

APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE *Eucalyptus globulus* EN UN ESQUEMA DE BIORREFINERÍA EN DOBLE ETAPA

INTEGRAL USE OF *Eucalyptus globulus* IN A DOUBLE STAGE BIOREFINERY SCHEME

Javier M. Loaiza¹, Ascensión Alfaro^{1*}, Francisco López¹, María T. García¹, Juan C. García¹

RESUMEN

Se han aplicado dos tratamientos previos al proceso de pasteado etanol-sosa sobre madera de *Eucalyptus globulus* para evaluar su influencia sobre las propiedades de las pastas celulósicas obtenidas. Se aplica una primera etapa optimizada de autohidrólisis para maximizar la extracción de derivados hemicelulósicos preservando el glucano, seguida de una deslignificación enzimática mediante un sistema lacasa/mediador (siringaldehído). Se aplican diseños experimentales para la optimización de los procesos. Las condiciones de operación óptimas en la etapa de deslignificación enzimática han sido: concentración de lacasa 18,5 U/g, concentración de siringaldehído 1,5 %, temperatura 45 °C y tiempo de operación 60 min., con las cuales se alcanza una eliminación del 16,8 % de la lignina existente en la materia prima y se afecta ligeramente al glucano (conservando entre el 82,2 % y 89,7 % del glucano inicial). Paralelamente se obtienen dos fases líquidas valorizables, ricas en derivados hemicelulósicos y polifenólicos. En este esquema de proceso para obtención de pasta celulósica etanol-sosa a partir de madera eucalipto requiere una menor concentración de reactivos químicos, menores tiempos de operación y temperaturas más bajas, lo que supone una mejora económica y medioambiental respecto del proceso convencional de pasteado.

Palabras clave: Autohidrólisis, eucalipto, etanol-sosa, hemicelulosa, lacasa, pulpa.

ABSTRACT

Two previous treatments have been applied to the ethanol-soda paste process on *Eucalyptus globulus* wood to evaluate its influence on the properties of the obtained cellulose pulps. The treatments consisted of a first optimized stage of autohydrolysis (temperature: 180 °C, time: 30 min) to obtain the maximum extraction rate of hemicellulosic derivatives preserving the glucan, followed by enzymatic oxidative delignification by a laccase/mediator system (syringaldehyde). Experimental designs have been applied for the optimization of processes. The optimum operating conditions in the enzymatic delignification stage were: Laccase concentration 18,5 U/g, concentration of syringaldehyde 1,5 %, temperature 45 °C and operating time 60 min., with which an elimination of the 16,8% of the existing lignin in the raw material and slightly affects the glucan (it is conserved between 82,2 % and 89,7 % of the initial glucan). Two liquid, recoverable phases are obtained, rich in hemicellulose and polyphenolic derivatives. In this process scheme to obtain ethanol-soda cellulose pulp from eucalyptus wood requires a lower concentration of chemical reagents, shorter operating times and lower temperatures, which is an economic and environmental improvement over the conventional pulping process.

Keywords: Autohydrolysis, eucalypts, ethanol-soda, hemicellulose, laccase, pulp.

¹Research Center in Technology of Products and Chemical Processes. PRO²TECS- Chemical Engineering Department. Campus "El Carmen". University of Huelva. Huelva, Spain.

*Corresponding author: ascension.alfaro@deaf.uhu.es

Received: 29.01.2019 Accepted: 11.11.2019

INTRODUCCIÓN

La extracción de hemicelulosa de materiales lignocelulósicos antes de la formación de pulpa y su conversión en productos de valor agregado es una tecnología clave de biorrefinería. La eficiencia de la tecnología depende en gran medida de la operación del tratamiento previo, cuyo desafío es extraer una cantidad significativa de hemicelulosas sin un impacto negativo en la calidad y cantidad de la pulpa (Moshkelani *et al.* 2013).

De hecho, en el caso de la industria papelera tradicional, se ha considerado que la presencia de una cierta cantidad de hemicelulosas en las pastas es necesaria por su influencia en la calidad del papel resultante, aunque en los procesos convencionales una proporción mayoritaria de lignina y gran parte de las hemicelulosas pasan a las lejiás (Tuero-Cruz *et al.* 2011). Así, en las primeras fases del pasteado se produce una rápida eliminación de la parte más lábil del complejo hemicelulosa-lignina (Núñez 2008) estimándose que se elimina entre el 15 % y 25 % de la lignina y el 40 % de las hemicelulosas (Villar 2008). Otra parte de las hemicelulosas se disuelven después a lo largo de la cocción de forma bastante selectiva respecto a las cadenas de celulosa porque a diferencia de esta celulosa, las hemicelulosas forman cadenas ramificadas de menor grado de polimerización, y no tienen zonas cristalinas. Además, los puentes de hidrógeno son menos eficaces, haciendo de las hemicelulosas polisacáridos más accesibles al ataque de los reactivos químicos (BREF 2006).

Por otro lado, la extracción de hemicelulosas antes de la formación de pulpa (en materia prima) puede proporcionar ventajas competitivas, ya que se pueden usar como sustratos para la fabricación de múltiples productos comerciales como la xilosa y otros azúcares hemicelulósicos, xilooligosacáridos, furanos, etanol, ácido láctico, acetona, butanol, ácido cítrico, propilenglicol, xilitol, formaldehído, butanodiol, propanodiol y enzimas celulolíticas (Vila *et al.* 2012, Marinova *et al.* 2009). Además, en la actualidad crece la tendencia en las fábricas de papel de avanzar su desarrollo hacia una producción menos contaminante integrándose en esquemas de economía circular en los que se aprovechen al máximo los recursos y se produzcan menos residuos y contaminación. Como hipótesis futura, las fábricas de celulosa se podrían transformar en biorrefinerías, las cuales se basará en nuevos métodos de cocción en los que la biomasa se fracciona en una abundancia de novedosos materiales. Estas fracciones son luego procesadas en diferentes materiales o químicos (Cebreiros *et al.* 2017, Rafione *et al.* 2014, Martín-Sampedro *et al.* 2014, Moshkelani *et al.* 2013), asegurando así la competitividad económica, medioambiental y la sostenibilidad (Demirbas 2009), favoreciendo la autosuficiencia energética y el control de las emisiones de gases de efecto invernadero (Cherubini 2010, Towers *et al.* 2007, Heiningen 2007, García *et al.* 2009).

Bajo estas premisas, en el presente trabajo se plantea la hipótesis de que sería posible, en pretratamientos de autohidrólisis, controlar las condiciones de operación con el fin de permitir que en el sólido permanezca una fracción de hemicelulosas suficiente para el posterior desarrollo de propiedades de resistencia en las hojas de papel asegurando a la vez un grado sustancial de solubilización de la hemicelulosa y lograr concentraciones de sacáridos suficientemente altos como para hacer que cualquier uso adicional sea rentable. La composición de la materia prima y las condiciones de cocción determinan la composición de la pasta y esto afecta el comportamiento de la pasta en el proceso de refinado y el potencial de fabricación del papel (López *et al.* 2015, García *et al.* 2010, Anjos *et al.* 2004).

