



Pretratamiento de la biomasa de sarmiento con líquidos iónicos

A. Duque García, I. Higuera Losilla, R. Cañadas Soler, R. Iglesias Esteban y P. Manzanares Secades

Unidad de Biocombustibles Avanzados y Bioproductos. División de Energías Renovables. CIEMAT

G. Alonso Lafora

Universidad Complutense de Madrid

El mundo se enfrenta actualmente a una transición de una economía basada en combustibles fósiles a una economía en base biológica (bioeconomía). En este contexto, los residuos agrícolas representan una fuente abundante de biomasa, generalmente de bajo coste, que se pueden revalorizar para la producción de bioenergía y bioproductos.

PALABRAS CLAVE: Residuo agrícola; Biorrefinería; Biomasa lignocelulósica; Bioproductos; Hidrólisis enzimática; Disolventes verdes.

The world is currently facing a transition from a fossil fuel-based economy to a biologically based economy (bioeconomy). In this context, agricultural waste represents an abundant source of biomass, generally low cost, that can be revalued for the production of bioenergy and bioproducts.

KEYWORDS: Agricultural waste; Biorefinery; Lignocellulosic biomass; Bioproducts; Enzymatic hydrolysis; Green solvents.

INTRODUCCIÓN

La transición de una economía en base a combustibles fósiles a una verdadera economía “bio” o bioeconomía, se propone como una etapa esencial para hacer frente a los retos globales que actualmente enfrenta la sociedad: cambio climático, degradación de suelo y ecosistemas y demandas crecientes de alimentos y energía. Esta transición se basa en el uso integral de fuentes de biomasa sostenibles con el fin de proporcionar una gran variedad de combustibles y bioproductos. Entre los distintos tipos de biomasa susceptibles de utilización en este nuevo concepto de bioeconomía se encuentra la biomasa lignocelulósica. La biomasa lignocelulósica comprende un amplio rango de materiales de diferente procedencia (p.ej., residuos agrícolas y forestales, cultivos energéticos, residuos agroindustriales y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos), que constituyen una amplia fuente de materias primas renovables susceptibles de revalorización a través de procesos de transformación adecuados. En este sentido, la biomasa de sarmiento, residuo originado en las operaciones de poda de la vid, representa una fuente abundante y barata de biomasa lignocelulósica residual, que actualmente tiene un uso limitado como combustible en industrias de generación de energía y, principalmente, en aplicaciones domésticas.

La biomasa lignocelulósica se compone mayoritariamente de los carbohidratos, celulosa y hemicelulosa, y de la lignina, un polímero polifenólico complejo que actúa como adhesivo de los carbohidratos, aportando a las plantas su integridad estructural. Esta estructura compleja de la biomasa lignocelulósica hace que se necesite un proceso adecuado de pretratamiento o fraccionamiento que consiga extraer y

separar los componentes mayoritarios para su posterior conversión a compuestos de alto valor añadido. Entre las diferentes tecnologías de fraccionamiento que se han desarrollado, la utilización de líquidos iónicos (LIs) ha despertado un creciente interés en la comunidad científica, debido a que muestran ventajas con respecto a los disolventes convencionales, tales como estabilidad térmica y química, baja volatilidad, alta conductividad eléctrica, reciclabilidad y no ser inflamables [1]. Los LIs son un grupo de sales que, en general, se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente y están formados por un catión grande (orgánico) y un anión pequeño (orgánico o inorgánico). Esta polaridad por el carácter iónico posibilita una mejor capacidad de romper los polímeros. En este contexto, se ha demostrado su capacidad de disolución tanto de la celulosa como de la lignina, influenciada por la temperatura y la viscosidad [2].

El presente trabajo se enmarca dentro de las actividades del proyecto coordinado BioVineShoot [<https://biovineshoot.es/>], financiado por la Agencia Española de Investigación (AEI) del Ministerio de Ciencia e Innovación. Dentro de este proyecto, la Unidad de Biocarburantes y Bioproductos (BIOCAR) del Ciemat participa con el subproyecto Biovisib (Bioconversión de la fracción celulósica de la biomasa del sarmiento de la vid en etanol y bioproductos), que se centra en el estudio del proceso de conversión de la biomasa de sarmiento de vid, mediante una estrategia experimental de fraccionamiento mediante extrusión en combinación con LIs. El objetivo es obtener distintas corrientes de proceso enriquecidas en los componentes mayoritarios de la biomasa: celulosa, hemicelulosa y lignina. A partir del sólido pretratado enriquecido en celulosa, el proyecto plantea la optimización de la producción de azúcares fermentables para la transformación en productos de alto valor añadido, como son el etanol como biocombustible, y el ácido láctico y el

