



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS  
NUTRICIONAL A PARTIR DE BAGAZO DE  
CERVEZA MEDIANTE TECNOLOGÍA  
MICROONDAS**

**Autor:**

**Pérez de la Calle, Raquel**

**Tutores:**

**Lucas Yagüe, Susana  
López Linares, Juan Carlos  
Dpto. Ingeniería Química y TMA**

**Valladolid, julio de 2019**



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Susana Lucas Yagüe por haber querido ser mi tutora durante este trabajo, y por la paciencia que ha tenido conmigo. Muchas gracias por tu consideración y por el tiempo que has dedicado, me ha ayudado a mejorar mucho y aprender.

Agradecer también a Juan Carlos su paciencia en el laboratorio al explicarme cada procedimiento de la mejor forma posible. Me he sentido muy cómoda y a gusto en estos meses, y la experiencia ha sido inolvidable, he aprendido mucho gracias a la atención que le has puesto a enseñarme.

Gracias a mis ingenieras Estefanía, Chabe, Icíar e Iria, os habéis convertido en un apoyo enorme, me habéis dado el empujón cuando lo he necesitado y es que, hasta de los momentos de desesperación tengo un buen recuerdo, empezar riendo y acabar llorando. Hemos ido creciendo y superándonos juntas y no sabéis lo orgullosa que estoy de decir que tengo unas amigas como vosotras. Irene, mi ingeniera favorita, creo que sin ti no hubiera pasado ni de primero, gracias por ayudarme siempre amiga.

Gracias a mis amigos de Íscar, por sacarme de casa y hacerme desconectar. Sara en especial a ti, por haber soportado vivir varios añitos conmigo, me has comprendido, me has visto en mis mejores y peores temporadas y me has apoyado incondicionalmente.

Pero no hubiera llegado nunca hasta aquí si mi familia no me hubiera dado esta oportunidad que agradeceré toda mi vida. Muchas gracias por apoyarme hasta cuando ni yo siquiera sabía que iba a poder llegar hasta este punto, os quiero muchísimo. Raúl, vas a conseguir todos los objetivos que te propongas, solamente tienes que quererlo de verdad, y yo voy a estar ahí echándote una mano en todo lo que pueda.



# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN/ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
2.1 ARABINOXILANOS.....	3
2.1.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA.....	4
2.1.2 PROPIEDADES.....	5
2.1.3 APLICACIONES.....	8
2.2 BAGAZO DE CERVEZA .....	9
2.2.1 PROCESO DE PRODUCCIÓN .....	10
2.2.2 DATOS DE PRODUCCIÓN .....	11
2.2.3 COMPOSICIÓN .....	11
2.2.4 APLICACIONES.....	12
2.3 OBTENCIÓN DE ARABINOXILANOS A PARTIR DEL BAGAZO DE CERVEZA ...	14
2.3.1 PRETRATAMIENTO.....	15
2.3.2 EXTRACCIÓN .....	16
2.3.3 SEPARACIÓN/PURIFICACIÓN .....	20
2.4 PROCESOS ESTABLECIDOS PARA REALIZAR EL TRABAJO EXPERIMENTAL ...	20
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>4. TRABAJO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>25</b>
4.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1.1 MATERIA PRIMA Y REACTIVOS.....	25
4.1.2 ACONDICIONAMIENTO/PRETRATAMIENTO.....	26
4.1.3 EXTRACCIÓN ALCALINA ASISTIDA CON TECNOLOGÍA MICROONDAS ...	27
4.1.4 EXPERIENCIAS PRELIMINARES.....	30
4.1.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
4.1.6 PUNTO ÓPTIMO.....	32
4.1.7 SEPARACIÓN .....	32
4.1.8 MÉTODOS UTILIZADOS .....	33
4.1.9 TRATAMIENTO DE DATOS.....	38
4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.2.1 EXPERIENCIAS PRELIMINARES.....	44
4.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	46
4.2.3 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA CON MICROONDAS. ....	53
<b>5. EVALUACIÓN ECONÓMICA .....</b>	<b>57</b>
5.1 COSTE TOTAL DE LA PLANTA.....	58

5.2	VIABILIDAD ECONÓMICA Y ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD .....	60
6.	CONCLUSIONES.....	65
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	66
8.	ANEXO.....	69

# LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1-Estructura molecular del polímero de arabinosilanos. (Holmsten, 2018)

Figura 2.2- Estructura química de una fracción de AX ferulado (Morales Otega et al., 2013).

Figura 1.3- Generación de BSG durante el proceso de elaboración industrial de la cerveza (Xiros & Christakopoulos, 2012).

Figura 2.4 - Contenido medio de AX totales en granos enteros de distintos tipos de cereales (Bastos, Coelho, & Coimbra, 2018).

Figura 2.5 - Diagrama de bloques de las principales etapas en la obtención de AX a partir de BSG.

Figura 2.6 Diagrama de bloques del trabajo experimental realizado.

Figura 4.1- BSG seco sin moler.

Figura 4.2- BSG seco molido.

Figura 4.3- Medida de BSG sin moler.

Figura 4.4- Medida de BSG molido.

Figura 4.5- Diferencia de tamaño entre BSG antes y después de la molienda.

Figura 4.6- Tubo de presión de cerámica.

Figura 4.7- Rotor donde se colocan los tubos de presión.

Figura 4.8- Equipo de microondas apagado.

Figura 4.9- Equipo microondas con el rotor introducido en su interior.

Figura 4.10- Mezcla de BSG con NaOH antes de la extracción microondas.

Figura 4.11- Mezcla después de la extracción.

Figura 4.12- Sólido residual tras la centrifugación.

Figura 4.13- Extracto líquido rico en arabinosilanos recuperado tras la centrifugación.

Figura 4.14- Fracción sólida centrifugada rica en AX.

Figura 4.15- Resuspensión de AX en etanol 95%.

Figura 4.16- Sólido seco con alto concentrado en AX.

Figura 4.17- Diagrama de los métodos de análisis usados para la fracción sólida tras la extracción alcalina asistida con microondas.

Figura 4.18- Diagrama de los métodos de análisis usados para la fracción líquida tras la extracción alcalina asistida con microondas.

Figura 5.1- Diagrama del proceso que tendría lugar en la planta piloto.

# LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1- Composición de BSG en distintos estudios (Ikram, Huang, Zhang, Wang, & Yin, 2017).

Tabla 2.2- Aplicaciones del BSG.

Tabla 4.1- Composición en porcentaje en peso por cada 100g de materia prima (BSG).

Tabla 4.2- Condiciones iniciales de las pruebas MAE de BSG con NaOH.

Tabla 4.3- Diseño experimental para la extracción de BSG alcalina asistida con tecnología microondas (2,5 min).

Tabla 4.4- Concentración (g/L) de azúcares del extracto líquido antes y después de HA, y concentración (g/L) de inhibidores en el extracto líquido antes de HA.

Tabla 4.5- pH del extracto líquido tras la MAE, recuperación total de sólidos (% RGT), concentración de oligómeros en el extracto líquido (g/L), pureza del extracto (%) y recuperación de azúcares del extracto líquido (%).

Tabla 4.6- Concentración (g/L) de glucosa, xilosa y arabinosa antes y después de someter el extracto líquido a HA, y concentración de inhibidores (g/L) del extracto líquido antes de HA para cada T y concentración de NaOH en cada experimento. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Tabla 4.7- pH del extracto líquido tras la MAE, concentración (g/L) de oligómeros (xilosa y arabinosa) contenida en el extracto líquido tras la MAE y pureza de los AX (xilosa y arabinosa) contenidos en el extracto líquido tras MAE. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Tabla 4.8- Recuperación total gravimétrica, (% RTG) de la fracción sólida, composición (%) de la fracción sólida tras la extracción MAE, grado de deslignificación de la fracción sólida tras la MAE. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante

Tabla 4.9- Recuperación de azúcares (recuperación de glucosa (%RG) y recuperación de azúcares hemicelulósicos (% RAH)) en el extracto líquido y en la fracción sólida. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Tabla 4.10- Concentración (g/L) de glucosa, xilosa y arabinosa antes y después de someter el extracto líquido a HA, y concentración de inhibidores (g/L) del extracto líquido antes de HA para cada T y concentración de NaOH en cada experimento. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Tabla 4.11- pH del extracto líquido tras la MAE, concentración (g/L) de oligómeros (xilosa y arabinosa) contenida en el extracto líquido tras la MAE y pureza de los AX

(xilosa y arabinosa) contenidos en el extracto líquido tras MAE y recuperación de azúcares (recuperación de glucosa (%RGL) y recuperación de azúcares hemicelulósicos (%RAHL)) en el extracto líquido Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Tabla 4.12- Recuperación total gravimétrica, (% RTG) de la fracción sólida, composición (%) de la fracción sólida tras la extracción MAE, grado de deslignificación de la fracción sólida tras la MAE. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Tabla 5.1- Precio de los equipos de la planta de extracción alcalina de arabinosilanos asistida mediante tecnología microondas.



# 1. RESUMEN/ABSTRACT

En este trabajo se ha realizado un estudio experimental para la obtención de arabinosilanos (AX), compuestos con propiedades prebióticas, a partir de bagazo de cerveza (BSG). Este proceso consta de una etapa de lavado de BSG, pretratamiento mediante molienda, extracción alcalina con NaOH asistida mediante tecnología microondas y separación de los arabinosilanos por precipitación con etanol.

El objetivo de este trabajo es optimizar mediante un diseño experimental (Diseño Central Compuesto) la etapa de extracción a escala de laboratorio. Las condiciones óptimas de operación obtenidas son 172°C y 0,38M NaOH con una recuperación de arabinosilanos de 52,6%.

El estudio de viabilidad económica para una planta piloto de 40kg/h de BSG húmedo establece un coste total de la planta de 0,5 millones € con un tiempo de recuperación de la inversión de 4 años, un VAN de 1 millón € y un TIR de 23,9%, indicadores de que la planta es rentable económicamente.

Palabras clave: arabinosilanos (AX), bagazo de cerveza (BSG), extracción, microondas, Diseño Central Compuesto.

An experimental study about the insulation of a prebiotic compound called arabinosylan (AX) from brewer's spent grain (BSG) has been done in this final project. This process is divided in several steps which are: BSG washing, a pretreatment by BSG grinding, an alkaline extraction with NaOH assisted by microwave technology and an AX separation by ethanol precipitation.

The main purpose of this study is to optimize the extraction step by a Central Composite Design. The optimum operating conditions are 172°C, 0,38 M NaOH and provide 52,59% AX recuperation.

A viability economic made to a demonstration plant which has a flow of 40kg/h wet BSG sets up the cost of the plant in 0,5 million €, recovered in four years. VAN is 1 million € and TIR is 23,9% which proves that it is an affordable investment.

Key words: arabinosylan (AX), brewer's spent grain (BSG), extraction, microwave, Central Composite Design.



### Siglas

**AX-** Arabinoxilanos.

**WEAX-** Water Extractable Arabinoxylans (arabinoxilanos extraíbles con agua).

**WUAX-** Water Unextractable Arabinoxylans (Water Unextractable Arabinoxilans.  
(arabinoxilanos no extraíbles con agua)

**AXOS-** arabinoxioligosacáridos.

**BSG-** bagazo de cerveza (Brewer Spent Grain).

**X-**Xilosa.

**A-**Arabinosa.

**Xii-**  $\beta$ -D-xilopiranosil.

**Arab-**  $\alpha$ -L-arabinofuranosil.

**MAE-** Microwave-Assisted Extraction.

**US-** Extracción con ultrasonidos.

**HA-** Hidrólisis ácida.

**TOC-** Total Organic Carbon (Carbono Orgánico total).

**HMF-** 5-hidroximetilfurfural.



## 2. INTRODUCCIÓN

En este proyecto se aborda el estudio experimental del proceso de obtención de arabinosilanos (AX) a partir del bagazo de cerveza (BSG). El bagazo de cerveza es un subproducto industrial del proceso de producción de la cerveza susceptible de valoración. Los AX son unos de los compuestos mayoritarios con un gran potencial debido a que ejercen una serie de beneficios sobre la salud humana.

### 2.1 ARABINOSILANOS

Los arabinosilanos fueron identificados por primera vez por Hoffman y Gerner en 1927, y fueron descritos como una goma viscosa presente en la harina de trigo. El AX es un componente de la hemicelulosa que se encuentra en la pared celular de las plantas, incluidas la madera y los granos de los cereales. Junto con las microfibras de celulosa, forman una matriz con la que ayudan a mantener la integridad de la pared celular. (Bastos et al., 2018). La mayoría de la pared celular de los granos del cereal está formada por fibra insoluble y son divididas en celulosa, que es totalmente insoluble en agua y hemicelulosas, que son parcialmente solubles. (Holmsten, 2018).

Los granos de cereal contienen entre 5 y 15% de su peso en masa (seco) de pared celular, y está formada mayoritariamente por polisacáridos no almidonados. De este porcentaje, los AX representan el mayor porcentaje de composición. (Mandalari et al., 2005).

Las estructuras moleculares de los AX determinan sus propiedades físicas como solubilidad en agua, viscosidad y sus funciones fisiológicas en el tracto gastrointestinal. (Izydorczyk & Dexter, 2008). Se clasifican en dos tipos, extraíbles en agua (WEAX) o no extraíbles en agua (WUAX) dependiendo de su solubilidad (Bastos et al., 2018).

Los AX tienen importancia entre los componentes de la fibra dietética debido a que tienen propiedades funcionales, tecnológicas y nutricionales. Estas funciones tales como efecto prebiótico y antioxidante, producen efectos beneficiosos para la salud al ingerirlos. (Ciudad-Mulero, 2017). Son llamados prebióticos los compuestos que no son digeridos por el cuerpo, pero afectan de forma beneficiosa estimulando el crecimiento y actividad de determinadas bacterias que viven en el colon, mejorando así la salud del ser humano. (Grootaert, Verstraete, & Van de Wiele, 2007).

El desarrollo y mejora de la extracción de estos compuestos garantiza la obtención de recuperaciones más altas de AX y un uso eficiente del material lignocelulósica procedente de los subproductos de los cereales (Bastos et al., 2018).

### 2.1.1 COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA

Dependiendo del grano de cereal de origen, se distingue una variación en la estructura molecular de los arabinoxilanos. Como se observa en la Figura 2.1, los AX están formados por xilosa y arabinosa en forma cíclica: una cadena lineal principal de  $\beta$ -D-xylopiranosil (Xyl) unidos por enlaces glucosídicos (1  $\rightarrow$  4) a  $\alpha$ -L-arabinofuranosil (Ara). (Izydorczyk & Dexter, 2008). Muchos estudios han demostrado que las distintas estructuras de los AX muestran diferentes actividades biológicas, por lo que existe una fuerte correlación entre la estructura molecular que siguen y estas. Como consecuencia, se pueden encontrar cuatro tipos de patrones de sustitución: insustituido, monosustituido en el C-2, monosustituido en el C-3 o disustituido en C-2,3. (Chen et al., 2019). Grado de sustitución, o ratio de contenido es el término que indica el número de unidades de arabinosa está unido a la cadena principal de xilosa, puede indicarse como la relación arabinosa-xilosa (A/X), esto es, el grado de ramificación en la cadena polimérica. (Morales Otega et al., 2013). En los cereales, el ratio A/X suele variar entre los valores de 0.3 a 1.1 (Bastos et al., 2018).

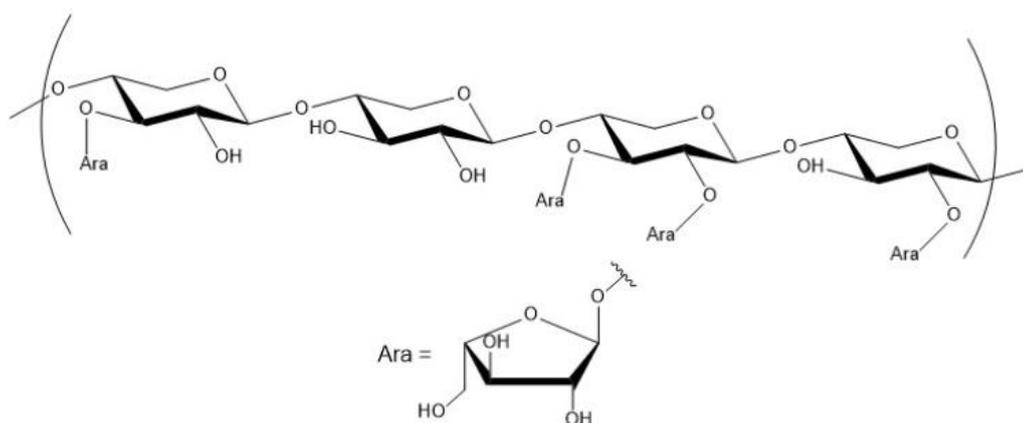


Figura 2.1-Estructura molecular del polímero de arabinoxilanos. (Holmsten, 2018)

Los ácidos hidroxicinámicos, como el ácido ferúlico, cumárico y sinápico se encuentran unidos al residuo arabinofuranosil a través de enlaces éster con el grupo hidróxido 5-OH de la arabinosa. Los arabinoxilanos que lo contienen se denominan **arabinoxilanos ferulados**. En la Figura 2.2 se observa cómo es la unión del ácido ferúlico al grupo de arabinosa mediante el enlace éster (Chen et al., 2019). El ácido ferúlico tiene un papel muy importante en la propiedad antioxidante de los AX (Izydorczyk & Dexter, 2008).

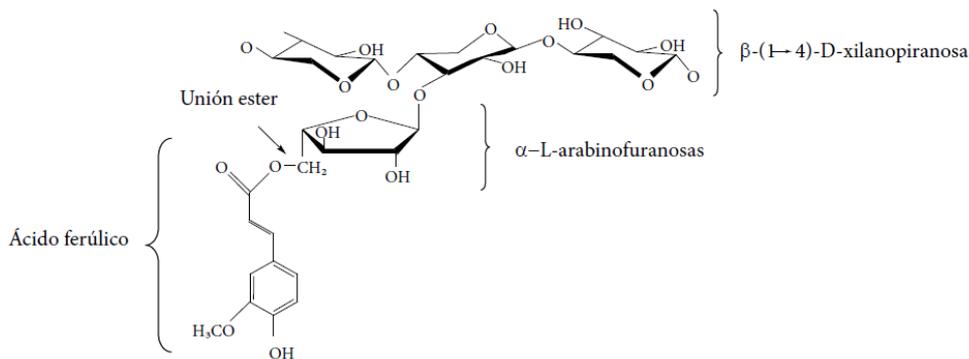


Figura 2.2- Estructura química de una fracción de AX ferulado (Morales Otega et al., 2013).

Como se ha descrito anteriormente, los AX se clasifican en función de su solubilidad en: WEAX y WUAX. Los WEAX son extraíbles a temperatura ambiente, y los WUAX se deben extraer mediante otro tratamiento, como el alcalino. También se diferencian en que los WUAX tienen un mayor peso molecular y también mayor cantidad de cadenas laterales. En los cereales, los WEAX se encuentran en el endospermo y los WUAX se distribuyen en la capa aleurona y en el pericarpio (Morales Otega et al., 2013). Los AX insustituídos son prácticamente insolubles debido a los fuertes enlaces de hidrógeno que ocurren intra e intermolecularmente. A medida que el residuo de arabinosa aumenta en la cadena, el polisacárido comienza a ser más soluble debido al hecho de que los enlaces de hidrógeno se van restringiendo. (Chen et al., 2019)

Los polisacáridos se pueden degradar mediante hidrólisis enzimática por enzimas como la arabinofuranosidasa y xilanasas, dando lugar a oligosacáridos, que son pequeñas cadenas llamadas arabinoxiloligosacáridos (AXOS). Los AXOS tienen potencial como prebióticos con un gran rango de aplicaciones en alimentos y la industria farmacéutica, ya que son digeridos por las bacterias del intestino dando lugar a cadenas cortas de ácidos grasos (SFDA) y otros metabolitos (Xiros & Christakopoulos, 2012).

## 2.1.2 PROPIEDADES

### *Propiedades fisicoquímicas de los arabinoxilanos.*

Los AX han jugado un papel muy importante en el desarrollo de procesos biotecnológicos, que en estos últimos años ha sido el interés de muchos investigadores. Las propiedades principales de los AX son su solubilidad en agua y viscosidad cuando se disuelven en esta. Debido a estas propiedades fisicoquímicas, la influencia de los AX es importante en los procesos biotecnológicos como horneado de pan, elaboración de cerveza, producción de glucosa por hidrólisis o alimentación animal (Rosicka-Kaczmarek, Komisarzczyk, Nebesny, & Makowski, 2016).