Diversos autores han explorado esta posibilidad sobre diversas materias primas y procesos. Por ejemplo, Heiningen (2007) ha observado que la pre-extracción de hemicelulosas en una planta kraft, suponía una ventaja en términos de disminución de la carga alcalina efectiva durante el despulpado, mayor velocidad de deslignificación y menores incocidos. Similar conclusión obtuvo Yuan *et al.* (2016) trabajando con pulpa de bambú kraft. En el pretratamiento eliminaba el 50 % de las hemicelulosas y dio como resultado una mejora significativa en la deslignificación de las astillas durante la fabricación de pulpa Kraft, ofreciendo una opción para reducir la carga alcalina efectiva o el factor H. El rendimiento de la pulpa fue similar al control, mientras que la resistencia al drenaje de la pulpa de las astillas extraídas previamente mejoró ligeramente. López *et al.* (2015) han obtenido pastas de *Eucalyptus globulus* a la sosa tras un pretratamiento de autohidrólisis, reduciendo la concentración del alkali en un 31 %, la temperatura de cocción 10 °C y 25 minutos el tiempo de cocción, a la vez que mantuvieron unas propiedades similares de la pasta celulósica y el papel obtenidas sin pretratamiento previo, lo cual representa una ventaja económica y medioambiental respecto al proceso convencional a la sosa. Con las fibras de bagazo sometidas a la formación de pulpa de sosa, la preextracción de hemicelulosas reduce el índice de tracción y de rotura, sin embargo, no se observa diferencias significativas en el índice de desgarro, lo que indica que la resistencia de la fibra no se ve afectada, pero la unión entre las fibras disminuye con la extracción. El rendimiento total de pulpa para el bagazo extraído aumentó considerablemente, mientras que

el número de kappa y los incocidos disminuyeron moderadamente. Después de la preextracción, también se mostró mejor blancura (Hamzeh *et al.* 2013). Duarte *et al.* (2011) con pastas kraft de arce con pre-extracción de agua caliente, han observado que la deslignificación se acelera significativamente, aumenta la viscosidad de la pulpa y las longitudes de las fibras no mostraron cambios, pero se redujo el contenido de incocidos. Asimismo, el índice de rotura de las pulpas pre-extraídas mostró grandes incrementos. La porosidad de la pared celular también aumentó con la gravedad de la extracción, al igual que el tamaño medio de los poros. Los valores de retención de agua (VRA) también aumentaron con la extracción probablemente debido a la mayor porosidad de la fibra. También hay una pérdida significativa de la resistencia a la tracción y la rotura de las hojas hechas con pulpas extraídas, posiblemente como consecuencia del aumento del índice de retorcimiento y curvatura y la disminución de la capacidad de unión entre las fibras. Molin y Teder (2002) utilizando pulpas kraft de abeto, han encontrado relación directa y proporcional del índice de rotura y tracción con la proporción de celulosa/hemicelulosa. El índice de rotura, la resistencia a la fractura y la resistencia al plegamiento disminuyeron, mientras que la rigidez a la tracción y el índice de tracción aumentaron al disminuir la proporción de celulosa/hemicelulosa (3 a 9). Un aumento de la proporción de celulosa/hemicelulosa dio una fibra menos rígida y frágil. Anjos (2004) ha observado en pastas de eucalipto que un contenido diferente en hemicelulosas influye en la capacidad de refinado de las pastas. Respecto a las propiedades biométricas de las fibras, la pasta con menos hemicelulosa, presenta una mayor dureza y un mayor índice de retorcimiento y curvatura. La tasa de refinación aumenta claramente con el contenido de hemicelulosas asociado a una mayor generación de finos y una mayor hidratación. Como consecuencia, la pasta celulósica con un menor contenido en hemicelulosas requiere más energía en la etapa de refinado aunque se lleguen a alcanzar propiedades de resistencia de las hojas similares. Hu *et al.* (2013) extrajo hemicelulosas con una solución de hidróxido de sodio de pasta kraft de eucalipto blanqueada para observar la influencia de las hemicelulosas en las propiedades del papel. Se observó que el volumen, la rugosidad de la superficie y la permeabilidad al aire del papel aumentaron como resultado de la pérdida de hemicelulosa, particularmente porque el contenido de hemicelulosa en la pulpa disminuyó por debajo del 13 %. Tanto la blancura como la opacidad del papel mejoraron ligeramente debido a la eliminación de la hemicelulosa, mientras que los índices de resistencia disminuyeron. Tanto la transferencia de tinta como la impresión se redujeron con la pérdida de hemicelulosa.

En esquemas de fraccionamiento consistentes en una etapa de autohidrólisis y otra de deslignificación con sosa u organosolv, se han ensayado distintos procesos y condiciones de operación sin que se haya constatado que la reducción de la cantidad de hemicelulosas que provoca la autohidrólisis en el sólido suponga un impedimento para la posterior utilización del mismo (Loaiza *et al.* 2016, Zamudio *et al.* 2015, Boucher *et al.* 2014, Feria *et al.* 2011, Romaní *et al.* 2011, García *et al.* 2011, Alfaro *et al.* 2010, García *et al.* 2010, Alfaro *et al.* 2009, Caparrós *et al.* 2008, Alfaro *et al.* 2007). Incluso, el tratamiento de autohidrólisis permitió la producción posterior de pasta de celulosa y papel sosa-antraquinona con propiedades tan buenas o incluso mejores que las obtenidas sin el tratamiento previo (López *et al.* 2015). Otros autores constatan que la utilización de una primera etapa de fraccionamiento del material lignocelulósico mediante autohidrólisis, explosión de vapor o tratamiento de hidrólisis, puede facilitar una posterior penetración de las enzimas en esquemas de biopasteado en una primera etapa del proceso de deslignificación permitiendo también un tiempo de pasteado más corto, debido a una difusión más eficiente del licor de cocción en las fibras (Martín-Sampedro *et al.* 2014, Martín-Sampedro *et al.* 2011, Scott *et al.* 2002). En particular, las lacasas son un grupo de enzimas oxidativas de gran interés para el desarrollo de tecnologías respetuosas con el medio ambiente, especialmente si se combinan con un mediador natural como el siringaldehído (Mayer y Staples 2002), el cual podría potencialmente ser obtenido a partir de la lignina contenida en los licores negros del pasteado (Anil *et al.* 2018). Este sistema lacasa-mediador es capaz de mejorar significativamente las propiedades (blancura y deslignificación) de las pastas de eucalipto así como de reducir significativamente el contenido de los compuestos lipofílicos de la pasta de eucalipto responsables de la formación de depósitos de pitch (Rico 2010). Asimismo, permite reducir el consumo de energía en el proceso de refinado y facilita el blanqueamiento posterior de la pasta, también la reducción de los extractos lipofílicos, facilitando la fabricación del papel al reducir los problemas de tono, mejorando asimismo las propiedades de resistencia del papel (Widsten y Kandelbauer 2008).

En el estudio actual, se realizó un tratamiento con el Sistema Lacasa/Mediador después de la autohidrólisis de la madera de *Eucalyptus globulus* para la fabricación de pasta con etanol-sosa a fin de verificar si este tratamiento previo influye en las propiedades de la pulpa. La autohidrólisis y las condiciones enzimáticas se han realizado para maximizar la extracción de hemicelulosas al tiempo que se preserva la integridad del glucano. Con la optimización de una etapa de hidrólisis enzimática se pretende aumentar el porcentaje de rendimiento de obtención de celulosa sin degradarla, lo que supondría un ahorro energético y de materias primas, contribuyendo asimismo a la disminución de emisiones de CO₂.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de la materia prima

Se han empleado astillas de madera de *Eucalyptus globulus* cedidas por la empresa ENCE Energía y Celulosa S.A. (Huelva, España). Se molieron para pasar por un tamaño de malla de 8 mm, ya que en los estudios preliminares no se observaron limitaciones de difusión de esta partícula, se secaron al aire, se homogenizaron en un solo lote para evitar diferencias en las composiciones, y se almacenaron.

Después de esto, se tomaron alícuotas de materia prima y se molieron a un tamaño de partícula < 0,5 mm, y se determinaron el porcentaje de humedad y los compuestos extraíbles TAPPI 264 cm-07 (2007) y TAPPI 204 cm-07 (2007) 1 % NaOH solubles TAPPI 212 om-02 (2002), lignina soluble TAPPI UM 250 (1991) y la hidrólisis ácida cuantitativa (HAC) con 72 % H₂SO₄ siguiendo métodos estándar. El residuo sólido después de la HAC se recuperó por filtración y se considera como lignina Klason TAPPI T 222 om-02 (2002) y la fase líquida se caracterizó por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) para azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa). A partir de los datos de estas concentraciones, mediante correcciones estequiométricas y teniendo en cuenta la descomposición de los azúcares, se calcula el contenido en polímeros (glucano, xilano y arabinano) que se hidrolizaron para dar los monómeros medidos en la muestra analizada. Las cenizas se determinaron por calcinación TAPPI 211 om-02 (2002).

