



Universidad de Valladolid

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TECNOLOGÍA DEL MEDIO
AMBIENTE**

TESIS DOCTORAL:

**PRETRATAMIENTO DE EXTRUSIÓN REACTIVA
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR
DE PAJA DE CEBADA**

Presentada por Aleta Duque García para optar al grado de
doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Paloma Manzanares Secades

Tutora académica:

M^a Teresa García Cubero

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Secretaría

La presente tesis doctoral queda registrada en el folio número _____
del correspondiente libro de registro número _____

Valladolid, a _____ de _____ de 2015

Fdo: El encargado del registro

Paloma Manzanares Secades

Científico titular

Unidad de Biocarburantes

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas

Certifica que:

ALETA DUQUE GARCÍA ha realizado bajo su dirección el trabajo “Pretratamiento de extrusión reactiva para la producción de bioetanol a partir de paja de cebada”, en el Departamento de Biocarburantes de la División de Energías Renovables del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas. Este trabajo se enmarca dentro del programa de Doctorado en Ingeniería Industrial, impartido por el Departamento de Ingeniería de Sistemas y Automática de la Universidad de Valladolid. Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos para ser presentado como Tesis Doctoral, expresa su conformidad con dicha presentación.

Valladolid, a _____ de _____ de 2015

Fdo: Paloma Manzanares Secades

Reunido el tribunal que ha juzgado la Tesis Doctoral: “Pretratamiento de extrusión reactiva para la producción de bioetanol a partir de paja de cebada” presentada por la Ingeniera Química Aleta Duque García, y en cumplimiento de lo establecido por el Real Decreto 99/2011 de 28 de enero de 2011 acuerda conceder por _____ la calificación de _____.

Valladolid, a _____ de _____ de _____

PRESIDENTE

SECRETARIO

1^{er} VOCAL

2^o VOCAL

3^{er} VOCAL

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Mercedes Ballesteros y a mi directora de tesis, la Dra. Paloma Manzanares, su confianza en mí y en este trabajo. Especialmente a la Dra. Paloma Manzanares le agradezco su incansable ayuda y su voluntad continua de mejorar el trabajo, sólo ella sabe el esfuerzo que esta tesis ha supuesto y espero que esté orgullosa del resultado. Gracias también a todo el personal de la Unidad de Biocarburantes del Ciemat, especialmente a los técnicos que me han acompañado en el extrusor, por crear un buen ambiente para aprender y trabajar.

Mi agradecimiento también para mi tutora en la UVA, la Dra. M^a Teresa García, por su apoyo desde el primer momento, su disponibilidad y su orientación.

Por último, gracias muy especiales a mis padres, Alberto y Raquel, a mi hermano, Rodrigo, y a mi pareja, Bruno, por aguantarme todo el tiempo y motivarme cuando era necesario. El esfuerzo ha sido conjunto.

RESUMEN

Este trabajo se enmarca en el desarrollo de procesos biológicos para la producción de bioetanol como combustible alternativo a partir de biomasa lignocelulósica, concretamente de paja de cebada. El estudio se centra en la etapa de pretratamiento de la biomasa y tiene como objetivo estudiar la aplicación de un tratamiento prometedor basado en un proceso termo-mecánico, que puede suponer una alternativa viable a otros pretratamientos convencionales y un avance en lo que se refiere a la integración de las distintas etapas del proceso de producción de etanol. Así, a lo largo de los diferentes capítulos de este trabajo se desarrolla un pretratamiento de extrusión con agentes químicos y biológicos de la paja de cebada, desde las etapas iniciales de puesta punto del equipo y selección de rangos de operación, hasta la máxima integración que supone la introducción de enzimas dentro del extrusor, pasando por la definición, evaluación y optimización de diferentes configuraciones intermedias del proceso. La efectividad del pretratamiento de extrusión en las diferentes estrategias estudiadas se evalúa determinando la producción de azúcares a partir de los sustratos de paja de cebada extrusada, en ensayos de laboratorio de hidrólisis enzimática (HE) con enzimas comerciales. Igualmente, se evalúa el potencial de producción de etanol en estos sustratos mediante ensayos de licuefacción más sacarificación y fermentación simultáneas (LSFS) con el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*.

En una primera fase de la investigación se definió un proceso de extrusión con NaOH, filtración dentro del extrusor y una etapa posterior de lavado para la neutralización del sustrato pretratado. Los sustratos extrusados producidos en esta configuración presentaban un mayor contenido en carbohidratos y una digestibilidad enzimática mejorada respecto de la paja de cebada sin tratar. En esta configuración se optimizaron las variables de operación, temperatura (T) y relación de NaOH a biomasa de paja de cebada (%p/p, R), siguiendo un diseño de experimentos factorial 2^3 , con el fin de maximizar el rendimiento de hidrólisis enzimática (RHE) en base a la glucosa. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de HE con enzimas comerciales (Cellic CTec1 + Cellic HTec1, proporción 9:1 en base al contenido en proteínas, adición de 10 mg prot/g extusado) a 50°C durante 72h, y se determinó la liberación de glucosa. El máximo rendimiento calculado tomando como base la glucosa potencial fue un 89% del teórico, en las condiciones óptimas de 68°C de temperatura y una relación R = 6%.

A continuación se sustituyó la etapa de lavado externa por una neutralización con H_3PO_4 diluido dentro el extrusor, evaluándose el efecto de incluir o no una etapa de filtración dentro del extrusor. Por una parte, se estudiaron los cambios producidos en la composición de la biomasa tras la extrusión en relación a la materia prima. Por otra parte, se estudió el potencial de producción de azúcares y etanol de los extrusados producidos en esta configuración a 68°C y 8%R, en ensayos de HE y LSFS a

distintas cargas de sólidos. Las enzimas utilizadas fueron Cellic CTec2 y Cellic HTec2, mezcladas en una proporción 9:1 en base al contenido en proteínas, y se añadieron 20 mg de proteína de la mezcla por cada gramo de extrusado seco. Los ensayos de HE se realizaron como se describió anteriormente y los de LSFS se llevaron a cabo mediante incubación del extrusado con las enzimas a 50°C durante 24h, tras las que se realizó la inoculación con *S. cerevisiae* (1 g/L) y se incubó durante 72h adicionales a 35°C. En esta configuración con neutralización integrada se alcanzaron RHE de glucano del 63% del teórico y de xilano del 60% del teórico a las 48h, en ensayos con una concentración de sólidos del 20% p/v. En estas mismas condiciones de carga de sólidos, la producción de etanol mediante LSFS dio como resultado una concentración de 25 g/L de etanol.

Esta configuración se ensayó satisfactoriamente en una planta piloto de capacidad máxima 100 kg/h de biomasa, si bien al pasar a una escala mayor se produjeron algunos cambios en el balance de materia del proceso.

En una última etapa de desarrollo del pretratamiento, se propuso una configuración en la que, tras la extrusión alcalina y posterior neutralización, se llevó a cabo en el material extrusado una extrusión con el cóctel de enzimas comerciales Cellic CTec2 suplementado con Cellic HTec 2 (carga de enzimas añadida 40 mg prot/ g extrusado seco). Los materiales producidos (bioextrusados) resultaron tener una fracción soluble incrementada respecto de los extrusados alcalinos neutralizados y presentaron una alta capacidad de producción de azúcares, principalmente en forma de oligómeros. Se estudió la producción de azúcares por incubación de estos sustratos a 50°C durante 72h y la producción de etanol mediante ensayos de LSFS, a diferentes cargas de sólidos, siendo la mejor opción una carga del 20% p/v de sólidos. En estas condiciones, los mejores resultados fueron 38 g glucosa total y 18 g xilosa total/100 g bioextrusado seco (producción en monómeros y oligómeros) a las 24h de incubación, y 30 g/L de etanol a las 72h tras la inoculación. De cara a futuros estudios queda pendiente el diseño de una mezcla enzimática específica que consiga aumentar el rendimiento de producción de azúcares monoméricos de los bioextrusados, mediante la adición de enzimas accesorias.

Por último, se llevó a cabo la simulación de una planta de producción de bioetanol cuyo planteamiento incluye una etapa de pretratamiento por bioextrusión de paja de cebada, una etapa de producción de azúcares y fermentación de los mismos mediante LSFS, y una etapa de separación y recuperación del bioetanol mediante un tren de destilación y una deshidratación por tamices moleculares. Como alternativa para el uso de las corrientes residuales, éstas se aprovecharon para la producción de energía, bien por combustión (residuo sólido) o por digestión anaerobia (aguas residuales). Se estableció un caso base utilizando los resultados experimentales del trabajo realizado y, con fines comparativos, se contemplaron cuatro escenarios alternativos: i) aumento de la capacidad de la planta, ii) co-fermentación de glucosa y

xilosa con *Zymomonas mobilis*, iii) aumento de la carga de sólidos en la LSFS, y iv) combinación de los dos casos anteriores. En general, los resultados de la simulación del caso base y los distintos escenarios analizados están dentro del rango de otros procesos descritos en la bibliografía, que emplean diferentes pretratamientos, en cuanto al balance de materia (producción de etanol del caso base 199 L/t biomasa). Estos resultados indican que el proceso es potencialmente escalable, si bien el área de energía y consumo de agua deben ser optimizados para poder asegurar su viabilidad.

ABSTRACT

This work belongs to the field of the development of biological processes for the production of the alternative fuel bioethanol, produced from lignocellulosic biomass, in particular, barley straw. The thesis focuses on the biomass pretreatment step, with the objective of studying the application of a promising thermo-mechanical based treatment. This pretreatment (extrusion) is thought to be able to constitute an alternative to conventional pretreatments and represents an advance in the integration of the different steps comprised within the ethanol production process. Throughout the different chapters of this thesis, an extrusion pretreatment combined with chemical and biological catalysts is developed. The research work comprises all the steps from the early stages of setting up and selection of operating ranges, to the maximum integration level provided by the introduction of enzymes into the extruder, including the definition, evaluation and optimization of different intermediate process configurations. The effectiveness of the extrusion pretreatment was evaluated by the determination of sugar production from the extruded barley straw (extrudate), submitted to enzymatic hydrolysis (EH) laboratory assays with commercial enzymes. Likewise, the ethanol production potential of extrudates was determined by liquefaction plus simultaneous saccharification and fermentation (LSSF) assays with *Saccharomyces cerevisiae*.

In the first stage of the research, a process was defined, comprising NaOH extrusion, filtration inside the extruder, and subsequent washing step for the neutralization of the pretreated substrate. The extrudates produced in this configuration had an increased concentration in carbohydrates and presented an enhanced enzymatic digestibility compared to the raw barley straw. In this configuration, the operation variables, temperature (T) and ratio of NaOH to raw barley straw (% p/p, R), were optimized following a factorial experiment design 2^3 , aimed at the maximization of the enzymatic hydrolysis yield (EHY) based on potential glucose. In order to achieve this, EH experiments with commercial enzymes (Cellic CTec1 + Cellic HTec1, 9:1 ratio in protein content, addition of 10 mg prot/g extrudate) were carried out at 50°C for 72h. The liberation of sugars in such experiments was determined. The maximum glucose yield was 89% of theoretical, at the optimal conditions (temperature 68°C and R = 6%).

After this, the external washing step was replaced by a neutralization step with diluted H_3PO_4 inside the extruder. The effect of including or not a filtration step inside the extruder was evaluated. On the one hand, changes on the composition of extrudates compared to the raw biomass were studied. On the other hand, the sugar and ethanol production potential of the extrudates produced in this configuration at 68°C and 8%R were studied as well, by means of EH and LSSF assays carried out at different solids loads. The enzymes employed were Cellic CTec 2 plus Cellic HTec 2 in a

proportion 9:1 (based on protein content), and 20 mg prot/g extrudate were added to each experiment. The EH assays were carried out as described before and the LSSF experiments were done by incubating the extrudate with the enzymes at 50°C for 24h, after which the inoculation with *S. cerevisiae* (1 g/L) took place and the incubation proceeded for additional 72h at 35°C. In this configuration with neutralization inside the extruder, the EHY of glucan was 63% of the theoretical and the one of xylan was 60% of theoretical at 48h, being the solids load 20% p/v. At the same solids conditions, the extrudate was able to produce as much as 25 g/L ethanol.

The previous configuration was successfully proved in a pilot plant, with a maximum capacity of 100 kg/h biomass, although the scale-up of the process resulted in some changes in the mass balance of the process.

In the last step of the pretreatment development, a configuration was proposed in which, after the alkaline extrusion and neutralization, the resulting substrate was extruded with the enzymatic cocktail Cellic CTec2 plus Cellic HTec2 (enzyme load 40 mg prot/g dry extrudate). The produced materials (bioextrudates) had an increased soluble fraction over the alkaline and neutralized extrudates, and they presented a high sugar production capacity, mainly in oligomeric form. The sugar production of the bioextrudates was studied by their incubation at 50°C for 72h, and the ethanol production was evaluated by LSSF assays. Different solids loadings were considered, being the best option 20% p/v solids loading. In these conditions, the best results were 38 g glucose and 18 g xylose/100g dry bioextrudate (production of monomers and oligomers) at 24h incubation, and 30 g/L ethanol at 72h after inoculation. The design of a specific enzyme mixture that will be able to increase the monomeric sugar production yield on bioextrudates, by means of the addition of accessory enzymes, could be the subject of future studies.

Finally, the simulation of a bioethanol production plant was carried out. The concept includes the pretreatment of barley straw by bioextrusion, the production of sugars and their fermentation by LSSF, and a bioethanol separation and recovery step by distillation coupled to molecular sieves. As alternative for the use of waste currents, they were utilized for the production of energy, whether by combustion of the solid residue or anaerobic digestion of the waste water. A base case was set, using the experimental results of the work and, for comparison purposes, four additional alternative scenarios were considered: i) increase in the plant capacity, ii) co-fermentation of glucose and xylose by *Zymomonas mobilis*, iii) increase of the solids loading in the LSSF, and iv) a combination of the last two cases. In general, simulation results for the mass balance are in the range of values found in the literature, which use different pretreatments (base case ethanol production is 199 L/t biomass). These results indicate a good potential of the process for its scale-up; however the energy

and water consumption are issues that must be optimized, in order to be able to ensure the viability of the process.

Índice

Lista de abreviaturas	1
Lista de tablas	3
Lista de figuras	7
Introducción	13
1. Antecedentes	15
1.1. Biocarburantes: bioetanol	17
2. Estructura de la biomasa lignocelulósica	20
2.1. Celulosa.....	21
2.2. Hemicelulosas	22
2.3. Lignina.....	24
2.4. Otros componentes de la biomasa lignocelulósica	26
2.5. Estructura de la pared celular de las células vegetales.....	27
3. Residuos agrícolas como materia prima para la producción de bioetanol: paja de cebada	28
4. Proceso de producción de bioetanol de segunda generación.....	29
4.1. Pretratamiento	30
4.1.1. La extrusión	35
4.2. Hidrólisis enzimática	45
4.2.1. Enzimas.....	46
4.2.2. Factores que afectan a la hidrólisis enzimática	49
4.3. Fermentación.....	50
4.4. Configuraciones del proceso de hidrólisis enzimática y fermentación	52

4.5. Recuperación y purificación del etanol	55
5. Bibliografía	58
Objetivo e interés del tema	71
Capítulo I: Materia prima y puesta a punto del equipo de extrusión	77
1. Introducción	79
2. Materia prima	79
2.1. Materiales y métodos	79
2.1.1. Material	79
2.1.2. Análisis de la materia prima	80
2.2. Resultados y discusión	82
2.2.1. Composición de la materia prima	82
3. Puesta a punto del equipo de extrusión	83
3.1. Equipo de extrusión	83
3.2. Calibración y puesta a punto del equipo de extrusión	85
3.2.1. Calibración de la alimentación y de las bombas	85
3.2.2. Parámetros de operación en el extrusor	87
4. Bibliografía	93
Capítulo II: Extrusión alcalina de paja de cebada	97
1. Introducción	99
2. Materiales y métodos	101
2.1. Ensayos de extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor	101
2.1.1. Diseño de experimentos	102
2.2. Ensayos de extrusión alcalina con neutralización integrada en el extrusor	103
2.2.1. Ensayos en planta piloto	105

2.3. Análisis de los materiales extrusados y del líquido de filtración.....	107
2.4. Hidrólisis enzimática de los extrusados.....	108
2.4.1. Ensayos de hidrólisis a altas cargas de sólidos.....	109
2.5. Experimentos de sacarificación y fermentación simultáneos.....	110
3. Resultados y discusión	111
3.1. Efecto de los parámetros de proceso de extrusión alcalina en la efectividad del pretratamiento.....	111
3.1.1. Extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor	111
3.1.2. Extrusión alcalina con neutralización dentro del extrusor.....	123
3.2. Evaluación de la producción de etanol en los extrusados alcalinos neutralizados	135
3.3. Balances de materia	138
3.3.1. Balance de materia del proceso de extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor	138
3.3.2. Balance de materia del proceso de extrusión alcalina con neutralización.....	140
3.3.3. Balance de materia del proceso de extrusión alcalina con neutralización en planta piloto	141
4. Conclusiones	142
5. Bibliografía	144
Capítulo III: Bioextrusión	149
1. Introducción	151
2. Materiales y métodos	152
2.1. Ensayos de bioextrusión	152
2.2. Caracterización del bioextrusado	153
2.2.1. Ensayos de granulometría.....	154