ácido caproico como bioproductos. El trabajo presentado aquí forma parte de las actividades de dicho proyecto, en la etapa de desarrollo del pretratamiento con LIs a nivel de laboratorio, como etapa previa a su uso en combinación con la extrusión. Como medida de la eficacia del pretratamiento empleado, se estudió la producción de azúcares fermentables mediante ensayos de hidrólisis enzimática (HE) con enzimas comerciales, en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIA PRIMA

La biomasa de sarmiento utilizada como materia prima en este estudio fue proporcionada por la empresa VanMander S. L (Santa Margalida, Barcelona), molida a 2 mm en las instalaciones del Ciemat en Soria (Ceder-Ciemat), y almacenada a temperatura ambiente hasta su uso. Para el análisis de composición de la biomasa se tomaron tres muestras del lote de sarmiento, y se caracterizaron siguiendo los métodos estándares establecidos por el National Renewable Energy Laboratory (Colorado, EE UU), según describen Sluiter y col., (2012) [3]. De esta forma, se obtuvo una composición media de la biomasa de sarmiento en cuanto a sus componentes mayoritarios (celulosa,

hemicelulosa y lignina) y minoritarios (extractivos y cenizas).

PRETRATAMIENTO CON LÍQUIDOS IÓNICOS (LIS)

El líquido iónico seleccionado fue el acetato de 1-etil-3-metilimidazolio [EMIM] [Ac], por su probada eficacia en el pretratamiento de biomasa lignocelulósica, por su basicidad en la formación del enlace de hidrógeno y su capacidad de eliminación de la lignina. La mezcla de la biomasa de sarmiento con el líquido iónico se llevó a cabo en tubos de ensayo de vidrio de 15 ml con tapón con rosca. Los materiales se mezclaron en una proporción de 10 % (p/v) en base a peso seco de sarmiento. Las mezclas se incubaron en estufa a diferentes temperaturas y tiempos de incubación, dependiendo del experimento. En un primer grupo de experimentos se ensayó el efecto del tamaño de partícula (0,5 y 2 mm) y el tiempo de incubación (tres y seis horas), en ensayos realizados a 110 °C. Posteriormente, se enfocó el estudio al efecto de la temperatura (80, 100 y 120 °C), con biomasa a 0,5 mm y con un tiempo de incubación de tres horas. Finalmente, se ensayó el solvente de lavado (agua, etanol o acetona: agua 50:50 (v/v)). En la Tabla 1 se muestran las distintas condiciones de ensayo evaluadas en este trabajo.

TABLA 1.

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS ENSAYOS REALIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE BIOMASA DE SARMIENTO CON [EMIM][AC]

Ensayo	Tamaño de partícula (mm)	Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (min)	Disolvente de lavado
1	0,5	110	3	Agua
2	0,5	110	6	Agua
3	2	110	3	Agua
4	0,5	80	3	Agua
5	0,5	100	3	Agua
6	0,5	120	3	Agua
7	0,5	120	3	Etanol
8	0,5	120	3	Acetona: Agua

Una vez transcurrido el tiempo de incubación establecido, la mezcla se filtró con un equipo de filtrado a vacío y el sólido obtenido se lavó con 50 ml de agua desionizada, para finalmente separar una fracción líquida, que contiene la lignina extraída y una parte de los azúcares derivados de las hemicelulosas. La fracción sólida recuperada tras el filtrado se pesó y se secó en estufa a 40 °C durante 24h para su posterior análisis -siguiendo la metodología antes mencionada para la materia prima- y para su utilización como sustrato en los ensayos de hidrólisis enzimática. Un esquema del proceso experimental seguido se muestra en la Figura 1.