Los AX solubles tienen muchas más propiedades funcionales en comparación con los insolubles, como aumentar el contenido de agua y disminuir los tiempos de digestión de los cerdos de forma que aumenta y regula su salud digestiva. También se ha demostrado que los AX aumentan la viscosidad de las disoluciones *in vitro*, de este modo esa viscosidad puede cambiar el metabolismo de lípidos y glucosa. (Chen et al., 2019) La viscosidad depende también del peso molecular, donde los AX solubles tienen una masa molecular de 10 a 10000 kDa mientras que los AX insolubles en agua exceden los 10000 kDa. (Rosicka-Kaczmarek et al., 2016)

La viscosidad varía también dependiendo de la estructura. Así, los AX procedentes del salvado de trigo, en comparación con el pan de centeno, tienen muchas más ramificaciones, el cual le proporciona una mayor viscosidad, confirmando que el grado de ramificaciones en la cadena está directamente relacionado con la viscosidad. De forma similar, los AX con un alto peso molecular, tienen mayor viscosidad. Además, el contenido de ácido ferúlico contribuye a aumentar la viscosidad. Aparte de las propias características estructurales, una mayor concentración de AX también incrementa la viscosidad. (Chen et al., 2019)

### *Propiedades funcionales de los arabinoxilanos.*

Existen varios estudios que confirman los efectos beneficiosos para los seres humanos de los AX derivados del trigo, aunque se necesita una mayor investigación *in vivo* para confirmar dichos efectos (Holmsten, 2018).

- Interacción de los AX con la flora intestinal: efecto prebiótico.

Un prebiótico es un alimento funcional, como la fibra dietética capaz de modificar la composición y actividad de la microbiota intestinal. (Holmsten, 2018).

Existen numerosos estudios que indican el impacto de los AX en la salud humana. Los AX, que son los principales componentes de la fibra dietética insoluble, no se digieren en el tracto intestinal, sino que son fermentados por bacterias (*Bifidobacterium*) en el colon, dando lugar a cadenas cortas de ácidos grasos. (Rosicka-Kaczmarek et al., 2016). Los SCFA producen acetato, propionato y butarato, que inhiben el crecimiento de organismos patógenos y la formación de productos de ruptura que son tóxicos (Bhat & Rose, 2019). Dentro de los efectos positivos encontrados en los AX, se encuentran: mitigación del estreñimiento, reducción del nivel de colesterol LDL en sangre, disminución de nivel de glucosa en sangre, reducción de riesgo de desarrollar tumores, particularmente cáncer de colon, efecto antiinflamatorio e incrementa la absorción de minerales como calcio y magnesio.



De modo que se ha confirmado que los AX y AXOS reducen la producción bacteriana de  $\beta$ -glucuronidasa y amonio en las heces, disminuyendo así los compuestos tóxicos en el colon. (Ciudad-Mulero, 2017)

- Efecto de los arabinosilanos en el metabolismo de lípidos.

A pesar de que se han hecho algunos experimentos con animales demostrando que la suplementación con arabinosilanos cambia la expresión genética en el hígado o el tejido adiposo reduciendo la cantidad de lípidos depositados en ellos, el mecanismo que lo realiza aún no queda esclarecido. Se necesitan más estudios para centrarse en la fracción bioactiva de arabinosilanos que producen dicho cambio en la expresión genética y determinar si la flora intestinal está involucrada en dicho mecanismo. (Chen et al., 2019)

- Efecto de los arabinosilanos en el metabolismo de glúcidos.

Se ha demostrado que los arabinosilanos modifican la expresión genética del metabolismo en glúcidos, pero, como ocurre en el caso de los lípidos, el mecanismo no está claro. Es posible que las fracciones de arabinosilanos bioactivas cambien la expresión genética o que los arabinosilanos modifiquen la composición de la flora intestinal produciendo la modulación de la expresión genética. Además, los AX tienen la capacidad de los arabinosilanos para reducir el nivel de glucosa en el plasma sanguíneo ayudando a controlar enfermedades como la diabetes. Este mecanismo descrito por Chen et al., 2019 puede ser uno de ellos para explicar el cambio en la expresión genética.

- Efecto de los AX en el sistema inmunológico.

El estudio de Mendis, Leclerc, & Simsek, 2016 indica que los AX tienen capacidad inmunomoduladora y además el sistema inmunológico reconoce los constituyentes de la fibra dietética. Varios estudios han determinado que la actividad antitumoral de los AX es principalmente debido a sus capacidades inmunoestimuladoras. Los AX incrementan la actividad de las células T y B e incrementa la respuesta inmunológica celular (M. Mendis & Simsek, 2014).

- Capacidad antioxidante de los AX.

La capacidad antioxidante de los AX está relacionada con el total de contenido ferúlico que contiene, ya que se encuentra unido de forma covalente al residuo de arabinosa. El ácido ferúlico de los AX implica capacidad antioxidante, de forma que el contenido de compuestos ferulados en los AX es el mayor factor para determinar su capacidad antioxidante (Chen et al., 2019). Son compuestos que evitan la oxidación de biomoléculas tales como lípidos, proteínas o ADN, y lesión de tejidos (Ciudad-Mulero, 2017). Entre los ácidos ferúlicos, se pueden encontrar también di- y tri-, todos esterificados con



arabinosa, siendo el tri-ácido ferúlico el que tiene una mayor capacidad antioxidante por tener mayores unidades de ácido ferúlico en cada molécula, aumentando los hidrógenos donadores proporcionados por los grupos -OH. (Chen et al., 2019).

### 2.1.3 APLICACIONES

El consumo de productos que contienen AX y AXOS tienen efectos beneficiosos en la salud humana. Estos efectos beneficiosos se adaptan muy bien a la actual tendencia en la dieta, es decir, un incremento del consumo y a su vez el desarrollo de tecnología para obtener alimentos con propiedades beneficiosas mejoradas para la salud. (Rosicka-Kaczmarek et al., 2016)

La combinación de las propiedades prebióticas y antioxidantes hacen a los AXOS un interesante ingrediente en alimentos funcionales. Además, su estabilidad a bajo pH y altas temperaturas y solubilidad en agua contribuyen a aplicarlos como ingredientes en un gran rango de productos alimenticios (Snelders et al., 2014).

Los AX tienen un efecto importante sobre las características resultantes de los productos obtenidos con esta materia prima. Debido a las propiedades fisicoquímicas, los AX se derivarán a un distinto uso. Estas propiedades dependen de las características de los AX antes descritas: la estructura molecular, el grado de sustitución y relación A/X. Estos polisacáridos adquieren mucha importancia en los procesos biotecnológicos que se encuentran relacionados con el procesamiento de cereales tales como horneado de pan, producción de cerveza, hidrolizado de glucosa y alimento para animales, y se debe tener en cuenta cómo interfieren los AX en la calidad de los productos.

- Horneado de pan.

En cuanto al sector panadero, los AX tienen un gran impacto en el proceso del horneado del pan. Añadir AX solubles en agua a la masa de trigo incrementa el volumen de la masa del pan al hornearse, también tienen un impacto positivo como conservante, manteniendo la humedad de la miga del pan y disminuyendo la descomposición del almidón por más tiempo durante su almacenamiento.

Además de modificar las propiedades fisicoquímicas del pan y mejorar su calidad, añadir preparaciones específicas de AX ayuda a prevenir y tratar enfermedades relacionadas con la dieta mencionadas anteriormente, como reducir la glucosa en sangre, mejorando la salud en personas con diabetes de tipo II (Rosicka-Kaczmarek et al., 2016).

- Elaboración de cerveza.



La malta de cebada que se usa en la producción de cerveza suele contener entre 6 y 10% de AX. El contenido de AX en el grano de cebada depende de la variedad de grano y también de las condiciones ambientales y su forma de cultivo. Aunque la mayoría de los AX quedan en el BSG, hay una cantidad de AX que acaban en el producto final. Los AX aportan los beneficios antes descritos a la cerveza, pero también la gelifican y añaden turbidez (Rosicka-Kaczmarek et al., 2016).

- Como ingrediente para alimentos funcionales.

Hoy en día, el estilo de vida ajetreado afecta a la salud física y mental de las personas, aumentando el riesgo de todo tipo de enfermedades incluyendo gastrointestinales, de manera que la comida tiene un rol muy significativo en la salud del intestino llegando a aliviar y mitigar los síntomas del estrés. Los alimentos funcionales son aquellos que tienen propiedades que proveen y mejoran la salud, además de tener un valor nutricional. Se añaden a las comidas, de forma que quedan modificadas y enriquecidas para dar mayores beneficios en la salud que una dieta normal. Los alimentos funcionales están enriquecidos con probióticos, prebióticos y simbióticos así como de componentes de plantas o animales que tienen la capacidad de mejorar la salud y el bienestar (Bhat & Rose, 2019).

Se han encontrado aplicaciones de los AX como sustituyente de sacarosa en la producción de galletas, añadiendo además propiedades beneficiosas para la salud humana incrementando el nivel de fibra de la galleta (Pareyt, Goovaerts, Broekaert, & Delcour, 2011).

Actualmente los alimentos prebióticos también se venden en cápsulas y en polvo.

## 2.2 BAGAZO DE CERVEZA

Los subproductos resultantes de la agricultura e industria, como el salvado de trigo o el bagazo de cerveza son ricos en polisacáridos celulósicos y no celulósico. En la actualidad, el interés por conseguir la total utilización de dichos subproductos está aumentando con el fin de garantizar la viabilidad económica y medioambiental de las empresas. Fraccionar dichos subproductos en sus componentes poliméricos y transformarlos en sus componentes monoméricos puede dar lugar a diversos caminos para explorar y la obtención de nuevos bioproductos. (Mandalari et al., 2005).

El bagazo de cerveza es un residuo sólido insoluble obtenido del proceso de fabricación de la cerveza. Representa el 85% de los subproductos generados, siendo el mayor subproducto de la industria cervecera. A pesar de

ser un producto fácilmente aprovechable, el sector no le ha prestado atención de forma que se usa tradicionalmente de alimento para animales (Ikram et al., 2017).

## 2.2.1 PROCESO DE PRODUCCIÓN

En las primeras etapas del proceso de producción de la cerveza, la cebada recogida de la cosecha se limpia y clasifica en tamaños. Se deja almacenada por 4-6 semanas y después se somete a un proceso de malteado, que es un proceso de germinación el cual sirve para aumentar el contenido enzimático del grano.

En la fábrica de cerveza, la malta se muele y se mezcla con agua en un tonel macerador aumentando gradualmente su temperatura de 37 a 78°C, de forma que así se promueve la hidrólisis enzimática de los constituyentes de la malta, mayoritariamente del almidón, pero también de otros componentes como las proteínas,  $\beta$ -glucanos y AX de forma que se solubilizan en el agua sus productos de ruptura. Durante el proceso de hidrólisis, el almidón se convierte en azúcares fermentables, (principalmente maltosa y maltotriosa) y azúcares no fermentables (dextrinas), y las proteínas son degradadas a polipéptidos y aminoácidos. Esta conversión enzimática llamada maceración produce un líquido de sabor dulce llamado mosto. La parte insoluble, formada por la malta, se asienta formando una cama en el macerador y se utiliza para filtrar el mosto. El mosto filtrado se usa como medio de fermentación para producir cerveza y a la fracción sólida residual resultante del grano de cebada malteado se le denomina **bagazo de cerveza** (Mussatto, Dragone, & Roberto, 2006).



Figura 2.3 - Generación de BSG durante el proceso de elaboración industrial de la cerveza (Xiros & Christakopoulos, 2012).



## 2.2.2 DATOS DE PRODUCCIÓN

El bagazo de cerveza (BSG) es el mayor subproducto de la industria cervecera, abarcando el 85% de los subproductos generados. (Ikram et al., 2017) (Buffington, 2014). El BSG representa el 31% del peso de malta inicial y se obtienen 20 kg de BSG por cada 100 litros de cerveza producida. El BSG se encuentra en el mercado a precio muy bajo (Mussatto et al., 2006). En 2018, se produjeron 23.756.952 hL de cerveza, que equivalen a 475.179 toneladas de BSG. En el primer trimestre de 2019 se han consumido 755.1646 hL de cerveza, siendo el BSG producido de 151.932 toneladas (Las & Asociadas, 2019).

En la Unión Europea se producen anualmente 3,4 millones de toneladas de bagazo de cerveza. A pesar de su gran volumen de producción, el sector no le ha prestado atención a este subproducto de forma que se ha usado tradicionalmente como alimento de animales. En los últimos años, el BSG ha ido ganando la atención para el consumo humano debido a sus componentes bioactivos y sus efectos beneficiosos para la salud. (Ikram et al., 2017).

Uno de los problemas que tiene este residuo es su compleja composición, su gran contenido en humedad (aproximadamente el 75%), que provocan problemas en su almacenaje y transporte. Debido a esta humedad, se lo considera un material de desecho debido a que esta aumenta el riesgo de descomposición microbiológica. (Ikram et al., 2017). Para evitar estos problemas, se suele utilizar el secado (liofilización y secado en horno) como método de conservación del bagazo de cerveza (Cruz, 2018).

## 2.2.3 COMPOSICIÓN

El bagazo de cerveza está compuesto mayoritariamente por la cáscara del grano, y pequeñas fracciones de pericarpio y del recubrimiento de la semilla (Bastos et al., 2018), compuesto por lignina, celulosa, hemicelulosa, lípidos y proteínas. El BSG es un material lignocelulósico ya que la celulosa (un homopolímero formado por unidades de glucosa), hemicelulosa y lignina (una macromolécula de polifenoles) forman casi el 50% en peso del BSG.

En general, la composición del BSG depende del grano de cereal inicial. Como se indica en la Figura 2.4, se puede ver la media de AX que contienen distintos tipos de granos de cereal (en base seca). La cebada contiene un 5% de AX en el grano completo, un 18% en el salvado, un 15% en la paja, un 3% en la harina y un 20% en la cáscara (Bastos et al., 2018). También varía en función de la variedad de cebada, la temporada de cosecha, las condiciones de malteado y macerado, y la calidad y tipo de productos añadidos al proceso de fabricación de la cerveza (Mussatto et al., 2006).

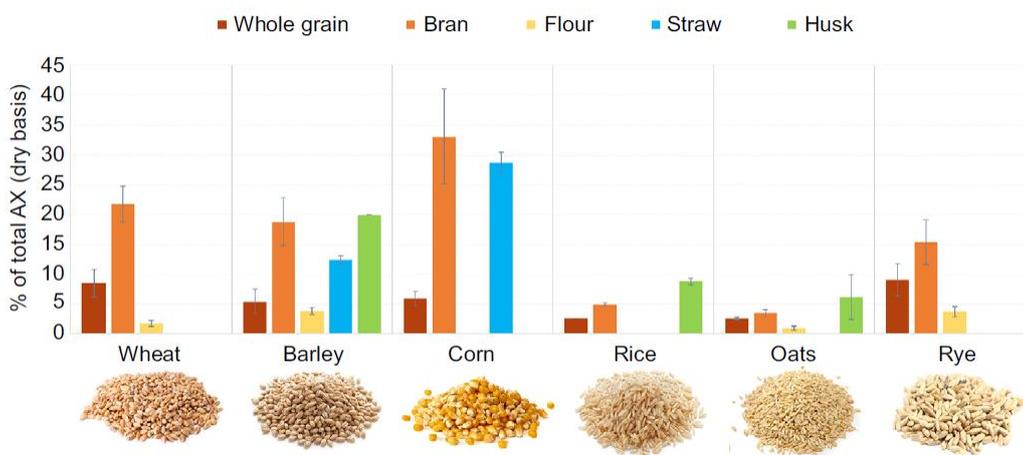


Figura 2.4 - Contenido medio de AX totales en granos enteros de distintos tipos de cereales (Bastos et al., 2018).

El BSG está compuesto entre 15-26,2% de proteínas y 70% de fibras, las cuales se dividen en celulosa (entre 15,5 y 25% w/w), hemicelulosas (28 a 35% w/w) y lignina (aproximadamente 28% w/w), también puede contener lípidos y cenizas. (Ikram et al., 2017). Los principales componentes de los tejidos fibrosos son arabinosilanos, lignina y celulosa. En concentraciones mucho menores, en el BSG también se encuentran minerales, vitaminas y aminoácidos (Mussatto et al., 2006).

En la Tabla 2.1, se presentan los datos de composición del BSG obtenidos de diferentes estudios.

Tabla 2.1 - Composición de BSG en distintos estudios (Ikram et al., 2017).

Peso de los componentes en g/kg base seca							Estudio realizado por:
Proteínas	Cenizas	Lignina	Celulosa	Hemicelulosa			
			(glucosa)	(xilosa)	(Arabinosa)		
153	46	278	168	199	85	Mussato et al., 2006	
240	24	118	254	ND	ND	Kanauchi et al., 2001	
246	12	217	219	206	90	Carvalho et al., 2004	
ND	46	169	253	ND	ND	Silva et al., 2004	
247	42	194	217	136	56	Moreira et al., 2013	

ND: No determinado en el estudio.

## 2.2.4 APLICACIONES

Los subproductos lignocelulósicos (madera, paja, materiales agrícolas e industriales) son el material orgánico más abundante de la tierra, siendo aproximadamente el 50% de la biomasa con una producción mundial de  $1 \times 10^{10}$  Mt. (Buffington, 2014).



Las grandes cantidades de grano usado y el incremento en la valoración de residuos orgánicos y bioeconomía circular, han impulsado el interés en desarrollar nuevos caminos de valorización como una alternativa al tradicional uso como alimentación animal. El grano usado BSG tiene un alto contenido en recursos nutritivos, por lo que puede ser usado como materia prima en distintos tipos de industria como alimento de ganado, químicos, industria farmacéutica y biofuel (Spjelkavik, Karlijn, Taylor, Bolwig, & Mark, 2019).

En la tabla 2.2 quedan recogidas las principales aplicaciones del BSG:

Tabla 2.2 - Aplicaciones del BSG.

Producto	Uso del BSG	Estudio:
Alimento para animales	Es un ingrediente excelente para el alimento de animales como rumiantes, aves, cerdos y pescado debido a que proporciona proteínas, fibra y energía mediante su ingesta.	Mussato, Dragone, & Roberto, 2006
Nutrición humana	El BSG es un ingrediente que, añadido en bajas concentraciones, mejora las propiedades sensoriales como el sabor y las nutricionales al tener alto contenido en proteínas y fibra, bajo contenido calórico, capacidad alta de absorción en agua, contiene minerales como Ca, P, Fe, Cu, Zn y Mg y fácil de mezclar. Debido a esto se ha añadido como ingrediente de: harina para hornear pan (5% a 10%), pasta, salchichas y snack de fritura.	Mussato, Dragone, & Roberto, 2006 Ikram et al., 2017
Producción de energía	El BSG se usa para producir energía por combustión directa o se fermenta para producir biogas.	Mussato, Dragone, & Roberto, 2006
Producción de carbón	Se hacen bloques de carbón secando el BSG con un poder calorífico de 27 MJ/kg.	Mussato, Dragone, & Roberto, 2006
Componente de bricks	Al ser un material formado mayoritariamente por fibra y poco contenido de cenizas, el BSG se usa para fabricar bricks, pudiendo sustituir al serrín, aumenta su porosidad.	Mussato, Dragone, & Roberto, 2006
Fabricación de papel	El BSG se utiliza para la producción de productos de papel como tarjetas, papel para secarse o posavasos.	Mussato, Dragone, & Roberto, 2006
Adsorbente	Debido a su poder adsorbente, se utiliza para adsorber distintos tipos de componentes como compuestos orgánicos volátiles de gases residuales. También adsorbe cadmio y plomo de soluciones acuosas.	Mussato, Dragone, & Roberto, 2006

Procesos biotecnológicos	Se usa como sustrato para cultivo de microorganismos y sustrato para producción de enzimas debido a su alto valor nutricional.	Mussato, Dragone, & Roberto, 2006
Obtención de bioproductos	Producción de AX, compuestos fenólicos, xilitol y arabitol.	Mussato, Dragone, & Roberto, 2006

## 2.3 OBTENCIÓN DE ARABINOXILANOS A PARTIR DEL BAGAZO DE CERVEZA

Como ha sido descrito anteriormente, el BSG contiene componentes de interés que deben extraerse para poder aprovechar sus distintas aplicaciones. Este trabajo centra su atención en la recuperación de los AX contenidos en el BSG para su uso como prebiótico en alimentos o suplementos alimentarios.

Como se aprecia en la Figura 2.5, el proceso de obtención de AX se puede dividir en tres etapas, una de pretratamiento, otra de extracción de la materia prima (BSG), seguido de una etapa de separación y purificación del extracto para obtener el compuesto de interés (AX).



Figura 2.5 - Diagrama de bloques de las principales etapas en la obtención de AX a partir de BSG.

Antes de la etapa de pretratamiento, se incluyen otras operaciones unitarias como son el secado y el lavado del BSG (acondicionamiento de BSG).

### Secado previo

El bagazo, cuyo contenido en agua está entre 70-80%, se somete a un proceso de secado hasta lograr un contenido de humedad del 10-12% necesario para evitar su deterioro. Este secado puede ser realizado mediante diferentes técnicas como secado con tambor rotatorio, secado mediante un flujo de vapor sobrecalentado, secado mediante separación con membranas con secado a vacío o secado en estufa (Skendi, Harasym, & Galanakis, 2018).