2.3. Producción de azúcares en el bioextrusado mediante incubación en diferentes condiciones	154
2.3.1. Ensayos en matraz.....	154
2.3.2. Ensayos en reactor de altas cargas de sólidos	155
2.3.3. Ensayos con suplementación de enzimas	156
2.4. Ensayos de sacarificación y fermentación simultáneos	157
3. Resultados y discusión	158
3.1. Características del bioextrusado	158
3.1.1. Composición del bioextrusado: fracción soluble e insoluble.....	158
3.1.2. Distribución de partículas en el bioextrusado	161
3.2. Estudio de la producción de azúcares en el bioextrusado	164
3.2.1. Ensayos en matraz.....	164
3.2.2. Ensayos en reactor de altas cargas de sólidos	169
3.2.3. Ensayos de producción de azúcares en bioextrusado con suplementación de enzimas	172
3.2.3.1. Adición de β -glucosidasa	172
3.2.3.2. Adición de β -xilosidasa	175
3.3. Producción de etanol en bioextrusados	178
3.3.1. Producción de etanol en el bioextrusado sin diluir	181
4. Conclusiones	183
5. Bibliografía	185
Capítulo IV: Balances de materia y energía	187
1. Introducción	189
2. Materiales y métodos	190
2.1. <i>Software</i> de simulación	190
2.2. Descripción del proceso: caso base	191

2.3. Análisis energético	196
2.4. Limitaciones de la simulación	196
2.5. Alternativas al caso base	197
3. Resultados y discusión	199
3.1. Caso base	199
3.1.1. Diagrama de flujo	199
3.1.2. Tabla de corrientes (BM)	203
3.1.3. Análisis energético	208
3.2. Evaluación de alternativas	211
3.2.1. Balance de energía	216
4. Conclusiones	219
5. Bibliografía	220

Anexos

Lista de abreviaturas

AFEX – *Ammonia fiber explosion*

ASE – *Automatic solvent extraction*

B1 – bioextrusado producido a partir del lote 1 de paja de cebada

B2 – bioextrusado producido a partir del lote 2 de paja de cebada

BE – balance de energía

BG – β -glucosidasa

BM – balance de materia

BPC – bioproceso consolidado

CBH – celobiohidrolasas

CEDER – Centro de Desarrollo de Energías Renovables

EAG – paja de cebada extrusada con agua

Ec. – Ecuación

EC – extrusado alcalino neutralizado completo

EF – extrusado alcalino neutralizado filtrado

EG – endoglucanasa

EP – sustrato extrusado producido en planta piloto

ETBE – etil-ter-butil-éter

FEP – líquido filtrado producido en la extrusión llevada a cabo en planta piloto

FI – fracción insoluble

FIB – fracción insoluble del bioextrusado

FPU – *Filter paper units* (unidad de medida de la actividad enzimática)

FS – fracción soluble

FSB – fracción soluble del bioextrusado

GEI – gases de efecto invernadero

HE – hidrólisis enzimática

HFS – hidrólisis y fermentación separadas

HMF – hidroxi-metil-furfural

HPLC – *High pressure liquid chromatography*

I+D – investigación y desarrollo

IDAE – Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía

INPT – *Institut National Polytechnique de Toulouse*

L/S – relación de flujo total de líquidos a sólidos en el extrusor

$(L/S)_r$ – relación de flujo de disolución de sosa a peso seco de paja de cebada en el extrusor

LAI – lignina ácido insoluble

LHW – *liquid hot water*

LSCFS – licuefacción más sacarificación y co-fermentación simultáneas

LSFS – licuefacción más sacarificación y fermentación simultáneas

MESH – *Mass, Equilibrium, Summation and Heat*

MP – materia prima

MTBE – metil-ter-butil-éter

NREL – *National Renewable Energy Laboratory*

p/p – peso/peso

p/v – peso/volumen

PC – paja de cebada sin tratar

R – relación entre la cantidad de álcali y de biomasa en el extrusor (g NaOH/100g biomasa seca)

RACS – reactor de altas cargas de sólidos

RHE – rendimiento de hidrólisis enzimática (% del teórico)

RTA – reactor de tanque agitado

SFS – sacarificación y fermentación simultáneas

T – temperatura de extrusión

tep – toneladas equivalentes de petróleo

UE – Unión Europea

Lista de tablas

Introducción

Tabla 1- Clasificación de los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica según el tipo de agente empleado (Tomás-Pejó <i>et al.</i> , 2011)	32
Tabla 2- Resumen de los parámetros de operación y efectos producidos en la biomasa lignocelulósica por el tratamiento de extrusión, descritos en la bibliografía	38-43

Capítulo I

Tabla 1.1- Composición de la paja de cebada de los lotes 1 y 2 en % de peso seco. Valores medios y desviación estándar de tres replicados	83
Tabla 1.2- Relaciones (L/S), alcanzadas en función de la concentración de la R seleccionada y la concentración de sosa en la disolución añadida al extrusor, para 100 y 150 rpm. En verde, valores seleccionados como factibles para una correcta operación del equipo	89
Tabla 1.3- Variables de operación analizadas y valores seleccionados	92

Capítulo II

Tabla 2.1- Condiciones experimentales para la extrusión alcalina de la paja de cebada de acuerdo con el diseño de experimentos factorial 2 ³ usado en este estudio.....	103
Tabla 2.2- Composición de la paja de cebada y de los extrusados (%ps) y contenido en azúcares hemicelulósicos de los filtrados (g/L) para diferentes temperaturas y relaciones NaOH/MS (%p/p), según los experimentos descritos en la Tabla 1. Los valores son la media de triplicados ± la desviación típica.....	112
Tabla 2.3- RHE basados en la glucosa y la xilosa liberadas por los extrusados con álcali, para diferentes temperaturas y relaciones de sosa, según el diseño de experimentos descrito en la Tabla 2. Se incluyen extrusado con agua (EAG) y paja de cebada sin extrusar (PC) como controles. Valores medios de triplicados ± desviación estándar.....	117
Tabla 2.4- Análisis de varianza para el modelo ajustado a la respuesta del rendimiento de hidrólisis de glucano.....	121

Tabla 2.5- Comparación entre la composición de los extrusados y los rendimientos de hidrólisis dados por el modelo matemático para las condiciones óptimas de 68°C y 6%R, y la media de un sustrato extrusado en dichas condiciones, por duplicado	122
Tabla 2.6- Producción de azúcares, ácido acético y compuestos de degradación (en g/100g MS) en el líquido filtrado durante la extrusión en las condiciones óptimas de 68°C y 6%R	123
Tabla 2.7- Composición (% peso seco) de la paja de cebada sin tratar (PC) y de los extrusados, según la configuración de proceso y la cantidad de NaOH añadida por peso seco de biomasa. EC- extrusado completo; EF- extrusado filtrado; 6, 8 y 10 (% R p/p)	124
Tabla 2.8- Concentración (g/L) de azúcares totales (glucosa y xilosa), ácido acético y fenoles en el filtrado (F) según la cantidad de NaOH añadida por peso seco de biomasa. F- extrusado filtrado. 6, 8 y 10% p/p	125
Tabla 2.9- Composición (% peso seco) de la paja de cebada sin tratar del lote 2 (PC2) y del extrusado en planta piloto (EP)	126
Tabla 2.10- Concentración (g/L) de azúcares (glucosa y xilosa), ácido acético y fenoles en el filtrado del extrusado en planta piloto (FEP)	126

Capítulo III

Tabla 3.1- Composición del sustrato completo y de las fracciones soluble e insoluble (FS, FI) del extrusado alcalino con neutralización (EF, 8% R, 68°C) y del bioextrusado B1 producido a partir de éste con 25 mg proteína/ sustrato	159
Tabla 3.2- Concentraciones de glucosa y xilosa, monoméricas y totales, (en g/L) a las 72h de incubación del bioextrusado B1	168
Tabla 3.3- Rendimientos de producción y concentraciones de azúcares (glucosa y xilosa) en monómeros y totales (monómeros y oligómeros) a 0, 24, 48 y 72h de incubación del bioextrusado B1 en reactor de alta carga de sólidos.....	170
Tabla 3.4- Rendimientos de producción de azúcares monoméricos y oligoméricos durante la bioextrusión y durante la etapa de licuefacción (en g glucosa o xilosa/100g bioextrusado seco) y rendimiento de LSFS (en % del etanol teórico), del bioextrusado B2 diluido al 20% (p/v) de sólidos	180
Tabla 3.5- Rendimientos de producción de azúcares monoméricos y oligoméricos durante la bioextrusión y durante la etapa de licuefacción (en g glucosa/xilosa/100g bioextrusado seco) y rendimiento de LSFS (en % del etanol teórico), del bioextrusado B2 sin diluir	182

Capítulo IV

Tabla 4.1- Datos de partida más importantes para realizar la simulación del caso base	195
Tabla 4.2- Tabla de corrientes con las especificaciones de las corrientes más importantes del caso base	204-205
Tabla 4.3- Balance energético del caso base para la producción de etanol lignocelulósico, referido a la energía consumida y producida en el proceso, clasificada según su tipo.....	209
Tabla 4.4- Modificaciones introducidas en la simulación de los casos alternativos respecto del caso base	211
Tabla 4.5- Resultados de los balances de materia para los diferentes casos de estudio alternativos planteados y comparación con el caso base.....	213
Tabla 4.6- Desglose del consumo energético por etapas y conceptos de los casos 2, 3 y 4 y comparación con el caso base	216
Tabla 4.7- Balance energético de los diferentes casos de estudio, referido a la energía consumida (valores negativos) y producida (valores positivos) en el proceso, clasificada según su tipo. Valores de recuperación de energía considerando el aporte energético de la biomasa.....	218

Lista de figuras

Introducción

Figura 1- Producción diaria de petróleo (millones de barriles) procedente de los diferentes yacimientos descubiertos hasta el año 2007. Datos históricos desde 1925 y predicción hasta 2045 (Robelius, 2007)	15
Figura 2- Evolución del consumo energético en Europa entre los años 2001 y 2011 según el tipo de combustible empleado para su producción (Mtep) (Eurostat, 2013)	16
Figura 3- Consumo de energía primaria en España según fuente energética (IDAE, 2011)	17
Figura 4- Esquema de la estructura de la lignocelulosa (Ritter, 2008)	20
Figura 5- Estructura de una cadena de celulosa (Liu y Sun, 2010).....	21
Figura 6- Estructura de la hemicelulosa de diferentes plantas (Scheller y Ulvskov, 2010). De arriba a abajo xiloglucano de guisantes y arabisopsis, β -(1-3,1-4)-glucano de Poales, glucoarabinooxilano de monocotiledonias, glucuronoxilano de dicotiledonias, galactomanano de semillas de leguminosas y galactoglucomanano de madrea de conífera. Se representan con distintos colores las unidades monoméricas constituyentes	23
Figura 7- Estructura de la hemicelulosa de paja de trigo (Ren y Sun, 2010).....	24
Figura 8- Alcoholes precursores de la lignina (monolignoles) y sus derivados (Lu y Ralph, 2010).....	25
Figura 9- Representación de la pared celular primaria de una célula vegetal (McCann y Roberts, 1991).....	28
Figura 10- Esquema básico del proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica por la ruta bioquímica.....	30
Figura 11- Representación de los tres tipos de elementos de tornillo usados en el EV 25. Entre paréntesis, tipo de efecto principal: T-transporte; M-mezcla; R-rozamiento	35
Figura 12- Esquema simplificado de un equipo de extrusión de doble husillo. A) Dosificador de biomasa, B) Motor, C) Carcasa con control térmico, D) Tornillos, E) Bombas periféricas para la adición de líquidos.....	36
Figura 13- Modelo propuesto para la hidrólisis enzimática de la celulosa (Horn <i>et al.</i> , 2012). EG = endoglucanasa; CBH = celobiohidrolasa; CDH = celobiosa-deshidrogenasa; CBM = módulo de unión a carbohidratos; CGH61 = monooxigenasa polimérica lítica (atacan a carbonos C1 o C4).....	48
Figura 14- Esquema de las diferentes configuraciones posibles de las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación dentro de la ruta bioquímica para la producción de bioetanol de segunda generación.....	53

Figura 15- Esquema tecnológico para la separación y deshidratación de etanol por adsorción usando tamices moleculares. 1. Fermentador. 2. Lavador de gases. 3. Precalentador. 4. Columna de concentración. 5. Columna de rectificación. 6,9. Intercambiadores de calor. 7. Tamices moleculares. 8. Tanque de regenerado. 10. Enfriador del producto	56
---	----

Capítulo I

Figura 1.1- Paja de cebada molida a 5 mm	79
Figura 1.2- Esquema de la primera fase del proceso analítico para la determinación de la composición de la paja de cebada: preparación de la muestra y análisis de extractos	80
Figura 1.3- Determinación de carbohidratos y lignina en la biomasa lignocelulósica extraída	82
Figura 1.4- Imagen del equipo de extrusión Evolum EV25 usado en Ciemat	84
Figura 1.5- Imagen de la sección final del perfil de los tornillos co-rotativos del extrusor EV 25	85
Figura 1.6- Flujo de biomasa de paja de cebada alimentado al equipo de extrusión en función de la capacidad del dosificador	86
Figura 1.7- Configuración 1 para la extrusión de paja de cebada en el extrusor de doble tornillo co-rotativo. En la figura se muestran los elementos de tornillo empleados (T-transporte, M-mezcla, R-rozamiento) y se señalan las entradas y salidas.....	87
Figura 1.8- Tiempo de residencia de la biomasa dentro del extrusor en función de la velocidad del tornillo.....	91

Capítulo II

Figura 2.1- Configuración 1 para la extrusión de paja de cebada en el extrusor de doble tornillo co-rotativo. En la figura se muestran los elementos de tornillo empleados y se señalan las entradas y salidas. T-transporte, M-mezcla, R-rozamiento (ver detalle en Figura 11, Introducción).....	101
Figura 2.2- Configuración 2 para la extrusión de paja de cebada con una etapa de neutralización y filtración dentro del extrusor. En la figura se muestran los elementos de tornillo empleados y se señalan las entradas y salidas. T-transporte, M-mezcla, R-rozamiento (ver detalle en Figura 11, Introducción)	104
Figura 2.3- Configuración 3 para la extrusión alcalina de paja de cebada con una etapa de neutralización. En la figura se muestran los elementos de tornillo empleados y se señalan las entradas y salidas. T-transporte, M-mezcla, R-rozamiento (ver detalle en Figura 11, Introducción)	104
Figura 2.4- Vistas lateral y frontal del extrusor HT53 de la planta piloto Agromat	105

Figura 2.5- Dosificador gravimétrico del extrusor HT53	106
Figura 2.6- Configuración para la extrusión alcalina con neutralización en el extrusor HT53 de la planta piloto Agromat	106
Figura 2.7- Gráfico de superficie respuesta (A) y gráfico de Pareto (B) del efecto de T y R sobre el contenido en glucano de los extrusados.....	115
Figura 2.8- Gráfico de superficie respuesta (A) y gráfico de Pareto (B) del efecto de T y R sobre el contenido en hemicelulosa de los extrusados	115
Figura 2.9- Gráfico de superficie respuesta (A) y gráfico de Pareto (B) del efecto de T y R sobre el contenido en lignina ácido insoluble de los extrusados.....	115
Figura 2.10- Gráfico de superficie respuesta (A) y gráfico de Pareto (B) del efecto de T y R sobre el rendimiento de hidrólisis enzimática de glucano en extrusados alcalinos con lavado fuera del extrusor	118
Figura 2.11- Gráfico de superficie respuesta (A) y gráfico de Pareto (B) del efecto de T y R sobre el rendimiento de hidrólisis enzimática de xilano en extrusados alcalinos con lavado fuera del extrusor	119
Figura 2.12- Digestibilidad enzimática a 24 y 48h de los extrusados EC y EF al 6, 8 y 10%R, tomando como referencia el RHE del glucano (A) y del xilano (B) (en % del teórico).....	127
Figura 2.13- Rendimiento de hidrólisis enzimática del glucano (en % del teórico) del extrusado filtrado a 8% R a 24, 48 y 72h, en ensayos de HE al 2,5, 5, 10, 15 y 20% (p/v) de carga de sólidos	131
Figura 2.14- Rendimiento de hidrólisis enzimática del xilano (en % del teórico) del extrusado filtrado a 8% R a 24, 48 y 72h, en ensayos de HE al 2,5, 5, 10, 15 y 20% (p/v) de carga de sólidos	131
Figura 2.15- Producción de glucosa (en g/100g extrusado seco) a 0, 24, 48 y 72h, al someter al extrusado EF, 8%R a ensayos de HE a 2,5, 5, 10, 15 y 20% (p/v). Barras uniformes – producción de monómeros. Barras rayadas – producción de oligómeros.....	133
Figura 2.16- Producción de xilosa (en g/100g extrusado seco) a 0, 24, 48 y 72h, al someter al extrusado EF, 8%R a ensayos de HE a 2,5, 5, 10, 15 y 20% (p/v). Barras uniformes – producción de monómeros. Barras rayadas – producción de oligómeros.....	133
Figura 2.17- Rendimiento de producción de etanol (en % del teórico) después de 48,72 y 96h de incubación del extrusado filtrado a 8% R, al someterlo a ensayos de LSFS al 2,5, 15 y 20% (p/v) de carga de sólidos.....	136
Figura 2.18- Balance de materia para 1 kg de paja de cebada pretratado por extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor.....	138
Figura 2.19- Balance de materia para 1 kg de paja de cebada pretratada por extrusión alcalina con neutralización dentro del extrusor	140

Figura 2.20- Balance de materia para 1 kg de paja de cebada pretratada por extrusión alcalina con neutralización, llevada a cabo en planta piloto	141
---	-----