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Los experimentos de HE se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 ml, con un volumen de trabajo de 50 ml. Se utilizó una carga de sustrato del 5 % (p/v) en peso seco, que se disolvió en tampón citrato 50 mM pH 4,8. A esta mezcla se añadieron 15 unidades de papel de filtro (FPU, de sus siglas en inglés) /g de sustrato de un cóctel celulolítico comercial (SAE0020, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) y un 0,02 % en peso de azida sódica (Scharlab, Barcelona, España), para evitar una posible contaminación microbiana. Se añadió el tensioactivo Tween 20 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania), en una concentración de 25 µl/g de sustrato, para facilitar la fluidificación de la mezcla. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se incubaron a 50 °C y 150 rpm durante 72 h. Como control, se utilizó un material sin pretratar como sustrato. Al final de la hidrólisis se tomó una muestra de cada matraz, se centrifugó y se midió el contenido en azúcares en el sobrenadante mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), según se describe a continuación. Las medidas se realizaron por triplicado.

Para analizar los resultados de los ensayos de HE se calculó el rendimiento de conversión de carbohidratos en

azúcares (celulosa y xilano en glucosa y xilosa, respectivamente), según indica la ecuación (1):

$$\text{Rendimiento de conversión de celulosa/xilano (\%)} = \frac{\text{g glucosa o xilosa en la hidrólisis enzimática}}{100 \text{ g de glucosa o xilosa en el material pretratado}} \quad (1)$$

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

La concentración de azúcares libres (glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa) en las muestras generadas en el análisis de composición, así como en los medios procedentes de los ensayos de HE, se midió por HPLC en un

equipo Waters (Milford, MA, EEUU) con detector de índice de refracción (modelo 2412), acoplado a una columna Transgenomic CarboSep CHO-782 (Omaha, NE, EEUU). Como fase móvil se usó agua ultra pura a 0,6 ml/min y la temperatura se mantuvo a 70 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Los resultados de la composición media de la biomasa de sarmiento se muestran en la Figura 2.

FIGURA 1. Esquema de la metodología empleada para el pretratamiento de biomasa de sarmiento con [EMIM][Ac]

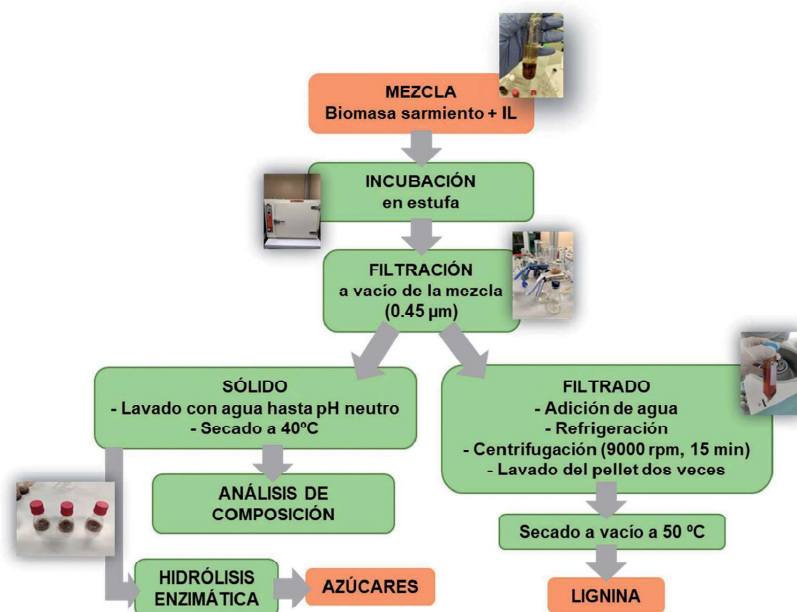
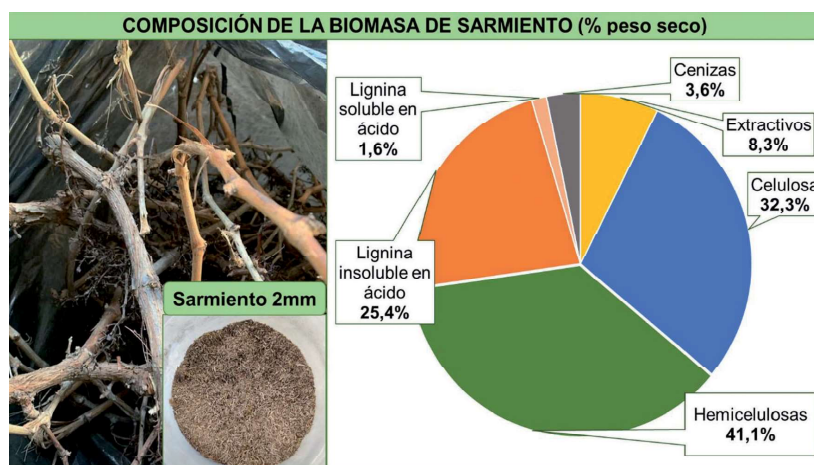


