mL por cada 50 gramos de cáscara de naranja triturada, es decir, una relación sólido-líquido 1:4. A partir de este valor y según se aumenta, se comprueba un claro descenso del rendimiento de proceso.
4. Los resultados obtenidos en cuanto al estudio de la concentración de ácido sulfúrico, permiten concluir que la misma debe ser del 5% en peso. Al aumentar este valor, se observó una disminución significativa en el rendimiento del proceso de obtención de bioetanol.

Etapas de fermentación:

5. En cuanto a la etapa de fermentación se concluyó que el tiempo más adecuado para llevar a cabo la fermentación de la glucosa y su conversión en etanol, es de 24 horas. Tiempos por encima de estos, repercuten en una disminución significativa del rendimiento de la reacción.

Etapa de destilación:

6. La repetición o no del proceso de destilación fue también objeto de estudio. Respecto a esto, se pudo comprobar que la realización de una segunda destilación del bioetanol obtenido repercute en una mejora de la pureza existente en la muestra. Si bien es cierto que, tras esta segunda destilación, el volumen total de la muestra se reduce considerablemente. Se debe buscar el compromiso entre la pureza y volumen deseados para definir de forma precisa el número de destilaciones a realizar.

Etapa de caracterización del bioetanol:

7. Una vez obtenido el bioetanol a partir de la cáscara de la naranja, se comprobó que dicho bioetanol cumple las condiciones de densidad, acidez y turbidez especificadas por la normativa para los combustibles consistentes en bioetanol. De la misma forma, el mismo no cumple los requisitos mínimos en cuanto a coloración. Este bioetanol deberá ser sometido a procesos de adecuación si se quiere utilizar con fines energéticos ya que el obtenido en el laboratorio, no constituye de por sí un biocombustible adecuado para su uso.

Como conclusión final del presente trabajo puede decirse que el proceso utilizado en la obtención de bioetanol de segunda generación a partir de material lignocelulósico (cáscara de naranja), ha sido satisfactorio, conduciendo a rendimientos de 0,114 gramos de bioetanol por gramo de materia prima con una pureza de un 8,9%.

5.2 Líneas futuras

El proceso de obtención de bioetanol está totalmente integrado en la industria energética, pero se debe seguir investigando en este sentido para aumentar el rendimiento del proceso, abaratar los costes del mismo y reducir los tiempos de obtención del mismo.

Como líneas futuras de desarrollo para el presente trabajo se presentan las siguientes:

1. Se propone seguir investigando acerca de las condiciones experimentales para la obtención de bioetanol. Dada la baja pureza obtenida en las experiencias, se postula como una línea futura de interés, la realización de hidrólisis enzimática con el objetivo de intentar mejorarla y comparar resultados respecto a la hidrólisis ácida.
2. Como ya se ha descrito, existen otros tipos de materias primas para obtener bioetanol de segunda generación. Se propone como línea de trabajo para futuros proyectos, utilizar como materia prima de partida, la monda de la patata. Este es otro de los residuos orgánicos generados en la Escuela Naval Militar y que podría dar resultados para comparar con los de la cáscara de la naranja.
3. Otro punto interesante de partida, lo constituye el uso de algas como materia prima para la obtención de bioetanol. Se ha investigado que estas, aportan unos resultados excelentes en comparación con los residuos alimentarios. Además, dada la situación de las bases y arsenales de la Armada y su cercanía al mar, podría no suponer dificultad la obtención de esta materia prima.