Capítulo III

Figura 3.1- Configuración en dos pases, extrusión alcalina más neutralización seguida por bioextrusión, llevado a cabo en el EV25 del Ciemat.....	152
Figura 3.2- Reactor de alta carga de sólidos, modelo Terrafors-IS (InforsHT)	155
Figura 3.3- Reactores de tanque agitado y consola de control de pH y temperatura (Biostat B plus)	157
Figura 3.4- Distribución del tamaño de partícula (en mm) en la paja de cebada sin tratar, en el extrusado alcalino neutralizado y en el bioextrusado B1	161
Figura 3.5- Aspecto físico de la paja de cebada sin tratar (A), el extrusado alcalino neutralizado (B) y el bioextrusado (C).....	163
Figura 3.6- Rendimiento de producción de glucosa a 0, 24, 48 y 72h (en g/100 g de peso seco) de incubación del bioextrusado B1 a 50°C, a diferentes cargas de sólidos: 2,5, 5, 10, 15 y 20% p/v. Columnas de color uniforme – producción de monómeros. Columnas rayadas – producción de oligómeros.....	165
Figura 3.7- Rendimiento de producción de xilosa a 0, 24, 48 y 72h (en g/100 g peso seco) de incubación del bioextrusado B1 a 50°C, a diferentes cargas de sólidos: 2,5, 5, 10, 15 y 20% p/v. Columnas de color uniforme – producción de monómeros. Columnas rayadas – producción de oligómeros.....	166
Figura 3.8- Rendimiento de producción de glucosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de Novozyme-188, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos. Columnas uniformes – glucosa monomérica. Columnas rayadas – glucosa oligomérica.....	173
Figura 3.9- Rendimiento de producción de xilosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de Novozyme-188, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos. Columnas uniformes – xilosa monomérica. Columnas rayadas – xilosa oligomérica	173
Figura 3.10- Rendimiento de producción de xilosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de β -xilosidasa, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos y 40°C. Columnas uniformes – xilosa monomérica. Columnas rayadas – xilosa oligomérica	175
Figura 3.11- Rendimiento de producción de glucosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de β -xilosidasa, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos y 40°C. Columnas uniformes – glucosa monomérica. Columnas rayadas – glucosa oligomérica	176

Figura 3.12- Rendimiento de producción de xilosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de β -xilosidasa, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos y 50°C. Columnas uniformes – xilosa monomérica. Columnas rayadas – xilosa oligomérica	177
Figura 3.13- Rendimiento de producción de glucosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de β -xilosidasa, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos y 50°C. Columnas uniformes – glucosa monomérica. Columnas rayadas – glucosa oligomérica	177
Figura 3.14- Concentraciones de glucosa, xilosa y etanol (en g/L) a lo largo del ensayo de LSFS en bioextrusado B2 diluido al 20% (p/v) de sólidos	179
Figura 3.15- Concentraciones de glucosa, xilosa y etanol (en g/L) a lo largo del ensayo de LSFS en bioextrusado B2 sin diluir	181

Capítulo IV

Figura 4.1- Diagrama de flujo simplificado del proceso de producción de bioetanol a partir de paja de cebada con pretratamiento por extrusión reactiva	192
Figura 4.2- Diagrama de bloques del proceso de producción de bioetanol a partir de paja de cebada, caso base.....	199
Figura 4.3- Diagrama de flujo simplificado del pretratamiento por extrusión reactiva de la paja de cebada.....	200
Figura 4.4- Diagrama de flujo simplificado de la etapa de licuefacción y sacarificación y fermentación simultáneas.....	201
Figura 4.5- Diagrama de flujo simplificado de la etapa de separación y recuperación de bioetanol	202
Figura 4.6- Diagrama de flujo parcial de la zona de separación para el caso 4, incluyendo venteo antes de la destilación.....	212

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

El panorama energético de principios de este siglo viene marcado por un aumento sostenido del precio del petróleo ligado, a su vez, al progresivo agotamiento de las reservas más fácilmente accesibles (Figura 1), así como por una preocupación social hacia las emisiones de carbono y de gases de efecto invernadero derivados del elevado consumo de combustibles fósiles y su marcada influencia en el cambio climático. Como respuesta a estas problemáticas, la producción energética se ha diversificado con el apoyo de diferentes iniciativas políticas, apostando fuertemente por las energías renovables.

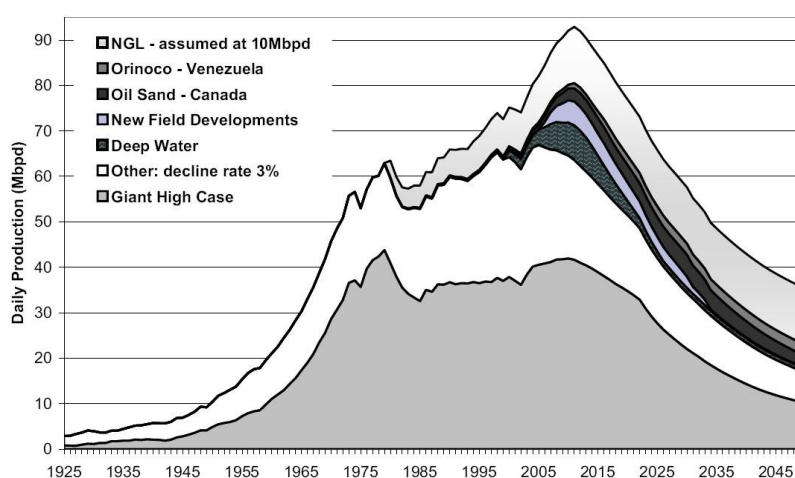


Figura 1- Producción diaria de petróleo (millones de barriles) procedente de los diferentes yacimientos descubiertos hasta el año 2007. Datos históricos desde 1925 y predicción hasta 2045 (Robelius, 2007).

En la Unión Europea, la situación se ve agravada por la alta dependencia energética que sufre en base a importaciones de otros países de fuera de la Unión. En 2011, un 53,8% de la energía consumida en la UE-28 era importada, dato que ascendió hasta el 76,4% en el caso de España (Eurostat, 2013). Si se refiere solamente al petróleo consumido, casi todo proviene de fuera de la Unión Europea (un 84,9% en el total de la UE-28 y un 99,8% en España). En este contexto, el uso de energías renovables ha aumentado constantemente desde el año 2001 en Europa y en España, aunque el crecimiento se ha ralentizado en los últimos años, debido a la situación de crisis económica actual. La aportación del total de las energías renovables al consumo energético en Europa en 2011 llegó hasta 170 Mtep, lo que supone un crecimiento de un 69% respecto a 2001 y la quinta posición como fuente de consumo de energía primaria (Eurostat, 2013). Debido a que el consumo total de energía en la UE se ha mantenido en niveles similares a lo largo de la última década (decreció ligeramente, un 4%, entre 2001 y 2011), el aumento del consumo de energías renovables se tradujo en

una disminución de la contribución del petróleo y el carbón, principalmente (Figura 2). En España, como se puede ver en la Figura 3, la contribución de las energías renovables al total de energía primaria consumida en el año 2010, alcanzó un 11,4%, quedando en cuarta posición, por detrás del petróleo, el gas natural y la energía nuclear (IDAE, 2011).

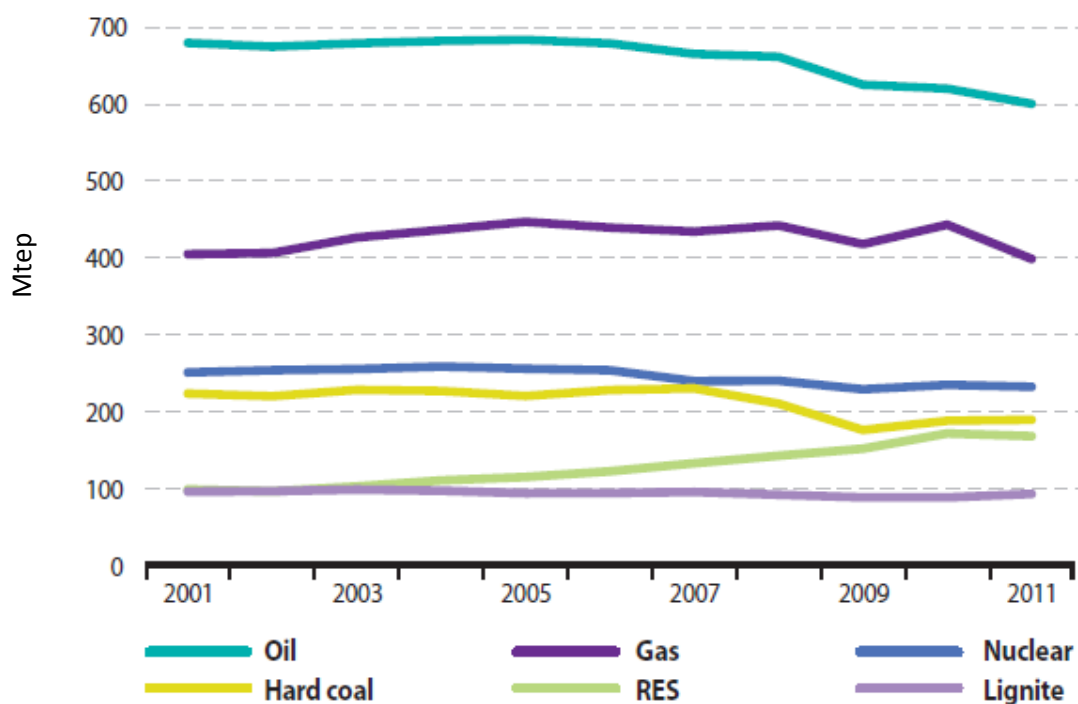


Figura 2- Evolución del consumo energético en Europa entre los años 2001 y 2011 según el tipo de combustible empleado para su producción (Mtep) (Eurostat, 2013).

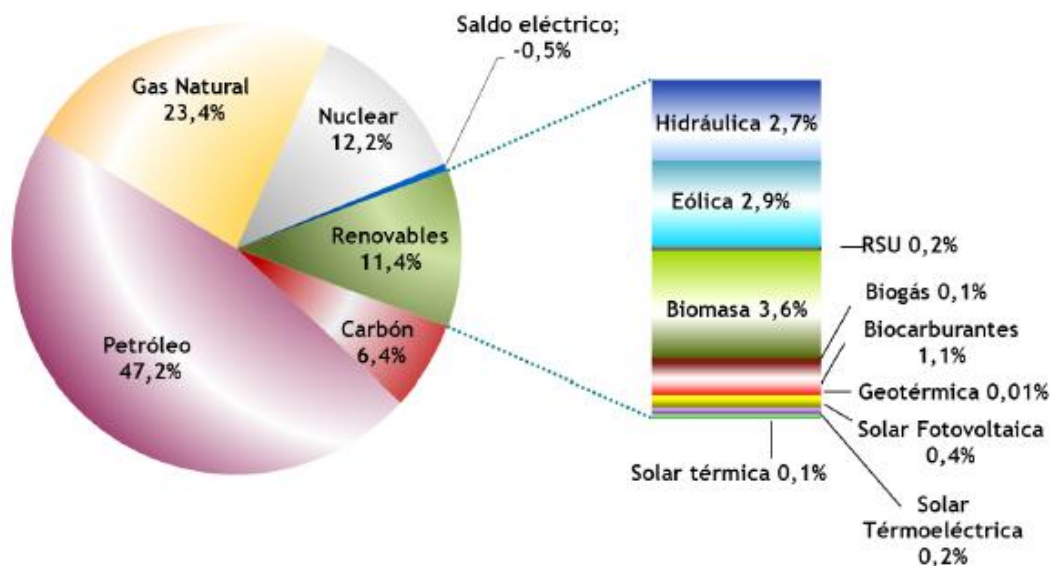


Figura 3- Consumo de energía primaria en España según fuente energética (IDAE, 2011).

Desde el punto de vista de la producción energética, las energías renovables en España y en la UE han crecido de forma acorde a su demanda, posicionándose como la segunda fuente de producción de energía primaria en ambos casos, por detrás de la nuclear, y alcanzando en 2011 un 20% de la producción en Europa y hasta un 44% de la producción energética española (Eurostat, 2013).

Analizando el consumo energético por sectores, sin duda es el sector del transporte y, dentro de éste, el transporte por carretera, el de mayor demanda energética, suponiendo un 27% y un 33% del consumo total de energía en Europa y en España, respectivamente, con datos de 2011 (Eurostat, 2013). Una gran parte de esta energía se basa en combustibles fósiles, lo que a su vez constituye un gran foco de emisiones de CO₂ y una relevante contribución a la dependencia energética de Europa. Esta necesidad crea un nicho de mercado para un tipo de combustible que sea limpio, barato y de producción propia.

1.1. Biocarburantes: bioetanol

Los combustibles de origen agrícola o biocombustibles se contemplan como una clara alternativa frente a la utilización de combustibles fósiles (Bai *et al.*, 2008). Los biocombustibles se definen como aquellos combustibles y aditivos a los combustibles derivados en su totalidad, o en parte, de biomasa. Actualmente, la biomasa constituye la única fuente de energía renovable capaz de ofrecer una alternativa real y factible a la utilización de combustibles de origen fósil en el sector transporte. Según la

definición de la Unión Europea, se entiende por biomasa “la fracción biodegradable de los productos, desechos y residuos de origen biológico procedentes de actividades agrarias (incluidas las sustancias de origen vegetal y de origen animal), de la silvicultura y de las industrias conexas, incluidas la pesca y la acuicultura, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y municipales” (Directiva 2009/28/EC, del 23 de abril de 2009). Atendiendo a esta definición, existe una gran variedad de sustratos de tipo biomásico para su utilización como materia prima para la obtención de distintos tipos de biocombustibles, lo que añade valor a su utilización como recurso energético en el panorama actual.

Se establece una distinción entre biocombustibles sólidos destinados principalmente a generar vapor y electricidad, y biocombustibles líquidos destinados para su utilización como combustibles para automoción. Puesto que esta última es la aplicación más generalizada de los biocombustibles líquidos, en este contexto se tiende a denominarlos “biocarburantes”. Existen distintos tipos de biocarburantes (bioetanol, biodiesel, aceites vegetales, biometanol, bio-ETBE, etc.), si bien los únicos utilizados actualmente en mezclas con combustibles fósiles son el biodiesel, el bioetanol y sus derivados. En el caso concreto del bioetanol, la producción actual se basa en la utilización de materias primas ligadas al mercado alimentario de tipo azucarado (como la caña de azúcar en Brasil) o amiláceo (como el maíz en EEUU o los cereales en Europa). Las tecnologías para su producción son maduras y están desarrolladas a escala comercial, denominándose de **primera generación**. No obstante, cada vez existe un mayor consenso en reconocer que estos biocarburantes solo podrán sustituir una parte de los derivados del petróleo debido a problemas de abastecimiento de las materias primas y su competencia con el mercado alimentario. Como alternativa, los biocarburantes obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica ofrecen el potencial de aumentar la capacidad de producción, y a la vez minimizar los impactos sociales y ambientales negativos derivados de la utilización de materias primas ligadas al mercado alimentario, ya que las fuentes de biomasa utilizadas no compiten directamente con la producción de alimentos, ni con las tierras destinadas al cultivo de los mismos. Estos biocarburantes, denominados avanzados o de **segunda generación**, han sido identificados por la Comisión Europea como elementos decisivos para el cumplimiento de los objetivos marcados de biocombustibles en el consumo energético del sector transporte.

La Unión Europea ha promovido desde el año 1997 la producción y uso de los biocarburantes en el transporte mediante políticas de apoyo expresadas a través de diversas Directivas relativas a su uso y a la aplicación de los impuestos especiales. El primer gran impulso para considerar a los biocarburantes una opción estratégica se plasmó en el Libro Blanco de las energías renovables (Comunicación de la Comisión Europea, 1998), donde se señalaron como la única opción viable, a corto plazo, que ayudaría a cumplir los compromisos adoptados a escala europea. Desde entonces, el

Consejo, la Comisión y el Parlamento europeo han realizado una serie de trabajos encaminados al fomento de los biocarburantes como elemento clave en el ámbito de las políticas energética, agrícola y de medio ambiente. La última Directiva promulgada es la Directiva Europea de Energías Renovables (2009) relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables, que fija el objetivo de que los biocombustibles alcancen una cuota del 10% (en valor energético) de los combustibles consumidos en el sector del transporte para el año 2020. Hasta la publicación de la Directiva, la Comisión Europea había apoyado y recomendado la utilización de biocarburantes, pero esta Directiva marca por primera vez una obligatoriedad de consumo de biocarburantes en el total de combustibles para el transporte. Además, la normativa establece por primera vez que los biocarburantes utilizados para cumplir los objetivos de consumo en la UE deben verificar unos criterios de sostenibilidad ambiental y social, independientemente de si han sido producidos dentro o fuera de la UE. Dichos criterios de sostenibilidad se refieren a aspectos relacionados con la procedencia de las materias primas, en cuanto a la utilización para su cultivo de áreas de elevado valor en biodiversidad y reservas de carbono y a la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) derivada de su uso, en comparación con los combustibles fósiles (Directiva 2009/28/EC, del 23 de abril de 2009). Para que el consumo de biocarburantes sea tenido en cuenta en el cumplimiento de los objetivos, se establece una reducción mínima que debía alcanzar en el año 2013 el 35% de GEI con respecto a los carburantes de origen fósil. Este umbral mínimo de ahorro de emisiones se eleva al 50% en el año 2017 y del 60% a partir de ese año. La Directiva incluye en su Anexo V unos valores reales calculados y por defecto de reducción de GEI de los biocarburantes más utilizados, obtenidos en distintas condiciones de proceso, incluyendo también valores para los biocarburantes de segunda generación. Los valores por defecto de estos últimos son muy superiores a los de primera generación, superando en la mayoría de los casos el 90% de reducción. Este hecho proporciona a los biocarburantes de segunda generación un valor añadido en cuanto a su potencial para contribución al cumplimiento de los objetivos establecidos en la UE y constituyen actualmente una línea prioritaria en la política europea de producción y utilización de combustibles alternativos en el transporte. Los criterios de sostenibilidad establecidos en la DER se aplican al total de la cadena de producción y distribución de los biocarburantes dentro del Espacio Económico Europeo y también a los biocarburantes producidos a partir de materias primas provenientes de fuera de la UE. En 2011 tan sólo un 29% del total de biocarburantes consumidos alcanzó la certificación de sostenible, cifra que se espera que llegará al 79,8% en 2012 (EurObserv'ER 2013, 2014). En España, la incorporación de la obligatoriedad de esta certificación se ha hecho a través del Real Decreto 1597/2011 y debería haber entrado en vigor hasta el 1 de enero de 2013, pero actualmente existe una moratoria y no se está aplicando.