Tanto en el sólido obtenido después del tratamiento enzimático, como en la fase sólida obtenida después de la etapa de pasteado organosolv se determina el porcentaje de rendimiento, la lignina Klason, la lignina soluble en ácido y el glucano, aplicando los mismos procedimientos descritos anteriormente para la materia prima. Además, en las pastas se determina el número kappa TAPPI T 236 cm-99 (1999) y viscosidad intrínseca TAPPI T230 om-19 (2019).

Primera etapa de autohidrólisis

La autohidrólisis de la materia prima se llevó a cabo en un reactor MK-systems Inc. (Danvers, Massachusetts, Estados Unidos) cilíndrico de acero inoxidable de 10 litros de capacidad, utilizando el agua como único reactivo. Las condiciones aplicadas son las que se determinaron como óptimas en trabajos previos: relación sólido-líquido 1/8, temperatura de cocción 180 °C durante 30 minutos en condiciones isoterma (Loaiza *et al.* 2016). En esta etapa se eliminan los extraíbles y se extrae gran parte de las hemicelulosas de la materia prima, obteniendo un líquido valorizable rico en oligómeros y algunos monómeros como glucosa, xilosa y arabinosa.

Una vez finalizado el tiempo de reacción de la autohidrólisis se separan las astillas y el licor y se lavan con agua abundante, posteriormente se centrifugan y se dejan secar a temperatura ambiente hasta alcanzar una humedad entre 8 % y el 10 %.

Doble etapa de deslignificación, tratamiento enzimático-mediador, diseño experimental y modelización de regresión múltiple

Para la realización de la hidrólisis enzimática se ha utilizado una lacasa de Novozyme producida por la fermentación de un cultivo de *Aspergillus Oryzae* que contiene el gen de lacasa derivado de *Myceliophthora thermophila*. El mediador utilizado ha sido el siringaldehído (3,5-Dimetoxi-4-hidroxibenzaldehído), proporcionado por Sigma-Aldrich (Cat: S-760-2 Lot: 26323-398).

Para relacionar las variables dependientes (rendimiento y propiedades químicas de la pulpa) con las variables independientes (concentración de enzima -X_e, concentración de mediador -X_m y tiempo de operación -X_t) en el proceso de hidrólisis enzimática con la prueba mínima, se utilizó un diseño experimental de composición central compuesto y factor de 2n (n es igual a tres niveles para cada variable), por lo que es posible construir un polinomio de segundo orden en las variables independientes y la identificación de la significación estadística en las variables dependientes. Las variables independientes fueron normalizados utilizando la siguiente Ecuación (1):

$$X_n = \frac{X - \bar{X}}{(X_{\max} - X_{\min}) / 2} \quad (1)$$

Donde X es el valor absoluto de la variable independiente de preocupación, es el valor medio de la variable, y X_{\max} y X_{\min} son sus valores máximo y mínimo, respectivamente.

El número de pruebas requeridas se calculó como $N=2^n+2n+nc$, siendo 2^n el número de puntos que constituye el factor de diseño, $2n$ el número de puntos axiales, y $nc=2$ el número de repeticiones del punto central. En las condiciones utilizadas, $N = 16$.

Los resultados experimentales se ajustaron al siguiente polinomio de segundo orden (Ecuación 2):

$$Y = a_o + \sum_{i=1}^n b_i X_{ni} + \sum_{i=1}^n c_i X_{ni}^2 + \sum_{i=1; j=1}^n d_i X_{ni} X_{nj} \quad (i < j) \quad (2)$$

Las variables independientes utilizadas en las ecuaciones relativas a ambos tipos de variables son las que tienen un coeficiente estadísticamente significativo (es decir aquellos que no exceda de un nivel de significación de 0,05 en la prueba de Student- y que tiene un intervalo de confianza del 95 % excluyendo el cero). Los resultados fueron evaluados con STATISTICA 8.0 (StatSoft 2008).

Cada uno de los 16 experimentos se realizó con una cantidad fija de 30 g de materia en base seca de madera de Eucalipto hidrolizada con una relación sólido-líquido de 1/8 a una temperatura de 45 °C, pH de 7,5 y un tiempo de impregnación del eucalipto hidrolizado con el mediador de 30 minutos. En la Tabla 1 se muestra la variación de los parámetros de tiempo de reacción, cantidad de enzima y cantidad de mediador que se aplicaron en los diferentes experimentos del diseño experimental.

Tabla 1: Condiciones de operación de la hidrólisis enzimática.

Condiciones	-1	0	1
Concentración lacasa (X_L), U/g m.p.s.	15	25	35
Concentración Siringaldehído (X_m), % m.p.s.	1,5	3,0	4,5
Tiempo (X_T), min.	60	120	180

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en frascos de vidrio en incubadora con agitación y aireación controlada. Transcurrido el tiempo de reacción se filtran las astillas, se lavan con agua destilada y se dejan secar a temperatura ambiente. En el material sólido resultante de la hidrólisis enzimática se determinan lignina klason, lignina soluble en ácido y glucano de acuerdo a la metodología descrita en el apartado de la caracterización de la materia prima.

Doble etapa de deslignificación, deslignificación de etanol-sosa y caracterización de la pulpa

Se realizaron los experimentos con 20 gramos en base seca del material resultante del tratamiento enzimático en un reactor de acero inoxidable (Parr Instruments Company, Moline, Illinois, Estados Unidos), con una capacidad de 600 cm³, equipado con impulsores de turbina de cuatro palas, calentados por un manto de tela externa y enfriados por agua fría que circula a través de un circuito interno. Los medios de reacción se agitaron a 150 rpm y se calentaron para alcanzar la temperatura deseada. El licor empleado es una disolución etanol al 65 % en volumen y sosa al 7,5 % en peso para una relación sólido-líquido de 1:8. Este sistema permite una importante reducción del álcali a la vez que no son necesarias presiones elevadas. El reactor se programa a una temperatura fija de 143 °C y un tiempo de reacción de 65 minutos para todos los puntos del diseño experimental de la deslignificación enzimática. La selección de las condiciones de operación se ha basado en unos ensayos previos consistentes en deslignificaciones con etanol (Garrote *et al.* 2003) y con sosa tras un tratamiento enzimático (Loaiza *et al.* 2019).

Transcurrido el tiempo de reacción el reactor se refrigera externamente con agua. La pasta se lava con un licor de igual composición que el introducido en el reactor y después con agua. Posteriormente se realiza un tratamiento mecánico de la pasta consistente en un desfibrado y centrifugación. En la pasta resultante se determina lignina Klason, lignina soluble en ácido, glucano, número kappa y viscosidad. La Tabla 2 muestra

un esquema de trabajo experimental.

Tabla 2: Esquema de trabajo experimental.