### Lavado previo

Antes de realizar este secado, se puede realizar un lavado previo del BSG con agua destilada con el fin de eliminar los restos de glucosa procedentes del



residuo de mosto, obtenido tras la etapa de maderación en el proceso de elaboración de cerveza.

### 2.3.1 PRETRATAMIENTO

La etapa de pretratamiento tiene como objetivo modificar la estructura lignocelulósica favoreciendo el acceso del disolvente a los AX durante la posterior etapa de extracción. Puede ser realizada mediante tratamientos como molienda o la utilización de la tecnología de ultrasonidos (US). Se ha demostrado que el uso de cualquiera de estos tratamientos afecta a la solubilidad y estructura de los componentes del BSG. (Skendi et al., 2018)

#### Molienda

Mediante este proceso, la solubilidad de los WEAX mejora al reducir el tamaño de partícula del BSG, aumentando el área específica de contacto BSG-disolvente. Al disminuir el tamaño de partícula de BSG, se facilita de este modo que los polímeros más ramificados se puedan extraer. (Skendi et al., 2018).

Un tamaño de la partícula menor permite incrementar el alcance de la hidrólisis. Las partículas de mayor tamaño se impregnan menos por lo que se tiene un menor rendimiento de extracción ya que en el interior de la partícula se ha producido una hidrólisis incompleta. (Bastos et al., 2018)

#### Ultrasonidos

La extracción con ultrasonidos (US) es un proceso que puede utilizarse tanto como pretratamiento antes de realizar la extracción, ya que se ha demostrado que aumenta su rendimiento, o directamente como método de extracción con el uso de un solvente adecuado.

La tecnología de US provoca fluctuaciones de presión en el agua que se propagan a través del material. Las olas de presión y el fenómeno de cavitación producen unas burbujas que colapsan y producen un aumento de la temperatura en esa zona que rompe las paredes celulares. Además, promueve la ruptura de los enlaces de los AX con la lignina. Al romperse las paredes celulares se libera el contenido de la célula en el medio. El pretratamiento usando ultrasonidos y agua es una etapa de pretratamiento utilizada para la eliminación de almidón y proteínas de los subproductos de los cereales (mejora del rendimiento y de la pureza de los AX en la etapa de extracción).

Se ha demostrado que usar este tratamiento reduce el tiempo de extracción, el solvente a utilizar y la temperatura de extracción, produciendo un rendimiento y una pureza de polisacáridos más altos, sin modificar su estructura ni sus propiedades funcionales (Bastos et al., 2018).



También se utiliza como método de extracción directamente. En el estudio de Reis, Coelho, Coimbra, & Abu-Ghannam, 2015 se realiza el proceso de pretratamiento y extracción mediante tecnología de US para producir un extracto rico en AX. Se realiza un proceso de **pretratamiento** mediante tecnología de US de BSG con agua destilada en relación 1:25 w/v y se les aplicó ultrasonidos, realizando experimentos utilizando diferentes amplitudes de forma intermitente de 5 segundos aplicando US y otros 5 sin ello. La mezcla se centrifuga, el residuo sólido se resuspende en agua y se lleva a autoclave. El proceso de autoclavado se realiza como un lavado complementario. El residuo autoclavado se suspende en una solución alcalina y se realiza una **extracción con tecnología US** utilizando como disolvente hidróxido de potasio (KOH), mediante el mismo método de aplicación de US intermitente. La suspensión obtenida se neutraliza con ácido clorhídrico y se somete a centrifugación. Posteriormente, el líquido se mezcla con etanol (96%) de forma que hace precipitar los AX. Los extractos obtenidos en el pretratamiento con agua y autoclavado también se mezclan con etanol para precipitar los AX. Los AX son purificados mediante un proceso de diálisis y de liofilización. El **rendimiento** obtenido de recuperación de AX en este estudio es 20,3% (sobre el BSG inicial) en la extracción alcalina más un 2,2% de rendimiento del extracto pretratado US con agua y 1,1% del extracto obtenido del proceso de autoclavado.

### 2.3.2 EXTRACCIÓN

La etapa de extracción de la materia prima consiste en **solubilizar los AX** de forma selectiva frente a otros compuestos contenidos en el BSG. La mayoría de los AX no se pueden solubilizar en agua, solamente puede una pequeña cantidad a presión atmosférica (WEAX). Además, las cantidades de proteínas, componentes fenólicos y otros polisacáridos solubles provocan dificultad en la solubilización de los AX y, consecuentemente, su posterior purificación. Por este motivo, hay distintas metodologías para la extracción de los AX de los subproductos de los cereales, como hidrotermal (con agua caliente comprimido), extracción química (alcalina) o tratamiento enzimático, también mediante adsorción con resinas y membranas. Además, las tecnologías de microondas y ultrasonidos se utilizan para mejorar los rendimientos de recuperación y aumentar la sostenibilidad del proceso de extracción (Bastos et al., 2018).

El rendimiento de extracción de los AX puede ser mejorada ajustando ciertos parámetros, como aumentar la temperatura, prolongar el tiempo de extracción, incrementar la fuerza iónica y el pH de los solventes de forma que se mejore la solubilidad de los polímeros. (Izydorczyk & Dexter, 2008).



### Extracción con agua (hidrotermal o autohidrólisis)

La extracción con agua es un método muy extendido y se utiliza para extraer los AX de distintos tipos de cereales como el trigo.

Las extracciones con agua son realizadas normalmente a temperaturas entre 25-100°C, esto permite recuperar AX con un alto peso molecular sin modificar prácticamente su estructura. Para mejorar el rendimiento de la extracción y pureza de los WEAX, se somete el BSG a pretratamientos para eliminar el almidón del material lignocelulósico, retirar componentes hidrofóbicos que pueden dificultar la extracción de AX y un tratamiento para retirar la grasa.

Para mejorar la eficiencia de la extracción con agua se utiliza un tratamiento hidrotermal como un proceso verde con alto rendimiento de extracción de hemicelulosa (58%-70%). Se utiliza agua caliente como solvente, por lo que se evita del uso de disolventes orgánicos con efectos perjudiciales desde el punto de vista medioambiental.

Un proceso hidrotermal es la **autohidrólisis**, que consiste en usar agua líquida a una temperatura superior a 100°C, a presiones entre 5 y 40 MPa. Durante el proceso, el agua caliente presurizada hidrata la celulosa e hidroliza la hemicelulosa. Esto promueve la solubilización de casi todo el contenido hemicelulósico de BSG, mayoritariamente compuesto por AX. Dependiendo de las condiciones de operación, los productos de la autohidrólisis de los AX son principalmente una mezcla de AXOS, arabinosa, xilosa y ácido acético (Bastos et al., 2018).

En el estudio de Gómez, Míguez, Veiga, Parajó, & Alonso, 2015, se utiliza una **extracción para eliminar almidón**: mezclando BSG con agua destilada en proporción 8:1 w/w (sólido seco) en un reactor de tanque agitado mediante un proceso isoterma (100°C) durante 30 minutos. Se centrifuga y la fase sólida se seca y almacena para su posterior uso. Posteriormente, la **extracción** se realiza mediante un **proceso hidrotermal**. El sólido seco extraído se mezcla con agua destilada (relación 8:1 w/w) en reactor de tanque agitado y se somete al proceso hidrotermal no isoterma donde se produce la extracción acuosa. Los licores que contienen los AX extraídos se centrifugan. Se realiza una **hidrólisis enzimática** para intentar disminuir el grado de polimerización de los AX y conseguir AXOS. La purificación se realiza con **filtración de membranas** seguido de un **intercambio iónico y catiónico**. Se obtiene un producto final con 84% de oligosacáridos sustituidos (AX, 56.2%; AXOS, 15.3%) y un 8% de impurezas no volátiles.



### Extracción química alcalina

El tratamiento alcalino es uno de los métodos más usados, el cual descompone los enlaces éter entre la lignina y hemicelulosas, y también las cadenas éster entre la lignina y/o hemicelulosa con ácidos hidroxycinámicos, creando poros en la estructura permitiendo así la expansión de la lignocelulosa. Debido a que se extraen los WUAX mediante solventes alcalinos-acuosos, mejora el rendimiento de la extracción de AX. Los solventes más utilizados son hidróxido de sodio (NaOH) e hidróxido de potasio (KOH). Los AX se precipitan con etanol en pasos secuenciales (Bastos et al., 2018).

Además de los AX extraídos, que componen casi el 80% de los carbohidratos en el extracto, también se extraen eficientemente otros componentes como proteínas, lípidos y algo de lignina. Esto es debido a que la composición del BSG es muy compleja y la consecuencia es que reduce la selectividad de la extracción alcalina (Skendi et al., 2018).

El experimento de Laine et al., 2015, utiliza una **extracción alcalina** con NaOH 1 M acuoso como solvente. Se mezcla BSG con NaOH en relación 1:50 w/v, a temperatura ambiente (20°C) durante 1h. El extracto rico en AX se separa mediante centrifugación y se analiza. El residuo sólido se lava y centrifuga para ser almacenados. Tras realizarse el análisis, se obtiene que contiene una gran proporción de AX. Inicialmente, el BSG contenía un 23,3% de AX. Se consigue un extracto que contiene menos del 50% de AX iniciales que contenía el BSG. En este experimento se recicla el NaOH utilizado mediante el proceso de ultrafiltración.

En el experimento de Vieira et al., 2014 se alcanza un rendimiento de recuperación de AX de 82-85% realizando tres extracciones alcalinas secuenciales utilizando como solvente KOH 4M. La mezcla se realiza en proporciones 1:5 w/v y los AX son precipitados con etanol 70%.

### Extracción asistida con tecnología microondas

Tanto la extracción con agua como la alcalina pueden ser realizadas utilizando simultáneamente la tecnología microondas asistida (**MAE**), la cual mejora la eficiencia de extracción y la viabilidad del proceso, ya que se reduce la cantidad de reactivo a utilizar.

La MAE utiliza la energía microondas para calentar rápidamente la mezcla introducida de material lignocelulósico-solvente con periodos cortos de extracción que en otros tratamientos térmicos. Normalmente, el procedimiento de MAE dura unos 15-30 minutos utilizando volúmenes de solvente 10 veces menor que los usados con técnicas de extracción convencionales. El uso de tecnología microondas para la extracción de AX ha sido propuesta para distintos tipos de residuos industriales como cáscaras de cebada, maíz y paja



de trigo. Los AX se pueden obtener directamente en agua o mezclándolos con soluciones alcalinas o ácidas (Bastos et al., 2018).

A diferencia de otros métodos convencionales, al usar la tecnología microondas se disipa uniformemente la energía a través del material ya que el calor es introducido a nivel molecular mediante la transformación directa de la energía electromagnética en calor. Por lo tanto, la onda microondas penetra entre el material lignocelulósico y esto hace que el calor se distribuya a través de toda la materia prima en lugar de usar una fuente externa de calor. El calor generado por el microondas genera que la fibra se hinche y se fragmente como resultado del calentamiento de las partículas de dicha fibra. Por este motivo, el pretratamiento y extracción mediante microondas ofrece unas ventajas que los métodos de calentamiento convencionales debido a las propiedades mencionadas y la simplicidad del proceso, además de la disminución de compuestos inhibidores.

Además, uno de los aspectos más importantes es que es un método muy eficiente energéticamente, y que tiene un coste de capital relativamente bajo (López-linares, García-cubero, & Lucas, 2019).

Como ejemplo, en el experimento de Coelho, Rocha, Saraiva, & Coimbra, 2014, se realiza una **extracción microondas** con BSG como materia prima mezclado con agua en proporción 1:6 (w/v) en un microondas realizando pruebas a distintas temperaturas (de 140 a 210°C) durante dos minutos con agitación continua. Después se enfría a temperatura ambiente, se centrifuga y filtra para separar la fracción soluble de los residuos celulósicos. La fracción sólida es suspendida en agua y almacenada en frío. El residuo sólido se utiliza para hacer varias **extracciones microondas** en cadena a 180°C durante 2 minutos. **La separación** de los AX se realiza mediante **precipitación**. El líquido extraído se mezcla con etanol 70% (v/v), en agitación durante 2h a 4°C. Los AX precipitan. Se centrifuga la mezcla resultante y el precipitado se disuelve en agua, se lleva a la estufa con el fin de obtener los AX secos (**evaporación**). El rendimiento obtenido de recuperación de AX y AXOS es máximo con la temperatura máxima: 210°C y **43,4%**, y la recuperación total de AX y AXOS (w/w) **72%**.

### [Tratamiento enzimático](#)

Los métodos enzimáticos se presentan como una alternativa a la extracción química convencional. Se ha demostrado que los métodos enzimáticos son igual de eficientes en la conversión de los WUAX en AX solubles, y más sostenible desde el punto de vista medioambiental.

Las enzimas más usadas para recuperar los AX mediante este método son las endo-( $\beta$ 1,4)-xilanasas. Las endoxilanasas atacan la cadena de xilanos,



produciendo una mezcla de AXOS monosustituídos y disustituídos. Esto permite solubilizar y extraer los WUAX, y depolimerizar los WEAX que son degradados a sus monómeros, arabinosa y xilosa. Existen más tipos de enzimas capaces de hidrolizar los AX cuando es necesario modificar su estructura para su uso en aplicaciones específicas. Para aumentar el rendimiento de recuperación, se utilizan diferentes enzimas para eliminar el almidón y la celulosa de la pared celular.

Los tratamientos enzimáticos suelen tener un rendimiento de recuperación de AX menor comparado con extracciones químicas alcalinas o ácidas. Por ejemplo, en el experimento de Zhou et al., 2010 el rendimiento de obtención de AX fue 12,4% con tratamiento enzimático y de 18,5% con una extracción alcalina de peróxido de hidrógeno. Esto se debe a obstáculos como la estructura cristalina de la lignocelulosa y la presencia de inhibidores de enzimas (Bastos et al., 2018).

Se ha demostrado que la extracción alcalina no es buena para el medio ambiente y, además, con este método se pierde ácido ferúlico. Por otra parte, en el tratamiento enzimático el contenido de ácido ferúlico contenido en los AX es mayor, siendo esto un punto importante debido a que tiene un gran poder antioxidante en el organismo. (Bastos et al., 2018).

### 2.3.3 SEPARACIÓN/PURIFICACIÓN

La etapa de separación y purificación es necesaria para aislar los AX del líquido obtenido en la etapa de extracción. Este extracto contiene además de los AX, otros compuestos del BSG como azúcares, almidón, compuestos fenólicos y grasas que dificultan la posterior etapa de separación. La precipitación con alcohol es el tratamiento más usado para la separación de AX, ya que es barato y fácil de realizar, aunque no es selectivo. Si el uso de los AX va a derivar en la industria alimentaria, se suelen usar mezclas entre agua y etanol ya que son disolventes aptos para el consumo humano (Skendi et al., 2018).

## 2.4 PROCESOS ESTABLECIDOS PARA REALIZAR EL TRABAJO EXPERIMENTAL

Desde un punto de vista sostenible, los métodos usados para el tratamiento deberían promover una alta recuperación de los compuestos que se desean extraer, separar y purificar, implicando un alto rendimiento de extracción de AX, usando solventes seguros y minimizando los gastos generados. (Bastos et al., 2018).

Analizando la viabilidad técnica y económica del proceso de recuperación de AX, en este estudio se ha seleccionado la siguiente secuencia de recuperación de AX a partir del BSG:

- Como **pretratamiento** se va a realizar un **lavado** de bagazo, **secándose** después en una estufa a 50°C. Después se reduce el tamaño del BSG mediante molienda hasta reducir el tamaño de partícula < 2 mm y se almacena hasta su uso.
- La **extracción** de los AX se realizará utilizando una **extracción alcalina utilizando tecnología microondas** tratando el BSG con NaOH (alcalino).
- Para la **separación** de los AX extraídos, se va a usar **precipitación** de los AX con etanol, centrifugación del precipitado, lavado con agua y secado del precipitado obtenido.

Por lo que el proceso realizado en este trabajo experimental queda reflejado en el diagrama de bloques de la Figura 2.6:

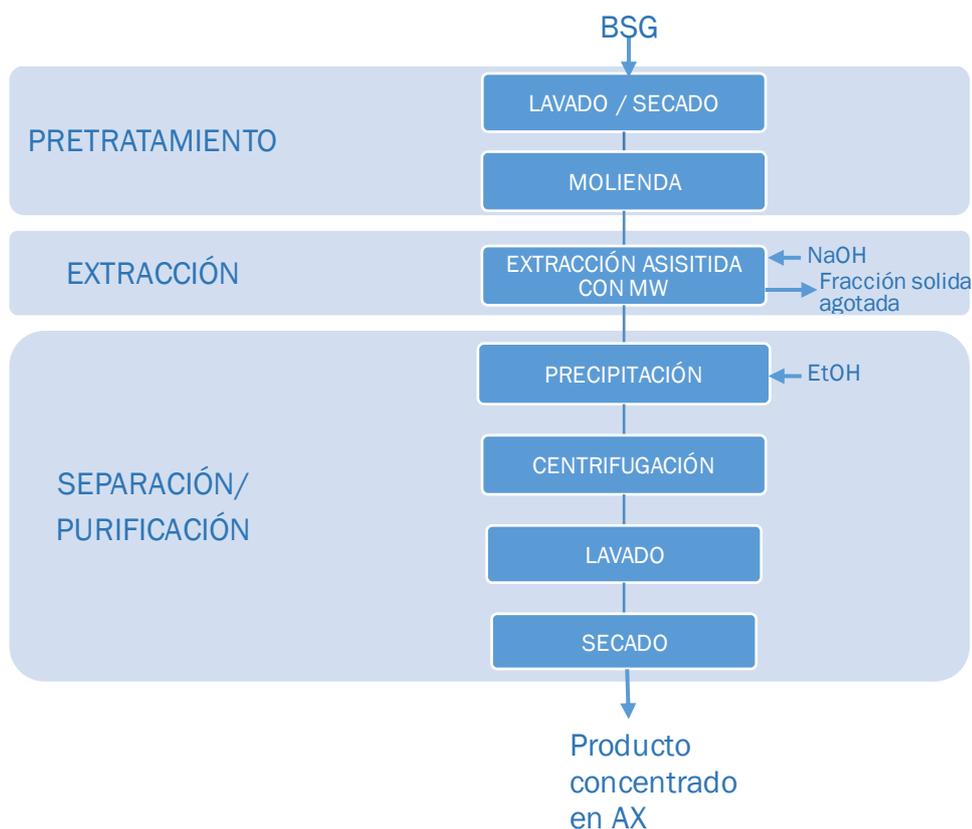


Figura 2.6 - Diagrama de bloques del trabajo experimental realizado.





## 3. OBJETIVOS

El objetivo global de este proyecto es **realizar un estudio experimental a escala laboratorio para la recuperación de arabinoxilanos (AX)** mediante una extracción alcalina asistida con **tecnología microondas** a partir de **bagazo de cerveza (BSG)**.

Los objetivos parciales de este proyecto quedan enumerados a continuación:

1. **Hacer una revisión bibliográfica** con el fin de analizar que la propuesta del estudio experimental sobre las distintas etapas de obtención de AX a partir de BSG es más eficaz que otras alternativas y desempeñarla de la forma más eficiente.
2. Realizar un **estudio experimental** basado en la optimización de la etapa de extracción alcalina con NaOH asistida con tecnología microondas.
  - 2.1. Llevar a cabo unas **experiencias preliminares**, las cuales van a ayudar a determinar los principales parámetros de operación del diseño experimental.
  - 2.2. Proponer y realizar un **diseño experimental** para la etapa de extracción, utilizando el software Statgraphics Centurion XVIII.
  - 2.3. Obtener las **condiciones óptimas de extracción** que permitan obtener la máxima recuperación de arabinoxilanos en el extracto líquido.
3. Comprobar la **viabilidad económica** que tendría una **planta piloto** de capacidad de tratamiento de 40kg/h BSG húmedo mediante un estudio de costes de la planta y un análisis de sensibilidad del proyecto.

El presente Trabajo de Fin de Grado se ha realizado en el marco del proyecto “Transformación de las fracciones lignocelulósicas del bagazo de cerveza en productos con valor energético y alimentario” financiado por la Junta de Castilla y León (VA010P17) y concedido al Grupo de Investigación Reconocido de Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos (GIR 30) de la Universidad de Valladolid, que pertenece al Instituto de Procesos Sostenibles de la misma universidad.





# 4. TRABAJO EXPERIMENTAL

## 4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.1 MATERIA PRIMA Y REACTIVOS

*Bagazo de cerveza:* el BSG utilizado ha sido proporcionado por una cervecería local (Mahou SA, Burgos), y ha sido almacenado a -20°C hasta su uso. Su composición queda recogida en la Tabla 4.1, en porcentaje en peso por cada 100g de materia prima de BSG. Su caracterización ha sido realizada en el estudio de López-linares et al., 2019:

Tabla 4.1- Composición en porcentaje en peso por cada 100g de materia prima (BSG).