Las políticas de apoyo e impulso a los biocarburantes en la UE han dado como resultado un incremento constante en su consumo a lo largo de los últimos años, el

cual se estimó en el año 2013 en 13,6 Mtep, con una tasa media de incorporación del 4,7% en base energética (EurObserv'ER, 2014). De este total, se estimó que un 79,0% corresponde al consumo de biodiesel, mientras que el bioetanol supondría un 19,9% del consumo de biocarburantes en 2013 (EurObserv'ER, 2014). La información proporcionada por EurObserv'ER 2014, que confirma los datos de consumo y producción en el año 2012, y estima los valores de 2013, establece una bajada del consumo total de biocarburantes en España entre estos dos años, debido a la situación de crisis y a las políticas energéticas desarrolladas por el gobierno. Atendiendo a esta fuente, España cedería su puesto como tercer país consumidor de biocarburantes en 2012 (EurObserv'ER, 2013), para situarse en quinto lugar, por detrás de Alemania, Francia, Italia y Reino Unido, con un consumo total de biocarburantes de 997 ktep, 816 ktep de biodiesel, 180 ktep de bioetanol y una tasa rebajada de incorporación al transporte que se fijó en un 4,1% en base energética.

2. Estructura de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es un material heterogéneo que se encuentra en la pared secundaria de las células vegetales. Sus componentes principales son los carbohidratos celulosa y hemicelulosa, y la lignina, que se encuentran en diferentes proporciones según el tipo de material de que se trate (Figura 4). Una distribución media de estos componentes sería: celulosa 40-80%, hemicelulosa 10-40% y lignina 5-25% (Bidlack *et al.*, 1992; Salisbury y Ross, 1992). Otros componentes minoritarios de la biomasa son los extractivos, las proteínas y las cenizas (Wyman, 1996).

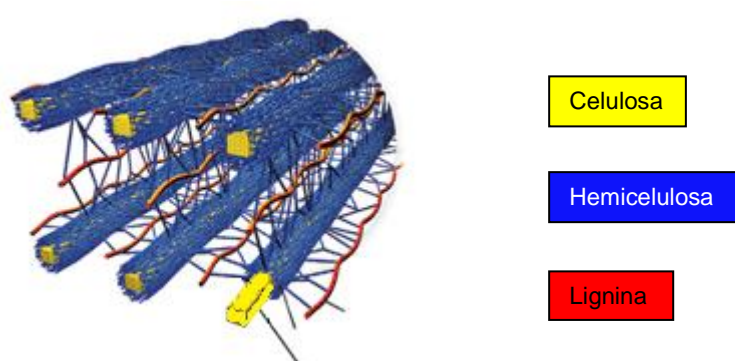


Figura 4- Esquema de la estructura de la lignocelulosa (Ritter, 2008).

2. 1. Celulosa

La celulosa es un polisacárido compuesto por moléculas de D-glucopiranosas unidas mediante enlaces $\beta(1-4)$ -glucosídicos, con una estructura de silla en C1 y C4 (Figura 5). Su unidad de repetición es la celobiosa, un dímero de glucosa. Al sintetizarse las cadenas de glucosa, queda un extremo reductor, capaz de abrirse y reaccionar, y un extremo no reductor. Las cadenas se unen entre sí lateralmente a través de enlaces de hidrógeno entre grupos hidroxilo de moléculas adyacentes, dando lugar a microfibrillas que se empaquetan en regiones cristalinas y amorfas. Las microfibrillas se agrupan formando macrofibrillas y, por último, fibras de celulosa. El grado de polimerización de la celulosa es alto; en las plantas se encuentran entre 7000 y 15000 unidades de glucosa, dependiendo de si se trata de la pared primaria o secundaria.

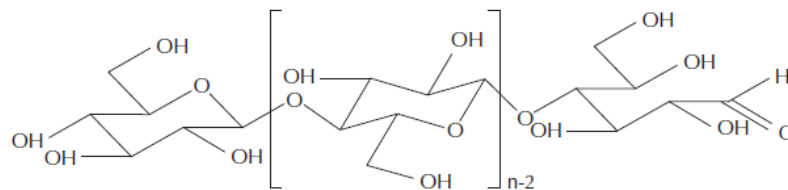


Figura 5- Estructura de una cadena de celulosa (Liu y Sun, 2010).

Como características comunes a la celulosa de todas las especies vegetales estarían una alta resistencia a la tracción y ser insoluble en la mayor parte de los disolventes. Sin embargo, existen diferencias entre algunas propiedades de la celulosa según su origen (paja, madera, algodón); por ejemplo, la longitud de las fibras y el grado de la cristalinidad. Así, los cristales de celulosa son más largos en la paja, en comparación a la madera, pero su grado de cristalinidad es menor (Liu y Sun, 2010).

La celulosa nativa se encuentra en dos formas cristalinas, celulosa I y celulosa II, siendo la celulosa I la forma mayoritaria. En la celulosa cristalina de tipo I las cadenas se disponen de forma paralela y en la celulosa de tipo II, antiparalela (Brown, 2003). La celulosa de tipo II se encuentra raramente en estado natural, tan sólo en algunas especies de algas y bacterias, pero se puede formar a partir de la celulosa I bajo determinadas condiciones. La celulosa I, a su vez, existe como una mezcla de dos formas cristalinas, celulosa I_α y celulosa I_β , que coexisten con regiones amorfas en las fibras. Según recogen Liu y Sun (2010), la estructura de la celulosa I_α es la de una única cadena triclinica, mientras que la celulosa I_β tiene una estructura monoclinica de doble cadena. Ambas estructuras forman diferentes enlaces de hidrógeno entre cadenas. La

celulosa I β es la forma más estable y la predominante en las plantas superiores (paja y madera).

El pretratamiento de la biomasa lignocelulosa, que suele emplear temperaturas altas, presión, esfuerzos mecánicos y/o empleo de productos químicos, puede alterar la estructura de la celulosa, dando lugar a otros tipos de estructuras cristalinas (tipo II, III, IV) (Mittal *et al.*, 2011).

2. 2. Hemicelulosas

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos de estructura amorfa y cadenas más cortas y ramificadas que la celulosa (tienen un grado de polimerización entre 80 y 200), constituidos por diferentes unidades de monosacáridos (pentosas y hexosas) y ácidos urónicos unidos mediante enlaces glucosídicos. Además, las ramificaciones se encuentran habitualmente acetiladas o metiladas. Las hemicelulosas se pueden extraer fácilmente de la matriz lignocelulósica mediante procesos hidrotérmicos y/o con soluciones ácidas y alcalinas, y encontrarse así en forma soluble en la fase líquida tras el pretratamiento. Sus características estructurales permiten aportar flexibilidad a la matriz lignocelulósica.

Por tratarse de un grupo de polímeros muy heterogéneo, no existe un consenso único en torno a la definición de las hemicelulosas. Scheller y Ulvskov (2010) consideran que las hemicelulosas se caracterizan por tener una cadena principal unida mediante enlaces β -(1-4) con una configuración ecuatorial en los carbonos C1 y C4. Así, distinguen cuatro grupos principales de hemicelulosas: xilanos, xiloglucanos, mananos y galactanos, y β -(1-3,1-4)-glucanos.

La cadena principal de los xilanos está formada por moléculas de D-xilosa (90%) y L-arabinosa (10%) unidas mediante enlaces β (1-4) (Gírio *et al.*, 2010). Las ramificaciones pueden contener hexosas (D-glucosa, D-galactosa y D-manosa), pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y ácidos urónicos (D-glucurónico, D-galacturónico y metilgalacturónico) (Limayem y Ricke, 2012). Los xiloglucanos están compuestos por una cadena lineal de D-glucosas unidas mediante enlaces β -(1-4), con ramificaciones de D-xilosa, D-galactosa o L-fucosa. Los mananos y galactanos se caracterizan por sus cadenas de manosa (mananos y glucomananos, frecuentemente acetilados), o de manosa y glucosa (glucomananos y galactoglucomananos). Por último, los β -(1-3,1-4)-glucanos son cadenas de glucanos enlazadas de forma β -(1-4), con uniones ocasionales β -(1-3) (Scheller y Ulvskov, 2010). Algunas de estas estructuras, encontradas en diferentes especies vegetales, se representan en la figura a continuación (Figura 6).

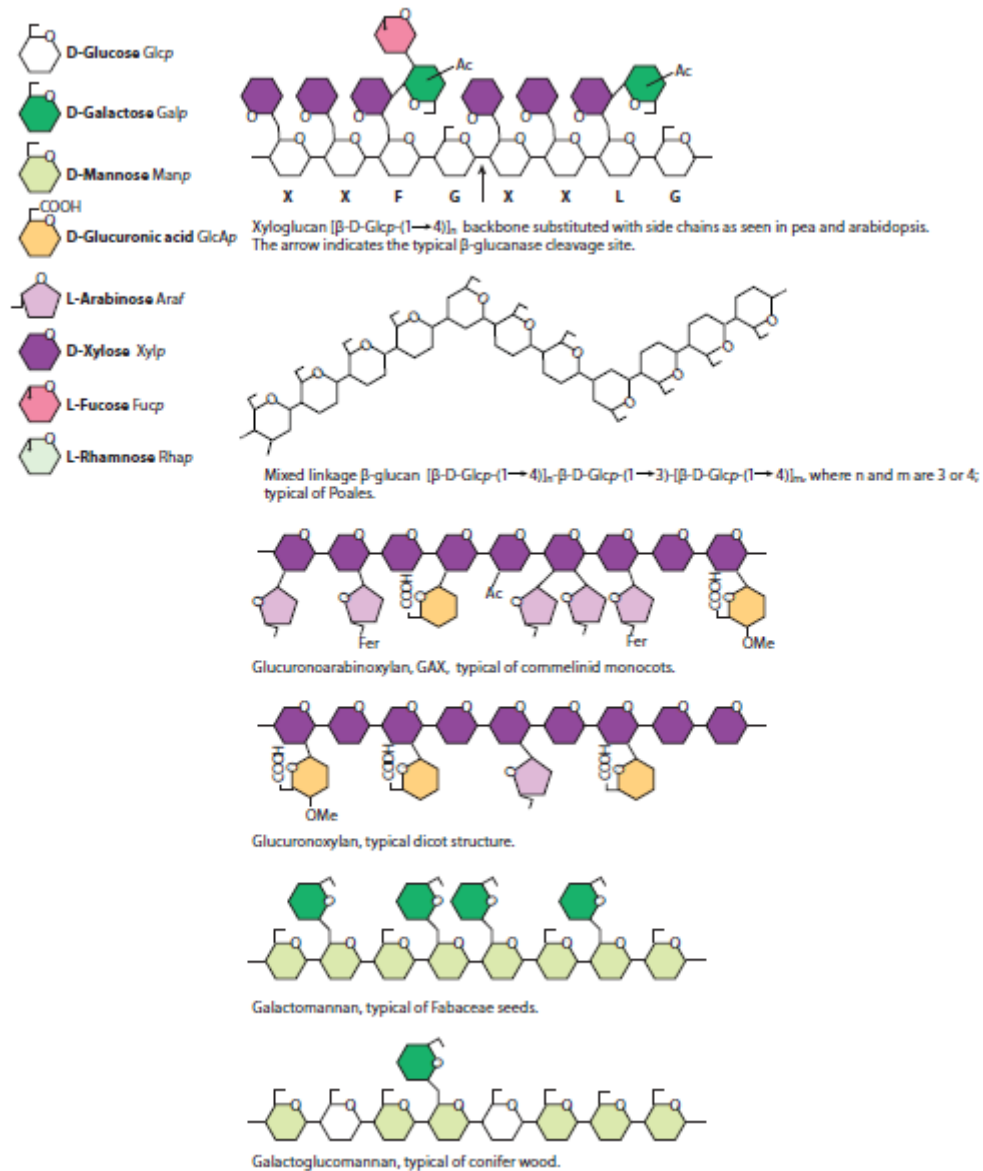


Figura 6- Estructura de la hemicelulosa de diferentes plantas (Scheller y Ulvskov, 2010). De arriba a abajo xiloglucano de guisantes y *Arabidopsis*, β -(1-3,1-4)-glucano de Poales, glucoarabinoxilano de monocotiledonias, glucuronoxilano de dicotiledóneas, galactomanano de semillas de leguminosas y galactoglucomanano de madera de conífera. Se representan con distintos colores las unidades monoméricas constituyentes.

Mananos y galactanos predominan en la lignocelulosa de las maderas, mientras que en las plantas herbáceas son más comunes los xilanos, principalmente glucoarabinoxilanos y glucuronoxilanos. La estructura de las hemicelulosas en la paja de cereal consiste en una cadena principal de β -(1-4)-D-xilosas con un número variable de sustituyentes (arabinosas, ácidos glucurónicos y/o acetilos), unidos a los grupos OH libres de los carbonos C2 y C3 de las xilopiranosas. Los glucuronoxilanos se caracterizan por las sustituciones con residuos de α -1,2 y 4-O-metil glucuronosil en la cadena principal de xilosas. En las herbáceas, los glucoarabinoxilanos (Figura 7) presentan

sustituciones de arabinofuranosa en la posición O-3 de la cadena principal de xilosa, o incluso las xilosas pueden verse sustituidas doblemente con arabinofuranosas en las posiciones O-2 y O-3 (Scheller y Ulvskov, 2010).

En la unión de la lignina a las hemicelulosas en paja de cereal, se ha descrito que existe hasta un 2% de ácidos fenólicos que forman enlaces éster con el C5 de los residuos de arabinosa (Ren y Sun, 2010). En concreto, Mueller-Harvey y Hartley (1986) estudiaron las hemicelulosas de la paja de cebada y hallaron que 1 de cada 121 pentosas está unida a un grupo feruloil, y 1 de cada 253 a un grupo *p*-cumaril. Se cree que el ácido ferúlico puede ser responsable de los enlaces cruzados entre la lignina y las hemicelulosas, mediante una unión hemicelulosa-éster-ácido ferúlico-éter-lignina (Ren y Sun, 2010).

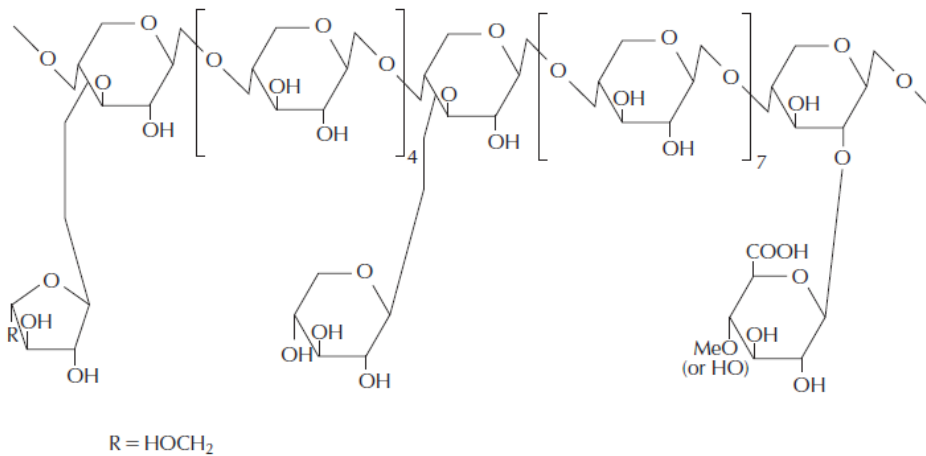


Figura 7.- Estructura de la hemicelulosa de paja de trigo (Ren y Sun, 2010).

2. 3. Lignina

La lignina es un polímero complejo formado por una secuencia de unidades que no siguen una secuencia repetitiva, y cuya estructura y composición varían según su origen (Lu y Ralph, 2010).

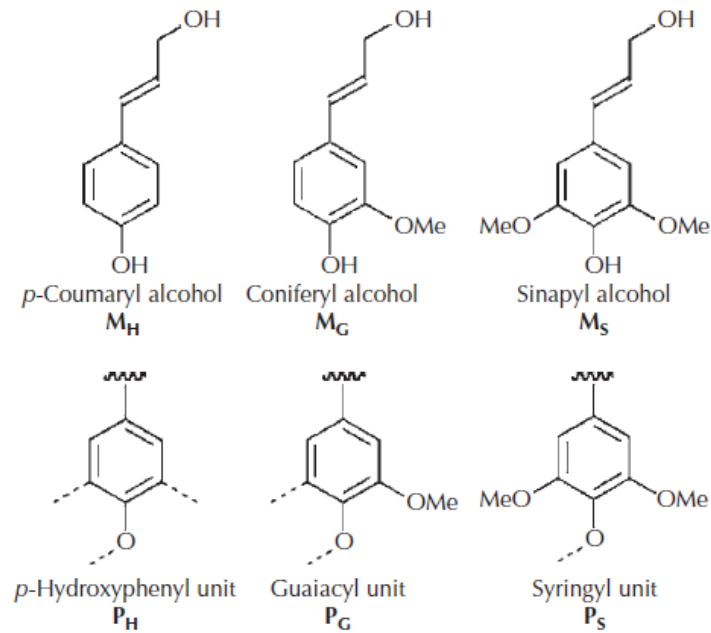


Figura 8- Alcoholes precursores de la lignina (monolignoles) y sus derivados (Lu y Ralph, 2010).