<i>Eucalyptus globulus</i> Determinación química
Primera etapa Tratamiento de autohidrólisis (condiciones fijas) Temperatura: 180 °C; Tiempo: 30 min; L/S: 8/1
Determinación química: rendimiento de autohidrólisis, glucano, xilano, lignina klason (trabajos anteriores)
Segunda etapa Diseño experimental Tratamiento- Enzima/Mediador. (Concentración Lacasa)= 15 U/g, 25 U/g y 35 U/g, m.p.s (Concentración Siringaldehído) = 1,5 %; 3,0 % y 4,5 % m.p.s Tiempo= 60 min, 120 min y 180 min.
Determinación química: rendimiento enzimático, glucano, lignina klason, lignina soluble
Fabricación de pasta de papel, etanol-sosa (condiciones fijas en diseño experimental) T =143 °C; t = 65 min; (concentración NaOH)= 7,5 %; (Etanol/agua)= 65 %, S/L: 1/8
Determinación química: rendimiento de la pulpa, glucano, lignina klason, lignina soluble, número Kappa, viscosidad intrínseca

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proceso de autohidrólisis

Como se ha indicado en apartados precedentes en la primera etapa de fraccionamiento por autohidrólisis se han aplicado condiciones previamente determinadas como óptimas con el fin de extraer la máxima cantidad de hemicelulosas sin dañar el sólido remanente (Loaiza *et al.* 2016). En dichas condiciones se ha alcanzado un rendimiento del 80,4 % en sólido post-hidrólisis con una composición en glucano de 45,3 %, lignina klason: 22,9 % y xilano: 1,9 %. El resto del material lignocelulósico se ha solubilizado. En la Tabla 3, se puede observar la composición de la materia prima inicial, similar a los resultados obtenidos por Vila *et al.* (2012) y Romani *et al.* (2011).

Tabla 3: Caracterización *Eucalyptus globulus*.

Determinación	<i>Eucalyptus globulus</i>
1 % NaOH solubles, %	13,1 ± 1,6
Extraíbles en Etanol %	2,7 ± 0,1
Cenizas, %	0,7 ± 0,1
Glucano, %	42,8 ± 2,4
Lignina Klason, %	21,2 ± 1,7
Lignina soluble, %	6,8 ± 0,4
Xilano, %	17,1 ± 1,4
Arabinano, %	0,7 ± 0,1

Los resultados de los análisis permiten deducir que en el sólido posthidrólisis permanece el 85,1 % del glucano existente en la materia prima, es decir, hay una escasa disolución del mismo que no alcanza el 15 %, sin embargo, se logra una elevada extracción del xilano, que en un 90,8 % pasa a formar parte del líquido. Asimismo, la autohidrólisis provoca una ligera deslignificación como consecuencia de la rotura de los enlaces éter, eliminando de la materia prima inicial el 13,5 % de la lignina.

En investigaciones que se han realizado tratamientos de autohidrólisis con eucalipto con temperaturas similares pero en condiciones “no isotermas” se observa, que la disolución que se produce del glucano presente en la materia prima es similar y menor la disolución del xilano. Garrote *et al.* (2003) aplicando temperaturas de 181 °C, obtuvieron rendimientos del 84,6 % y una fase sólida post-hidrólisis con una composición de 47,5 % de celulosa, 6,8 % de xilano y 22,5 % de lignina. Romani *et al.* (2011), aplicando temperaturas de 181 °C obtuvieron un sólido de eucalipto autohidrolizado con la siguiente composición: glucano: 54,3 %, xilano: 10,9 % y lignina klason: 26,3 %, con un rendimiento del 81,8 %. Asimismo, se observa que cuando el tratamiento se realiza en condiciones isotermas, como en este trabajo, el efecto de deslignificación es similar o mayor que en condiciones no isotermas, pudiendo tener el sólido posthidrólisis en condiciones no isotermas un contenido en lignina 1,64 veces superior comparado con un ensayo en condiciones isotermas (Loaiza *et al.* 2016, Garrote *et al.* 2003).

La reducción de temperatura en el tratamiento hidrotérmico influye notablemente en los resultados de disolución de hemicelulosas. Una disminución de 20 °C en la temperatura del tratamiento de autohidrólisis hace que el rendimiento sea mayor, que la solubilización del xilano se reduzca a más de la mitad y que se produzca cierta deslignificación pero menor que con temperaturas de tratamiento más altas. Por ejemplo, Garrote *et al.* (2007) con un tratamiento de autohidrólisis a 160 °C durante 30 minutos, obtuvieron un sólido posthidrólisis con un rendimiento del 89 % y una composición: glucano: 52,9 %, xilano: 12,0 % y lignina klason: 23,1 %. En un ensayo similar también con eucalipto Vila *et al.* (2012) con un tratamiento de autohidrólisis a 165 °C y tiempo de reacción 40 minutos, llegaron a solubilizar el 18,3 % de la madera y un 48,5 % del xilano presente en la madera de eucalipto.

La solubilización del xilano alcanzada en el pretratamiento por encima del 90 % permite su aprovechamiento. En otros trabajos que también tenían como objetivo la valorización de derivados hemicelulósicos se recuperó entre el 65 % y el 82 % de las hemicelulosas presentes en la materia prima (García-Domínguez *et al.* 2015) y en otros casos el 50 % del polímero inicial (Vila *et al.* 2012).

Deslignificación doble etapa: tratamiento enzimático y etanol-sosa de la fase post-autohidrólisis

La deslignificación enzimática lacasa-mediador se llevó a cabo sobre la fase sólida obtenida después de una primera etapa de autohidrólisis siguiendo un diseño experimental factorial de composición central. A la fase sólida obtenida en el tratamiento enzimático se le realizó una deslignificación etanol-sosa en condiciones fijas de pasteado. En la Tabla 4 Aparece la composición del sólido resultante después de ambos tratamientos, para cada uno de los ensayos del diseño experimental propuesto. Cada valor experimental fue el promedio de cinco resultados y las desviaciones sobre los valores medios fueron inferiores al 5 % en todos los casos.

Tabla 4: a) Composición del sólido resultante del tratamiento enzimático. b) Composición del sólido después del tratamiento enzimático y posterior deslignificación etanol-sosa para cada uno de los ensayos del diseño experimental (en tanto por ciento respecto del sólido, %rs).

Exp	a) Tratamiento enzimático				b) Tratamiento enzimático + pasteado etanol-sosa					
	Rendimiento Enzimático %rs	Lignina Klason %rs	Lignina Soluble %rs	Glucano %rs	Rendimiento Pulpa %rs	Lignina Klason %rs	Lignina Soluble %rs	Glucano %rs	Nº Kappa	Viscosidad Intrínseca cm ³ /g
O1	96,2	19,11	2,72	46,42	66,7	11,23	1,45	57,76	45,22	625,9
O2	96,2	19,11	2,72	46,42	66,7	11,25	1,43	58,15	45,16	671,6
1	95,9	22,39	1,82	45,65	65,3	11,77	1,39	58,19	45,58	609,0
2	95,0	22,60	2,09	47,53	64,2	11,93	1,51	61,59	46,06	613,7
3	94,8	19,42	1,97	48,28	64,6	10,24	1,29	62,35	38,78	591,0
4	95,0	19,80	2,09	46,22	63,3	10,55	1,20	63,70	39,25	612,7
5	96,8	20,28	1,80	45,23	62,9	11,77	1,43	62,92	46,31	575,9
6	96,5	20,22	1,80	49,49	62,1	11,69	1,54	63,10	43,31	665,6
7	95,2	21,25	1,70	47,69	63,5	10,73	1,28	63,16	40,11	654,2
8	95,8	21,30	2,21	47,13	62,3	10,88	1,31	63,98	40,17	709,0
9	96,0	19,14	2,85	45,61	63,3	11,04	1,26	61,40	42,43	640,3
10	96,6	19,15	2,58	47,12	62,4	11,23	1,36	63,14	42,28	673,3
11	96,3	19,94	2,58	46,88	67,4	11,25	1,56	58,06	48,02	664,8
12	95,5	19,15	2,87	47,15	67,8	11,77	1,46	58,78	42,59	669,2
13	96,2	20,50	1,68	46,03	66,8	11,93	1,39	58,26	45,43	622,0
14	96,0	20,33	2,20	46,90	65,8	10,24	1,47	59,10	44,90	680,7

Los rendimientos obtenidos en el tratamiento enzimático son muy elevados con valores comprendidos entre el 94,8 % y 96,8 %, lo que en el balance global de materia supone una escasa pérdida. Durante el tratamiento de autohidrólisis se disuelven las hemicelulosas que unen la lignina y la celulosa, y el material queda expuesto a ser más fácilmente atacado por las enzimas. Este ataque supone más una desestructuración que una disolución, lo que se traduce en un mantenimiento aproximado de la masa de la fase sólida sin disminución del rendimiento, pero generando unas condiciones en el sólido que propiciarán la deslignificación posterior.