Componentes	M. Prima Original (% w/w)
Glucosa	19,68 ± 0,34
XGM	23,44 ± 0,46
Arabinosa	8,95 ± 0,43
Celulosa	17,89 ± 0,31
Hemicelulosa	28,67 ± 0,80
LAI	19,43 ± 1,21
LAS	6,35 ± 0,10
Lignina total	25,78 ± 1,21
CAI	1,04 ± 0,35
Cenizas totales	2,72 ± 0,13
grupos acetilos	1,04 ± 0,05
Extractos	2,33 ± 0,14
Glucosa en extractos	1,34 ± 0,10
Almidón	2,11 ± 0,02

### Reactivos utilizados en el trabajo experimental:

- Hidróxido de sodio (**NaOH**) con pureza 98% de la casa comercial Panreac Applichem, usado para la realización de los experimentos con el microondas.
- Ácido sulfúrico de pureza 72% (**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**), de la casa comercial Panreac Applichem, utilizado para realizar la hidrólisis ácida de los prehidrolizados y la caracterización de los sólidos pretratados.
- Etanol de pureza 96% (**EtOH**) de la casa comercial Panreac Applichem, utilizado para la recuperación de los AX.
- Agua destilada tipo II.

#### 4.1.2 ACONDICIONAMIENTO/PRETRATAMIENTO

Se procede a lavar el bagazo con agua destilada (tipo II) ya que es un residuo obtenido de un proceso industrial, de esta forma se elimina la glucosa desprendida en el proceso de maceración.

Después, el bagazo ya lavado se seca en una estufa a temperatura de 50°C. Una vez el bagazo esté seco, se almacena en bolsas de plástico.

Como pretratamiento, se realiza una molienda utilizando un molinillo de café (Moulinex, A505, Francia), para reducir el tamaño de partícula del BSG y de forma que el tamaño de partícula sea como máximo de 2 milímetros. En la Figura 4.1 y Figura 4.2 se muestra la forma de almacenamiento del bagazo seco sin moler y tras el proceso de molienda.



Figura 4.1- BSG seco sin moler.

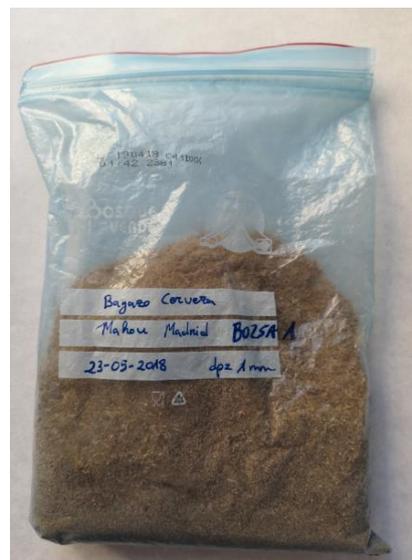


Figura 4.2- BSG seco molido.

En la Figura 4.3 y Figura 4.4 se muestra el tamaño de partícula del BSG antes y después de la molienda, en la Figura 4.5 se comparan los tamaños antes y después de la molienda.



Figura 4.3- Medida de BSG sin moler.



Figura 4.4- Medida de BSG molido.



Figura 4.5- Diferencia de tamaño entre BSG antes y después de la molienda.

### 4.1.3 EXTRACCIÓN ALCALINA ASISTIDA CON TECNOLOGÍA MICROONDAS

Los AX se van a extraer mediante una extracción alcalina utilizando tratamiento microondas con hidróxido de sodio (NaOH) como solvente.

El **equipo de microondas** empleado en la etapa de extracción de AX es el modelo Multiwave PRO SOLV reactor 50 Hz con Rotor tipo 16HF100 de la casa comercial Antoon Paar GmbH (Austria, Europa).

El microondas está compuesto por dos magnetrones de 1000W, siendo 1800W la máxima potencia del microondas. Se utilizan tubos de presión de PTFE-TFM (Figura 4.6), los cuales son introducidos dentro de tubos de

cerámica. Estos tubos tienen una capacidad de 100mL y están provistos con imanes agitadores. El reactor puede ser usado con 16 tubos (Figura 4.7), uno de ellos llevando una sonda que mide la presión y temperatura dentro del tubo. Este sensor tiene como finalidad controlar en todo momento la energía que el microondas aplica al reactor. Además, incorpora un sensor IR para registrar la temperatura de todos los tubos constantemente. En las Figuras 4.8 y Figura 4.9 se visualiza el equipo microondas con el rotor en su correcta posición.



Figura 4.6- Tubo de presión de cerámica.



Figura 4.7- Rotor donde se colocan los tubos de presión.



Figura 4.8- Equipo de microondas apagado.



Figura 4.9- Equipo microondas con el rotor introducido en su interior.

Inicialmente se mezcla el BSG con hidróxido de sodio con una relación sólido-líquido del 10% w/v (5 g BSG en peso seco y 50mL de NaOH) en cada tubo que se va a introducir al reactor microondas (Figura 4.10).



Figura 4.10- Mezcla de BSG con NaOH antes de la extracción microondas.

Se fija la temperatura de trabajo del reactor y el tiempo de mantenimiento. Para cada uno de los experimentos, se emplean diferentes rampas de temperatura dependiendo de la temperatura de trabajo. El reactor se calienta hasta alcanzar la temperatura seleccionada. Al alcanzar esta temperatura, esta se mantiene el tiempo establecido. Una vez terminado el experimento, los tubos se enfrían hasta 50°C. La mezcla se oscurece quedando de color marrón debido a que parte de la lignina del BSG se disuelve en la sosa (Figura 4.11).



Figura 4.11- Mezcla después de la extracción.

Después del tratamiento por microondas, la fracción sólida se separa del extracto líquido mediante centrifugación (Figuras 4.12 y 4.13). La fracción sólida se lava con agua destilada y se lleva a secar a 50°C en una estufa para determinar la recuperación de sólidos (g fracción sólida/100g BSG agotado) y para su posterior caracterización (determinación de su contenido en azúcares, lignina y cenizas) El extracto líquido, rico en AX, fue analizado para saber su composición de monosacáridos, productos de degradación (como ácido fórmico, ácido acético, HMF y furfural) y su contenido en carbono orgánico total.



Figura 4.12- Sólido residual tras la centrifugación.



Figura 4.13- Extracto líquido rico en arabinoxilanos recuperado tras la centrifugación.

#### 4.1.4 EXPERIENCIAS PRELIMINARES

Con la finalidad de establecer un intervalo razonable de temperatura y concentración de NaOH para la etapa de extracción de AX a partir de BAG se van a realizar unas experiencias previas al diseño experimental. Estas pruebas tienen por finalidad encontrar la zona de trabajo óptima para asegurar una mayor recuperación de AX. Las condiciones de trabajo de estas pruebas iniciales están en la Tabla 4.2.

Se han realizado un total de 13 experimentos operando en un intervalo de trabajo de temperatura (120-180°C), y un intervalo de concentraciones de



(0,05-0,2 M). El tiempo de mantenimiento ( 2,5 min) ha sido fijado en base a otras experiencias realizadas con BSG utilizando como disolvente agua (López-linares et al., 2019). El experimento (P13) ha sido realizado con un tiempo de 5 min con el fin de justificar que los tiempos de mantenimiento superiores no mejoran los rendimientos de recuperación de AX.

Tabla 4.2- Condiciones iniciales de las pruebas MAE de BSG con NaOH.

Exp	Tª (°C)	Tiempo de mantenimiento de temperatura (min)	Concentración de NaOH (M)
P1	120	2,5	0,05
P2			0,1
P3			0,2
P4	150	2,5	0,05
P5			0,1
P6			0,2
P7	180	2,5	0,05
P8			0,1
P9			0,2
P10			0,3
P11	200	2,5	0,2
P12			0,3
P13	180	5	0,2

#### 4.1.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el fin de seleccionar las condiciones óptimas para la extracción alcalina asistida mediante tecnología microondas, se ha propuesto un diseño experimental con ayuda del software estadístico Statgraphics Centurion XVIII en base a los resultados de las experiencias preliminares realizadas. El diseño experimental seleccionado es el denominado **Diseño Central Compuesto**, el cual es un diseño de superficie de respuesta. Los factores establecidos han sido la temperatura de extracción (niveles entre 170°C y 210°C) y la concentración de NaOH (niveles entre 0,1 y 0,4 M).

El diseño está formado por 13 puntos (experiencias), incluyendo un punto y cuatro réplicas en el centro del dominio seleccionado para cada factor estudiado (puntos centrales) y 4 puntos estrella, 2 por cada factor. Los factores y niveles quedan recogidos en la Tabla 4.3. El tiempo de mantenimiento de la temperatura ha sido fijado en 2,5 min.



Tabla 4.3- Diseño experimental para la extracción de BSG alcalina asistida con tecnología microondas (2,5 min)).

Exp	T <sup>a</sup> (°C)		Concentración NaOH (M)	
	Codificada	Real	Codificada	Real
1	1	210	-1	0,10
2	-1	170	-1	0,10
3	1	210	1	0,40
4	0	190	0	0,25
5	0	190	0	0,25
6	0	190	0	0,25
7	0	190	-1,41	0,04
8	0	190	0	0,25
9	0	190	1,41	0,46
10	1,41	218,28	0	0,25
11	-1	170	1	0,40
12	0	190	0	0,25
13	-1,41	161,72	0	0,25

#### 4.1.6 PUNTO ÓPTIMO

Una vez realizado el diseño, se ha maximizado la variable respuesta que es la concentración de AX en el extracto líquido con la finalidad de obtener el valor óptimo de esta variable. Para ello, se ha usado el mismo programa con el que se ha determinado el diseño experimental, Statgraphics Centurion XVIII.

#### 4.1.7 SEPARACIÓN

Para separar los AX contenidos en el extracto líquido se utiliza la precipitación con etanol. Para ello, se mezcla el extracto líquido con etanol en relación 1:3 v/v (50 mL extracto por cada 150mL de EtOH) mediante agitación suave durante una hora. Posteriormente, los AX precipitados se separan mediante centrifugación (3000 g, 10 min) (Figura 4.14). A continuación, se resuspende en etanol 95% (Figura 4.15), se seca en la estufa a 60°C obteniendo un polvo sólido rico en AX, que se pesa con objetivo de determinar el contenido de AX precipitados (Figura 4.16).



Figura 4.14- Fracción sólida centrifugada rica en AX.



Figura 4.15- Resuspensión de AX en etanol 95%.

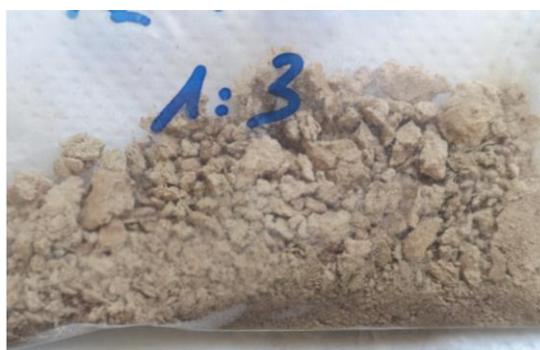


Figura 4.16- Sólido seco con alto concentrado en AX.

#### 4.1.8 MÉTODOS UTILIZADOS

La determinación de los sólidos totales, carbohidratos estructurales, lignina y cenizas en la fracción sólida se lleva a cabo usando los métodos estándares de análisis de biomasa del Laboratorio Nacional de Energías renovables (NREL, National Renewable Energy Laboratory).

Los métodos de caracterización aplicados a la fracción sólida quedan recogidos en la Figura 4.17 y los correspondientes a la fracción líquida se visualizan en la Figura 4.18:

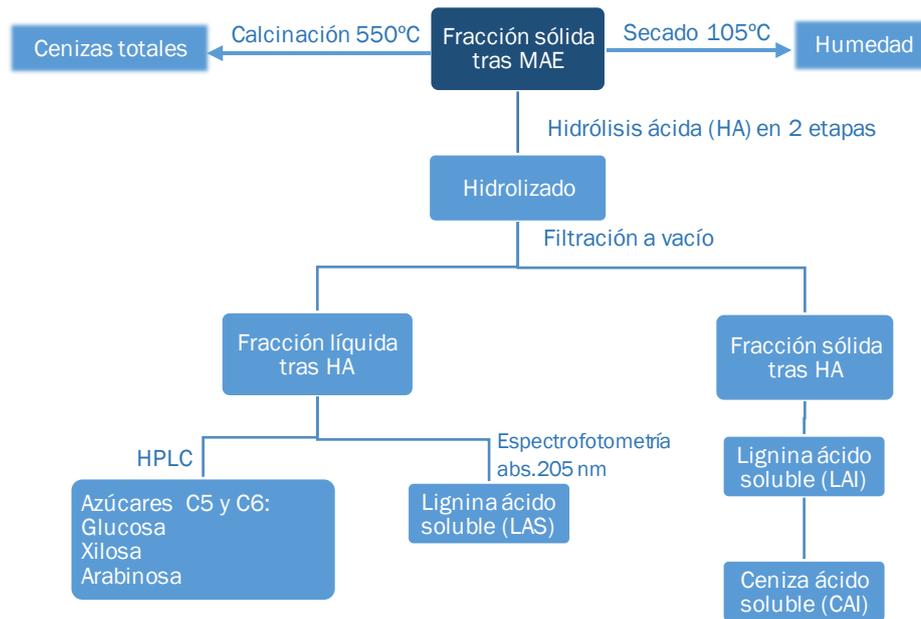


Figura 4.17- Diagrama de los métodos de análisis usados para la fracción sólida tras la extracción alcalina asistida con microondas.

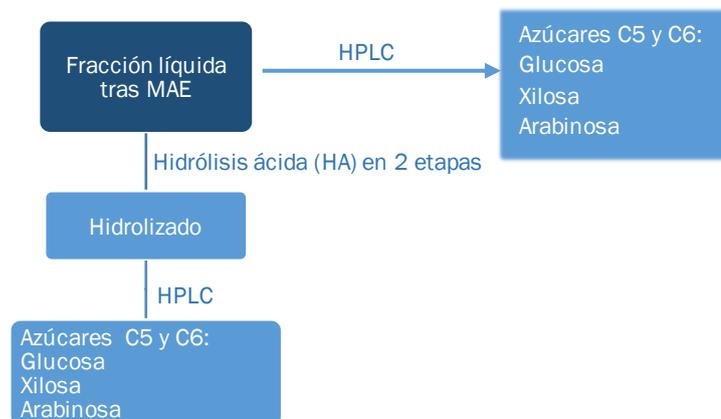


Figura 4.18- Diagrama de los métodos de análisis usados para la fracción líquida tras la extracción alcalina asistida con microondas.

Todas las pruebas realizadas en este estudio experimental se han hecho por triplicado.

## MÉTODOS DE ANÁLISIS

### CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

La concentración de azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa) y componentes inhibidores (ácido acético, fórmico, furfural y HMF(5-hidroximetilfurfural)) se han determinado mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con una columna Aminex HPX-87H. Para medir los azúcares, se utiliza un detector de índice de refracción (Waters 2414). El furfural y HMF se analizan con un



conjunto de detectores de fotodiodo (DAD) a 280 nm (Waters 996). La fase móvil está compuesta por 0,01 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> siendo el flujo empleado de 0,6 mL/min a 60°C.

Antes de llevar las muestras al HPLC, todas ellas se centrifugan a 13400 rpm durante 10 min y se filtran a través de filtros de nylon de 0,2 µm.

### *Espectrofotometría.*

Este método sigue la ley de Lambert-Beer, se basa en medir la luz que absorbe una sustancia química, haciendo pasar un haz de luz por la muestra y midiendo la intensidad. De esta forma se puede conocer la cantidad de una sustancia. Este método se va a utilizar para determinar la lignina insoluble en ácido (LAS) tras la realización de la hidrólisis.

### *Determinación de carbono orgánico total (TOC: Total Organic Carbon)*

La pureza de los AX extraídos se determina mediante esta técnica. Este análisis determina el carbono orgánico que se encuentra en la muestra disuelta en agua destilada. El TOC se determina oxidando la muestra de forma que se cuantifica el CO<sub>2</sub> producido. El aparato que determina el TOC en este caso es el TOC-V 5000 analyzer (TOC-VCSH Shimadzu). Se van a utilizar un patrón con contenido en carbono de 500 mg/L y un blanco de agua tipo II. Se calcula el carbono orgánico total para la xilosa y arabinosa del extracto líquido tras la extracción alcalina con microondas, ya que son los principales componentes de los AX. En este caso se realizará dilución 1:80 con agua destilada.

### *Método estándar para la determinación de sólidos totales en la biomasa.*

El contenido en sólidos totales de una muestra de biomasa es la cantidad de sólidos que permanecen después de eliminar toda la materia volátil mediante el calentamiento de muestra a 105°C hasta peso constante. El contenido en humedad de la muestra es la medida de la cantidad de agua (y otros componentes volatilizados a 150°C) presentes en la muestra.

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

### **Procedimiento**

Secar los crisoles a 105°C y pesarlos. Mezclar bien la muestra y pesar en el crisol 1g de muestra. Poner la muestra en la estufa a 105°C y secar hasta peso constante, normalmente durante 24h. La muestra se saca de la estufa y se enfría en un desecador a temperatura ambiente (durante 10 min) y pesar, anotando el peso.



### [Método de determinación de carbohidratos en la biomasa mediante HPLC.](#)

#### **Procedimiento (realización de hidrólisis ácida (HA) a la fracción sólida.**

Se pesan 0,3g de la muestra libre de extractivos (BSG inicial, sin haber sido sometido a extracción asistida mediante microondas) y poner en un tubo de ensayo. Hacerlo por triplicado. Se añaden 3,00mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y agita con una varilla hasta que esté completamente impregnado. Poner los tubos en un baño durante 1 hora a 30°C agitando la muestra cada 15 min para asegurar una mezcla completa.

Se pesan 0,3g de glucosa, xilosa y arabinosa de alta pureza (secada a 45°C) y ponerlo en un tubo de ensayo. Añadir ácido y proceder como se ha descrito anteriormente. Estas muestras (estándar de recuperación de azúcares) serán los patrones y se hará en paralelo con el resto de las muestras. Los resultados de recuperación de azúcares de esta muestra se utilizarán para corregir las pérdidas por degradación de azúcares durante la hidrólisis. Hacerlo por triplicado.

Una vez transcurrida la hora de hidrólisis transferir los hidrolizados a una botella y diluir a 4% la concentración de ácido añadiendo 84 mL de agua desionizada. Puesto que la densidad de la solución de 4% de ácido es 1,03 g/mL, el volumen total de la solución es 87 mL. Se pesan las botellas para registrar si hubiera pérdidas durante el proceso de autoclavado.

Meter en autoclave las muestras en las botellas cerradas durante 1h a 121°C. Tras la finalización del proceso de autoclavado, dejar enfriar las botellas 20 min a temperatura ambiente antes de abrirlas, seguidamente se pesan.

Filtrar a vacío la solución de hidrólisis (mediante un filtro de 0,45µm previamente desecado y pesado) a través de crisoles de filtración previamente metidos en la mufla y pesados (hasta una precisión de 0,1mg). Filtrar el líquido neutralizado utilizando una jeringa con un filtro de 0,2µm. Filtrar directamente sobre un vial. Analizar mediante HPLC.

### [Determinación de lignina ácido insoluble \(LAI\).](#)

Para la determinación de la lignina ácida insoluble se utiliza un método que parte del líquido tras el proceso de autoclavado (tras la hidrólisis).

#### **Procedimiento**

Una vez se ha filtrado el líquido tras la hidrólisis, y tomadas las muestras para la determinación de carbohidratos y lignina soluble en ácido, continuar la filtración utilizando agua desionizada para arrastrar cualquier partícula pegada



a la botella y para lavar el residuo filtrado exento de ácido, mediante filtración a vacío.

Secar el crisol de filtración y su contenido a 105°C durante 2 horas, enfriar en desecador y anotar el peso del crisol, lignina insoluble, y cenizas insolubles en ácido.

El crisol y su contenido en una mufla y calentar a 550°C durante un mínimo de 3 horas, o hasta que se haya eliminado el carbono. Secar en desecador y anotar el peso del crisol y las CAI, con precisión de 0,1 mg.

#### *Determinación de lignina ácido soluble (LAS).*

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

Las condiciones de trabajo para determinar la lignina ácido soluble, son una longitud de onda  $\lambda = 205\text{nm}$  realizando una dilución 1:10 con ácido sulfúrico 72%. Al encontrarse en el rango ultravioleta visible UV (180-380 nm), se utilizarán cubetas de cuarzo con un patrón de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%. La longitud de onda entre la que deben estar las muestras es entre  $\lambda = 200\text{-}700\text{ nm}$ .