6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Banco Mundial, «Banco Mundial,» 2015. [En línea]. Available: <http://datos.bancomundial.org/indicador/SP.POP.TOTL>. [Último acceso: 23 Enero 2017].
- [2] D. Pasquevich, «La creciente demanda mundial de energía frente a los riesgos ambientales,» 2015.
- [3] REPSOL, «REPSOL,» 13 Noviembre 2015. [En línea]. Available: https://www.repsol.com/es_es/corporacion/conocer-repsol/contexto-energetico/matriz-energetica-mundial/. [Último acceso: 23 Enero 2017].
- [4] F. Rey y E. Velasco, *Bombas de calor y energías renovables en edificios*, Thomson, 2005.
- [5] M. Abo-State, A. Regab, N. El-Gendy, L. Farahat y H. Madian, «Effect of different pretreatments on egyptian sugar-cane bagasse saccharification and bioethanol production,» *Egyptian Journal of Petroleum*, vol. 22, pp. 161-167, Junio 2013.
- [6] Organización de las Naciones Unidas, «Biblioteca ONU,» 2017. [En línea]. Available: <http://research.un.org/es/docs/environment/conferences>. [Último acceso: 9 Febrero 2017].
- [7] Organización del Cambio Climático, «Cambio climático,» Enero 2017. [En línea]. Available: <http://www.cambioclimatico.org/tema/protocolo-de-kyoto>. [Último acceso: 9 Febrero 2017].
- [8] M. Hernández y J. Hernández, «Verdades y mitos de los biocombustibles,» *Ciencia y cultura*, vol. 15, nº 071, pp. 15-18, 2008.
- [9] S. Naik, «Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review,» *ScienceDirect*, 2009.
- [10] G. Walker, *Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol*, Ventus Publishing ApS, 2010.
- [11] Consejo de los Profesionales del Agro, Agroalimentos y Agroindustria, «Biocombustibles: tipos, generaciones y biomásas empleadas para su elaboración,» *Bioenergía, agregando valor desde el origen*, nº 127, pp. 4-6, Agosto 2013.

- [12] J. Defour, «Las algas: un biocombustible de gran potencial,» [En línea]. Available: <http://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/2007/10/01/74977>. [Último acceso: 30 Enero 2017].
- [13] ABENGOA, «Biocarburantes en el Transporte,» ABENGOA, 2007. [En línea]. Available: http://www.abengoa.es/htmlsites/boletines/es/diciembre2007ext/fr_biocarburantes.htm. [Último acceso: 8 Febrero 2017].
- [14] Renewable Fuels Association, «Industry Statistics,» 2017. [En línea]. Available: <http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099788442-e48b2782-ea53>. [Último acceso: 31 Enero 2017].
- [15] D. Fengel y G. Wegener, *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*, Libraries Australia, 1984.
- [16] L. Laureano-Perez, F. Teymouri, H. Alizadeh y B. Dale, «Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass,» *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005.
- [17] A. Valverde, J. Monteagudo y B. Sarria, «Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz,» *Scientia Et Technica*, vol. XIII, n° 37, pp. 255-260, Diciembre 2007.
- [18] M. Area, F. Felissia y C. Nuñez, *Pulpado hidroalcohólico de alto rendimiento de bagazo de caña de azúcar para la fabricación de cartones*, Córdonba, 2004.
- [19] D. Mamma, E. Kourtoglou y P. Christakopoulos, «Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry,» *ScienceDirect*, 2007.
- [20] J. Monsalve, V. M. Perez y A. Ruiz, «Producción de Etanol a partir de la cáscara de Banano y de almidón de Yuca,» 2006.
- [21] A. Sánchez, A. Gutiérrez, J. Muñoz y C. Rivera, «Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos,» *Revista Tumbaga*, 2010.
- [22] W. Murray y S. Duff, «Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review,» *Bioresource Technology*, vol. 55, n° 1, pp. 1-33, 1996.
- [23] L. Fan, M. Gharpuray y Y. Lee, *Cellulose Hydrolysis*, Berlín: Springer, 1987.
- [24] F. Gomez, *Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano*, San Luis Potosí, 2008.
- [25] J. Tsukamoto, N. Duran y L. Tasic, «Nanocellulose and Bioethanol Production from Orange Waste using Isolated Microorganisms,» *Journal of Brazilian Chemistry Society*, vol. 24, n° 9, pp. 1537-1543, 2013.
- [26] F. Shen, J. Saddler, L. Lin, Y. Zhang, G. Yang, H. Xiao y Y. Li, «Evaluation of steam pretreatment on sweet sorghum bagasse for enzymatic hydrolysis and bioethanol production,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 86, pp. 1542-1548, 15 Octubre 2011.
- [27] Ó. Sánchez y C. Cardona, «Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks,» *ScienceDirect*, 2008.
- [28] E. Emeka, O. Oseghale y A. Okoye, «Utilization of cellulosic cassava waste for bio-ethanol production,» *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 3, pp. 2797-2800, Diciembre 2015.