El efecto que el tratamiento hidrotérmico puede suponer sobre el rendimiento en tratamientos posteriores como el pasteado ha sido estudiado por varios autores, constatándose, que en contra de lo que pueda parecer, el tratamiento hidrotérmico puede resultar positivo en el balance final (Alfaro *et al.* 2009).

Alfaro *et al.* (2009) observaron que el rendimiento general del proceso de autohidrólisis con etanol de *Chamaecytisus proliferus* supera al de la cocción sola (58,2 % vs. 42,6 %). Esto puede ser debido a que el tratamiento hidrotérmico disuelve las hemicelulosas que actúan de aglutinante entre la lignina y la celulosa, y el material resulta más accesible a los reactivos, como consecuencia la cantidad de material sin cocer es menor (menor cantidad de incocidos) y el rendimiento por tanto es mayor. Otros autores obtuvieron previamente resultados similares a este respecto; si bien un aumento de la disolución de las hemicelulosas y la lignina debería disminuir el rendimiento de la pulpa, un tratamiento previo por hidrólisis en ocasiones reduce las pérdidas de celulosa, con poco efecto sobre el rendimiento de la pulpa (Alfaro *et al.* 2009, Papatheophanus *et al.* 1995, Aravamuthan *et al.* 1989).

Los tratamientos enzimáticos afectan ligeramente al glucano, ya que el sólido post-enzimático conserva entre el 82,2 % y el 89,7 % del glucano que previamente contenía la materia prima, como se ha indicado anteriormente, los tratamientos enzimáticos atacan fundamentalmente la estructura de la lignina, favoreciendo los tratamientos posteriores (Singh *et al.* 2010).

Expresando el grado de deslignificación en relación a la proporción de lignina inicialmente presente en la materia prima, los datos de la Tabla 4 muestran que tras las etapas de autohidrólisis y deslignificación mediante un sistema lacasa/mediador se ha eliminado entre el 18,6 % y el 30,3 % de la lignina inicialmente presente en la materia prima y teniendo en cuenta que la etapa de autohidrólisis había extraído a fase líquida el 13,5 % de dicha lignina, la etapa de deslignificación enzimática ha conseguido eliminar entre el 5,1 % y el 16,8 % de la lignina inicialmente presente en la materia prima. El grado de extracción tras la etapa enzimática ha sido aún mayor para la fracción de lignina soluble en ácido. Se ha extraído entre el 67,6 % y el 80,9 % de la lignina soluble en ácido inicialmente presente en la materia prima.

Si consideramos el proceso completo, tras la segunda etapa de deslignificación con la mezcla etanol-soda y de acuerdo a los resultados de la Tabla 4, la etapa enzimática contribuye a aumentar la deslignificación total, en concreto, el porcentaje total de lignina que se ha extraído del sólido ha oscilado entre el 70,9 % y el 76,2 % respecto de la materia prima inicial.

Estos resultados son comparables con trabajos previos en los que se realizaba un tratamiento de autohidrólisis en las mismas condiciones y una deslignificación con sosa en diversos rangos de condiciones de operación (concentración sosa: 13 % y 21 %, temperatura: 153 °C y 173 °C, y 65 min y 115 min) (López *et al.* 2015). La aplicación de la doble etapa de deslignificación: Sistema Lacasa/Mediador + deslignificación etanol-sosa ha conseguido mejorar el número kappa de las pastas en la mayoría de las condiciones de operación del diseño experimental aplicado (entre 38,8 y 48,0 frente a 33,2 y 87,9 del proceso autohidrólisis + deslignificación sosa) mientras que los rendimientos totales se mantienen en niveles similares (entre 48,0 % y 52,2 % frente a 42,5 % - 67,2 % del proceso autohidrólisis + deslignificación con sosa).

Loaiza *et al.* (2016) en eucalipto, aplicaron un tratamiento de autohidrólisis previo en condiciones similares a las empleadas en el presente trabajo y posteriormente un tratamiento enzimático también en las mismas condiciones pero con mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT). Sobre el sólido resultante realizó una deslignificación con sosa con un 7,5 % de NaOH en peso, 65 % de etanol en volumen, 133 °C durante 75 minutos. En estas condiciones el sólido resultante presenta un contenido en lignina klason (8,1 %) y glucano (61,3 %) similares, pero con mayor número kappa que el obtenido en el presente trabajo (50,81 frente a 43,3).

Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los realizados por Garrote *et al.* (2003) en eucalipto en el que se realizó una autohidrólisis previa del material a 181 °C, con un tiempo de procesamiento de 37,5 minutos y posteriormente una deslignificación con etanol a 175 °C, 120 min y 70 % de etanol en volumen, obteniendo una pasta con un número kappa de 92,6 viscosidad de 741 mL/g, lignina 10,46 % se observa que

alcanzamos valores mucho más bajos del número kappa (38,8) las viscosidades son menores (669 mL/g) y un 10,2 % de contenido en lignina. Se concluye que en condiciones menos severas y utilizando tratamiento enzimático se alcanzan mejores resultados.

Para optimizar las condiciones de la etapa de deslignificación mediante un sistema lacasa/mediador y la doble etapa de deslignificación mediante un sistema lacasa/mediador y deslignificación con etanol-soda, se han modelizado los resultados de la Tabla 4 mediante regresión múltiple y de acuerdo a la metodología expuesta en el apartado del diseño experimental obteniéndose las ecuaciones que aparecen en la Tabla 5.

Las ecuaciones (e) a (j) de la Tabla 5 permiten representar la Figura 1, Figura 2, Figura 3, Figura 4 y Figura 5 (figura de lignina soluble no mostrada). El análisis de las superficies de respuesta facilita la determinación de los intervalos óptimos de operación.

Tabla 5: Ecuaciones obtenidas para cada variable dependiente del proceso enzimático después del proceso de autohidrólisis y el pasteado con etanol-sosa.

Hidrolisis + tratamiento enzimático		
Ecuaciones	r ²	F-Snedecor
(a) $Y_R = 96,29 - 0,42 X_1 + 0,43 X_m - 0,42 X_m X_m - 0,24 X_1 X_1 - 0,15 X_1 X_m + 0,14 X_1 X_t + 0,25 X_m X_t$	0,98	62,8
(b) $Y_{LK} = 19,11 + 0,11 X_1 + 0,45 X_m + 0,46 X_m X_m + 1,33 X_1 X_1 + 0,98 X_1 X_m$	0,99	158,3
(c) $Y_{LS} = 2,71 + 0,07 X_1 - 0,14 X_1 - 0,78 X_1 X_1$	0,93	55,6
(d) $Y_{GLU} = 46,41 - 0,34 X_1 - 0,44 X_1 + 0,71 X_m X_m + 0,49 X_1 X_1 - 1,10 X_m X_t$	0,94	31,2
Hidrolisis + tratamiento enzimático + pasteado etanol-sosa		
(e) $Y_R = 66,55 - 0,74 X_1 + 0,54 X_1 - 3,87 X_1 X_1 + 0,89 X_m + 0,30 X_1 X_m$	0,99	159,0
(f) $Y_{LK} = 11,20 - 0,09 X_1 + 0,57 X_m + 0,13 X_1 X_m$	0,94	81,0
(g) $Y_{LS} = 1,44 - 0,03 X_1 + 0,10 X_m - 0,02 X_1 - 0,13 X_1 X_1 + 0,06 X_m X_m - 0,03 X_m X_1$	0,94	24,2
(h) $Y_{GLU} = 58,35 - 0,90 X_1 - 0,81 X_m - 0,66 X_1 + 4,0 X_1 X_1 - 0,64 X_1 X_m - 0,47 X_1 X_t$	0,95	52,1
(i) $Y_K = 45,22 + 2,84 X_m + 0,25 X_t - 2,80 X_1 X_1 + 0,53 X_1 X_m - 0,49 X_1 X_t + 0,38 X_m X_t$	0,99	136,5
(j) $Y_{VIS} = 670,82 - 21,10 X_1 - 10,60 X_m - 23,10 X_1 - 17,95 X_1 X_1 - 22,95 X_1 X_t + 17,50 X_1 X_m + 14,75 X_1 X_t$	0,96	27,9

Variables Dependientes: Y_R : Rendimiento (%); Y_{GLU} : Glucano (%); Y_{LK} : Lignina Klason (%); Y_{LS} : Lignina soluble-ácido (%); Y_{VIS} : Viscosidad ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$); Y_K : Numero Kappa. Variables Independientes: X_1 : concentración lacasa; X_m : Concentración Siringaldehído; X_t : tiempo de operación.