FIGURA 2. Composición de la biomasa de sarmiento (% peso seco)

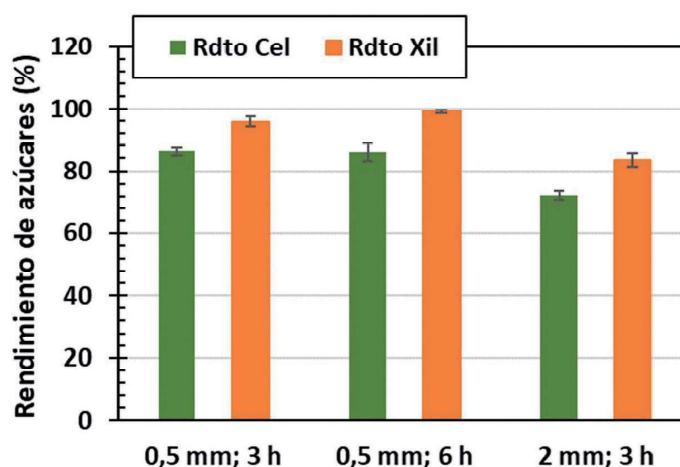


Por una parte, los resultados obtenidos de la composición de la biomasa de sarmiento muestran que este material contiene alrededor de un 50 % de su peso en carbohidratos, de los que la celulosa es el componente mayoritario (32,3 %). En cuanto a la composición de las hemicelulosas, los datos obtenidos reflejan la presencia mayoritaria del polímero xilano (~15 %), seguido por cantidades muy inferiores de galactanos, mananos y arabinanos. La detección de aproximadamente un 5 % de grupos acetilo muestran que estos polímeros hemicelulósicos están fuertemente acetilados. Por otra parte, el contenido en lignina ácido insoluble de alrededor del 25 % es similar al encontrado en otros materiales lignocelulósicos como las maderas (15-28 %) [4], que se consideran materiales muy lignificados. Otros componentes minoritarios, tales como los compuestos extraíbles (extractivos, 8,3 %) y las cenizas (3,6%), completan la composición de la biomasa de sarmiento.

PRETRATAMIENTO CON LÍQUIDOS IÓNICOS (LIS)

Los resultados del rendimiento de conversión de celulosa y xilano tras el pretratamiento con [EMIM] [Ac] de los experimentos 1 a 3 (Tabla 1), se muestran en la Figura 3. Como se puede observar, el empleo del material con un tamaño de partícula menor (0,5 mm) conduce a la obtención de mejores resultados de conversión en comparación al tamaño de 2 mm, en el caso de la conversión de celulosa ($85,9 \pm 1,4$ % frente a $72,2 \pm 1,5$ %), así como de xilano ($95,8 \pm 1,5$ - $99,2 \pm 0,6$ % frente a $83,4 \pm 2,0$ %). Estos resultados pueden considerarse muy satisfactorios, y se encuentran en el rango de los obtenidos con este LI en otros materiales lignocelulósicos tales como, p. ej., chopo [5] o biomasa de bambú [6]. En cuanto al tiempo de incubación, la extensión de tres a seis horas no resulta en un aumento significativo de liberación de azúcares cuando se comparan los ensayos

FIGURA 3. Efecto del tamaño de partícula y el tiempo de incubación en el rendimiento de conversión de celulosa y xilano de biomasa de sarmiento pretratada con [EMIM] [Ac]



» La utilización de residuos biomásicos de origen agrícola para la producción de biocombustibles y bioproductos es una estrategia esencial para el avance de la bioeconomía

con sarmiento a 0,5 mm, por lo que se puede concluir que no es efectivo alargar el periodo de incubación más allá de ese tiempo. En este grupo de experimentos, las concentraciones más elevadas de glucosa (16 gL^{-1}) y xilosa ($6,0 \text{ gL}^{-1}$) se alcanzaron en el experimento 1 (datos no mostrados). Estos resultados, junto con los de los rendimientos de conversión, llevan a concluir que el tamaño de 0,5 mm y el periodo de incubación de tres horas se mantendrán en el resto de experimentos.