De un modo genérico se puede definir la lignina como un polímero fenólico heterogéneo unido covalentemente a los xilanos de la pared celular secundaria de las células vegetales, lo cual confiere un mayor empaquetamiento y rigidez a la estructura de la biomasa lignocelulósica. Está compuesta por tres unidades fenilpropanóicas (monolignoles): alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Figura 8). Estos alcoholes son los precursores de las unidades *p*-hidroxifenilo, guayacilo y siringilo, que se unen entre sí mediante enlaces éter o carbono-carbono. El grado de entrecruzamiento que puede alcanzar la lignina está relacionado con el grado de sustitución de los grupos alcohólicos. Éste determina la rigidez de la estructura y, por lo tanto, la facilidad o dificultad con la que la biomasa puede ser transformada bioquímicamente (Doherty *et al.*, 2011).

Según el tipo de biomasa lignocelulósica, las proporciones de estos monolignoles varían. Así, en las maderas blandas se encuentran grandes cantidades de alcohol coniferílico y cumárico, pero no sinapílico; en las maderas duras abundan los alcoholes coniferílico y sinapílico, y se encuentra en menor medida el alcohol cumárico; y en las hierbas los tres monolignoles aparecen en proporciones igualadas (Brett y Waldron, 1996).

2. 4. Otros componentes de la biomasa lignocelulósica

Aparte de los componentes mayoritarios (celulosa, hemicelulosa y lignina), la biomasa lignocelulósica contiene otros compuestos como pectinas, extractos y cenizas.

Las **proteínas** de las paredes celulares vegetales se encuentran normalmente glicosiladas. La familia de proteínas más estudiada es la de las extensinas, compuesta por los aminoácidos hidroxiprolina (más del 40%), serina y lisina. Además, contiene residuos de tirosina que se cree que son capaces de enlazarse covalentemente de forma intramolecular o intermolecular con otros componentes de la pared celular. Otros tipos de proteínas identificados son las proteínas de arabinogalactano, las proteínas ricas en prolina, las proteínas ricas en glicina, las lectinas y toda una colección de enzimas (Brett y Waldron, 1996). En las pajas de cereales las cantidades de proteína cruda son bajas (3-5%) (Antongiovanni y Sargentini, 1991).

Las **pectinas** se encuentran principalmente en la lámina intermedia y la pared primaria de las células vegetales (ver apartado 2.5.). Su presencia en las pajas de cereal es minoritaria (Antongiovanni y Sargentini, 1991), pudiendo alcanzar hasta un 5% del peso seco en la paja de trigo. Son una familia de polisacáridos complejos fácilmente extraíbles, compuestos por ácido galacturónico y menores proporciones de ramnosa, arabinosa y galactosa, que se encuentran en forma de homogalactouronanos y ramnogalactouronanos, respectivamente. Tienen la capacidad de unirse covalentemente a los fenoles, la celulosa y las proteínas.

Los **extractos** son compuestos no estructurales de la biomasa lignocelulósica fácilmente extraíbles con alcohol y agua. Normalmente suman una fracción pequeña de la composición total de la paja de cebada y tienen bajo peso molecular. La cantidad y composición de los extractos varía enormemente entre especies, condiciones de cultivo y área geográfica.

Sun y Sun (2001) determinaron la composición de los extractos de la paja de cebada, extraídos con una mezcla de tolueno-etanol (2:1, v/v), cloroformo, MTBE, una mezcla hexano-acetona (2:1, v/v) y diclorometano en un equipo Soxhlet. Dentro de los compuestos lipofílicos, los cinco más comunes, según su contenido en % sobre el peso seco de extracto, fueron los ácidos grasos libres (15-38%), los esteroides (1,4-10%), las ceras (3,4-12%), los ésteres esterílicos (5-25%) y triglicéridos (1,2-10%). En cuanto a los compuestos fenólicos, se encontraron en pequeñas cantidades (<0,4% en peso seco de extracto) de ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, siringaldehído, vainillina, ácido, sinápico, ácido benzoico y ácido *m*-toluénico. Además, las herbáceas contienen una cantidad no despreciable de compuestos solubles en agua, entre los que se encuentra una cierta cantidad de carbohidratos no estructurales (Slutier *et al.*, 2010).

Las **cenizas** son la fracción inorgánica presente en la biomasa. Están compuestas por diferentes sales, sílice y otros metales pesados. Narasimhalu *et al.* (1998)

analizaron la composición de 75 lotes de paja de cebada y encontraron una composición mineral media de 0,4% K, 0,2% Ca, 0,1% Mg, 0,1% S, 0,1% P, 0,06% Na y trazas de Cu, Zn y Mn. Por otra parte, según Antongiovanni y Sargentini (1991), uno de los mayores componentes de las pajas de cereal es la sílice, que en la paja de cebada puede llegar a suponer hasta un 1,5% de la composición total.

2. 5. Estructura de la pared celular de las células vegetales

La pared celular de las células vegetales se dispone en forma de capas que se van depositando sobre la membrana celular desde el momento de la división hasta su muerte. En general se distinguen tres capas diferenciadas: desde el exterior hasta el interior se encuentran la lámina intermedia, la pared primaria y la pared secundaria (Brett y Waldron, 1996).

La **lámina intermedia** es una capa muy fina que se sitúa entre las paredes celulares de las células adyacentes y está formada fundamentalmente por pectinas.

La **pared primaria** tiene un grosor más o menos regular entre 0,1 y 1,0 μm y en ella se combinan microfibrillas de celulosa dentro de una matriz de pectina y hemicelulosa. La composición depende del tipo de planta; así, la pared primaria de las gimnospermas, dicotiledóneas y la mayor parte de las monocotiledóneas no gramíneas contiene sobretodo pectina y xiloglucanos, mientras que las gramíneas y algunas otras monocotiledóneas tienen menos pectina y más arabinoxilanos y β -(1-3,1-4)-glucanos. Las proteínas extensinas se sitúan perpendicularmente a las fibras de celulosa, asociadas a las hemicelulosas.

La **pared secundaria** se diferencia principalmente porque contiene lignina, la cual confiere una gran rigidez a la pared celular, debido a su efecto hidrofóbico y a los enlaces covalentes entre sus unidades constitutivas. Su estructura es una matriz de fibras de celulosa recubiertas por la hemicelulosa y unidas a ésta mediante puentes de hidrógeno. La hemicelulosa, a su vez, se une a la lignina mediante enlaces éster y éter (Figura 9). En cuanto a la lignina, aquélla con la que se enlaza la hemicelulosa es la lignina no-nuclear, mientras que la lignina nuclear se encuentra formando una matriz amorfa en la que se embeben el resto de componentes.

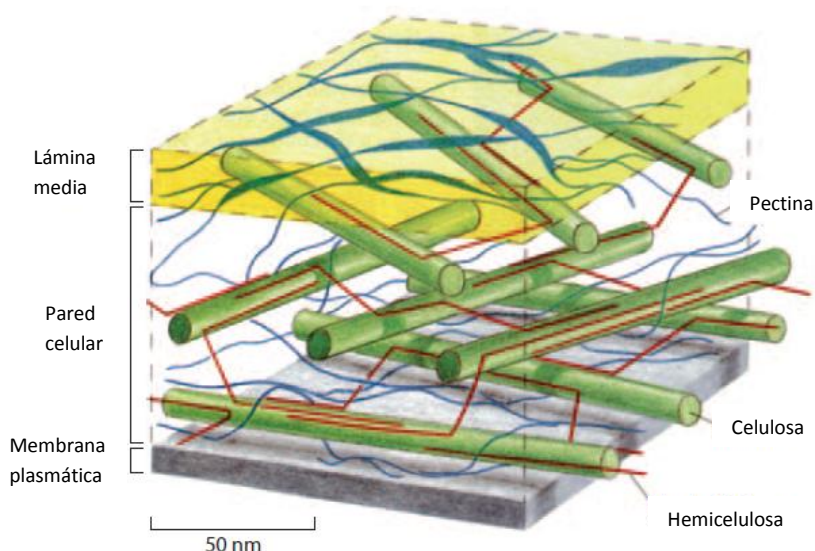


Figura 9- Representación de la pared celular primaria de una célula vegetal (McCann y Roberts, 1991).

La pared celular en su conjunto tiene una gran resistencia mecánica, debida a la orientación alterna de las fibras de celulosa en las diferentes capas. Suele tener una carga negativa debido a los residuos de ácido urónico de la pectina y los xilanos, que se ve parcialmente compensada por las cargas positivas de las proteínas y algunos iones de hidrógeno. El pH suele encontrarse entre 6 y 4.

3. Residuos agrícolas como materia prima para la producción de bioetanol: paja de cebada

Una parte de los materiales lignocelulósicos susceptibles de ser utilizados como materia prima para la producción de bioetanol se genera como residuos en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial. Los residuos agrícolas proceden de los cultivos leñosos y herbáceos y de algunos otros cultivos con utilidad industrial, como por ejemplo los residuos de la industria oleícola. Los residuos forestales provienen de los tratamientos silvícolas y de mejora y mantenimiento de los montes y masas forestales. La biomasa residual de origen industrial es la generada en las industrias, como la papelera, y la fracción orgánica de los residuos sólidos industriales. Muchos de estos residuos no sólo tienen un valor económico en el contexto en el que se generan, sino que suelen provocar problemas ambientales durante su eliminación.

Entre los residuos agrícolas más estudiados como materias primas para la producción de bioetanol hay que destacar los producidos en los cultivos del cereal, el maíz y el procesado de la caña de azúcar (bagazo de caña). Entre los residuos del

cultivo de cereal, la **paja de cebada** es uno de los residuos de mayor potencial en el contexto español y europeo por su elevado nivel de producción. La cebada es el tercer cereal por magnitud de producción en Europa, por detrás del trigo y muy cerca del maíz: un 19,3% del total de la producción de cereales en 2012, es decir, 54,9 millones de toneladas (Eurostat, 2012). Según el valor típico del Índice de Cosecha (El-Banna *et al.*, 2011) aproximadamente un tercio de la cebada cosechada es grano, siendo el resto residuo. Además, se estima que el Índice de Recuperación es de un 25%, es decir, que un 75% de los residuos generados queda en el campo tras la cosecha. De éste 75%, solo un 20% se destina al sector ganadero (Kretschmer *et al.*, 2012), por lo que se puede estimar que existen en Europa 22 millones de toneladas de paja de cebada por año disponibles para otros usos. Sólo en España se produjeron en 2012 casi 6 millones de toneladas de cebada, según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente español (MAGRAMA, diciembre 2012); se trata del segundo cultivo en importancia por detrás del trigo. Aplicando los mismos factores que en el caso europeo, tendríamos más de 2 millones de toneladas de paja de cebada por año disponibles en España. Por lo tanto, en cuanto a la disponibilidad de materia prima, existe un gran potencial a nivel europeo y español para la producción de bioetanol a partir de paja de cebada.

4. Proceso de producción de bioetanol de 2ª generación

El etanol se puede obtener a partir de biomasa lignocelulósica mediante tecnologías basadas en procesos termoquímicos o bioquímicos, y ambas rutas han sido objeto de numerosos estudios de I+D en los últimos años (EBTP-SABS, 2014). La **ruta termoquímica** incluye la gasificación de los materiales lignocelulósicos para la producción de gas de síntesis, el cual puede catalizarse hacia la conversión en diversos tipos de carburantes, tales como metanol, diésel sintético y etanol. Las **tecnologías bioquímicas** para la producción de bioetanol se basan en la utilización de agentes biológicos o químicos para la hidrólisis de carbohidratos y fermentación de azúcares mediante microorganismos. Estas últimas tecnologías han alcanzado un grado de desarrollo superior en los últimos años en base a un fuerte impulso de la I+D+i de los procesos, situándolos muy cerca de una escala comercial. No obstante, existen todavía algunos retos tecnológicos cuya resolución contribuirá sin duda a mejorar la sostenibilidad del proceso desde un punto de vista medioambiental, así como su competitividad económica.

La estrategia de proceso más prometedora dentro del proceso de **conversión bioquímica** de biomasa lignocelulósica a etanol y la que presenta mejores perspectivas de llegar a reducir los costes de producción (Mussatto *et al.*, 2010), se basa en la utilización de agentes biológicos (enzimas hidrolíticas) para el fraccionamiento de los carbohidratos en azúcares simples, que posteriormente son transformados a etanol

mediante microorganismos fermentadores. Uno de los principales obstáculos al que se enfrenta este proceso es la complejidad de la estructura de la biomasa lignocelulósica, que constituye una fuerte barrera a las enzimas hidrolíticas. Por ello, se requiere un pretratamiento previo que rompa la rígida estructura de la biomasa y altere la cristalinidad de la celulosa para facilitar la acción de los enzimas. El mecanismo para hacer la celulosa más accesible a las enzimas depende del pretratamiento empleado y de la naturaleza del material. Además de ser considerada una fase clave para mejorar la efectividad del proceso de conversión biológica a etanol, el pretratamiento ha sido identificado como una etapa muy significativa en cuanto a su contribución al coste económico y energético del proceso en su conjunto (Mosier *et al.*, 2005). Existe por tanto una necesidad de mejorar esta etapa mediante el desarrollo de procesos de fraccionamiento de la biomasa de bajo coste energético y medioambiental, que además favorezcan una mayor integración de las distintas etapas del proceso.

Básicamente, un proceso de producción de bioetanol de 2ª generación por conversión biológica de biomasa lignocelulósica comprende las siguientes etapas: pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y destilación (Figura 10).

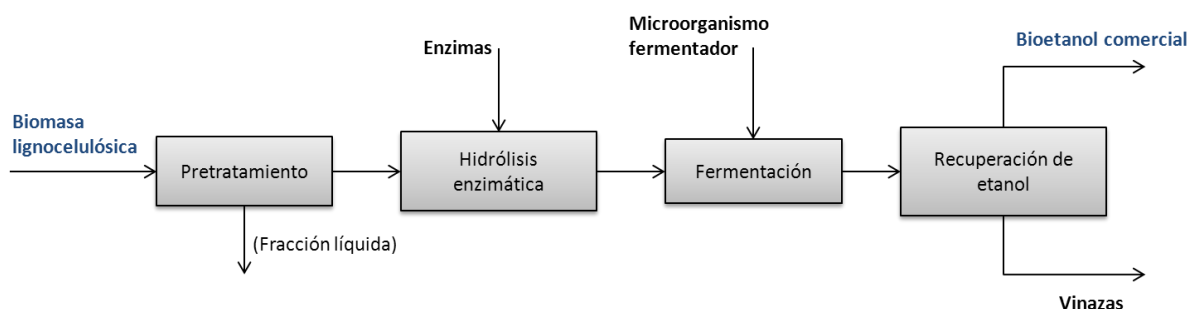


Figura 10- Esquema básico del proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica por la ruta bioquímica.

4. 1. Pretratamiento

La etapa de pretratamiento es necesaria para romper la estructura de la biomasa lignocelulósica, atacar la matriz cristalina de la celulosa y hacer el sustrato accesible a las enzimas hidrolíticas durante la etapa de hidrólisis (Mosier *et al.*, 2005). Como se ha mencionado anteriormente, el pretratamiento supone uno de los grandes costes económicos y energéticos del proceso. Por ejemplo, Lynd *et al.* (1996) estimaron el coste del pretratamiento en un tercio del coste total del proceso, mientras que Mosier *et al.* (2005) lo consideran el segundo gasto más importante en el proceso, por detrás de la materia prima.

El pretratamiento es un proceso crucial en la producción de bioetanol, ya que tiene un gran impacto en las siguientes etapas. En efecto, la hidrólisis enzimática y la fermentación se ven afectadas por factores como la digestibilidad de la celulosa, la toxicidad y la reología del medio, que dependen del tipo de pretratamiento y su efectividad. Por otra parte, el pretratamiento tiene una gran influencia en la demanda energética y de agua del proceso, que son factores claves en la eficacia global del mismo (Galbe y Zacchi, 2012).

Según Alvira *et al.* (2010) un pretratamiento efectivo y de bajo coste de la biomasa lignocelulósica debería cumplir los siguientes requisitos:

- Ser versátil en cuanto al tipo de materia prima.
- No requerir acondicionamiento previo de esta materia prima, como la reducción del tamaño de partícula.
- Producir un material con una fracción de celulosa altamente digestible.
- No producir una degradación significativa de los azúcares.
- No producir o minimizar la producción de compuestos tóxicos para los microorganismos fermentadores.
- Producir una lignina que sea recuperable para otros usos y subproductos.
- No producir residuos sólidos o líquidos que requieran tratamiento específico.
- Ser efectivo en condiciones de alta carga de sólidos y producir una gran concentración de azúcares en el medio de hidrólisis.
- No precisar de grandes inversiones en los equipos (equipos con un tamaño preferiblemente pequeño y de materiales estándar).
- Tener un consumo energético moderado.

Actualmente no existe un pretratamiento que aúne todas estas características, pero se han escrito un gran número de artículos de revisión que recopilan las diferentes tecnologías que se han investigado, con sus puntos fuertes y débiles y su efectividad sobre diferentes sustratos (Alvira *et al.*, 2010; Agbor *et al.*, 2011; Galbe y Zacchi, 2012; Zhao *et al.*, 2012; Sathitsuksanoh *et al.*, 2013; Cardona *et al.*, 2014).