En la Figura 1 del rendimiento se observa que los rendimientos son mayores cuando menor es la cantidad de lacasa utilizada, influyendo en ese caso escasamente las variables del porcentaje de mediador y el tiempo de operación, aunque en ambos casos son ligeramente mejores los rendimientos cuando estos valores son altos.

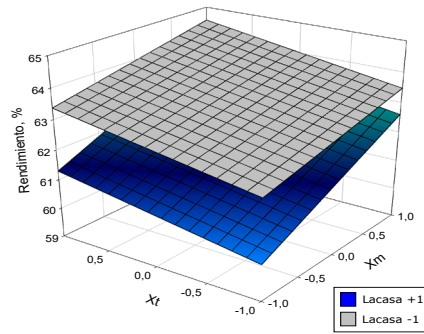


Figura 1: Variación del rendimiento según el tiempo de operación y la concentración del mediador (siringaldehído) en dos niveles de concentración de lacasa.

Con respecto al glucano (Figura 2) la variable más influyente es la concentración de lacasa siendo más ventajosa una baja concentración de enzima, sin influir prácticamente nada las variables tiempo y concentración del mediador. Ahora bien si las concentraciones de enzima son elevadas, interesa utilizar poco mediador y tiempos bajos de operación para no dañar al glucano.

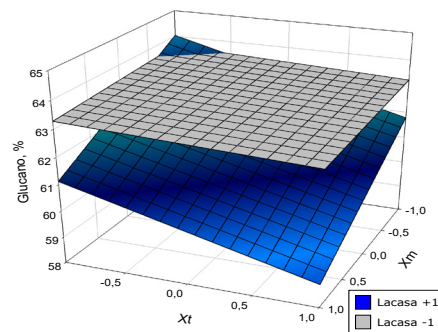


Figura 2: Variación de Glucano según el tiempo de operación y la concentración del mediador (siringaldehído) en dos niveles de concentración de lacasa.

En la lignina klason (Figura 3) no influye la variable tiempo, las menores cantidades de lignina en el sólido final se obtienen utilizando poca cantidad de mediador, influyendo escasamente la lacasa pero siendo mejor los resultados con valores elevados.

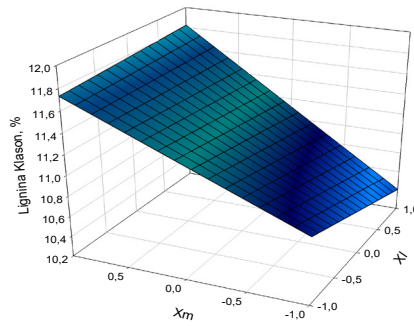


Figura 3: Variación de lignina Klason según la concentración de lacasa y del mediador (siringaldehído) en dos niveles de tiempo de operación.

Para obtener bajos números kappa, (Figura 4), interesa trabajar con cantidades bajas del mediador, el tiempo influye poco, y la mejor opción con la lacasa es trabajar con concentraciones intermedias. Concentraciones en los extremos de lacasa aumentan el número kappa en ambos casos.

El proceso combinado de autohidrólisis + deslignificación enzimática + deslignificación etanol sosa, presenta una mejora sustancial de la deslignificación respecto a procesos convencionales Sosa-antraquinona (Loaiza *et al.* 2016) que ofrecen resultados de número kappa entre 60,4 y 65,4; procesos de deslignificación con autohidrólisis + deslignificación organosolv (Garrote *et al.* 2003) que ofrecen resultados de número kappa entre 53,5 y 100,7; frente al rango de número kappa 39 - 45 que hemos obtenido en el presente trabajo.

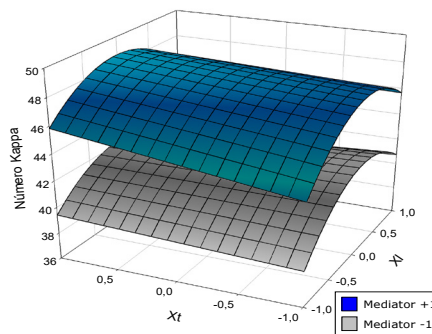


Figura 4: Variación del número Kappa según el tiempo de operación y la concentración de lacasa en dos niveles de concentración del mediador (siringaldehído).

La viscosidad (Figura 5) se ve favorecida por bajos tiempo de operación y bajas cantidades de lacasa, siendo indiferente la cantidad de mediador.

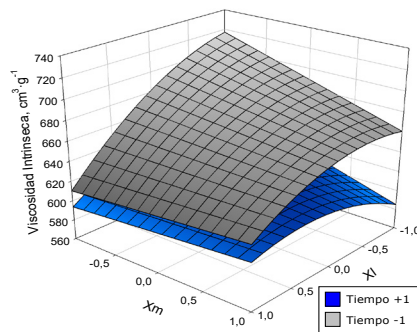


Figura 5: Variación de la viscosidad intrínseca según el tiempo de operación y la concentración de lacasa en dos niveles de concentración de mediador (siringaldehído).

Por tanto, a la vista de los resultados, la concentración de lacasa interesa baja para favorecer el rendimiento, el contenido en glucano y la viscosidad, pero como para las variables número kappa y contenido en lignina interesan valores medios, una solución de compromiso sería optar por una concentración de lacasa baja-intermedia, $X_1(-0,5)$: 18,5 U/g m.p.s. Como el tiempo influye poco en casi todas las variables, excepto en la viscosidad en la que interesan tiempos bajos, se considera óptimo un tiempo de operación bajo, $t(-1)$: 60 minutos. Y el contenido en mediador interesa bajo para tener bajos números kappa, influyendo poco en el resto de las variables así que se recomienda una concentración de mediador baja, $X_m(-1)$: 1,5 %. En estas condiciones y aplicando las ecuaciones de la Tabla 5 (hidrólisis+tratamiento enzimático+pasteado etanol-sosa) se obtiene un sólido con un rendimiento: 64,7 %, lignina klason: 10,7 %, lignina soluble: 1,4 %, glucano: 60,7 %, número kappa: 41,8 y viscosidad: 704 cm^3/g . En este trabajo se ha bajado 10 °C la temperatura, el tiempo se ha reducido en un 43,5 % y la concentración de álcali se ha reducido en un 56 %, respecto a pasteados a la sosa convencionales (López *et al.* 2015).

CONCLUSIONES

La aplicación de biorrefinería sobre materiales lignocelulósicos permite obtener distintas fracciones valorizables aplicando tratamientos sucesivos. En este trabajo sobre madera de eucalipto se ha realizado un tratamiento hidrotérmico (temperatura: 180 °C, tiempo: 30 min) del que se obtiene un líquido rico en azúcares hemicelulósicos y una fracción sólida que será deslignificada aplicando un tratamiento enzimático y posteriormente un pasteado organosolv etanol-sosa.