Los resultados del efecto de la temperatura de incubación de las mezclas [EMIM][Ac]-biomasa de sarmiento (Figura 4) muestran un marcado efecto del aumento de la temperatura en la liberación de azúcares, con una mejora muy significativa del rendimiento respecto al valor obtenido en la biomasa sin tratar (muestra control). El

tratamiento con [EMIM] [Ac] a 120°C permite aumentar el rendimiento de $10,5 \pm 0,6$ % a alrededor de $67,8 \pm 2,1$ % en el caso de la conversión de celulosa, y de $2,4 \pm 0,3$ % a $77,5 \pm 2,7$ % en el caso del xilano a la máxima temperatura de 120°C . Una revisión en la literatura de los parámetros más significativos en la acción de los LIs en el fraccionamiento de la biomasa permite identificar a la temperatura como uno de ellos, siendo en la mayoría de los casos necesario aplicar temperaturas alrededor o por encima de 100°C para lograr un efecto significativo en la disolución del material [7].

Finalmente, la Figura 5 muestra los resultados obtenidos en los experimentos 6, 7 y 8, que se refieren a la utilización de etanol o acetona para el lavado del material pretratado con [EMIM] [Ac] antes de realizar los ensayos de hidrólisis.

sis enzimática, en comparación con el uso de agua. Como puede observarse, la utilización de acetona: agua 50:50 (v/v) da como resultado un incremento muy significativo del 33 % en el caso de la celulosa y del 26 % para el xilano, respecto al obtenido al lavar con

agua, y, en mayor medida, respecto al lavado con etanol. Ello puede deberse a la mayor capacidad de la acetona de retirar del material pretratado los restos de [EMIM] [Ac] que hayan podido quedar en la superficie de las fibras y que puede estar dificultando la acce-

sibilidad de las enzimas celulolíticas.

En cuanto al grado de deslignificación alcanzado en los distintos experimentos realizados, se obtuvieron valores que varían entre 15 y 30 % respecto al contenido en lignina de la materia prima, dependiendo de las condiciones del pretratamiento. Estos resultados muestran que el tratamiento con LIs tiene un elevado potencial como método de deslignificación, si bien es necesario todavía mejorar estos rendimientos.

En resumen, este estudio permite valorar la efectividad del tratamiento de la biomasa de sarmiento con el LI [EMIM] [Ac], estableciendo cuáles son las condiciones de ensayo más adecuadas en cuanto a parámetros como el tamaño de partícula de la biomasa (0,5 mm), el tiempo de incubación (3 min), la temperatura (120 °C) o el disolvente de lavado (acetona: agua 50:50 v/v), para maximizar la liberación de azúcares potencialmente fermentables a partir de la misma.

» El desarrollo de pretratamientos novedosos y ambientalmente sostenibles es crucial para el avance de las tecnologías de conversión biológica de la biomasa lignocelulósica

FIGURA 4. Efecto de la temperatura de incubación en el rendimiento de conversión de celulosa y xilano de biomasa de sarmiento pretratada con [EMIM] [Ac]

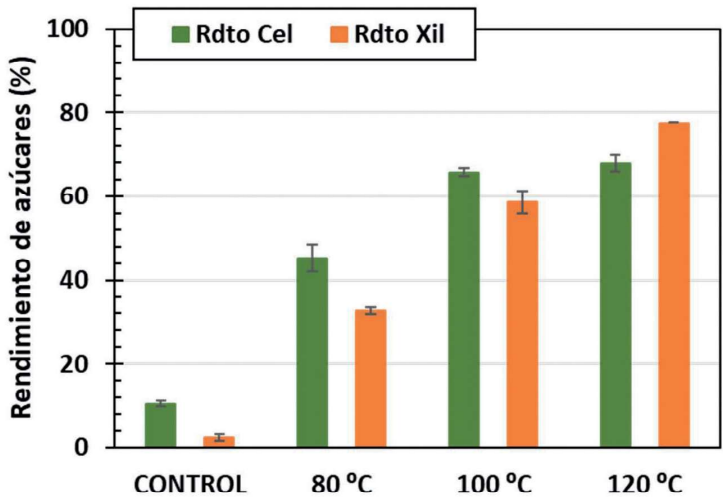
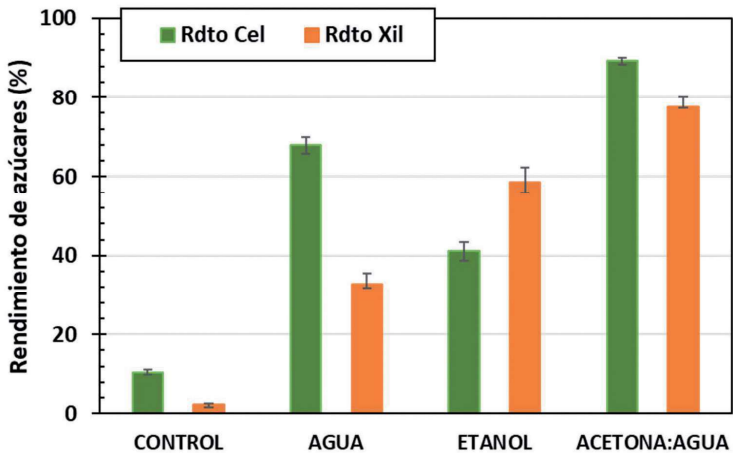