Una de las clasificaciones que se pueden hacer dentro de los pretratamientos es según el tipo de agente utilizado para alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica (Tomás-Pejó *et al.*, 2011). De acuerdo con esta clasificación, en la tabla 1 se presenta un resumen de los pretratamientos que han sido objeto de estudio en los últimos años.

Tabla 1- Clasificación de los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica según el tipo de agente empleado (Tomás-Pejó *et al.*, 2011).

Tipo de agente	Pretratamiento	Principio
Físico	Molienda	Reducción del tamaño de partícula en un molino
	Extrusión	Acción mecánica de un tornillo sin fin
Químico	Ácido	Efecto catalítico sobre la hemicelulosa
	Alcalino	Deslignificación e hinchamiento de las fibras vegetales
	Organosolv	Extracción de la lignina mediante disolventes orgánicos
	Ozonólisis	Deslignificación por oxidación con ozono
	Líquido iónico	Solubilización de los carbohidratos y la lignina
Físico-químico	Oxidación húmeda	Oxidación con oxígeno a altas temperaturas y presiones
	Microondas	Uso de microondas en medio acuoso para generar efectos térmicos y degradativos de la lignocelulosa
	Ultrasonidos	Cavitación en medio líquido que facilita la acción enzimática y abre la superficie de las fibras
	Liquid Hot Water (LHW)	Uso del agua a alta presión y temperatura para alterar la estructura de la biomasa
	Explosión de vapor	Tratamiento con vapor a alta presión y temperatura seguido por una liberación súbita de la misma
	Explosión con amoníaco (Ammonia Fiber Explosion, AFEX)	Similar a la explosión de vapor, pero con amoníaco en vez de vapor de agua
	Sulfitos (Sulfite Pretreatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulose, SPORL)	Tratamiento con una disolución de sulfito seguido por una reducción del tamaño de partícula. Especial para maderas.
	Fluido supercrítico	Extracción de lignina con un fluido supercrítico.
Biológico	Hongos	Degradación de lignina y hemicelulosa mediante un hongo

Los **pretratamientos de tipo térmico o termo-químico** son hasta el momento los más prometedores para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica debido a su probada efectividad en muchos tipos de biomasa lignocelulósica y a que su tecnología está bien establecida a nivel comercial (Chandra *et al.*, 2007; Jørgensen *et al.*, 2007a; Alvira *et al.*, 2010). Sin embargo, las altas temperaturas que emplean pueden provocar una cierta pérdida de carbohidratos por degradación de los azúcares hemicelulósicos y la formación de posibles tóxicos. Este hecho implica además que a menudo el material precisa de posteriores etapas de acondicionamiento antes de ser hidrolizado y fermentado.

Dentro de los pretratamientos de tipo químico, los **pretratamientos con ácido** buscan disolver la fracción hemicelulósica de la biomasa para así hacer más accesible la celulosa. Este tipo de pretratamientos se puede llevar a cabo con ácidos concentrados o diluidos, siendo preferibles los ácidos diluidos, ya que los concentrados pueden dar lugar a compuestos inhibidores, como se comenta más adelante en este capítulo. Además, especialmente el caso de ácidos concentrados, implica un mayor gasto en equipos resistentes a la corrosión y en la recuperación del reactivo después del pretratamiento. El ácido más comúnmente utilizado en este tipo de pretratamiento es el H_2SO_4 diluido, pero también se han estudiado el HCl, el H_3PO_4 , el HNO_3 y algunos ácidos orgánicos como el maleico y el fumárico (Alvira *et al.*, 2010).

Los **pretratamientos alcalinos** más comunes se llevan a cabo con NaOH, KOH o $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Los álcalis actúan solubilizando la lignina y reaccionando con los grupos acetilo de la hemicelulosa. Además, se ha descrito que el tratamiento con NaOH produce un efecto de esponjamiento de las fibras (este aspecto se discute más detalladamente en el Capítulo III). Como los ácidos, las bases plantean algunos problemas de manejo y es necesario incorporar sistemas para su recuperación, de forma que se reduzca el gasto asociado a su consumo.

Dependiendo del tipo de pretratamiento y de la materia prima empleada, se pueden producir una serie de compuestos potencialmente inhibidores de la hidrólisis como furaldehídos, ácidos débiles y fenoles (Olafsson *et al.*, 2008). Los furaldehídos más comunes son: HMF (5-hidroxi-metil-2-furaldehído) y furfural (2-furaldehído). El primero es un producto de degradación de las hexosas y el segundo de las pentosas, y se forman en pretratamientos que emplean condiciones severas (altas T y condiciones ácidas). Los ácidos débiles (ácido acético, levulínico y fórmico) provienen, bien de la desacetilación de las hemicelulosas, o bien de la degradación última del HMF. Los fenoles, por su parte, son productos de degradación de la lignina y dependiendo de la estructura de ésta pueden ser de un tipo u otro.

Otros tipos de pretratamientos químicos son la **ozonólisis**, que emplea ozono producido a partir de oxígeno puro o de aire, los procesos con **organosolventes** (metanol, etanol, acetona, etilen-glicol...) y los pretratamientos con **líquidos iónicos**

(sales líquidas a temperatura ambiente, formadas por cationes orgánicos de gran tamaño y pequeños aniones inorgánicos). Estos tres tipos de pretratamiento son capaces de solubilizar la lignina de la biomasa lignocelulósica y, en el caso de los líquidos iónicos, también los carbohidratos. Otra característica común es el elevado coste de los reactivos y la necesidad de una separación posterior del sustrato pretratado, bien para conseguir reciclar los productos químicos, bien para evitar un posible efecto inhibitor sobre la hidrólisis y la fermentación.

Los **pretratamientos físicos**, tales como la molienda, requieren en general un gran aporte de energía y su efectividad es limitada. Ésta se basa en la reducción del tamaño de partícula, lo cual afecta a la cristalinidad de la celulosa y al tamaño de poro.

Por último, los **pretratamientos biológicos** se llevan a cabo típicamente mediante microorganismos capaces de degradar la madera (hongos o bacterias). Estos pretratamientos son muy atractivos desde el punto de vista económico, ya que no precisan del uso de reactivos y tienen un gasto energético y de inversión menor que otros pretratamientos. Sin embargo, la efectividad de los microorganismos ensayados hasta el momento es baja en comparación con otros métodos de pretratamiento, conduciendo a bajos rendimientos de hidrólisis. Esta baja eficiencia se relaciona con el consumo no sólo de lignina, sino también de celulosa y hemicelulosa en su metabolismo (Singh *et al.*, 2008), la necesidad de controlar estrictamente el crecimiento de los microorganismos, los largos tiempo de residencia (10-14 días) asociados y la necesidad de grandes volúmenes de reactor (Chandra *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se ha elegido el pretratamiento por extrusión de la paja de cebada como alternativa a otros tratamientos bien estudiados, como por ejemplo, los de tipo hidrotérmico. Si bien se ha demostrado que estos son efectivos en una amplia variedad de materiales lignocelulósicos, requieren la utilización de elevadas temperaturas y, en la mayoría de los casos, etapas posteriores de destoxificación y/o lavado del sustrato pretratado. La versatilidad del tratamiento de extrusión en cuanto a la gran variedad de sustratos que se pueden utilizar, los diferentes efectos producidos en la biomasa en base a numerosas configuraciones que se pueden emplear en el extrusor y su capacidad de integrar otros pretratamientos y/o etapas del proceso, hacen de su estudio un tema de indudable interés.

4. 1. 1. La extrusión

La extrusión es un pretratamiento termo-mecánico relativamente novedoso que se puede aplicar a la biomasa lignocelulósica. Su acción se basa en el giro de uno o dos tornillos sin fin dentro de una carcasa ajustada y con control de temperatura, produciéndose un fuerte rozamiento entre la biomasa, el filete del tornillo y las paredes del módulo. Los tornillos están compuestos por unos ejes estriados sobre los que se van montando, consecutivamente, piezas cortas denominadas elementos de tornillo. Estos elementos tienen diferentes formas, según el efecto que producen sobre el flujo de biomasa: transporte, mezcla, presión o combinaciones de estos (Figura 11).

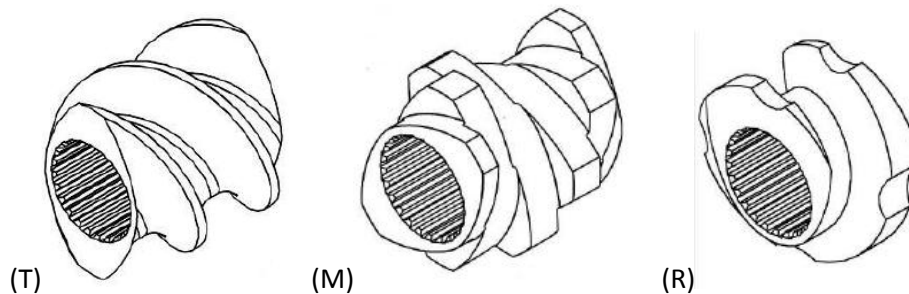


Figura 11- Representación de los tres tipos de elementos de tornillo usados en el EV 25. Entre paréntesis, tipo de efecto principal: T-transporte; M-mezcla; R- rozamiento.

La extrusión se caracteriza por transmitir al material fuerzas de cizallamiento elevadas y por lograr una rápida transferencia de calor y una mezcla rápida y completa del material (Karunanithy y Muthukumarappan, 2010a). Se trata de un pretratamiento versátil que puede ser usado solo o en combinación con otros pretratamientos. Por ejemplo, según la configuración de proceso, se puede añadir un catalizador químico antes, o durante la extrusión (extrusión reactiva), para potenciar el efecto sobre la biomasa. Un esquema simplificado de un extrusor como el empleado en este trabajo se muestra en la figura 12.

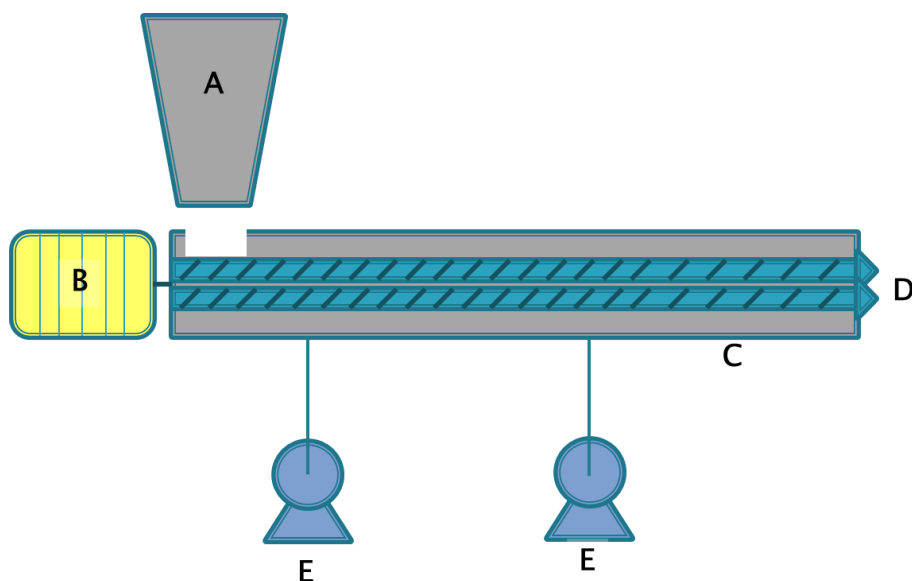


Figura 12- Esquema simplificado de un equipo de extrusión de doble husillo. A) Dosificador de biomasa, B) Motor, C) Carcasa con control térmico, D) Tornillos, E) Bombas periféricas para la adición de líquidos.

Existen diferentes tipos de extrusores, siendo la principal división entre extrusores de husillo simple y doble. Los primeros producen exclusivamente una mezcla distributiva, mientras que al emplear los extrusores de doble husillo denominados de interpenetración total, se consigue una mezcla distributiva y dispersiva (hay cambios en las propiedades físicas del material) (Kalyon y Malik, 2007). Dentro de estos últimos, se distingue entre extrusores de doble husillo con interpenetración total de giro contrario y de giro paralelo. Para el pretratamiento de la biomasa, el tipo más adecuado sería un extrusor de doble husillo co-rotativo (de giro paralelo) con interpenetración total, ya que permite un óptimo funcionamiento del equipo, consiguiendo al mismo tiempo grandes fuerzas de rozamiento que actúan sobre el material a lo largo del proceso. Este tipo de extrusión se caracteriza por la posibilidad de crear tapones dinámicos (zonas de mayor presión) dentro del extrusor mediante la combinación de elementos de transporte, de mezcla y de flujo inverso. La formación de un tapón dinámico estable depende también de las propiedades de flujo de la mezcla de biomasa y aditivos (Sentruk-Özer *et al.*, 2011).

Existe un gran número de variables que pueden afectar a la efectividad del pretratamiento por extrusión. Karunanithy y Muthukumarappan (2013), en su revisión sobre esta tecnología, hacen referencia al radio de compresión (en los extrusores de un solo husillo), la configuración del tornillo, la velocidad de giro y la temperatura. Además, otros autores hablan de la importancia del torque (Scott *et al.*, 2011; Karunanithy y Muthukumarappan, 2011c), la relación líquido a sólido (L/S) en el extrusor (Chen *et al.*, 2010; Karunanithy y Muthukumarappan, 2011a, b, c; Choi *et al.*,

2013a), o la configuración del proceso (Duque *et al.*, 2014b). El consumo energético del extrusor se relaciona con un parámetro denominado torque, que es la fuerza necesaria para hacer girar el motor. A su vez, el valor del torque está relacionado con la velocidad del tornillo, el nivel de llenado del extrusor en funcionamiento y con la viscosidad del material dentro del mismo (Karunanithy y Muthukumarappan, 2012).

Muchos de estos parámetros, están relacionados entre sí, por lo que en ocasiones es difícil aislar los efectos individuales de cada uno. Por ejemplo, en el caso de la velocidad de giro, se han descrito efectos distintos que dependen del material extrusado (Karunanithy y Muthukumarappan, 2010a) o de la temperatura (Lamsal *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha descrito que la velocidad del tornillo es más determinante cuando se utiliza la extrusión sola, que cuando se combina con un álcali (Zhang *et al.*, 2012), pero esto puede estar ligado a la relación de flujos líquidos y sólidos en el extrusor o al efecto de la sosa, que enmascara una influencia más pequeña de la velocidad.

Entre las ventajas de la extrusión respecto de otros tratamientos descritos en la bibliografía, se encuentra que se puede trabajar en continuo, que existen equipos comerciales para trabajar a escala industrial y que puede ser fácilmente adaptado para diferentes configuraciones de proceso (Karunanithy y Muthukumarappan, 2013). Además, como se ha mencionado anteriormente, las temperaturas moderadas que se pueden emplear durante la extrusión pueden evitar la producción de productos de degradación de los azúcares con efectos inhibidores sobre las enzimas y las levaduras, como el furfural o el hidroximetil furfural (HMF).

En los últimos años, la extrusión ha atraído bastante atención y se han publicado varios estudios acerca de la efectividad de la extrusión como pretratamiento para la producción de azúcares a partir de diferentes materias primas lignocelulósicas, bien sea como tratamiento único (Karunanithy y Muthukumarappan, 2010a, 2010b, 2011a, 2011e; Karunanithy *et al.*, 2012; Yoo *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012), o en combinación con una extracción acuosa (Karki *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011), con álcali (Dale *et al.*, 1999; Karunanithy y Muthukumarappan, 2011b, 2011c, 2011d; Lamsal *et al.* 2010; Duque *et al.*, 2013; Duque *et al.*, 2014b; Liu *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2013), ácido (Choi *et al.*, 2012, 2013 a y b; Um *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013) u otros reactivos (Eckard *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2013). Los resultados en cuanto a efectividad del pretratamiento varían según el tipo de biomasa y las condiciones de pretratamiento, pero mejoran en todos los casos respecto de una materia prima sin tratar. La tabla 2 resume los diferentes estudios publicados sobre la extrusión de biomasa lignocelulósica que se han llevado a cabo en los últimos años.

Tabla 2- Resumen de los parámetros de operación y efectos producidos en la biomasa lignocelulósica por el tratamiento de extrusión, descritos en la bibliografía.