- [29] N. Adela, A. Nasrin, S. Loh y Y. Choo, «Bioethanol Production by Fermentation of Oil Palm Empty Fruit Bunches Pretreated with Combined Chemicals,» *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, vol. 4, pp. 234-242, 2014.
- [30] A. Singh, «A comparative study of Bioethanol Production ability of *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae* using Banana and Orange Peels,» *International Journal of Scientific & Engineering Research*, vol. 5, Enero 2014.
- [31] C. Hamley-Bennett, G. Lye y D. Leak, «Selective fractionation of Sugar Beet Pulp for release of fermentation and chemical feedstocks; optimisation of thermo-chemical pre-treatment,» *Bioresource Technology*, vol. 209, pp. 259-264, Junio 2016.
- [32] H. Khaleghian, K. Karimi y T. Behzad, «Ethanol production from rice straw by sodium carbonate pretreatment and *Mucor hiemalis* fermentation,» *Industrial Crops and Products*, vol. 76, pp. 1079-1085, 15 Diciembre 2015.
- [33] F. Talebnia, M. Pourbafrani, M. Lundin y M. Taherzadeh, «Citrus waste saccharification,» *BioResources*, vol. 3, nº 1, pp. 108-122, 2008.
- [34] K. Öhgren, J. Vehmaanperä, M. Siika-Aho, M. Galbe, L. Viikari y G. Zacchi, «High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production,» *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, pp. 607-613, 5 Marzo 2007.
- [35] S. Krido, V. Taufika, C. Darsih, D. Pratiwi y A. Frediansyah, «Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation Incubation Time Using Cellulose Enzyme for Sugarcane Bagasse on the Second-generation Bioethanol Production Technology,» *Energy Procedia*, vol. 65, pp. 331-336, 2015.
- [36] A. Kefale, M. Redi y A. Asfaw, «Potential of bioethanol production and optimization test from agricultural waste: the case of wet coffee processing waste (pulp),» *International Journal of Renewable Energy Research*, vol. 2, nº 3, pp. 446-450, 2012.
- [37] H. Singh, P. Venkata, R. Madl, L. Saida y J. Abeykoon, «Production from Orange Peels: Two-Stage Hydrolysis and Fermentation Studies Using Optimized Parameters through Experimental Design,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, pp. 3422-3429, 2010.
- [38] ASTM, *ASTM 4806. Standard Specification for Denatured Fuel Ethanol for Blending with Gasolines for Use as Automotive Spark-Ignition Engine Fuel*, 2016.
- [39] AENOR, *UNE-EN 15376. Combustibles para automoción. Etanol como componente de mezclas para gasolina. Requisitos y métodos de ensayo.*, 2015.
- [40] AENOR, *UNE-EN 15491. Etanol como componente de la formulación de gasolinas. Determinación de la acidez total. Método de valoración con indicador de color.*, 2007.
- [41] AENOR, *UNE-EN 15769. Etanol como componente en la formulación de gasolinas. Determinación del aspecto. Método visual*, 2009.
- [42] A. Esteghlalian, A. Hashimoto, J. Fenske y M. Penner, «Modeling And Optimization Of The Dilute- Sulfuric-Acid Pretreatment Of Corn Stover, Poplar And Switchgrass,» *Bioresource Technology*, nº 59, pp. 129-136, 1997.

- [43] H. Jorgensen, J. Kristensen y C. Felby, «Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities,» *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, vol. I, pp. 119-134, 2007.
- [44] A. Jaramillo, S. Jimenez, A. Merino y A. Hormaza, «Obtención de un inóculo fúngico para la degradación de un colorante azo por fermentación en estado sólido,» *Revista U.D.C.A. Act. y Div. Cient.*, 2014.
- [45] E. Zakaria, «Bioconversion of orange peels for ethanol production using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*,» *African Journal of Microbiology Research*, vol. 7, nº 14, pp. 1266-1277, 2013.
- [46] L. Tejada, C. Tejada, A. Villabona, M. Alvear, C. Castillo, D. Henao, W. Marimon, N. Madariaga y A. Taron, «Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña,» *Revista Educación en Ingeniería*, nº 10, pp. 120-125, Diciembre 2010.
- [47] M. Balat y H. Balat, «Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel,» *ScienceDirect*, 2009.