FIGURA 5. Efecto del solvente utilizado en el lavado del material pretratado en el rendimiento de conversión de celulosa y xilano de biomasa de sarmiento pretratada con [EMIM] [Ac]



CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten concluir que el tratamiento con LIs es un método muy prometedor para favorecer la producción de azúcares potencialmente fermentables a partir de la biomasa de sarmiento. Las condiciones de tratamiento óptimas que se han determinado en este trabajo para maximizar el rendimiento de liberación de azúcares por HE, servirán de base para el estudio de la aplicación de LIs, en combinación con la extrusión, en una etapa posterior del proyecto. Este estudio supone una contribución al desarrollo de un método adecuado para la revalorización de la biomasa de sarmiento de forma que se consiga hacer un uso sostenible de este abundante recurso. A su vez, esto puede suponer un importante motor de crecimiento social y económico en zonas agrícolas, a través del desarrollo de nuevos procesos tecnológicos para la obtención de productos en base biológica que puedan sustituir a los productos químicos de origen fósil.

Bibliografía

- [1] Halder, P., Kundu, S., Patel, S., Setiawan, A., Atkin, R., Parthasarthy, R., Paz-Ferreiro, J., Surapaneni, A., Sha, K., 2019. "Progress on the pre-treatment of lignocellulosic biomass employing ionic liquids". *Renew Sust. Energ. Rev.*, 105, 268-292.
- [2] Liu, C.Z., Wang, F., Stiles, A.R., Guo, C., 2012. "Ionic liquids for biofuel production: Opportunities and challenges". *Appl. Energy*, 92, 406-414.
- [3] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2012. "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass". LAP-002 NREL Analytical Procedure. <https://www.nrel.gov/bioenergy/biomass-compositional-analysis.html>.
- [4] Lourenço, A., Pereira, H., 2017. Compositional Variability of Lignin in Biomass. En: Matheus Poletto (Ed.). "Lignin - Trends and Applications" InTechOpen.
- [5] Elgharabawy, A.A., Alam, M.Z., Moniruzzaman, M., Goto, M., 2016. "Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass". *Biochem. Eng. J.*, 109, 252-267.
- [6] Rahim, A.H.A., Man, Z., Sarwono, A., Muhammad, N., Khan, A.S., Hamzah, W.S.S., Yunus, N.M., Elsheikh, Y.A., 2020. "Probe sonication assisted ionic liquid treatment for rapid dissolution of lignocellulosic biomass".

Cellulose, 27, 2135-2148.

- [7] Da Costa Lopes, A.M., João, K.G., Morais, A.R.C., Bogel-Lukasik, E., Bogel-Lukasik, R., 2013. "Ionic liquids as a tool for lignocellulosic biomass, Fractionation". *Sustain. Chem. Process.*, 1, 3.

Abreviaturas

CIEMAT: Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
HE: Hidrólisis enzimática
Lis: Líquidos iónicos
AEI: Agencia Española de Investigación
BIOCAR: Unidad de Biocarburantes y Bioproductos
BIOVISEB: Bioconversión de la fracción celulósica de la biomasa del sarmiento de la vid en etanol y bioproductos
[EMIM] [Ac]: 1-etil-3-metilimidazolio
v/v: volumen/volumen
p/v: peso/volumen
FPU: Unidades de papel de filtro
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
Cel: Celulosa
Xil: Xilano

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto "BIOVISEB" financiado por la AEI del MCIN (MCIN/AEI/10.13039/501100011033). Proyecto referencia PID2020-112594RB-C32.