#### **Procedimiento**

Medir la absorbancia del hidrolizado a 205 nm, utilizando una solución de ácido sulfúrico al 4% (preparada diluyendo 3 ml de ácido sulfúrico al 72% w/w con 84 ml de agua tipo II) como blanco.

#### *Determinación de cenizas en biomasa.*

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

Las muestras se deben haber secado a 105°C, antes del ensayo de cenizas.

Se va a determinar el porcentaje de cenizas de la materia prima de BSG, sólido insoluble recuperado tras la extracción MAE y de los sólidos resultantes de la hidrólisis ácida. El proceso utilizado es mediante pesada. Las muestras se depositan en crisoles, se secan en una estufa a 100°C durante 24h y se pesan. Una vez secas se llevan a la mufla a una temperatura aproximada de 550°C durante al menos 3,5 h. Tras ese periodo de tiempo, los crisoles se llevan a una estufa a 100°C durante 1h y, después, se depositan en un



deseCADador durante 10 min para que alcancen la temperatura ambiente, Una vez alcancen la temperatura ambiente, los crisoles con las cenizas se pesan.

### **Procedimiento:**

Determinar la tara del crisol, introduciendo el crisol vacío en la mufla a 550°C hasta peso constante. Enfriar el crisol a temperatura ambiente en un desecador y pesar con precisión de 0,1 mg.

Pesar 1,0 g de muestra y anotar el peso de muestra descontando la tara del crisol. Introducir el crisol en la mufla a 550°C durante un mínimo de tres horas, o hasta que el carbono se haya eliminado. Calentar lentamente y evitar sobrepasar la temperatura. Si la muestra tiende a encenderse, cubrir parcialmente el crisol.

Enfriar el crisol a temperatura ambiente en un desecador y pesar con precisión de 0,1 mg.

### **[Determinación de carbohidratos y compuestos inhibidores en el extracto líquido mediante HPLC.](#)**

Para medir los carbohidratos y compuestos inhibidores en el **extracto líquido**, se introduce el extracto en botes de 2mL y se centrifugan (10 min, 13,4x1000 rpm) para eliminar todo tipo de finos, seguidamente se llenan viales con las muestras para llevar al HPLC.

### **Procedimiento hidrólisis ácida realizada al extracto líquido.**

Se añaden 2mL de extracto líquido junto con 3mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% en una botella ISO 250mL, tapando con papel de aluminio para evitar pérdidas. La mezcla se lleva a un agitador orbital durante 30 min, a 30°C y 200 rpm.

Se añaden 84mL de agua destilada a la mezcla (corresponde a una segunda hidrólisis con ácido diluido), y se lleva a autoclave pesándolo antes, ya que se van a tener en cuenta las pérdidas en el tratamiento de datos.

Tras acabar el tiempo de autoclave (60 min a 120°C), las muestras se enfrían introduciéndose en un baño con hielo. Cuando se enfrían, cada botella se pesa para determinar los gramos de pérdidas en el proceso de autoclavado.

Seguidamente, las muestras se filtran en viales tal como se ha comentado anteriormente para su análisis mediante HPLC.

## **4.1.9 TRATAMIENTO DE DATOS**

Los datos obtenidos en este trabajo se dividen en:

- Tratamiento de la **fracción sólida**.
- Tratamiento del **extracto líquido**.



## TRATAMIENTO DE LA FRACCIÓN SÓLIDA

### Carbono Orgánico Total (TOC)

De forma teórica, para la xilosa y arabinosa (5 carbonos en su estructura y peso molecular de 150,13 g/mol), se calcula su carbono orgánico total partiendo de su concentración (g/L) mediante la Ec1:

$$\text{COT (g/L)} = \text{g/L} \cdot \frac{\text{peso atómico C (60 g/mol)}}{\text{peso molec. xilosa (150,13 g/mol)}} \quad \text{Ec (1)}$$

### Cenizas insolubles en ácido (CAI)

Su porcentaje se calcula mediante la Ec 2:

$$\% \text{CAI} = \frac{\text{cenizas después de la mufla}}{\text{g muestra seca de sólido agot. tras MAE}} \cdot 100 \quad \text{Ec (2)}$$

### Lignina soluble en ácido (LAS)

Se utiliza un coeficiente de extinción de 110 l/g-cm, para calcular la cantidad lignina ácido soluble en el hidrolizado. Los coeficientes a 205 nm para la mayoría de las maderas están entre 88 y 113 l/g-cm. El valor de 110 utilizado aquí está de acuerdo con el valor utilizado en el procedimiento TAPPI, y representa una medida de valores de diferentes maderas y pulpas.

Para una muestra de biomasa sólida, el porcentaje de LAS en base al peso seco a 105°C, o en base libre de extractivos se calcula de la siguiente manera. El cálculo que determina la composición de la lignina ácido soluble es utilizando la Ec 3:

$$\% \text{LAS} = \frac{A}{b \times a} \cdot \text{dil } 40 \cdot 87 \text{ mL} \cdot \frac{L}{1000 \text{ mL}} \quad \text{Ec (3)}$$

Donde:

**A** = absorbancia a 205 nm

**df** = factor de dilución

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

**a** = coeficiente de extinción = 110 L/g-cm

### Cenizas de la fracción sólida tras la extracción

Las cenizas del sólido tras la extracción asistida con microondas se calculan mediante la Ec 4:



$$\%CEN = \frac{\text{cenizas MAE después de la mufla}}{\text{g muestra seca de sólido agot. tras MAE}} \cdot 100 \quad \text{Ec (4)}$$

### Cenizas insolubles en ácido

Son las cenizas que se obtienen después de hacer pasar por la mufla el sólido insoluble filtrado de la HA de sólidos, calculando su porcentaje mediante la Ec 5:

$$\%CAI = \frac{\text{cenizas después de la mufla}}{\text{g muestra seca de sólido agot. tras MAE}} \cdot 100 \quad \text{Ec (5)}$$

### Celulosa y hemicelulosa

La celulosa (Ec 6) proviene de la glucosa y la hemicelulosa (Ec 7) está formada por el resto de azúcares: xilosa, arabinosa, galactosa y manosa, aunque de estas dos últimas no se obtienen cantidades para ser consideradas, se desprecian.

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{glucosa}}{1,1} \cdot 100 \quad \text{Ec (6)}$$

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \left( \frac{\text{xilosa} + \text{arabinosa}}{1,13} + \frac{\text{galactosa} + \text{manosa}}{1,11} \right) \cdot 100 \quad \text{Ec (7)}$$

### Concentración inicial de la fracción sólida

La concentración inicial de las muestras sólidas de BSG tras la extracción MAE y los patrones de glucosa, xilosa y arabinosa se calcula de la siguiente forma (Ec 8):

$$\text{g/L teórico} = \frac{\text{g pesados inicialmente } (\approx 0,3\text{g})}{(3\text{mL H}_2\text{SO}_4 + 84\text{mL H}_2\text{O})} \quad \text{Ec (8)}$$

### Degradación de patrones: glucosa, xilosa y arabinosa

Con la concentración inicial y la medida obtenida de los patrones en HPLC tras la HA, se saca un factor de corrección mediante la Ec 9:

$$\text{factor corrección} = \frac{\text{concentración g/L teórico}}{\text{concentración g/L medida HPLC}} \quad \text{Ec (9)}$$

Debido a que la xilosa es más lábil, se degrada más y se obtendrá un factor de corrección mayor.

### Humedad

El porcentaje de humedad se calcula como (Ec 10):



$$\% \text{ humedad} = 100 - \% \text{ sólidos} \quad \text{Ec (10)}$$

Donde el porcentaje de sólidos es (Ec 11):

$$\% \text{ sólidos} = \frac{g \text{ muestra seca}}{g \text{ muestra húmeda}} \quad \text{Ec (11)}$$

La recuperación total gravimétrica de los licores es la recuperación de los sólidos insolubles en NaOH tras la extracción MAE, se calcula a través de la Ec 12:

$$\% \text{ RTG} = \frac{g \text{ sólido extraído seco/tubo}}{5g(\text{masa por tubo})} \cdot 100 \quad \text{Ec (12)}$$

Donde los gramos totales de sólido tras MAE secos son calculados con la Ec 13:

$$g \text{ sólido seco} = \frac{g \text{ sólido}}{5g \text{ tubo}} \cdot (1 - \text{humedad}) \quad \text{Ec (13)}$$

### Concentración corregida

Se multiplica el dato obtenido de glucosa/xilosa/arabinosa medido en el HPLC por el factor de corrección obtenido por los patrones. Después, se calcula la concentración corregida en función de 100g de sólido agotado (Ec 14).

$$\% g \text{ GLU}/100 g \text{ sólido MAE} = \frac{g/L \text{ corregidos} \cdot 0,087 L}{gr. \text{ sólido seco tras MAE}} \cdot 100 \quad \text{Ec (14)}$$

El porcentaje de g GLU/100g sólido MAE se va a poner en función del bagazo de cerveza inicial (g GLU/100g sólido BSG inicial) utilizando cambios de base.

### Recuperaciones de azúcares (de sólidos)

La recuperación de azúcares va a ser analizada mediante dos cálculos:

- $RG_s$ : es la recuperación de glucosa en la fracción sólida tras MAE (g glucosa en sólido pretratado/100g glucosa en la materia prima) (Ec 15):

$$\% \text{ RG}_s = \frac{\% \text{ glucosa después MAE}}{\% \text{ glucosa antes MAE (mat prima)}} \cdot 100 \quad \text{Ec (15)}$$

- $RAH_s$ : Es la recuperación de los azúcares hemicelulósicos (xilosa y arabinosa) en la fracción sólida tras la MAE (g azúcares



hemicelulósicos en sólido pretratado/100g azúcares hemicelulósicos en la materia prima) (Ec 16):

$$\%RAH_s = \frac{\%(xilosa + arabinosa) \text{ después MAE}}{\%(xilosa + arabinosa) \text{ antes MAE (mat prima)}} \cdot 100 \quad \text{Ec (16)}$$

En la Ec 17 se refleja cómo se ha calculado el porcentaje de glucosa/xilosa/arabinosa después de la MAE:

$$\% \text{ después MAE} = gr. GLU / 100 g \text{ sólido MAE} \cdot \% \text{ recup sólidos MAE} \quad \text{Ec (17)}$$

### Grado deslignificación

El grado de deslignificación (Ec 19) es la cantidad de lignina que se ha disuelto en la base tras la MAE, es la diferencia entre el porcentaje de lignina entre 100% de la materia prima y el porcentaje de lignina recuperado (Ec 18):

$$\% \text{ recup. lignina total} = \frac{(\%LAS \cdot \% \text{ recup}) + (LAI \cdot \% \text{ recup})}{\%LAI \text{ mat prima} + \%LAS \text{ mat prima}} \cdot 100 \quad \text{Ec (18)}$$

$$\text{Grado deslignif.} = 1 - \% \text{ recup lignina total} \quad \text{Ec (19)}$$

## TRATAMIENTO DEL EXTRACTO LÍQUIDO

### Datos HPLC licores tras la extracción MAE (antes hidrólisis ácida)

La masa de materia prima utilizada en cada tubo es de  $\approx 5,13$  g, ya que la masa tiene un porcentaje de humedad, de modo que, añadiendo esa cantidad, se están añadiendo 5g de BSG seco.

### Reajuste de datos HPLC licores post hidrólisis ácida.

Tras la hidrólisis ácida hay una pérdida de peso que se va a tener en cuenta. Para calcular la concentración de oligómeros (xilosa +arabinosa) que se tiene después de la hidrólisis ácida se calcula (Ec 20):

$$g/L \text{ post HA reajustado} = \frac{g/L \text{ post HA} \cdot (89mL - gr \text{ perdidos})}{2mL} \quad \text{Ec (20)}$$

### Cálculo de la concentración de oligómeros.

Se realiza el cálculo de los oligómeros utilizando la xilosa y arabinosa mediante la Ec 21:

$$\begin{aligned} \text{Concentración (g/L) oligómeros} \\ = g/L \text{ (xilosa y arab) después HA} \\ - g/L \text{ (xilosa y arab) antes HA} \end{aligned} \quad \text{Ec (21)}$$



Donde los oligómeros son la resta de los azúcares antes y después de la HA.

Recuperación de azúcares.

Como se ha realizado anteriormente con el residuo sólido tras la MAE, se van a calcular la recuperación de azúcares:

- **RG<sub>L</sub>**: es la recuperación de glucosa en la fracción líquida de la MAE (g glucosa en líquido tras MAE/100g glucosa en la materia prima) (Ec 22).

$$\% \mathbf{RG}_L = \frac{\frac{g/L \text{ glucosa} \cdot 50mL \cdot 10^{-3}}{5g/tubo}}{\frac{19,68g \text{ glucosa}}{100 g/tubo}} \cdot 100 \quad \text{Ec (22)}$$

- **RAH<sub>L</sub>**: recuperación de azúcares hemicelulósicos (xilosa y arabinosa) en la fracción líquida (g azúcares hemicelulósicos en líquido tras MAE/ 100g glucosa en la materia prima) (Ec 23).

$$\% \mathbf{RAH}_L = \frac{\frac{g/L (xilosa + arabinosa) \cdot 50mL \cdot 10^{-3}}{5g/tubo}}{\frac{(23,44 + 8,95)g (xilosa + arabinosa)}{100 g/tubo}} \cdot 100 \quad \text{Ec (23)}$$

Pureza del líquido extraído (xilosa y arabinosa).

Donde el peso atómico del carbono es 12 g/mol multiplicado por los 5 carbonos contenidos en su estructura.

La pureza de los AX extraídos se va a determinar mediante la Ec 24, basada en el contenido en carbono total de xilosa y arabinosa como azúcar monomérico y oligomérico (g, el medido tras la HA) dividido entre el COT del extracto líquido tras la MAE medido en el HPLC.

$$\% \mathbf{Pureza \ extracto \ líquido} = \frac{COT \text{ xilosa} + COT \text{ arabinosa}}{COT \text{ en el extracto líq. tras MAE}} \cdot 100 \quad \text{Ec (24)}$$

## 4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo es conseguir la máxima solubilización de azúcares hemicelulósicos tras la realización de una extracción alcalina asistida con tecnología microondas, utilizando como solvente NaOH. Esto es, maximizar la concentración de oligómeros (xilosa + arabinosa) (g/L), maximizar la recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida (RAHL) y maximizar la pureza de xilosa y arabinosa (AX).

Los resultados obtenidos tras realizar los métodos de análisis descritos en el apartado 4.1 Materiales y métodos se exponen en los siguientes apartados.

### 4.2.1 EXPERIENCIAS PRELIMINARES

En las Tabla 4.4 y Tabla 4.5 se muestran los resultados de azúcares antes de la HA, inhibidores, azúcares tras la HA, el pH, la concentración de AX (oligómeros: xilosa + arabinosa), pureza de AX, y recuperación de azúcares (glucosa y azúcares hemicelulósicos (xilosa+arabinosa) obtenidos en las experiencias preliminares. Dichas experiencias permitirán establecer el rango óptimo de temperatura (T) y tiempo de mantenimiento (t), que son los factores empleados. Posterior en el diseño experimental. Para ello se seleccionarán las condiciones de T y t que proporcionen valores máximos de concentración de oligómeros, máxima recuperación de azúcares en el extracto líquido y pureza de AX.

Tabla 4.4- Concentración (g/L) de azúcares del extracto líquido antes y después de HA, y concentración (g/L) de inhibidores en el extracto líquido antes de HA.

Exp	T <sup>a</sup> (°C)	conc NaOH (M)	t (min)	Azúcares antes HA (g/L)			Inhibidores (g/L)				Azúcares después HA (g/L)		
				Gluc	Xilosa	Arab	Ácido Fórmico	Ácido Acético	HMF	Furfural	Gluc	Xilos	Arab
P2	120	0,10	2,50	0,47	0,00	0,00	0,19	1,14	0,00	0,00	0,65	1,20	0,77
P3	120	0,20	2,50	0,62	0,00	0,00	0,31	1,02	0,00	0,00	1,48	4,40	2,48
P4	150	0,05	2,50	0,10	0,00	0,00	0,12	0,61	0,00	0,00	2,72	0,22	0,00
P5	150	0,10	2,50	0,08	0,00	0,00	0,31	1,06	0,00	0,00	0,94	2,92	1,80
P6	150	0,20	2,50	0,73	0,00	0,00	0,86	1,17	0,00	0,00	1,08	8,19	4,87
P7	180	0,05	2,50	0,13	0,00	0,00	0,17	0,76	0,00	0,00	4,36	1,25	0,56
P8	180	0,10	2,50	0,03	0,00	0,00	0,39	1,21	0,00	0,00	2,75	4,86	3,14
P9	180	0,20	2,50	0,24	0,00	0,00	0,99	1,32	0,00	0,00	1,64	9,21	5,45
P10	180	0,30	2,50	0,79	0,00	0,00	1,09	1,28	0,00	0,00	0,74	11,01	6,63
P11	200	0,20	2,50	0,17	0,00	0,00	1,14	1,34	0,00	0,00	1,00	12,41	7,07
P12	200	0,30	2,50	0,48	0,00	0,00	1,29	1,40	0,00	0,00	0,87	11,70	6,59
P13	180	0,20	5,00	0,26	0,00	0,00	1,02	1,29	0,00	0,00	0,65	10,61	6,35

Exp: experiencia.

Gluc: glucosa.



Arab: arabinosa.

HMF: 5-Hidroximetilfurfural.

Tabla 4.5- pH del extracto líquido tras la MAE, recuperación total de sólidos (% RGT), concentración de oligómeros en el extracto líquido (g/L), pureza del extracto (%) y recuperación de azúcares del extracto líquido (%).

Exp	Tª (°C)	Conc NaOH		pH	RTG (%)	Conc oligómeros (xilosa+arab) (g/L)	Pureza (xilosa y arab) (%)	Recuperación azúcares	
		(M)	t (min)					RG <sub>L</sub> (%)	RAH <sub>L</sub> (%)
P1	120	0,05	2,50	8,43	76,20	0,00	0,00	4,79	0,00
P2	120	0,10	2,50	10,17	63,95	1,98	4,86	3,28	6,11
P3	120	0,20	2,50	12,62	64,75	6,88	10,81	7,52	21,23
P4	150	0,05	2,50	7,72	67,60	0,22	0,63	13,81	0,67
P5	150	0,10	2,50	9,52	52,30	4,72	9,19	4,80	14,57
P6	150	0,20	2,50	10,55	45,45	13,07	17,23	5,48	40,35
P7	180	0,05	2,50	6,55	64,43	1,81	4,06	22,13	5,59
P8	180	0,10	2,50	8,13	46,85	7,99	11,06	13,97	24,67
P9	180	0,20	2,50	10,20	45,90	14,66	19,13	8,35	45,27
P10	180	0,30	2,50	11,05	41,93	17,64	20,31	3,74	54,45
P11	200	0,20	2,50	9,79	26,05	19,48	23,87	5,07	60,15
P12	200	0,30	2,50	10,43	35,35	18,29	19,99	4,41	56,48
P13	180	0,20	5,00	10,15	40,65	16,96	20,16	3,31	52,37

Conc oligómeros (xilosa+arab) (g/L): concentración de oligómeros (xilosa y arabinosa) en el extracto líquido.

RG<sub>L</sub>: recuperación de glucosa en la fracción líquida o prehidrolizado (g glucosa en extracto líquido/100 g glucosa en el BSG inicial (materia prima)).

RAH<sub>L</sub>: recuperación de azúcares hemicelulósicos (xilosa y arabinosa) en la fracción líquida o prehidrolizado (g azúcares hemicelulósicos en extracto líquido/100 g azúcares hemicelulósicos en el BSG inicial (materia prima)).

Para establecer el efecto de la **temperatura**, se analizan las pruebas con la misma concentración y distinta temperatura de operación. **Fijando la concentración de NaOH**, a medida que la **temperatura** aumenta (120°C, 150°C, 180°C, 200°C), se incrementa las **concentraciones de oligómeros (AX) en el líquido, la %RAH<sub>L</sub> y la pureza**.

El **parámetro determinante** en este caso es la **concentración de NaOH**, ya que se experimentan grandes diferencias de resultados en función de las distintas concentraciones de NaOH utilizadas (0,05; 0,10; 0,20; 0,30 M NaOH). Los valores de **concentración de oligómeros, RAH<sub>L</sub> y pureza aumentan** con el aumento de concentración de NaOH hasta **0,20M NaOH**, sin embargo, dichos valores no mejoran cuando la concentración aumenta a **0,30M NaOH**. Así a la máxima T= 200°C y concentración 0,2M NaOH, se obtienen los valores de concentración AX=18,29 g/L, %RAH<sub>L</sub>=56,48% y pureza 19,99%.