Se ha concluido que las condiciones óptimas del tratamiento enzimático son, concentración de lacasa 18,5 U/g, concentración de siringaldehído 1,5 % y tiempo 60 min. permitiendo obtener un sólido fácilmente deslignificable y con escasa pérdida de rendimiento. El sólido resultante (autohidrólisis+enzimático+pasteado) presenta un contenido en glucano de 60,7 % y 10,7 % de lignina, composición adecuada para la fabricación de hojas de papel.

Los tratamientos previos aplicados permiten que la deslignificación pueda llevarse a cabo utilizando menos reactivos químicos, temperaturas y tiempo de reacción más bajos comparados con los procesos convencionales, lo que supone una ventaja económica y medioambiental.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de la Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (número de proyecto RNM 2323 y subvención FPI) y el Ministerio de Economía y Competitividad. Programa nacional de investigación dirigido a los desafíos de la sociedad, CTQ2017-85251-C2-1 y 2-R.

BIBLIOGRAFÍA

Alfaro, A.; Ribera, A.; Pérez, A.; Yáñez, R.; García, J.C.; López, F. 2009. Integral valorization of two legumes by autohydrolysis and organosolv delignification. *Bioresour Technol* 100(1): 440-445. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.003>.

Alfaro, A.; Garrote, G.; García, M.M.; López, F.; Díaz, M.J. 2007. Valorización integral del tagasaste (*Chamaecytisus proliferus* L.F. ssp *palmensis* mediante pretratamiento hidrotérmico y pastado con etanol. *Afinidad* 64(530): 486-494. <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2714620>>.

Alfaro, A.; López, F.; Pérez, A.; García, J.C.; Rodríguez, A. 2010. Integral valorization of tagasaste (*Chamaecytisus proliferus*) under hydrothermal and pulp processing. *Bioresour Technol* 101(19): 7635-7640. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.059>.

Anil, K.M.; Amith, A.; Kiran, K.M.; Rajeev K.S. 2018. Lignocellulosic biorefinery wastes, or resources? In: *Waste biorefinery. Potential and perspectives*. Chapter 9: 267-297. Elsevier. Amsterdam, Netherlands.

Anjos, O.; Santos, A.; Simões, R. 2004. Influence of hemicelluloses content on the paper quality produced with *Eucalyptus globulus* fibres. In: *Proceedings of Progress in Paper Physics Seminar, Trondheim, Norway*, p. 50-52.

Aravamuthan, R.; Chen, W.; Zargarian, K.; April, G. 1989. Chemicals from wood: prehydrolysis organosolv methods. *Biomass* 20(3-4): 263-276. [http://dx.doi.org/10.1016/0144-4565\(89\)90066-8](http://dx.doi.org/10.1016/0144-4565(89)90066-8).

Boucher, J.; Chirat, C.; Lachenal, D. 2014. Extraction of hemicelluloses from wood in a pulp biorefinery, and subsequent fermentation into ethanol. *Energ Convers Manage* 88: 1120-1126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2014.05.104>.

BREF. 2006. Documento de Referencia de las Mejores Técnicas Disponibles en la Industria de la Pasta y el Papel, Centro de publicaciones. Secretaría General Técnica. Ministerio de Medio Ambiente. España. <[http://www.prtr-es.es/data/images/BREF%20Pasta%20y%20Papel%20\(versi%C3%B3n%20en%20castellano\)-7C4A350C484D6A0E.pdf](http://www.prtr-es.es/data/images/BREF%20Pasta%20y%20Papel%20(versi%C3%B3n%20en%20castellano)-7C4A350C484D6A0E.pdf)>.

Caparrós, S.; Díaz, M.J.; Ariza, J.; López, F.; Jiménez, L. 2008. New perspectives for *Paulownia fortunei* L. valorisation of the autohydrolysis and pulping processes. *Bioresour Technol* 99(4): 741-749. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.028>.

Cebreiros, F.; Guigou, M.D.; Cabrera, M.N. 2017. Integrated forest biorefineries: recovery of acetic acid as a by-product from eucalyptus wood hemicellulosic hydrolysates by solvent extraction. *Ind Crop Prod* 109: 101-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.012>.

Cherubini, F. 2010. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energ Convers Manage* 51(7): 1412-1421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>.

Duarte, G.V.; Ramarao, B.V.; Amindon, T.E.; Ferreira, P.T. 2011. Effect of hot water extraction on hardwood kraft pulp fibers (*Acer saccharum*, sugar maple). *Ind Eng Chem Res* 50(17): 9949-9959. <http://dx.doi.org/10.1021/ie200639u>.

Demirbas, M.F. 2009. Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review. *Appl Energ* 8(1): 151-161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.04.043>.

Feria, M.J.; López, F.; García, J.C.; Pérez, A.; Zamudio, M.A.M.; Alfaro, A. 2011. Valorization of *Leucanea leucocephala* for energy and chemicals from autohydrolysis. *Biomass Bioenerg* 35(5): 2224-2233. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.038>.

García, A.; Egües, I.; Toledano, N.; González, M.; Serrano, L.; Labidi, J. 2009. Biorefining of ligno-cellulosic residues using ethanol organosolv process. *Chem Eng Trans* 18: 911-916. <https://doi.org/10.3303/CET0918149>.

García, J.C.; Zamudio, M.A.M.; Pérez, A.; De Alva, H.E.; López, F. 2011. Paulownia as a raw material for the production of pulp by soda-anthraquinone cooking with or without previous autohydrolysis. *J Chem Technol Biotechnol* 86(4): 608-615. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.2563>.

García, J.C.; Zamudio, M.A.M.; Pérez, A.; López, F.; Colodete, J.L. 2010. Search for optimum conditions of Paulownia autohydrolysis process and influence in pulping process. *Environ Prog Sustain* 30(1): 92-101. <http://dx.doi.org/10.1002/ep.10442>.

García-Domínguez, M.T.; García-Domínguez, J.C.; López, F.; de Diego, C.M.; Díaz, M.J. 2015. Maximizing furfural concentration from wheat straw and *Eucalyptus globulus* by non-isothermal autohydrolysis. *Environ Prog Sustain* 34(4): 1236-1242. <https://doi.org/10.1002/ep.12099>.

Garrote, G.; Eugenio, M.E.; Díaz, M.J.; Ariza, J.; López, F. 2003. Hydrothermal and pulp processing of *Eucalyptus*. *Bioresour Technol* 88(1): 61-68. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00256-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00256-0).

Garrote, G.; Kabel, M.A.; Schols, H.A.; Falqué, E.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. 2007. Effects of *Eucalyptus globulus* wood autohydrolysis conditions on the reaction products. *J Agr Food Chem* 55(22): 9006-9013. <https://doi.org/10.1021/jf0719510>.

Hamzeh, Y.; Ashori, A.; Khorasani, Z.; Abdulkhani, A.; Abyaz, A. 2013. Pre-extraction of hemicelluloses from bagasse fibers: effects of dry-strength additives on paper properties. *Ind Crop Prod* 43: 365-371. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.047>.

Heiningen, A.V. 2007. Converting a kraft pulp mill into an integrated forest products biorefinery. *Pulp Pap-Canada* 107(6): 38-43. <<https://pdfs.semanticscholar.org/90aa/eb6b5b7e46824c3cc465b2ccd1aee86d955e.pdf>>.

Hu, G.; Fu, S.; Liunaki, H. 2013. Hemicellulose in pulp affects paper properties and printability. *Appita J* 66(2): 139-144. <<https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=371599901817158;res=IELNZC>>.

Loaiza, J.M.; Alfaro, A.; López, F.; García, M.T.; García, J.C. 2019. Optimization of Laccase/Mediator System (LMS) stage applied in fractionation of *Eucalyptus globulus*. *Polymers* 11(4): 731. <http://dx.doi.org/10.3390/polym11040731>.