Materia prima/Tipo de extrusor	Condiciones óptimas de extrusión	Pretratamientos adicionales	Efectos observados sobre la biomasa	Referencia bibliográfica
Bagazo de maíz / Extrusor de husillo simple	75 rpm 125°C	No estudiado	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática 	Karunanithy y Muthukumarappan (2010b)
Pasto varilla (<i>Panicum virgatus</i>) Extrusor de husillo simple	50 rpm 150°C 15% humedad	No estudiado	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática Desacetilación 	Karunanithy y Muthukumarappan (2010a)
<i>Spartina pectinata</i> / Extrusor de husillo simple	50 rpm 50°C 25% humedad	No estudiado	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática Desacetilación 	Karunanithy y Muthukumarappan (2010a)
Pasto varilla / Extrusor de husillo simple	155 rpm 176°C 20% humedad 8 mm partícula	No estudiado	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática Desacetilación Aumento del área superficial un 50% respecto a la materia prima 	Karunanithy y Muthukumarappan (2011a)
Pasto varilla, bagazo de maíz, <i>Andropogon gerardii</i> , <i>Spartina pectinata</i> / Extrusor de husillo simple	50-150 rpm 50-150°C 15-14% humedad 2:1 y 3:1 compresión	No estudiado	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática (influencia del parámetro torque) 	Karunanithy y Muthukumarappan (2012)

Tabla 2 (continuación)

Materia prima/Tipo de extrusor	Condiciones óptimas de extrusión	Pretratamientos adicionales	Efectos observados sobre la biomasa	Referencia bibliográfica
Vainas de soja / Extrusor de doble husillo	350 rpm 80°C 40% humedad	No estudiado	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática 	Yoo <i>et al.</i> (2011)
Vainas de soja / Extrusor de doble husillo	280-350 rpm 40°C → 80°C 50% humedad	No estudiado	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática Efectividad demostrada para la producción de etanol (15,4 g/l etanol con un 10% sólidos inicial) 	Yoo <i>et al.</i> (2012)
Bagazo de maíz / Extrusor de doble husillo	80 rpm 50 y 140°C 27,5% humedad	No estudiado	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática Aumento del área superficial y de la exposición de la celulosa (SEM) 	Zhang <i>et al.</i> (2012)
Paja de arroz / Extrusor de doble husillo	40 rpm 120°C	Extracción con agua caliente catalizada por H ₂ SO ₄ (3%), 130°C, 20 min	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática Reducción del diámetro de partícula hasta 100µm 	Chen <i>et al.</i> (2011)
Vainas de soja / Extrusor de doble husillo	100°C	Extracción con agua caliente a 50°C + ultrasonidos, NaOH, H ₂ SO ₄ , NH ₃ OH	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática Deslignificación 	Karki <i>et al.</i> (2011)
Madera de abeto Douglas y eucalipto / Extrusor de doble husillo	45-120 rpm Temperatura ambiente	Reactor de agua caliente a presión (180°C)	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática Mayor alteración de las fibras (SEM) 	Lee <i>et al.</i> (2010)

Tabla 2 (continuación)

Materia prima/Tipo de extrusor	Condiciones óptimas de extrusión	Pretratamientos adicionales	Efectos observados sobre la biomasa	Referencia bibliográfica
Bagazo de maíz / Extrusor de doble husillo	500rpm	AFEX	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la digestibilidad rumiante 	Dale <i>et al.</i> (1999)
<i>Miscanthus</i> / Extrusor de doble husillo	100 rpm 100°C	Impregnación con NaOH (12% p/p) durante 40 min	<ul style="list-style-type: none"> Mejora del rendimiento de hidrólisis en base a la liberación de glucosa y xilosa Efectividad demostrada para la producción de acetato (42 mM) y de hidrógeno (82 mM) 	De Vrije <i>et al.</i> (2002)
Salvado de trigo / Extrusor de doble husillo	7Hz/150°C 3,7Hz/110°C	Impregnación con NaOH, urea, tiourea y CaCl ₂ (10% p/p cada uno)	<ul style="list-style-type: none"> Mejora del rendimiento de hidrólisis en base a la producción de azúcares reductores Deslignificación Reducción de la cristalinidad (XDR) 	Lamsal <i>et al.</i> (2010)
Vainas de soja / Extrusor de doble husillo	7Hz/150°C 3,7Hz/110°C	Impregnación con NaOH, urea, tiourea y CaCl ₂ (10% p/p cada uno)	<ul style="list-style-type: none"> Mejora del rendimiento de hidrólisis en base a la producción de azúcares reductores Deslignificación Reducción de la cristalinidad (XDR) 	Lamsal <i>et al.</i> (2010)
Pasto varilla / Extrusor de husillo simple	118 rpm 180°C 6 mm partícula	Impregnación en NaOH al 2% durante 30 min	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática 	Karunanithy y Muthukumarappan (2011c)
<i>Andropogon gerardii</i> / Extrusor de husillo simple	155 rpm 90°C 4 mm partícula	Impregnación en NaOH al 2% durante 30 min	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática 	Karunanithy y Muthukumarappan (2011d)

Tabla 2 (continuación)

Materia prima/Tipo de extrusor	Condiciones óptimas de extrusión	Pretratamientos adicionales	Efectos observados sobre la biomasa	Referencia bibliográfica
Bagazo de maíz / Extrusor de doble husillo	80 rpm 140°C 4% (p/p) NaOH/MP	Impregnación con NaOH al 14%	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora de la recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática • Aumento de la porosidad (por adsorción del tinte Congo red) 	Zhang <i>et al.</i> (2012b)
Paja de cebada / Extrusor de doble husillo	150 rpm 68°C 6% (p/p) NaOH/MP	NaOH al 10%	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora del rendimiento de hidrólisis en base a la liberación de glucosa y xilosa 	Duque <i>et al.</i> (2013)
Paja de cebada / Extrusor de doble husillo	150 rpm 68°C 8% (p/p) NaOH/MP	NaOH al 10%, neutralización con H ₃ PO ₄	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora del rendimiento de hidrólisis en base a la liberación de glucosa y xilosa • Efectividad demostrada para la producción de etanol a altas cargas de sólido (29 g/l etanol al 20% sólidos) 	Duque <i>et al.</i> (2014b)
<i>Miscanthus</i> / Extrusor de doble husillo	80 rpm 95°C 13% (p/p) NaOH/MP	NaOH (0,4 M)	<ul style="list-style-type: none"> • Efectividad demostrada para la producción de etanol a altas cargas de sólido (67 g/l etanol al 25% sólidos) 	Kang <i>et al.</i> (2013)
Paja de cebada / Extrusor de doble husillo	100 rpm 87°C 16% (p/p) NaOH/MP	NaOH (0,58M)	<ul style="list-style-type: none"> • Efectividad demostrada para la producción de etanol a altas cargas de sólido (46 g/l etanol al 20% sólidos) 	Han <i>et al.</i> (2013)
Bagazo de maíz / Extrusor de doble husillo	99°C ½ S/L ratio 6% (p/p) NaOH/MP	NaOH con preservación de calor 1h	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora de la producción de azúcares por hidrólisis enzimática • Deslignificación (71%) 	Liu <i>et al.</i> (2013)

Tabla 2 (continuación)

Materia prima/Tipo de extrusor	Condiciones óptimas de extrusión	Pretratamientos adicionales	Efectos observados sobre la biomasa	Referencia bibliográfica
Serrín de chopo / Extrusor de doble husillo	60 rpm 180°C 54% (p/p) H ₂ SO ₄ /MP	H ₂ SO ₄ (4% p/v)	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática Efectividad demostrada para la producción de etanol (40 g/l etanol al 6% sólidos, fed-batch) 	Kim <i>et al.</i> (2013)
Paja de colza / Extrusor de doble husillo	20 rpm 165°C 31-48%(p/p) H ₂ SO ₄ /MP	H ₂ SO ₄ (3,5% p/v)	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática 	Choi <i>et al.</i> 2012
Paja de colza / Extrusor de doble husillo	30 rpm 165°C 40% (p/p) H ₂ SO ₄ /MP	H ₂ SO ₄ (3% p/v)	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la producción de azúcares por hidrólisis enzimática 	Choi <i>et al.</i> (2013a)
Paja de colza / Extrusor de doble husillo	60 rpm 165°C 27% (p/p) H ₂ SO ₄ /MP	H ₂ SO ₄ (2% p/v)	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática Efectividad demostrada para la producción de etanol (16 g/l etanol al 6% extrusado) 	Choi <i>et al.</i> (2013b)
Paja de colza / Extrusor de doble husillo	20 rpm 170°C 1:3 S/L	Agua caliente ó NaOH (0,5% p/v) ó H ₂ SO ₄ (2% p/v)	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática Reducción del tamaño de partícula y de la cristalinidad (XRD) a temperaturas altas 	Um <i>et al.</i> (2013)
Bagazo de maíz / Extrusor de husillo simple	155 rpm 90 → 180°C	0,3 g polietilen-glicol/g glucano	<ul style="list-style-type: none"> Mejora de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática 	Eckard <i>et al.</i> (2011)

Tabla 2 (final)

Materia prima/Tipo de extrusor	Condiciones óptimas de extrusión	Pretratamientos adicionales	Efectos observados sobre la biomasa	Referencia bibliográfica
Madera de abeto Douglas / Extrusor de doble husillo contra-rotativo	50 rpm	Etilen-glicol	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática • Mayor fibrilación (SEM) 	Lee <i>et al.</i> (2009)
Bagazo de caña de azúcar / Extrusor de doble husillo	15 rpm 140°C 25 y 50% (p/p) LI/MP	Líquido iónico (LI) [Emim]-[Ac]	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora de la producción de glucosa por hidrólisis enzimática • Descenso en la cristalinidad (WAXD) y aumento del área superficial (FE-SEM) 	Da Silva <i>et al.</i> (2013)
Pasto varilla y <i>Spartina pectinata</i> / Extrusor de husillo simple	155 rpm 176 y 180°C 8 mm partícula 20% humedad	Ozonización 37-365 mg ozono/h 2,5-10 min	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora de la recuperación de glucosa por hidrólisis enzimática • Desacetilación 	Karunanithy <i>et al.</i> (2014)
Paja de cebada / Extrusor de doble husillo	150 rpm 68 y 50°C 8% (p/p) NaOH/MP 2,5% (p/p) proteínas/MP	NaOH al 10%, neutralización con H ₃ PO ₄ y adición de enzimas en el extrusor	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora de la producción de azúcares por hidrólisis enzimática • Solubilización de azúcares (17%) • Reducción del tamaño de partícula 	Duque <i>et al.</i> (2014a)
Residuo de maíz, bagazo de agave, residuo de palma aceitera, paja de cebada / Extrusor de doble husillo	85-200 rpm 68-100°C 7,5-12,6% (p/p) NaOH/MP 2,5-11% (p/p) proteínas/MP	NaOH, neutralización con H ₃ PO ₄ y adición de enzimas en el extrusor	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora de la producción de azúcares por hidrólisis enzimática • Solubilización de hemicelulosa • Aumento de la cantidad de celulosa tipo II 	Vandenbossche <i>et al.</i> (2014)

Como se puede ver en la tabla 2, se han ensayado una gran variedad de materias primas para su pretratamiento mediante extrusión. La mayor parte de los estudios se han realizado sobre residuos agrícolas, que son más blandos y fáciles de extrusar; sin embargo, algunos investigadores han utilizado maderas de chopo (Kim *et al.*, 2013), abeto y eucalipto (Lee *et al.*, 2009, 2010).

En el análisis de los resultados publicados, es necesario puntualizar que existe una gran heterogeneidad en cuanto a la forma de calcular los rendimientos de azúcares y etanol. Según el autor, éstos se expresan en base al contenido de celulosa y hemicelulosa en la materia prima, respecto al material extrusado por peso de material completo añadido al experimento, o referidos a la cantidad de glucosa y xilosa potenciales expresados en porcentaje. Por ello, en la tabla no se han mostrado los resultados cuantificables extraídos directamente de los artículos, porque es difícil comparar directamente entre ellos, si bien se ha tratado de recoger los efectos principales producidos por la extrusión.

En cuanto al tipo de equipos de extrusión empleado, la mayor parte de los estudios publicados se llevaron a cabo en extrusores de doble husillo de tipo corrotativo, que son los más adecuados para el tratamiento de la biomasa, debido a que producen una buena mezcla dispersiva (Sentruk-Ozer *et al.*, 2011). El tipo de extrusor es un factor que puede influir en los resultados finales, ya que los efectos mecánicos no son iguales cuando se cuenta con un extrusor de husillo simple o doble.

En la mayoría de casos se emplearon velocidades de tornillo no muy altas (<150 rpm), con vistas a intentar conseguir un mayor tiempo de residencia dentro del extrusor, ya que son equipos que se caracterizan por tiempos cortos de tratamiento. Las temperaturas empleadas son muy variables, oscilando entre 50 y 180°C. Numerosos trabajos emplean temperaturas por encima de 90°C, pero temperaturas más bajas también se mostraron efectivas, por ejemplo, para el pretratamiento de *Spartina pectinata* (Karunanithy y Muthukumarappan, 2010a), vainas de soja (Yoo *et al.*, 2011, 2012), madera de abeto y eucalipto (Lee *et al.*, 2010), *Andropogon gerardii* (Karunanithy y Muthukumarappan, 2011d) o paja de cebada (Duque *et al.*, 2013, 2014b; Han *et al.*, 2013). La posibilidad de usar una temperatura de operación más baja conservando una efectividad razonable, influiría positivamente en el balance energético del pretratamiento.

De la bibliografía publicada se puede inferir que la extrusión como único pretratamiento produce una serie de efectos sobre las fibras de la biomasa. Así, se ha descrito que la extrusión como tal produce un aumento del área superficial y una mayor exposición de las fibras (Karunanithy y Muthukumarappan, 2011a; Chen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012a; Lee *et al.*, 2009, 2010...). También se observaron cambios en la cristalinidad, aunque éstos no presentan una tendencia clara. Por ejemplo, Yoo *et al.* (2011) hallaron un aumento de la cristalinidad de tipo I en los sustratos extrusados,

lo que atribuyeron a la cristalización de la celulosa amorfa. Sin embargo, Zhang *et al.* (2012a) observaron la transición de CrI a CrII, sin que se produjesen cambios significativos en la cristalinidad global.

Estos mismos efectos se observan al combinar la extrusión con otros pretratamientos, si bien en estos casos, resulta difícil determinar cuál es la contribución real de cada pretratamiento al efecto obtenido sobre la biomasa. Así, Dale *et al.* (2009), Liu *et al.* (2013) y Duque *et al.* (2014a) constataron una ruptura mecánica de las fibras y una reducción del tamaño de partícula en extrusiones alcalinas en un proceso AFEX y con NaOH, respectivamente. Autores como Da Silva *et al.* (2013), Um *et al.* (2013) y Lamsal *et al.* (2010) encontraron que la extrusión combinada con diferentes reactivos (álcali, ácido, agua caliente y líquido iónico) producía un descenso del grado de cristalinidad, y en concreto Um *et al.* (2013) relacionan una disminución en este parámetro con el aumento de la eficacia de la sacarificación. Sin embargo, sí es posible hablar de que la extrusión reactiva potencia el aumento del área superficial de los extrusados, bien mediante la hidrólisis parcial de la hemicelulosa, lo que despeja el acceso a la celulosa (observado en pretratamientos de extrusión con ácido y con extracción con agua caliente como los de Lee *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2013a y b), o bien a través de cambios en la lignina (una cierta deslignificación fue observada en pretratamientos alcalinos por De Vrije *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2012b; Khang *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013, y Lamsal *et al.*, 2010).

Una observación importante es que, en las condiciones descritas en la bibliografía, no se produjeron inhibidores (furfural, HMF, ácido acético) durante el pretratamiento, o lo hicieron en cantidades por debajo de los niveles considerados críticos.

4. 2. Hidrólisis enzimática

La utilización de la ruta bioquímica supone llevar a cabo una etapa de hidrólisis con catalizadores biológicos (enzimas) para romper los polisacáridos de la biomasa en unidades monoméricas que puedan ser metabolizadas por los microorganismos fermentadores para producir etanol. Esto se logra gracias a la acción combinada de diferentes enzimas hidrolíticas.

Existen diferentes tipos de enzimas hidrolíticas, dependiendo del tipo de carbohidrato sobre el que actúe o enlace que rompan específicamente: celulasas, xilanasas, celobiasas, esterasas, arabinofurosidases, etc. Debido a la complejidad de la biomasa lignocelulósica, son necesarias varias actividades para obtener una hidrólisis de los carbohidratos contenidos en ella. Los dos grupos de enzimas más relevantes para la hidrólisis de la lignocelulosa son las enzimas celulolíticas y las hemicelulolíticas,

ya que estos son sus polímeros principales. No obstante, las actividades concretas y su proporción correcta dependen del tipo de material y del pretratamiento al que ha sido sometido.

4. 2. 1. Enzimas

4. 2. 1. 1. *Enzimas celulolíticas*

Las enzimas celulolíticas o celulasas son producidas por un gran número y variedad de microorganismos, incluyendo hongos y bacterias, como parte de su metabolismo. Estos microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios, termofílicos o mesofílicos. Dentro de ellos, los géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* y *Aspergillus* son los productores de celulasas más estudiados. El hongo filamentoso *Trichoderma reesei* es actualmente un modelo de producción eficiente de celulasas y hemicelulasas, y como tal lidera la producción a escala comercial.

Las celulasas tienen por lo general una estructura modular, compuesta por un módulo de unión a la celulosa (*carbohydrate binding module*, CBM) y un núcleo o dominio catalítico (*catalytic domain*, CD), unidos entre sí mediante un conector flexible y frecuentemente glicosilado (Quinlan *et al.*, 2010). La función de los CBM es facilitar la transferencia entre la fase soluble y el sustrato insoluble. La unión del CBM a la celulosa libera un oligoglucano de cadena corta, facilitando así su asociación con el CD.

Las enzimas celulolíticas se pueden clasificar en tres grandes grupos: las endoglucanasas, las celobiohidrolasas y las β -glucosidasas.

Las **endoglucanasas** (EG) son enzimas endocelulasas que actúan de forma no progresiva, rompiendo aleatoriamente los enlaces $\beta(1-4)$ dentro de la cadena, dando lugar a cadenas de glucosas más cortas y disminuyendo rápidamente el grado de polimerización. Tienen una preferencia catalítica por la celulosa no cristalina. La configuración de su dominio catalítico, más abierto, es el responsable de su acción no progresiva y su endo-actividad.

Las **celobiohidrolasas** (CBH) son exoglucanasas progresivas que hidrolizan los enlaces $\beta(1-4)$ de la cadena de celulosa a partir de los extremos liberando celobiosa o glucosa, produciendo una disminución gradual en el grado de polimerización. Su actividad se desarrolla sobre la celulosa cristalina. Existen dos tipos de celobiohidrolasas, CBH-I y CBH-II, que actúan sobre el extremo reductor y no reductor de la cadena de celulosa, respectivamente. Sus sitios activos se encuentran en un túnel en el CD, a lo que se atribuye su actuación progresiva.