El **valor máximo de concentración de arabinosanos** en el extracto líquido (Tabla 6), se encuentra en la prueba P11, con un valor de **19,48 g/L**. La **pureza**

es de **23,87%** y la **recuperación de azúcares hemicelulósicos** es de **60,15%**. Estos valores corresponden a la máxima temperatura de trabajo utilizada (200°C) y una concentración de 0,2M.

## 4.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se van a presentar los resultados del diseño, basado en un Diseño Central Compuesto experimental basado en los valores de la concentración de oligómeros (g/L) obtenidos en las experiencias preliminares. Estos resultados han sido obtenidos tras realizar los métodos de análisis al extracto líquido y a la fracción sólida. Se han variado los rangos de los factores respecto a las experiencias preliminares. El factor temperatura (170-210°C) (ligeramente superior a 200°C), y el factor concentración de NaOH (0,1-0,4M), para comprobar que, si aumenta la concentración de NaOH o temperatura no mejora la recuperación de AX.

### EXTRACTO LÍQUIDO

En este apartado se van a exponer los resultados correspondientes al extracto líquido (Tabla 4.6, Tabla 4.7). La variación de los factores (las condiciones durante la extracción asistida mediante tecnología microondas) producen distintos resultados en las variables respuesta.

Tabla 4.6- Concentración (g/L) de glucosa, xilosa y arabinosa antes y después de someter el extracto líquido a HA, y concentración de inhibidores (g/L) del extracto líquido antes de HA para cada T y concentración de NaOH en cada experimento. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Exp	T (°C)	Conc NaOH (M)	Azúcares antes HA (g/L)			Inhibidores (g/L)				Azúcares después HA (g/L)		
			Gluc	Xilosa	Arab	Fórmico	Acético	HMF	Furfural	Gluc	Xilosa	Arab
1	210,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,81	1,18	0,00	0,00	0,00	8,02	4,42
2	170,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,50	1,12	0,00	0,00	0,00	2,91	1,83
3	210,00	0,40	0,51	0,00	0,00	2,02	1,36	0,00	0,00	0,51	9,26	4,85
4	190,00	0,25	0,06	0,00	0,00	1,38	1,30	0,00	0,00	0,17	11,16	7,10
5	190,00	0,25	0,01	0,00	0,00	1,38	1,21	0,00	0,00	0,01	9,19	5,38
6	190,00	0,25	0,00	0,00	0,00	1,31	1,25	0,00	0,00	0,00	10,06	5,68
7	190,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,23	0,60	0,00	0,00	1,09	0,96	0,39
8	190,00	0,25	0,00	0,00	0,00	1,29	1,15	0,00	0,00	0,00	9,08	5,02
9	190,00	0,46	0,58	0,00	0,00	1,28	1,13	0,00	0,00	0,58	10,45	5,75
10	218,28	0,25	0,00	0,00	0,00	1,21	1,15	0,00	0,00	0,00	10,46	5,69
11	170,00	0,40	0,63	0,00	0,00	0,95	1,15	0,00	0,00	0,63	10,36	6,86
12	190,00	0,25	0,05	0,00	0,00	0,99	0,97	0,00	0,00	0,05	9,09	5,13
13	161,72	0,25	0,28	0,00	0,00	1,04	1,08	0,00	0,00	0,28	8,12	4,85

Antes de realizar la hidrólisis, la concentración de glucosa, xilosa y arabinosa medidas por HPLC en la fracción líquida tras la MAE es



prácticamente **inexistente**. **Tras la hidrólisis**, los valores de glucosa siguen siendo casi nulos mientras que los **valores de concentración de xilosa y arabinosa han aumentado**. Este aumento indica que tras la HA las cadenas de oligómeros se han roto, quedando sus monómeros libres (xilosa y arabinosa) y cuantificables mediante la técnica de HPLC.

Como se ha descrito anteriormente, los factores (temperatura y concentración de NaOH) son determinantes en los resultados obtenidos (**Tabla 4.6**), de modo que, al aumentar la temperatura de extracción (161,72°C a 218,28°C), se obtiene una **mayor concentración de azúcares** medidos tras la hidrólisis. Esto ocurre hasta llegar a la temperatura de **190°C (Exp 4; 0,25 M NaOH)**, donde se encuentra el **valor máximo de concentración de xilosa y arabinosa (11,16 g/L xilosa; 7,10 g/L arabinosa)**. En la temperatura de 210°C se obtiene una gran concentración de azúcares, pero es ligeramente inferior a la conseguida con 190°C. El aumento de la **concentración de NaOH** (entre 0,04 M y 0,46 M NaOH), fijando una temperatura, produce un **significativo aumento de la composición de azúcares tras la hidrólisis**, esto indica que, tras la MAE, se ha conseguido extraer una mayor concentración de oligómeros (xilosa y arabinosa) y que la concentración de NaOH es el factor más influyente. Los resultados van **aumentando hasta** llegar a una concentración de NaOH de **0,25M NaOH**. Este resultado es coherente con las experiencias preliminares donde una concentración de 0,3M hacía disminuir la concentración de azúcares libres. Las mayores concentraciones de azúcares (**11,16 g/L xilosa y 7,10 g/L arabinosa**) se encuentran en el experimento nº4 con los factores (**190°C, 0,25M NaOH**).

Los **componentes inhibidores** son generados como consecuencia de la extracción asistida por microondas. Estas concentraciones de inhibidores se han determinado para ver la posible influencia de los mismos en la transformación de esta corriente a butanol (vía fermentación) en caso de que se utilizase con ese fin. Como consecuencia, sus concentraciones varían dependiendo de la severidad de la etapa de extracción. Como se puede ver en la **Tabla 4.6**, los compuestos inhibidores tienen muy baja concentración en las extracciones con muy baja severidad, y sus concentraciones más altas son alcanzadas en las condiciones más severas de extracción. (**ácido fórmico** entre **0,23 y 2,02 g/L**; **ácido acético** entre **0,60 y 1,36 g/L**). Del ácido acético, se obtiene una concentración inferior a 1,36 g/L **Exp 3 (210°C, 0,40M NaOH)**. El factor de aumento de temperatura es solapado por la concentración de NaOH, ya que, disminuyendo el factor concentración, la concentración de inhibidores también disminuye hasta su mínima concentración, que es también la mínima concentración de NaOH (**Exp 7; 190°C, 0,04M NaOH**). Aumentando la concentración de NaOH, aumenta concentración de inhibidores, siendo el **Exp 3 (210°C, 0,40M NaOH)** el punto con mayor concentración, que también es el

experimento con mayor concentración de NaOH y mayor temperatura sin contar con el punto estrella superior de temperatura. Además, el contenido en HMF (originado por la degradación de la glucosa) y furfural (originado por la degradación de pentosas) son despreciables.

Tabla 4.7- pH del extracto líquido tras la MAE, concentración (g/L) de oligómeros (xilosa + arabinosa) contenida en el extracto líquido tras la MAE y pureza de los AX (xilosa + arabinosa) contenidos en el extracto líquido tras MAE. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Exp	T (°C)	Conc NaOH (M)	pH	Conc oligómeros (xilosa+arab) (g/L)	Pureza AX (xilosa y arab) (%)
1	210,00	0,10	7,42	12,43	18,05
2	170,00	0,10	8,84	4,74	8,27
3	210,00	0,40	10,66	14,11	11,96
4	190,00	0,25	10,18	18,26	20,98
5	190,00	0,25	10,06	14,57	15,50
6	190,00	0,25	10,31	15,74	17,39
7	190,00	0,04	6,26	1,35	3,19
8	190,00	0,25	10,12	14,11	15,79
9	190,00	0,46	12,51	16,20	104,85
10	218,28	0,25	10,01	16,15	19,50
11	170,00	0,40	13,01	17,22	17,86
12	190,00	0,25	10,24	14,22	15,81
13	161,72	0,25	11,57	12,97	14,70
ópt	172,38	0,38	12,38	17,03	17,05

HMF: 5-Hidroximetilfurfural

En la **Tabla 4.7** están recogidos los resultados de pH del extracto líquido medido tras la extracción asistida con microondas, la concentración de oligómeros (xilosa y arabinosa) y la pureza de los AX que contiene el extracto líquido tras la MAE.

La **concentración de oligómeros (xilosa y arabinosa) (g/L)** se calcula mediante la Ecuación 21, que es la resta de las concentraciones de carbohidratos (xilosa y arabinosa) antes y después de la hidrólisis, por lo que variará en función de los factores proporcionalmente en función de estas.

El valor máximo de concentración de oligómeros (AX) se encuentra en el **Exp 4 (18,26 g/L)** cuyos factores son (**190°C; 0,25M NaOH**), la experiencia n°11 es la segunda con mayor concentración de oligómeros (17,22 g/L) con factores de (170°C; 0,40M NaOH). El tercer punto con una concentración de oligómeros es la Exp n°9 (16,20 g/L) cuyos factores son (190°C; 0,46M). A partir de estos tres valores se puede deducir que los **valores óptimos** de los factores van a ser: la temperatura óptima va a estar entre los 170°C y 190°C, y la concentración óptima va a estar entre los valores de 0,25 y 0,46 M NaOH.



Analizando los resultados de **pureza**, la experiencia con mayor pureza es la misma que presenta mayor concentración de oligómeros. La pureza varía entre **8,27% y 20,98%**, aumentando cuando se aumenta la temperatura (a una concentración de NaOH fija) y aumentando cuando la concentración de NaOH aumenta hasta el valor de (**0,25M NaOH; Exp 4**) donde se encuentra el mayor valor de porcentaje de pureza del diseño (**20,98% pureza**). El valor de la experiencia 9 no es válido y está asociado a algún error experimental, debido a que no se puede obtener una pureza superior al 100%.

El **pH** del extracto líquido obtenido tras la extracción **aumenta** a medida que la concentración de solvente va aumentando, el intervalo de pH varía de 6,26 a 13,01, siendo la medida más alta de pH la experiencia nº11 (**pH 13,1**), alcanzado en los valores de los factores (**170°C; 0,40M NaOH**). Estas condiciones son las del experimento de segunda mayor concentración, el de mayor concentración es ligeramente superior (Exp nº9; 0,46M NaOH), cuya temperatura es de las más bajas del diseño (170°C) Este resultado puede ser debido a que, al ser una temperatura baja, la extracción del BSG es menor y que se solubilice menos fracción hemicelulósica del BSG inicial.

### FRACCIÓN SÓLIDA

En este apartado se muestran los resultados correspondientes a la fracción sólida tras la extracción alcalina asistida mediante tecnología microondas. La Tabla 4.8 se exponen los resultados de la recuperación total gravimétrica de sólidos, la composición de la fracción sólida en porcentaje en peso y el grado de deslignificación de la fracción sólida.

En la **Tabla 4.8**, la **recuperación de sólidos (RTG)** está afectada por la severidad de la extracción, temperatura y concentración de NaOH, y estos factores influyen en las fracciones no estructurales y fracciones lábiles (extractivos y fracción hemicelulósica, respectivamente) los cuales se solubilizan como consecuencia de la extracción. Como se puede apreciar, cuanto mayor es la severidad de la extracción, se reduce la recuperación de sólidos. El rango de recuperación se encuentra entre 18,47% y 63,73%, correspondiendo a los factores de severidad más bajo y el más alto sin contar con el punto estrella superior. La temperatura de extracción influye muy poco en la recuperación de sólidos. El experimento con una **mayor** recuperación total gravimétrica (**63,73%**) es la **Exp 7 (190°C, 0,04M NaOH)**, y se caracteriza por ser la experiencia con menor factor de concentración de NaOH. En el trabajo de Fernández-Delgado et al., 2019 el rango de la recuperación total de sólidos varió de (39-61%) aumentando la concentración de NaOH (0,25-1,25M), esto indica que en los resultados de este trabajo tiene sentido que al aumentar la concentración de NaOH (0,4-0,46M), aumente la recuperación de sólidos (25,40-63,73% RTG).

Tabla 4.8- Recuperación total gravimétrica, (%RTG) de la fracción sólida, composición (%) de la fracción sólida tras la extracción MAE, grado de deslignificación de la fracción sólida tras la MAE. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Exp	T (°C)	Conc. NaOH (M)	RTG (%)	Composición (%)					Grado deslignificación (%)
				Glucosa	Xilosa	Arab	LAI	LAS	
1	210,00	0,10	40,12	40,44	24,78	4,99	22,46	1,38	62,91
2	170,00	0,10	48,93	31,04	30,62	9,34	20,53	2,51	56,27
3	210,00	0,40	18,47	63,98	24,61	3,18	7,64	0,62	94,08
4	190,00	0,25	25,4	52,42	26,21	4,61	17,57	0,74	81,95
5	190,00	0,25	25,78	52,41	25,98	4,64	17,49	0,69	81,82
6	190,00	0,25	27,87	52,09	25,64	4,03	17,17	0,70	80,68
7	190,00	0,04	63,73	24,36	28,52	8,97	22,34	4,30	34,14
8	190,00	0,25	25,95	51,28	23,28	3,81	18,26	0,62	80,99
9	190,00	0,46	22,6	59,69	26,68	4,27	10,86	0,59	89,97
10	218,28	0,25	23,41	56,98	22,24	2,93	13,45	0,55	87,29
11	170,00	0,40	28,16	52,54	27,3	5,33	13,00	0,96	84,75
12	190,00	0,25	26,77	52,17	25,08	4,13	15,51	0,61	83,26
13	161,72	0,25	33,31	<b>43,39</b>	27,99	5,95	16,58	1,32	76,87

RTG: recuperación total gravimétrica (recuperación de sólidos insolubles, recuperación de sólidos tras la MAE).

LAI: lignina ácido insoluble.

LAI: lignina ácido soluble.

Como se puede ver en la Tabla 4.8, la fracción sólida tras la extracción tiene un contenido en **glucosa** entre 24,36% y 63,98%. El enriquecimiento de glucosa en el sólido pretratado se debe a la solubilización de los extractivos y la hemicelulosa durante la extracción. El residuo sólido incrementa su contenido en glucosa de 17,9% (BSG inicial) v a 63,98%.

Como se observa en la Tabla 4.8, la **composición de la fracción sólida** tras la extracción varía de forma en que, si se trabaja con valores de los **factores bajos** (baja concentración de NaOH y bajas temperaturas de extracción), la **composición** se caracteriza por tener **más porcentaje de xilosa, arabinosa, lignina ácida soluble e insoluble** y **menor porcentaje de glucosa** (monómero de la celulosa). Esto es debido a que la extracción de oligómeros (AX compuestos por xilosa y arabinosa) es muy pequeña. En cambio, trabajando con altas temperaturas y alta concentración de NaOH, los porcentajes de xilosa y arabinosa en el sólido se reducen, de forma que la glucosa acaba siendo prácticamente la mitad de la composición de la fracción sólida, siendo la máxima composición de glucosa en la **Exp 9**, la experiencia con los máximos factores sin contar con los puntos estrella del modelo. La disminución en la celulosa y hemicelulosa contenidas en el BSG tras la extracción se debe a la solubilización parcial de los azúcares en el líquido tras la extracción,



especialmente la xilosa y arabinosa. En el trabajo de Fernández-Delgado et al., 2019, se encuentra una mayor solubilización de hemicelulosa (54,6%) utilizando una mayor concentración de NaOH (1,25M) utilizando el rango de (0,25-1,25M NaOH). Estos datos son más altos que en las experiencias realizadas en este trabajo debido a que el rango de trabajo de concentración de NaOH es más bajo (0,1-0,4M)

Según los datos recogidos en la Tabla 4.8, se puede ver que, **grado de deslignificación depende** en mucha **más medida** de la **concentración de NaOH** que de la temperatura, aunque depende de ambas. Una alta concentración de hidróxido de sodio solubiliza una alta cantidad de hemicelulosa y lignina ya que el hidróxido de sodio ataca las cadenas entre la lignina y la hemicelulosa presentes en la estructura del material lignocelulósico de forma que se incrementa su capacidad de biodegradación. El porcentaje de deslignificación más alto se encuentra en la **Exp 3 (94,80%)** con factores **(210°C; 0,40M NaOH)**. En Fernández-Delgado et al., 2019, se observa que un alto contenido de NaOH produce un efecto positivo en la deslignificación del BSG (de 27,9% con 0,25M NaOH a 49,5% para 1,25M NaOH), .

### [RECUPERACIÓN DE AZÚCARES \(EXTRACTO LÍQUIDO Y FRACCIÓN SÓLIDA\)](#)

Tras la extracción alcalina asistida mediante tecnología microondas, se analizan los resultados de la recuperación de azúcares en la fracción sólida y el extracto líquido recogidos en la **Tabla 4.9**. En este trabajo, interesa obtener una **alta recuperación de azúcares hemicelulósicos** (xilosa y arabinosa) **en el extracto líquido**, ya que son los monómeros que forman las cadenas de AX.

En la Ecuación 23 se observa que, la recuperación de xilosa y arabinosa en la fracción líquida (**RAH<sub>L</sub>**) depende directamente de la concentración de xilosa y arabinosa obtenida tras la HA, por lo que los experimentos que tienen las mayores concentraciones de xilosa y arabinosa son los que mayor porcentaje de RAH<sub>L</sub> tienen. Estas experiencias son la **Exp 4 (56,37%)**, seguido de Exp 11 (53,16%) y Exp 9 (50,03%). Por lo contrario, la **menor RAH<sub>L</sub>** es la **Exp 7 (4,16%)** ya que al ser la experiencia con menor concentración de NaOH a una temperatura media de diseño (190°C; 0,04 M NaOH) tiene una capacidad de extracción mucho menor. Coelho et al., 2014 obtuvo un rendimiento de recuperación de AX de 43%. En este trabajo se utilizó como solvente agua, 210°C, 2 min de tiempo de mantenimiento y una etapa extracción. Este rendimiento de recuperación es menor que el obtenido con la única etapa de extracción de este trabajo en el diseño óptimo (**52,59%**, apartado 4.7.3) con las condiciones óptimas (**172°C; 0,38 M NaOH; 2,5min**).

Tabla 4.9- Recuperación de azúcares (recuperación de glucosa (%RG) y recuperación de azúcares hemicelulósicos (%RAH)) en el extracto líquido y en la fracción sólida. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Exp	T (°C)	conc NaOH (g/L)	Recuperación azúcares				
			RG <sub>L</sub> (%)	RAH <sub>L</sub> (%)	RG <sub>S</sub> (%)	RAH <sub>S</sub> (%)	RAH <sub>TOTAL</sub> (%)
1	210,00	0,10	0,00	38,39	82,45	36,88	75,27
2	170,00	0,10	0,00	14,64	77,19	60,37	75,01
3	210,00	0,40	2,61	43,57	60,06	15,85	59,42
4	190,00	0,25	0,89	56,37	67,65	24,16	80,53
5	190,00	0,25	0,06	44,97	68,65	24,37	69,34
6	190,00	0,25	0,00	48,58	73,77	25,53	74,11
7	190,00	0,04	5,53	4,16	78,89	73,76	77,92
8	190,00	0,25	0,00	43,55	67,62	21,70	65,25
9	190,00	0,46	2,96	50,03	68,56	21,60	71,63
10	218,28	0,25	0,00	49,87	67,77	18,19	68,06
11	170,00	0,40	3,21	53,16	75,17	28,36	81,52
12	190,00	0,25	0,24	43,89	70,96	24,14	68,03
13	161,72	0,25	1,40	40,03	73,44	34,90	74,93

RG<sub>L</sub>: recuperación de glucosa en la fracción líquida o prehidrolizado (g glucosa en extracto líquido/100 g glucosa en el BSG inicial (materia prima)).

RAH<sub>L</sub>: recuperación de azúcares hemicelulósicos (xilosa y arabinosa) en la fracción líquida o prehidrolizado (g azúcares hemicelulósicos en extracto líquido/100 g azúcares hemicelulósicos en el BSG inicial (materia prima)).

RG<sub>S</sub>: recuperación de glucosa en la fracción sólida (g glucosa en sólido pretratado/100 g glucosa en el BSG inicial (materia prima)).

RAH<sub>S</sub>: recuperación de azúcares hemicelulósicos (xilosa y arabinosa) en la fracción sólida (g azúcares hemicelulósicos en sólido pretratado/100 g azúcares hemicelulósicos en el BSG inicial (materia prima)).

En este trabajo también se utilizaron tres extracciones secuenciales (dos con agua y una con 0,1M KOH) a 180°C durante 2 minutos que permitieron extraer 62% de AX y AXOS. El rendimiento obtenido con el punto óptimo de este trabajo es algo menor, pero se debe tener en cuenta que se han obtenido recuperaciones parecidas siendo el proceso de este trabajo más sencillo. En el estudio de (Vieira et al., 2014), fueron capaces de recuperar un porcentaje de AX del 75-82% de BSG mediante tres extracciones alcalinas secuenciales usando hasta concentraciones de 4M de hidróxido de potasio (KOH) como solvente. En el experimento óptimo de este trabajo, se ha conseguido mediante una única extracción asistida con microondas un porcentaje de **52,59%**. **De modo que, como ocurre en el trabajo de Coelho et al., 2014**, aunque la recuperación de AX es mayor debido a que es un proceso con más etapas.

La recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción sólida (RAH<sub>S</sub>), varía de forma inversa a RAH<sub>L</sub>, de forma que, en los experimentos en los que la



temperatura de extracción y la concentración de solvente son menores, se obtiene una mayor recuperación (Exp 2, 60,37%; Exp 7, 73,76%). Los demás valores de **RAHs** difieren menos entre ellos (entre 15% y 36%) siendo las experiencias Exp 3 y Exp 10, cuyos valores de temperatura de extracción son los más altos (210°C, 0,40M NaOH y 218,18°C; respectivamente), los que menor recuperación tienen. Esto implica el factor determinante en RAHs es la temperatura de extracción sobre la concentración de NaOH.

Jiang et al., 2019 optimizó MAE alcalina usando como materia prima salvado de maíz y NaOH como solvente, en las condiciones óptimas halladas en el estudio (70°C (fijada), 0,3M NaOH, 1:30 w/v, tiempo de mantenimiento de temperatura 20 min, 500W de potencia) se recuperó un rendimiento de WUAX de 27,78%, valor inferior al obtenido en este trabajo (**52,59%**) con las condiciones óptimas (**172°C; 0,38M NaOH; 2,5min**).

La recuperación de glucosa en el extracto líquido **RG<sub>L</sub>** es muy pequeña en todos los experimentos debido a que la celulosa no se disuelve en soluciones alcalinas, de modo que su extracción es prácticamente nula excepto en la **Exp 7 (5,53%)** cuyas condiciones (170°C; 0,04M NaOH) equivalen a la temperatura y concentración de solvente más bajas. La recuperación de glúcidos en la fracción sólida también es la mayor en este experimento (Exp 7). Todo lo contrario ocurre en la recuperación de glúcidos en la fracción sólida, **RG<sub>s</sub>**, los porcentajes de recuperación son muy altos en general (entre 60,06% y 82,45%) debido a la causa antes mencionada.

La recuperación de glucosa en la fracción sólida tras la extracción se observan valores bajos para las más altas severidades de tratamiento.

La suma de la recuperación de azúcares hemicelulósicos en el extracto líquido y la recuperación de azúcares hemicelulósicos de la fracción sólida equivale a los gramos totales recuperados de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida contenidos en 100g de BSG iniciales. Esta recuperación no llega a ser total en ningún caso debido a que una parte de los azúcares se degrada (la depolimerización podría ser debida a que se trabaja a altas temperaturas) durante la extracción. La recuperación máxima obtenida en el diseño es con la experiencia n°11, en el que se recupera el **81,52%** de azúcares hemicelulósicos totales (**RAH<sub>TOTAL</sub>**).

### 4.2.3 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA CON MICROONDAS.

En este trabajo, la etapa de extracción asistida con microondas ha sido llevada a cabo con el propósito de obtener una mayor recuperación de AX. Por

lo consiguiente, se ha optimizado la extracción maximizando la concentración de oligómeros (g/L), que es la concentración de AX extraídos en la fracción líquida.

Se ha optimizado la concentración de oligómeros (g/L) en la fracción líquida en función de los factores de temperatura de extracción y concentración del solvente (NaOH). A partir de los resultados experimentales, se ha llegado a la conclusión de que la interacción entre ambos factores tiene efecto positivo en la extracción de oligómeros, siendo la influencia de la concentración de NaOH el factor más influyente. Mediante el programa Statgraphics Centurion XVII, se ha obtenido una ecuación que muestra la influencia de cada factor (Ec 25) y que confirma la mayor contribución del factor concentración:

$$\begin{aligned} \text{conc. oligómeros (xilosa y arabinosa)} \\ = 14,71 + 1,13 \cdot A + 4,40 \cdot B - 2,70 \cdot A \cdot B - 2,84 \cdot B^2 \quad \text{Ec (25)} \end{aligned}$$

A: Temperatura (°C)

B: Concentración de NaOH (M)

El factor B aparece en tres términos de la ecuación, en uno de ellos sale elevado al cuadrado, mientras que el término A aparece en dos, donde en uno de ellos multiplicado por B. De forma que se puede asegurar que la concentración de oligómeros depende en más medida de la concentración de NaOH.

A través del mismo programa, se ha obtenido **el punto óptimo** con mayor concentración de AX, las **condiciones** del punto óptimo son **(172,38°C, 0,38M NaOH)**, siendo la **concentración de oligómeros (xilosa y arabinosa) de 17,51 g/L**, recuperación de azúcares hemicelulósicos en la fracción líquida (RAH<sub>L</sub>) de **54,71%** y una pureza del extracto líquido de **17,19%**.

Asimismo, se ha realizado un experimento confirmatorio del punto óptimo obtenido, mostrándose los resultados de concentración de glucosa, xilosa y arabinosa antes y después de someter el extracto líquido a HA, concentración de inhibidores del extracto líquido antes de HA, pH del extracto líquido, concentración de AX contenida en el extracto líquido, pureza de los AX contenidos en el extracto líquido tras MAE, recuperación de azúcares en el extracto líquido (recuperación de glucosa (%RG<sub>L</sub>) y recuperación de azúcares hemicelulósicos (% RAH<sub>L</sub>)), recuperación total gravimétrica de la fracción sólida (% RTG), composición (%) de la fracción sólida tras la extracción y grado de deslignificación de la fracción sólida, en las Tabla 4.10, Tabla 4.11 y Tabla 4.12.

*Tabla 4.10-Concentración (g/L) de glucosa, xilosa y arabinosa antes y después de someter el extracto líquido a HA, y concentración de inhibidores (g/L) del extracto líquido antes de HA para cada T y*



concentración de NaOH en cada experimento. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Exp	T (°C)	conc NaOH (M)	Azúcares antes HA (g/L)			Inhibidores (g/L)				Azúcares después HA (g/L)		
			Gluc	Xilosa	Arab	Fórmico	Acético	HMF	Furfural	Gluc	Xilos	Arab
ópt	172,38	0,38	0,30	0,00	0,00	1,21	1,17	0,00	0,00	0,34	10,22	6,81

Tabla 4.11- pH del extracto líquido tras la MAE, concentración (g/L) de oligómeros (xilosa + arabinosa) contenida en el extracto líquido tras la MAE y pureza de los AX (xilosa + arabinosa) contenidos en el extracto líquido tras MAE y recuperación de azúcares (recuperación de glucosa (%RG<sub>L</sub>) y recuperación de azúcares hemicelulósicos (%RAH<sub>L</sub>)) en el extracto líquido Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Exp	T (°C)	Conc NaOH (M)	pH	Conc oligómeros (xilosa+arab) (g/L)	Pureza xilosa y arab (%)	RG <sub>L</sub> (%)	RAH <sub>L</sub> (%)
ópt	172,38	0,38	12,38	17,03	17,05	1,73	52,59

Tabla 4.12-. Recuperación total gravimétrica, (% RTG) de la fracción sólida, composición (%) de la fracción sólida tras la extracción MAE, grado de deslignificación de la fracción sólida tras la MAE. Tiempo de mantenimiento de la temperatura (2,5 min) constante.

Exp	T (°C)	conc NaOH (M)	RTG (%)	Composición (%)					Grado deslignificación (%)
				Glucosa	Xilosa	Arab	LAI	LAS	
ópt	172,38	0,38	24,02	54,50	27,91	4,73	12,53	0,82	87,56

Como se puede comprobar, los datos que han sido predichos de forma estadística se ajustan de forma aceptable a los datos obtenidos de forma experimental en el laboratorio, donde el proceso experimental óptimo se ha realizado con las condiciones (172°C; 0,38 M NaOH; 2,5min). Siendo la recuperación de AX un poco más baja de la estimada (52,59%), pureza muy parecida (17,05%) y concentración de oligómeros 17,03 g/L, valores un porcentaje ligeramente inferiores a los determinados con el Modelo de Superficie, pero válidos asumiendo los posibles errores experimentales.

En la Figura 4.19, sacada junto con el punto óptimo, representa un diagrama de superficie de respuesta sobre cómo varía la concentración de AX en función de los factores (temperatura y concentración NaOH).

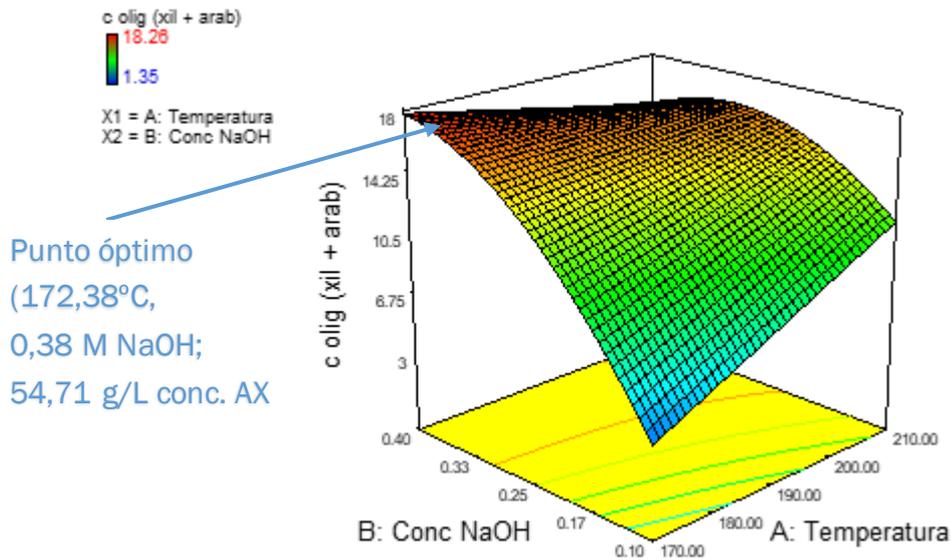


Figura 4.19- Gráfica de superficie que representa la variación de la concentración de oligómeros (xilosa + arabinosa) en función de la concentración de NaOH y de la temperatura de extracción.

En el artículo de Rose & Inglett, 2010 se realiza una extracción acuosa de salvado de maíz mediante tecnología microondas en la que se consigue recuperar 25,8% del contenido inicial de AX, donde las condiciones iniciales del tratamiento para conseguir esa recuperación fueron 180°C mantenidos durante 10 min o 200°C durante 2 min. Este porcentaje de recuperación es muy pequeño comparado con el porcentaje máximo de recuperación de AX obtenido con el punto óptimo (52,59%).

## 5. EVALUACIÓN ECONÓMICA

En este apartado se realiza un estudio económico de una planta piloto en la que se realiza el mismo proceso de extracción y separación de arabinosidos que en el laboratorio. También se va a calcular el valor de venta del producto (AX) para que el proceso de producción sea rentable. El estudio incluye un análisis de sensibilidad de la inversión si variase del precio de venta del producto o el precio de compra de la materia prima.

El proceso difiere del realizado en el laboratorio en que los equipos operan de forma continua, y el bagazo de cerveza (materia prima) se utiliza húmedo. Su diagrama de bloques está representado en la Figura 5.1:

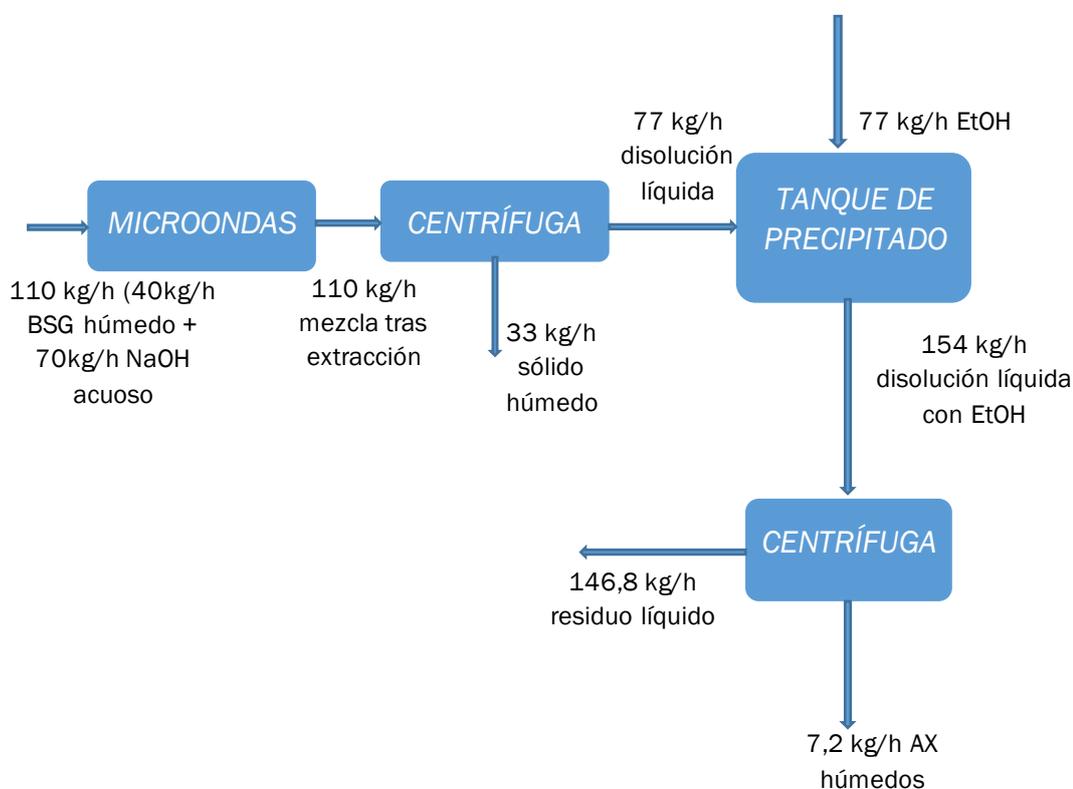


Figura 5.1- Diagrama del proceso que tendría lugar en la planta piloto.

Se introduce la mezcla de BSG con NaOH acuoso al microondas, cuyo flujo másico es de:

$$m_{\text{microondas}} = 110 \text{ kg/h (40kg BSG húmedo + 70kg H}_2\text{O)}$$

Este flujo ha sido calculado estableciendo la misma relación sólido-líquido 1:10 w/v que con la que se ha trabajado en el laboratorio, explicado en el ANEXO, tras el tiempo de residencia dentro del dispositivo ( $t_r=2,5\text{min}$ ), el flujo sale del microondas en la misma cantidad.



Esta mezcla se introduce a la centrífuga 1 en flujo continuo. La centrífuga separa el sólido con un 70% de humedad, separándose 33kg/h de sólido húmedo de 77kg/h de extracto líquido. El extracto líquido pasa al tanque de precipitado.

El tiempo de residencia en el tanque es  $t_r = 15$  min. Se añade la misma cantidad de etanol (77 L/h EtOH) que el flujo que proviene de la centrífuga 1 (77 L/h extracto líquido), y, tras el tiempo de residencia, la mezcla pasa a la centrífuga 2.

Esta segunda centrífuga se encarga de separar los AX precipitados del residuo líquido restante. Se obtienen 7,2kg/h de AX húmedos y 146,8kg/h de residuo líquido (se realizan cambios de litros a kg considerando la densidad de la mezcla como la densidad del agua).

Tomando como referencia los datos de precipitación de AX recogidos de las experiencias en el laboratorio, **3,2 kg/h corresponden a AX totalmente secos** ya que los AX húmedos tienen una humedad del 45%.

Para realizar la **evaluación económica**, se ha considerado como producto final la cantidad de arabinosilanos secos obtenidos en un año:

$$3,2 \frac{\text{kg AX seco}}{\text{h}} \cdot 16 \frac{\text{h}}{\text{d}} \cdot 300 \frac{\text{d}}{\text{año}} = 15360 \frac{\text{kg AX seco}}{\text{año}}$$

## 5.1 COSTE TOTAL DE LA PLANTA

El coste total de la planta se va a estimar mediante el método de Lang, es un método factorial el cual determina que el coste de la planta se puede expresar como un múltiplo del coste de todo el equipo base, este término de proporcionalidad es llamado factor de Lang. Para una planta mixta, que trabaja con sólidos y líquidos, el factor de Lang ( $f_L$ ) es 3,6.

Mediante la tabla 6.2 del capítulo 6 del libro SINNOTT, 2014 se van a obtener los costes del tanque de precipitado. Los costes de ambas centrífugas y del microondas se obtienen mediante revisión bibliográfica. Se ha calculado el coste total de equipos ( $C_e$ ), que es la suma de los precios de los equipos de la planta (Tabla 5.1):

Tabla 5.1- Precio de los equipos de la planta de extracción alcalina de arabinosilanos asistida mediante tecnología microondas.

Máquinas	Precios (€)
Microondas	120.000
Centrífuga GQ (F) L105	4.450



Tanque de precipitado (vertical)	2.136
Centrífuga GQ (F) L45	4.272
<b>Coste total de los equipos Ce</b>	<b>130.858</b>

Mediante la ecuación de Lang Ec 5.1, se obtiene el valor de los costes fijos de la planta:

$$C_f = f_L \cdot C_e \quad \text{Ec (5.1)}$$

Ce: coste total de los equipos.

Por lo que el capital fijo de la planta es **Cf = 39257,4 €**. Ahora se va a calcular el coste total de la inversión con la Ec 5.2:

$$\begin{aligned} \text{Coste total inversión (CTI)} \\ = \text{capital fijo (Cf)} \\ + \text{costes operación (WC, working cost)} \end{aligned} \quad \text{Ec (5.2)}$$

Los costes de operación equivalen al 5% del capital fijo Ec 5.3:

$$WC = 0,05 \cdot C_f \quad \text{Ec (5.3)}$$

El coste de puesta en marcha es el 10% del coste fijo (Ec 5.4):

$$\text{Coste puesta en marcha} = 0,1 \cdot C_f \quad \text{Ec (5.4)}$$

En la Tabla 5.2 se presenta un resumen de los costes calculados mediante el método de Lang:

Tabla 5.2- Resumen de costes calculados mediante el método de Lang.

<b>Coste total de equipos (Ce)</b>	130.858,00 €
<b>Coste fijo de la inversión (Cf)</b>	471.088,88 €
<b>Coste de operación de la planta (WC)</b>	23.554,44 €
<b>Coste de puesta en marcha</b>	47.108,88 €
<b>Coste total de inversión</b>	<b>494.643,24 €</b>

## 5.2 VIABILIDAD ECONÓMICA Y ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD

### VIABILIDAD ECONÓMICA

El coste anual de las materias primas que se necesitan en la planta queda recogido en la Tabla 5.3:

Tabla 5.3- Datos de flujo (kg/año), precio (€), y coste de la materia prima por año (€/año)

Materia prima	Flujo (kg/año)	Precio	Coste (€/año)
Bagazo de cerveza	384000,00	0,02 €/Kg húmedo	3.840,00
Hidróxido de sodio 98%	7257,60	12,40 €/Kg	89.994,24
Agua de proceso	84000,00	26,22 €/trimestre	243,40

Para determinar el estudio de la viabilidad económica, se va a realizar un análisis de costes simplificado partiendo de la Tabla 6.6 del capítulo 6 del libro SINNOTT, 2014 (Tabla 5.4). Se ha considerado que la planta va a operar 16h, en dos turnos, con un operario en cada turno (mañana y tarde), y los días trabajados van a ser 300 días/año.

Tabla 5.4- Costes fijos y variables de la planta piloto.

<b>Costes variables</b>	
Materia prima	94.077,64 €
Utilidades	2.355,44 €
<b>subtotal A</b>	<b>96.433,08 €</b>
<b>Costes fijos</b>	
Mantenimiento y labor de operación	23.554,44 €
Costes de laboratorio	4.710,89 €
Supervisión	4.710,89 €
Gastos generales de la planta	11.777,22 €
Cargos de capital	47.108,89 €
Seguro	4.710,89 €
Tasa local	9.421,78 €
Derechos	4.710,89 €
<b>subtotal B</b>	<b>110.705,87 €</b>
<b>Costes directos (A+B)</b>	<b>207.138,95 €</b>
Gastos de ventas y gastos generales	62.141,69 €
<b>subtotal C</b>	<b>62.141,69 €</b>
<b>Coste anual de producción: A+B+C</b>	<b>269.280,64 €</b>
AX obtenidos en un día	3,22 kg/d
AX en un año	15.456 kg/año



Coste de producción (€/kg)

17,42 €/kgAX

A partir del coste anual de producción y de la cantidad de AX producida por año, se calcula el coste de producción de AX de la planta piloto (€/kg) (Ec 5.5):

$$\text{Coste producción} = \frac{\text{Coste anual producción } \text{€}}{\text{Coste producción (€/kg)}} \quad \text{Ec (5.5)}$$

La amortización de la planta junto con la de los equipos es de 10 años desde su inicio, cuyo impuesto es de 25%.