Loaiza, J.M.; López, F.; García, M.T.; Fernández, O.; Díaz, M.J.; García, J.C. 2016. Selecting the pre-hydrolysis conditions for *Eucalyptus* wood in a fractional exploitation biorefining scheme. *J Wood Chem Technol* 36(3): 211-223. <http://dx.doi.org/10.1080/02773813.2015.1112402>.

López, F.; García, M.T.; Mena, V.; Loaiza, J.M.; Zamudio, M.A.M.; García, J.C. 2015. Can acceptable pulp be obtained from *Eucalyptus globulus* wood chips after hemicellulose extraction? *BioResources* 10(1): 55-67. <http://dx.doi.org/10.15376/biores.10.1.55-67>.

Marinova, M.; Mateos-Espejel, E.; Jemaa, N.; Paris, J. 2009. Addressing the increased energy demand of a kraft mill biorefinery: the hemicellulose extraction case. *Chem Eng Res Des* 87(9): 1269-1275. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2009.04.017>.

Martín-Sampedro, R.; Eugenio, M.E.; Moreno, J.A.; Revilla, E.; Villar, J.C. 2014. Integration of a kraft pulping mill into a forest biorefinery: Pre-extraction of hemicellulose by steam explosion versus steam treatment. *Bioresour Technol* 153: 236-244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.088>.

Martín-Sampedro, R.; Eugenio, M.E.; Carbajo, J.M.; Villar, J.C. 2011. Combination of steam explosion and laccase-mediator treatments prior to *Eucalyptus globulus* kraft pulping. *Bioresour Technol* 102(14): 7183-7189. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.053>.

Mayer, A.M.; Staples, R.C. 2002. Laccase: New functions for an old enzymes. *Phytochemistry* 60(6): 551-565. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00171-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00171-1).

Molin, U.; Teder, A. 2002. Importance of cellulose/hemicellulose-ratio for pulp strength. *Nord Pulp Pap Res J* 17(1): 14-19a. <http://dx.doi.org/10.3183/npprj-2002-17-01-p014-019>.

Moshkelani, M.; Marinova, M.; Perrier, M.; Paris, J. 2013. The forest biorefinery and its implementation in the pulp and paper industry: energy overview. *Appl Therm Eng* 50(2): 1427-1436. <http://dx.doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2011.12.038>.

Núñez, C.E. 2008. Transformaciones de la madera durante el pulpado químico. (Relaciones madera-agua, impregnación, deslignificación). <<http://www.cenunez.com.ar/archivos/65-TransformacionesdelamaderaduranteelP.Q..pdf>>.

Papatheophanus, M.G.; Koullas, D.P.; Koukios, E.G. 1995. Alkaline pulping of prehydrolysed wheat-straw in aqueous-organic solvent systems at low-temperatures. *Cell Chem Technol* 29(1): 29-40. <https://serials.unibo.it/cgi-ser/start/en/spogli/df-s.tcl?prog_art=3130307&language=ENGLISH&view=articoli>.

Rafione, T.; Marinova, M.; Montastruc, L.; Paris, J. 2014. The green integrated forest biorefinery: an innovative concept for the pulp and paper mills. *Appl Therm Eng* 73(1): 74-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2014.07.039>.

Rico, A. 2010. Tratamientos enzimáticos con lacasas y mediadores naturales para la eliminación de lignina y lípidos presentes en pastas de celulosa. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS, CSIC), Sevilla, España. <<http://digital.csic.es/bitstream/10261/66258/1/Tratamientos%20enzim%C3%A1ticos%20con%20lacasas%20y%20mediadores.pdf>>.

Romaní, A.; Garrote, G.; López, F.; Parajó, J.C. 2011. *Eucalyptus globulus* wood fractionation by auto-hydrolysis and organosolv delignification. *Bioresour Technol* 102(10): 5896-5904. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.070>.

Scott, G.M.; Akhtar, M.; Swaney, R.E.; Houtman, C.J. 2002. Recent developments in biopulping technology at Madison, WI. In: *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: 8th Icbppi Meeting: 21 (Progress in Biotechnology)*. L. Viikari, R. Lantto (eds.). pp. 61-71.

StatSoft 2008. Statistica version 8. StatSoft Enterprise, Tulsa, USA. <<http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features>>.

Singh, P.; Sulaiman, O.; Hashim, R.; Rupani, P.F.; Peng, L.C. 2010. Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: a review. *Rev Environ Sci Bio* 9(2): 165-175. <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-010-9200-0>.

TAPPI. 1991. Acid-soluble Lignin in Wood and Pulp. TAPPI UM 250. TAPPI Press: Atlanta, GA, USA.

TAPPI. 1999. Kappa number of pulp. TAPPI T236 om-99. TAPPI Press: Atlanta, GA, USA.

TAPPI. 2002. Ash in wood, pulp, paper, and paperboard: Combustion at 525 °C. TAPPI T 211 om-02. TAPPI Press: Atlanta, GA, USA.

TAPPI. 2002. One percent sodium hydroxide solubility of wood and pulp. TAPPI T212 om-02. TAPPI Press: Atlanta, GA, USA.

TAPPI. 2002. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. TAPPI T 222 om-02. TAPPI Press: Atlanta, GA, USA.

TAPPI. 2007. Solvent extractives of wood and pulp. TAPPI T204 cm-07. TAPPI Press: Atlanta, GA, USA.

TAPPI. 2007. Preparation of Wood for Chemical Analysis. TAPPI 264 cm-07. TAPPI Press: Atlanta, GA, USA.

TAPPI. 2019. Viscosity of pulp (capillary viscometer method). TAPPI T230 om-19: TAPPI Press: Atlanta,

GA, USA.

Tuero-Cruz, A.; Monte-Lara, M.C.; Tijero-Miguel, J.; Moral-Rama, A.; Perez-Ot Ildefonso; De La Torre-Molina, M.J. 2011. Procedimiento para la cocción kraft de material lignocelulósico con lejías alcalinas de baja sulfidez en la fabricación de pasta con incorporación directa al digestor de la sal disódica del dihidroxiantraceno. Patente: ES 2 393 596 B2 <<https://patents.google.com/patent/WO2012168513A1/es>>.

Towers, M.; Browne, T.; Kerekes, R.; Paris, J.; Tran, H. 2007. Biorefinery opportunities for the Canadian pulp and paper industry. *Pulp Pap-Canada* 108(6): 26-29. <<https://pdfs.semanticscholar.org/32e8/4b-2f1abccb93629d37be963e9af7a58793e5.pdf>>.

Vila, C.; Romero, J.; Francisco, J.L.; Santos, V.; Parajó, J.C. 2012. On the recovery of hemicellulose before kraft pulping. *BioResources* 7(3): 4179-4189. <<https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/on-the-recovery-of-hemicellulose-before-kraft-pulping/>>.

Villar, J.C. 2008. Pasteado kraft. II Curso internacional en tecnología de productos forestales. Módulo de celulosa y papel. INIA: Madrid, España. <www.inia.es/gcontrec/pub/6_Kraft_1227267134593.pps>.

Widsten, P.; Kandelbauer, A. 2008. Laccase applications in the Forest products industry. A review. *Enzyme Microb Technol* 42(4): 293-307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.12.003>.

Yuan, Z.; Kapu, N.S.; Beatson, R.; Chang, X.F.; Martínez, D.M. 2016. Effect of alkaline pre-extraction of hemicelloses and silica on kraft pulping of bamboo (*Neosinocalamus affinis* Keng). *Ind Crop Prod* 91: 66-67. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.019>.

Zamudio, M.A.M.; Alfaro, A.; De Alva, H.E.; García, J.C.; García, M.; López, F. 2015. Biorefinery of paulownia by autohydrolysis and soda-anthraquinone delignification process. Characterization and application of lignin. *J Chem Technol Biotechnol* 90(3): 534-542. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.4345>.