El balance de costes e ingresos y flujos de caja tras el análisis a los cálculos de la planta piloto están recogidos en la Tabla 5.4. Este estudio se realiza para comprobar la viabilidad económica de la planta piloto y estimar el precio de venta del producto para su lanzamiento al mercado.

En los tres primeros años se ha supuesto que se vende el 60%, 65% y 80% de producto respectivamente, y a partir del cuarto año las ventas son del 100%.

Tabla 3- Balance económico simplificado que incluye el balance de costes, ingresos y flujos de caja.

BALANCE ECONÓMICO SIMPLIFICADO Descripción (€)	Año			
	0	1	2	3
A1. Capital Inmovilizado	-494643,24			
A2. Capital circulante		-24732,16		
A3. Subvenciones				
<b>A. FI - Fondos invertidos</b>	-494643,24	-24732,16	0,00	0,00
B1. Ingresos por ventas		322560,00	349440,00	430080,00
B2. Costes		-207138,95	-207138,95	-207138,95
<b>B. Margen Bruto</b>		115421,05	142301,05	222941,05
C1. Amortización		-49464,32	-49464,32	-49464,32
<b>C. BAI - Beneficio antes de impuestos</b>		65956,72	92836,72	173476,72
D1. Impuestos		-16489,18	-23209,18	-43369,18
<b>D. BDI - Beneficio después de impuestos</b>		49467,54	69627,54	130107,54
<b>E. FGO - Fondos Generados por las operaciones</b>	-494643,24	24735,38	69627,54	130107,54
<b>F. FGO-R- Movimiento de Fondos Flujo de Caja Acumulado</b>	-494643,24	-469907,86	-400280,32	-270172,77

Año						
4	5	6	7	8	9	10



0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
537600,00	537600,00	537600,00	537600,00	537600,00	537600,00	537600,00
-207138,95	-207138,95	-207138,95	-207138,95	-207138,95	-207138,95	-207138,95
330461,05	330461,05	330461,05	330461,05	330461,05	330461,05	330461,05
-49464,32	-49464,32	-49464,32	-49464,32	-49464,32	-49464,32	-49464,32
280996,72	280996,72	280996,72	280996,72	280996,72	280996,72	280996,72
-70249,18	-70249,18	-70249,18	-70249,18	-70249,18	-70249,18	-70249,18
210747,54	210747,54	210747,54	210747,54	210747,54	210747,54	210747,54
210747,54	210747,54	210747,54	210747,54	210747,54	210747,54	210747,54
-59425,23	151322,31	362069,86	572817,40	783564,94	994312,49	1205060,03

Tras realizar el cálculo de flujos de caja, se calculan los indicadores principales de la viabilidad del producto, estos son el Valor Actual Neto (VAN) y la Tasa Interna de Retorno (TIR). El VAN es un indicador el cual analiza los flujos de caja y la rentabilidad que da el proyecto, se mide en unidades de euros (€). El TIR es el porcentaje cuando el VAN se hace cero.

Se ha escogido un precio de venta del producto en el que se obtengan unos valores de VAN y TIR que aseguren que la inversión sea rentable desde el punto de vista económico. Estos valores son:

**Precio del producto: 35€/kg**

**VAN = 984.726,08 €**

**TIR = 23,86%**

Debido a que el VAN tiene un valor positivo y alto, realizar la planta piloto sería una buena inversión. Esto queda confirmado debido a que el TIR tiene un valor superior a la tasa mínima de rentabilidad que es exigida para invertir (5%), por lo que se puede asegurar que el proyecto es rentable.

Se han representado los flujos de caja y los flujos de caja acumulados en la Figura 5.2:

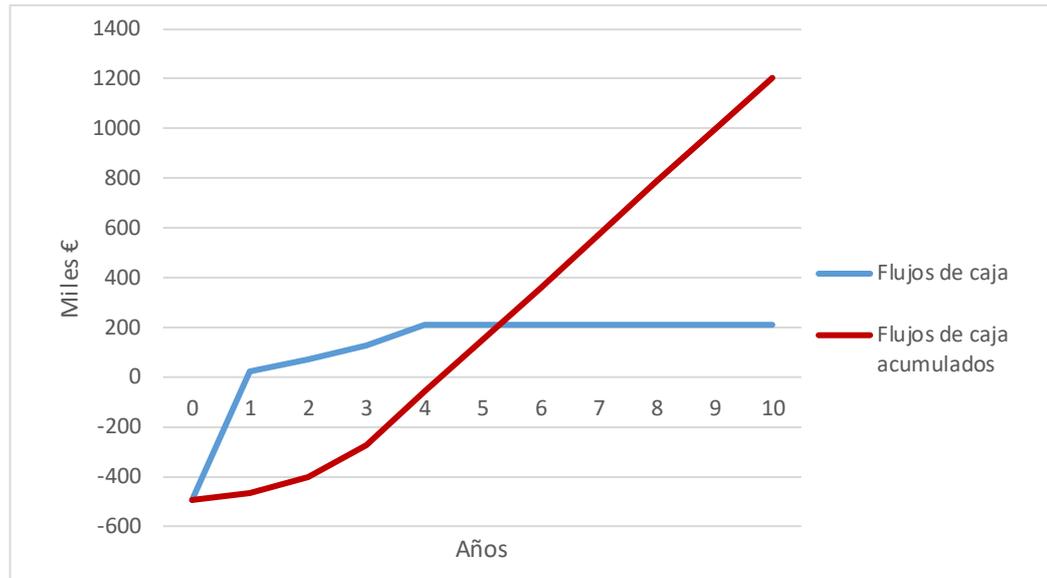


Figura 5.2- Flujos de caja y flujos de caja acumulados.

Como se puede apreciar en la gráfica, la representación de **los flujos de caja acumulados** indica que la inversión inicial se recupera a partir del cuarto año en el que la planta está operando. Este dato se ha obtenido tras elegir el precio de venta del producto (AX). Desde un punto de vista económico, el proyecto es viable económicamente. La representación de los **flujos de caja** indica que, tras la inversión inicial en el año cero, a lo largo del primer año aún no se obtienen suficientes ventas como para que los beneficios de la planta sean positivos.

### ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD

En la Figura 5.3 se muestra el **análisis de sensibilidad** realizado, el cual muestra cómo afectaría una **variación del precio de venta de los arabinos** y el **precio de compra de la materia prima, BSG**, ya que son la materia prima y el producto más importantes del proceso. La variación se va a estimar desde un 30% menos del precio actual hasta un 30% superior al precio actual.

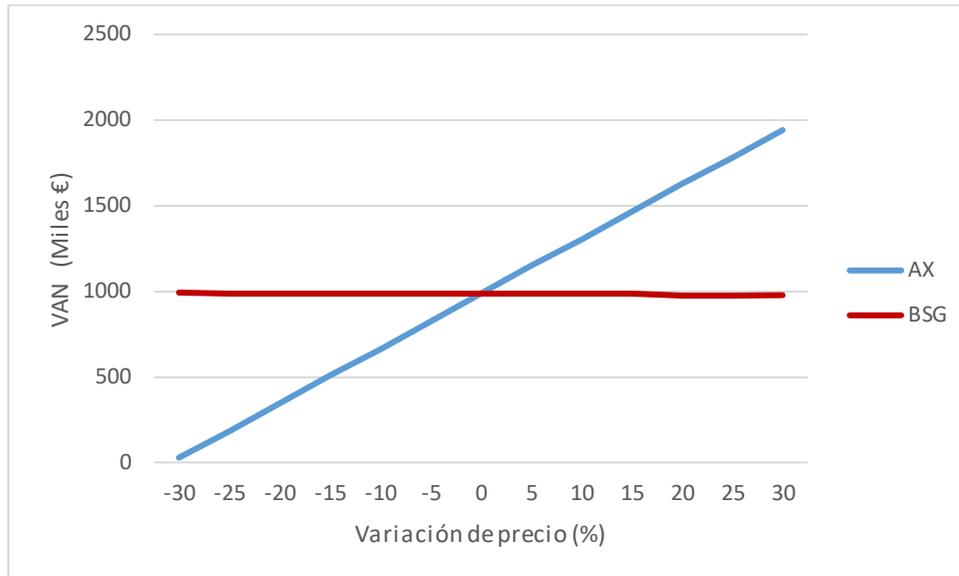


Figura 5.3- Análisis de sensibilidad variando los precios del producto (AX) y los precios de la materia prima (BSG).

Analizando la gráfica, se determina que el precio de los arabinosilanos es el factor más influyente en la viabilidad económica del proyecto, llegando a un punto en el que, si el precio baja más de un 25%, el proceso no sería viable. En cambio, la variación del precio de BSG no influye de forma significativa en el VAN, por lo que el proyecto sería viable económicamente aunque el precio del BSG cambiase de forma significativa.



## 6. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado un estudio experimental a escala laboratorio del proceso de obtención de arabinosidos a partir de bagazo de cerveza. El estudio se basa en la optimización de la etapa de extracción alcalina del BSG con NaOH asistida por la tecnología microondas.

De acuerdo con los objetivos fijados, se muestran las conclusiones tras realizar el trabajo experimental:

Mediante la revisión bibliográfica se ha confirmado que los **métodos** de acondicionamiento (lavado de BSG y secado), pretratamiento (molienda), extracción (alcalina asistida con NaOH mediante tecnología microondas) y separación (precipitación con etanol) **elegidos son más eficaces que otras alternativas**, de forma que así se ha realizado un trabajo experimental con expectativas de obtener unos mejores rendimientos de recuperación respecto a estudios anteriores a este. La materia prima ha sido elegida ya que es un recurso de bajo coste y con alta disponibilidad durante todo el año.

Este trabajo se ha centrado en la optimización de la etapa de **extracción de los arabinosidos**, asistida mediante tecnología microondas, utilizando hidróxido de sodio como solvente. Las experiencias preliminares, utilizando rangos de temperatura (120-180°C) y concentración de NaOH (0,1-0,3M NaOH) han servido para determinar los rangos de temperatura (170-210°C) y concentración de NaOH (0,1-0,4M NaOH) que deben usarse para realizar el diseño experimental posterior asegurando que entre esos valores se encuentre el punto óptimo de extracción de estos compuestos.

El diseño experimental seleccionado y realizado con el software Statgraphics Centurion XVIII se ha basado en un **Diseño Central Compuesto**. Se ha utilizado un tiempo de mantenimiento de la temperatura de 2,5 min y los factores de temperatura y concentración antes mencionados. Los valores óptimos obtenidos han sido **172,38°C** y **0,38 M NaOH**, con una concentración de arabinosidos en el extracto líquido de 17,03 g/L, correspondiente a una **recuperación** de los mismos del **52,6%**.

El estudio de **viabilidad económica** para una planta piloto de 40kg/h de BSG húmedo establece un coste total de la planta de 0,5 millones € con un tiempo de recuperación de la inversión de 4 años, un VAN de 1 millón € y un TIR de 23,9%, con un precio de venta de AX de 35€/kg indicadores de que la planta es **rentable económicamente**.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Bastos, R., Coelho, E., & Coimbra, M. A. (2018). Arabinoxylans from cereal by-products. In *Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102162-0.00008-3>
- Bhat, S. G., & Rose, V. D. (2019). *Green Bio-processes*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0>
- Buffington, J. (2014). The Economic Potential of Brewer's Spent Grain (BSG) as a Biomass Feedstock. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 04(03), 308–318. <https://doi.org/10.4236/aces.2014.43034>
- Chen, Z., Li, S., Fu, Y., Li, C., Chen, D., & Chen, H. (2019). Arabinoxylan structural characteristics, interaction with gut microbiota and potential health functions. *Journal of Functional Foods*, 54(October 2018), 536–551. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.007>
- Ciudad-Mulero, M. (2017). Arabinoxilanos y su importancia en la salud. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 11(1), 84–89. <https://doi.org/10.5209/rccv.55224>
- Coelho, E., Rocha, M. A. M., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2014). Microwave superheated water and dilute alkali extraction of brewers' spent grain arabinoxylans and arabinoxyloligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 99, 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.003>
- Cruz, P. R. (2018). *APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DERIVADOS DE LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANAL*.
- Fernández-Delgado, M., Plaza, P. E., Coca, M., García-Cubero, M. T., González-Benito, G., & Lucas, S. (2019). Comparison of mild alkaline and oxidative pretreatment methods for biobutanol production from brewer's spent grains. *Industrial Crops and Products*, 130(November 2018), 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.087>
- Gómez, B., Míguez, B., Veiga, A., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2015). Production, Purification, and in Vitro Evaluation of the Prebiotic Potential of Arabinoxyloligosaccharides from Brewer's Spent Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(38), 8429–8438. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03132>
- Grootaert, C., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (2007). Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends in Food Science and Technology*, 18(2), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.08.004>
- Holmsten, T. (2018). *Cereal dietary fibres as prebiotics – Metabolite production and health effects of arabinoxylan and  $\beta$ -glucan fermentation*.
- Ikram, S., Huang, L. Y., Zhang, H., Wang, J., & Yin, M. (2017). Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain. *Journal of Food Science*, 82(10), 2232–2242. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13794>



- Izydorczyk, M. S., & Dexter, J. E. (2008). Barley  $\beta$ -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a Review. *Food Research International*, 41(9), 850–868. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.04.001>
- Jiang, Y., Bai, X., Lang, S., Zhao, Y., Liu, C., & Yu, L. (2019). Optimization of ultrasonic-microwave assisted alkali extraction of arabinoxylan from the corn bran using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.138>
- Laine, C., Kemppainen, K., Kuutti, L., Varhimo, A., Asikainen, S., Grönroos, A., ... Harlin, A. (2015). Extraction of xylan from wood pulp and brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*, 70, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.009>
- Las, P. O. R., & Asociadas, E. (2019). *Últimas cifras disponibles Cerveceros de España. 2017–2018*. Available: <https://cerveceros.org/documentacion>. Accessed: 15/05/2019
- López-linares, J. C., García-cubero, M. T., & Lucas, S. (2019). *Microwave assisted hydrothermal as greener pretreatment of brewer's spent grains for biobutanol production*. 368(February), 1045–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.032>
- Mandalari, G., Faulds, C. B., Sancho, A. I., Saija, A., Bisignano, G., Locurto, R., & Waldron, K. W. (2005). Fractionation and characterisation of arabinoxylans from brewers' spent grain and wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 42(2), 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.03.001>
- Mendis, M., & Simsek, S. (2014). Arabinoxylans and human health. *Food Hydrocolloids*, 42(P2), 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.022>
- Mendis, Mihiri, Leclerc, E., & Simsek, S. (2016). Arabinoxylans, gut microbiota and immunity. *Carbohydrate Polymers*, 139, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.068>
- Morales Otega, A., Niño Medina, G., Carvajal Millán, E., Gardea Béjar, A., Torres Chávez, P., López Franco, Y., & Lizardi Mendoza, A. R. C. J. (2013). Características Físicoquímicas Y Capacidad Gelificante Ferulated Arabinoxylans From Cereals . a Review of Their Physico-Chemical Characteristics and Gelling Capability. *REv. Fitotec. Mex*, 36(4), 439–446.
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). *Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications*. 43, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>
- Pareyt, B., Goovaerts, M., Broekaert, W. F., & Delcour, J. A. (2011). Arabinoxylan oligosaccharides (AXOS) as a potential sucrose replacer in sugar-snap cookies. *LWT - Food Science and Technology*, 44(3), 725–728. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.008>
- Reis, S. F., Coelho, E., Coimbra, M. A., & Abu-Ghannam, N. (2015). Improved efficiency of brewer's spent grain arabinoxylans by ultrasound-assisted



- extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 155–164.  
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.010>
- Rose, D. J., & Inglett, G. E. (2010). Production of feruloylated arabinoxylo-oligosaccharides from maize (*Zea mays*) bran by microwave-assisted autohydrolysis. *Food Chemistry*, 119(4), 1613–1618.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.053>
- Rosicka-Kaczmarek, J., Komisarczyk, A., Nebesny, E., & Makowski, B. (2016). The influence of arabinoxylans on the quality of grain industry products. *European Food Research and Technology*, 242(3), 295–303.  
<https://doi.org/10.1007/s00217-015-2549-0>
- SINNOTT, R. K. (2014). Costing and Project Evaluation. *Coulson and Richardson's Chemical Engineering*, 209–244. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-041865-0.50014-3>
- Skendi, A., Harasym, J., & Galanakis, C. M. (2018). Recovery of high added-value compounds from brewing and distillate processing by-products. In *Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102162-0.00007-1>
- Snelders, J., Olaerts, H., Dornez, E., Van de Wiele, T., Aura, A. M., Vanhaecke, L., ... Courtin, C. M. (2014). Structural features and feruloylation modulate the fermentability and evolution of antioxidant properties of arabinoxylanoligosaccharides during in vitro fermentation by human gut derived microbiota. *Journal of Functional Foods*, 10, 1–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.011>
- Spjelkavik, M., Karlijn, M., Taylor, B., Bolwig, S., & Mark, M. S. (2019). *6 Beyond animal feed? The valorisation of brewers' spent grain*. <https://doi.org/10.4324/9780429460289>
- Vieira, E., Rocha, M. A. M., Coelho, E., Pinho, O., Saraiva, J. A., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Coimbra, M. A. (2014). Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process for extraction of proteins and arabinoxylans. *Industrial Crops and Products*, 52, 136–143.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.012>
- Xiros, C., & Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. *Waste and Biomass Valorization*, 3(2), 213–232. <https://doi.org/10.1007/s12649-012-9108-8>
- Zhou, S., Liu, X., Guo, Y., Wang, Q., Peng, D., & Cao, L. (2010). Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction. *Carbohydrate Polymers*, 81(4), 784–789.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.040>



## 8. ANEXO

### BALANCES Y CÁLCULOS PARA REALIZAR LA EVALUACIÓN ECONÓMICA DE LA PLANTA PILOTO:

#### Flujo que entra al microondas.

La relación sólido-líquido es de 1:10 (10kg de BSG seco con 100L de NaOH 0,38M), se mantiene igual que en las experiencias del laboratorio. Se va a incorporar BSG húmedo al microondas, con alrededor de 75% de humedad, por lo que se necesita realizar un reajuste:

$$10 \text{ kg BSG seco} \cdot \frac{1 \text{ kg BSG húmedo}}{0,25 \text{ kg BSG seco}} = 40 \text{ kg BSG húmedo}$$

Esto quiere decir que se introducirán 40kg de BSG húmedo, de los cuales, 30kg son agua, por lo que en vez de introducir 100L de mezcla NaOH-H<sub>2</sub>O, se introducen 100L - 30L = 70L H<sub>2</sub>O-NaOH. Se debe corregir entonces la molaridad de NaOH:

$$\frac{0,38 \text{ mol NaOH}}{70 \text{ L H}_2\text{O}} = 0,54 \text{ M}$$

Entonces, los litros de agua que se utilizan en la planta son 70L/h, en un trimestre (75d) se calculan los litros necesarios para la planta, ya que el precio del agua es trimestral:

$$70 \frac{\text{L H}_2\text{O}}{\text{h}} \cdot 16 \frac{\text{h}}{\text{d}} \cdot 75 \frac{\text{d}}{\text{trimestre}} = 84000 \frac{\text{L H}_2\text{O}}{\text{trimestre}} = 84 \frac{\text{m}^3}{\text{trimestre}}$$

Se calcula la cantidad de NaOH necesaria por cada hora:

$$0,54 \frac{\text{mol NaOH}}{\text{L H}_2\text{O}} \cdot 0,04 \frac{\text{kg NaOH}}{\text{mol NaOH}} \cdot 70 \frac{\text{L H}_2\text{O}}{\text{h}} = 1,512 \frac{\text{kg NaOH}}{\text{h}}$$

Se calcula la cantidad de NaOH necesaria para operar durante un año:

$$1,512 \frac{\text{kg NaOH}}{\text{h}} \cdot 16 \frac{\text{h}}{\text{d}} \cdot 300 \frac{\text{d}}{\text{año}} = 7257,6 \text{ kg NaOH año}$$

Como la mezcla NaOH-H<sub>2</sub>O es muy acuosa, se va a considerar la densidad del agua para los cálculos.

#### Dimensiones de equipos.

Se van a estimar las dimensiones del microondas necesario para la planta piloto a partir de:



$$V_{microondas} = 110 \frac{L}{h} \cdot \frac{2,5 \text{ min}}{60 \text{ min}} = 4,58 L$$

Siendo 2,5min el tiempo de residencia dentro del microondas.

Mediante revisión bibliográfica se ha elegido un microondas con D=60mm y altura de 1,5m que suple las necesidades de la planta.

Las centrífugas han sido elegidas a partir de los kg/h de sólido que separan, mediante revisión bibliográfica.

Para escoger el tanque de precipitación, se ha estimado su volumen necesario y calculado su precio mediante la tabla 6.1 del capítulo 6 del libro SINNOTT, 2014:

$$V_{tanque} = 154 \frac{L}{h} \cdot \frac{15 \text{ min}}{60 \text{ min}} = 38,5 L$$