Por último, las enzimas **β -glucosidasas** (BG) atacan a la celobiosa y a los oligosacáridos (celodextrinas), liberados por la acción de las exoglucanasas, y los hidrolizan a D-glucosa.

Entre estas tres actividades enzimáticas existen diferentes sinergias (Quinlan *et al.*, 2010), como la sinergia exo-endo, que consiste en que la despolimerización causada por la acción primera de las endoglucanasas genera nuevos extremos sobre los que pueden actuar a continuación las exoglucanasas, o la sinergia exo-exo, por la que la acción combinada de las CBH-I y CBH-II desprenden capas de celulosa, creando nuevos puntos de unión para las enzimas. Una sinergia muy importante es la que se establece entre las CBHs y la BG; la actividad de las celobiohidrolasas es inhibida por la propia celobiosa que producen, por lo que el papel de la β -glucosidasa en la preparación enzimática es muy relevante, al reducir el nivel de celobiosa en el medio (Bezerra y Dias, 2005). Además, existen sinergias con la adición de hemicelulasas y β -xilosidasas.

4. 2. 1. 2. Otras enzimas implicadas en la hidrólisis de la celulosa

Más recientemente se ha descubierto una familia de enzimas que producen una ruptura oxidativa de la celulosa, las monooxigenasas poliméricas líticas (Horn *et al.*, 2012). Éstas poseen sitios de unión planos, que se adherirían a las superficies cristalinas planas del sustrato, cortando el polímero e introduciendo a la vez un grupo cargado. El producto de esta reacción no es un azúcar, sino el ácido glucónico. La inclusión de este grupo de enzimas en los cócteles hidrolíticos requiere de un estudio previo de optimización, ya que, por una parte, la actividad oxidativa genera más sitios de unión para las enzimas hidrolíticas, mientras que, por otro lado, se produce una pérdida de etanol potencial, debido a la formación del ácido glucónico, que no puede ser metabolizado por los microorganismos.

En los últimos tiempos, se ha descrito el papel que podrían jugar en la hidrólisis de los carbohidratos otras proteínas no hidrolíticas que remodelan la pared celular, tales como las expansinas, identificadas en plantas. Se ha planteado que estas proteínas afectan los puentes de hidrógeno que unen los filamentos de celulosa y de la celulosa con otros polisacáridos, mediante un proceso no enzimático, que favorece la posterior degradación de la pared celular (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). Actuarían así en combinación con las celulasas favoreciendo la liberación de azúcares y haciendo más eficiente el proceso de hidrólisis. Del mismo modo, se han identificado otras enzimas pertenecientes a este mismo grupo de proteínas no hidrolíticas, tales como las *swolleninas* y *looseninas* por su potencial en la mejora de la hidrólisis de los carbohidratos. Como las expansinas, su efecto se atribuye a facilitar la acción de las enzimas hidrolíticas y oxidativas promoviendo la amorfogénesis del sustrato, abriendo

de este modo la pared y mejorando el acceso de las enzimas catalíticas a los enlaces glicosídicos de los polisacáridos (Gourlay *et al.*, 2013).

En la figura 13 se muestra el modelo propuesto por Horn *et al.* (2012) para la hidrólisis enzimática de la celulosa, teniendo en cuenta todas las enzimas celulolíticas que intervienen.

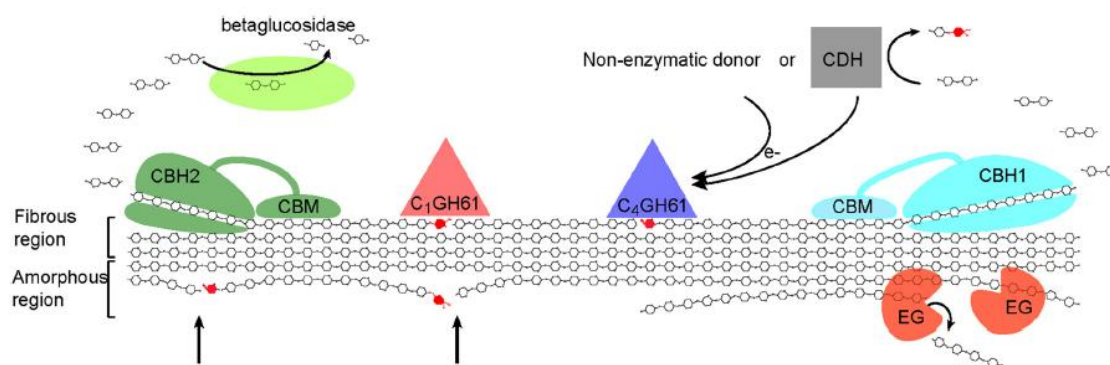


Figura 13- Modelo propuesto para la hidrólisis enzimática de la celulosa (Horn *et al.*, 2012). EG = endoglucanasa; CBH = celobiohidrolasa; CDH = celobiosa-deshidrogenasa; CBM = módulo de unión a carbohidratos; CGH61 = monooxigenasa polimérica lítica (atacan a carbonos C1 o C4).

4. 2. 1. 3. Enzimas hemicelulolíticas

Las hemicelulasas constituyen un tipo de enzimas relacionadas con la hidrólisis de la hemicelulosa presente en los materiales lignocelulósicos. Debido a la heterogeneidad estructural del polímero de hemicelulosa, existe una gran variedad de enzimas hemicelulasas.

Los esqueletos de los diferentes tipos de hemicelulosa son hidrolizados por diferentes grupos de enzimas específicos. Así, el xilano necesita las actividades β -1,4-endoxilanasas y β -1,4-xilosidasas para ser hidrolizado, galactanos y mananos precisan de β -1,4-endomananasas y β -1,4-manosidasas, y xiloglucanos se hidrolizan con β -1,4-endoglucanasas y β -1,4-glucosidasas (Van den Brinck y De Vries, 2011). La β -xilosidasa, por otro lado, libera monómeros de xilosa de los extremos no reductores de los xilooligosacáridos y xilobiosa producidos por las enzimas anteriores.

Para degradar completamente la hemicelulosa, de forma coordinada se tienen que liberar todas las sustituciones de la cadena principal, lo que requiere de la acción de otras enzimas accesorias, de las que se han descrito al menos nueve actividades diferentes (Coutinho *et al.*, 2009): α -L- arabinofurosidasa, α -xilosidasa, α -fucosidasa, α -

arabinofuranohidrolasa, α -D-glucuronosidasa, α -D-galactosidasa, acetilxilanoesterasa, ferúlico esterasa y cumárico esterasa.

En el caso de los arabinoxilanos de las pajas de cereal, se necesitaría un cóctel formado por endoxilanasas y β -xilosidasas para romper el esqueleto del xilano en pequeños xilooligosacáridos e hidrolizar estos a D-xilosa, respectivamente. Además, se necesitarían las siguientes enzimas accesorias para separar los residuos de L-arabinosa: α -L-arabinofuranosidasa y α -arabinofuranohidrolasa. Los residuos de ácido 4-O-metilglucurónico, por su parte, serían hidrolizados por α -glucuronosidasa, la D-galactosa por la β -D-galactosidasa, los grupos acetilo por acetil xilano esterases y los grupos ferúlicos por la feruloil esterasa (De Vries, 2003).

Las enzimas hemicelulolíticas no sólo degradan la hemicelulosa, sino que se ha demostrado que ayudan a la hidrólisis de la celulosa, retirando las cadenas de hemicelulosa y por lo tanto haciendo más accesible el glucano (Quinlan *et al.*, 2010), por lo que su presencia en los cócteles enzimáticos es doblemente importante.

4. 2. 2. Factores que afectan a la hidrólisis enzimática

La cinética de hidrólisis de la celulosa consta de dos fases: una rápida inicial, seguida por una fase lenta en la que la hidrólisis se acerca a su conversión límite. Si bien la primera fase es altamente dependiente de la concentración inicial de enzima, la segunda depende más del tipo de actividades presentes en la mezcla enzimática (Quinlan *et al.*, 2010).

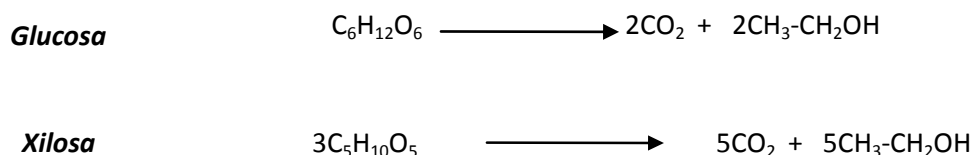
Actualmente existen numerosos preparados comerciales que contienen las actividades nombradas es el Apartado 3.2.1. o una mezcla de ellas, que normalmente consiguen hidrolizar de forma eficiente los materiales lignocelulósicos pretratados. Sin embargo, las cantidades relativamente altas de catalizador que son necesarias hacen que sea muy importante, por un lado, optimizar al máximo la efectividad del pretratamiento, para trabajar así sobre las limitaciones que impone el propio sustrato, y por otro lado, desarrollar nuevos preparados enzimáticos y/o mejorar los ya existentes.

En cuanto a las limitaciones del sustrato, la celulosa es de por sí un sustrato heterogéneo con zonas de cristalinidad diferente, pero las dificultades aumentan en sustratos lignocelulósicos y con el transcurso del tiempo, ya que, a medida que avanza la hidrólisis, van quedando las zonas más recalcitrantes a la acción de las enzimas. Según Alvira *et al.* (2010) existen una serie de factores principales que dependen del material y que limitan la eficacia de la hidrólisis enzimática, estos son: el grado de cristalinidad de la celulosa, su grado de polimerización, el área superficial accesible, el contenido y distribución de la lignina, el contenido de hemicelulosa, las características físico-químicas de la biomasa y la efectividad de la etapa previa de pretratamiento.

Por otra parte, la inhibición y la pérdida de la actividad enzimática son dos factores asociados al enzima que impiden llegar a la conversión total de la celulosa. La pérdida de actividad de las enzimas puede ocurrir por fenómenos de inhibición a partir de los productos, por la formación de uniones improductivas con la lignina y la hemicelulosa, o por impedimentos de tipo espacial al progreso de la hidrólisis. Frente a estas limitaciones se están explorando diferentes vías para la mejora de la actividad enzimática per se. Así, los estudios actuales se enfocan hacia la selección de nuevos microorganismos productores de enzimas, la mutagénesis al azar de los ya conocidos y la ingeniería genética sobre las propias enzimas. Los objetivos finales son aumentar la actividad específica de las enzimas, modificar la interacción de los módulos de unión a carbohidratos e incrementar la resistencia a los productos finales, las altas cargas de sólido, la temperatura y el pH (Jørgensen *et al.*, 2007a).

4. 3. Fermentación

En la etapa de fermentación biológica, los azúcares liberados en forma monomérica durante la hidrólisis son transformados a etanol. La fermentación alcohólica es un proceso bien conocido, en la que los azúcares monoméricos, glucosa y/o xilosa son transformados en etanol y CO₂.



Estequiométricamente, el factor de conversión de glucosa y la xilosa a etanol es de 0,51 g etanol/g azúcar. Sin embargo, hay que tener en cuenta que parte del sustrato consumido es empleado en el propio metabolismo celular, lo que, junto con otras posibles ineficiencias del proceso, hace que no se llegue a alcanzar el rendimiento teórico en una fermentación real. El objetivo es acercarse a este valor teórico y al mismo tiempo conseguir productividades volumétricas de etanol superiores a 2 g/L·h (Olsson *et al.*, 2005).

Los microorganismos generalmente empleados para la producción de etanol son las levaduras, y dentro de estas, la más utilizada es la *Saccharomyces cerevisiae*. Otras cepas tales como *Kluyveromyces marxianus* también han sido objeto de estudio, pero actualmente, y dentro del proceso de producción de etanol combustible, es *S. cerevisiae* la única levadura usada a escala industrial gracias a sus elevados

rendimientos de fermentación, a su alta tolerancia a los productos de inhibición que suelen originarse durante la etapa de pretratamiento y a su rápido crecimiento en condiciones anaerobias (Mussatto *et al.*, 2010). Este organismo tiene una productividad de etanol que puede llegar a superar los 0,45 g/g en condiciones óptimas, y una alta velocidad específica (hasta 1,3 g/g masa celular/h) y tolerancia al etanol (llega hasta valores de 100 g/l dependiendo de la cepa y las condiciones del medio) (Olofsson *et al.*, 2008a). Sin embargo, esta levadura solo tiene la capacidad de fermentar hexosas, tales como la glucosa, manosa y galactosa, a etanol. Además, en el caso de la galactosa, la capacidad de fermentación depende de la cepa y los genes correspondientes son reprimidos por la glucosa, por lo que se produce una fermentación secuencial de ambos azúcares (Olofsson *et al.*, 2008a). La falta de capacidad de fermentación de pentosas de *S. cerevisiae* supone una importante limitación, debido a que en el medio de fermentación tras la hidrólisis enzimática se encuentran no sólo hexosas, sino también las pentosas liberadas por la acción de las enzimas. Por ello, existe una fracción de azúcares que no son fermentados a etanol por este microorganismo, lo que resulta en una pérdida del rendimiento potencial del proceso.

Existen en la naturaleza géneros de microorganismos capaces de fermentar las pentosas a etanol, siendo los más estudiados *Pachysolen tannophilus* y *Scheffersomyces stipitis*; sin embargo, estos tienen el inconveniente de que normalmente sus productividades son más bajas que las de los fermentadores de hexosas. Por ello, se está estudiando otras alternativas que permitan fermentar estas azúcares y maximizar el rendimiento global de etanol. Una de las vías abiertas más prometedoras es la manipulación genética de, por ejemplo, *S. cerevisiae* para convertirla en un microorganismo fermentador de xilosa y arabinosa. Esto se puede lograr introduciendo genes de bacterias que codifican la enzima xilosa isomerasa, o genes de levaduras con capacidad de fermentar C5 que codifican la xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa. Además se necesita sobreexpresar el gen codificador de la xiluloquinasa (Karhumaa *et al.*, 2005; Kuyper *et al.*, 2005; Walfridsson *et al.*, 1997; Kötter *et al.*, 1990; Eliasson *et al.*, 2000). La xilosa es transportada en *S. cerevisiae* por las mismas proteínas que transportan las hexosas, pero su afinidad es mucho menor, por lo que la utilización de la xilosa es inhibida por competencia con la glucosa (Kötter y Ciriacy, 1993). Así, para obtener una co-fermentación efectiva es necesario mantener la glucosa en niveles bajos (Olofsson *et al.*, 2008a).

Por otra parte, las técnicas de manipulación genética también se han aplicado a otros microorganismos tales como las bacterias, para la utilización de todos los azúcares C6 y C5 presentes en la biomasa. Una de las posibilidades es la introducción de los genes relacionados con la producción de etanol en bacterias entéricas como *Escherichia coli*, o la introducción de los genes de la ruta de la fermentación de las pentosas en bacterias etanológicas como *Zymomonas mobilis*. Una aproximación

muy prometedora ha consistido en la introducción en *E.coli* de los genes para alcohol deshidrogenasa y piruvato descarboxilasa de *Z.mobilis* (Ingram *et al.*, 1998). Una cepa recombinante *E.coli* K011, que tiene estas dos enzimas sobreexpresadas ha mostrado buenos resultados en la producción de etanol a partir de sustratos lignocelulósicos tales como zuros de maíz y cascarilla de cebada (Dien *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 2008).

Las herramientas de ingeniería genética, metabólica y evolutiva también son clave para aumentar la resistencia de las cepas a los diferentes estreses que deben afrontar durante el proceso de fermentación. Así los microorganismos deben enfrentarse al estrés osmótico producido por las altas concentraciones de azúcar (alcanzables por medio de HE a altas cargas de sólidos), el estrés por la concentración de etanol al final de la fermentación, el estrés derivado de las condiciones anaeróbicas y el producido por los procesos de reciclaje de células tras la fermentación (Mussatto *et al.*, 2010).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que pueden encontrarse en los hidrolizados, productos de degradación de los azúcares y la lignina que son potenciales inhibidores de la fermentación, como son los ácidos débiles (ácido acético), los furanos (furfural y HMF) y los derivados fenólicos (aldehídos, cetonas, ácidos, alcoholes). La presencia y efecto de estos inhibidores puede evitarse actuando sobre el tipo de pretratamiento aplicado a la biomasa (condiciones severas de temperatura y catalizador favorecen la formación de estos compuestos), llevando a cabo un proceso de destoxificación, cambiando el modo de operación, de forma que haya una adaptación progresiva del microorganismo, o trabajando con microorganismos más resistentes (Tahezadeh y Karimi, 2011).

4. 4. Configuraciones de proceso de hidrólisis enzimática y fermentación

Dentro de los procesos de obtención de etanol por vía enzimática se han estudiado diferentes configuraciones dependiendo de la manera en que se lleven a cabo las etapas de hidrólisis y fermentación (Figura 14). La fermentación se puede realizar tras la hidrólisis en una etapa separada utilizando otro reactor, en una configuración denominada **HFS, hidrólisis y fermentación separadas**. Esta configuración tiene la ventaja de que ambas etapas pueden realizarse bajo sus condiciones óptimas de temperatura; en torno a 50°C en la hidrólisis enzimática, mientras que la fermentación se realiza a la temperatura óptima del microorganismo fermentador (32-35°C). Además, esta forma de operación facilita la recuperación de las levaduras tras la fermentación, ya que los sólidos insolubles que no han sido hidrolizados pueden retirarse fácilmente, llevándose a cabo la fermentación en medio líquido (Olsson *et al.*, 2005). Su principal inconveniente es que la glucosa y la celobiosa

liberadas durante la etapa de hidrólisis enzimática inhiben los enzimas implicados en el proceso, disminuyendo los rendimientos de sacarificación.

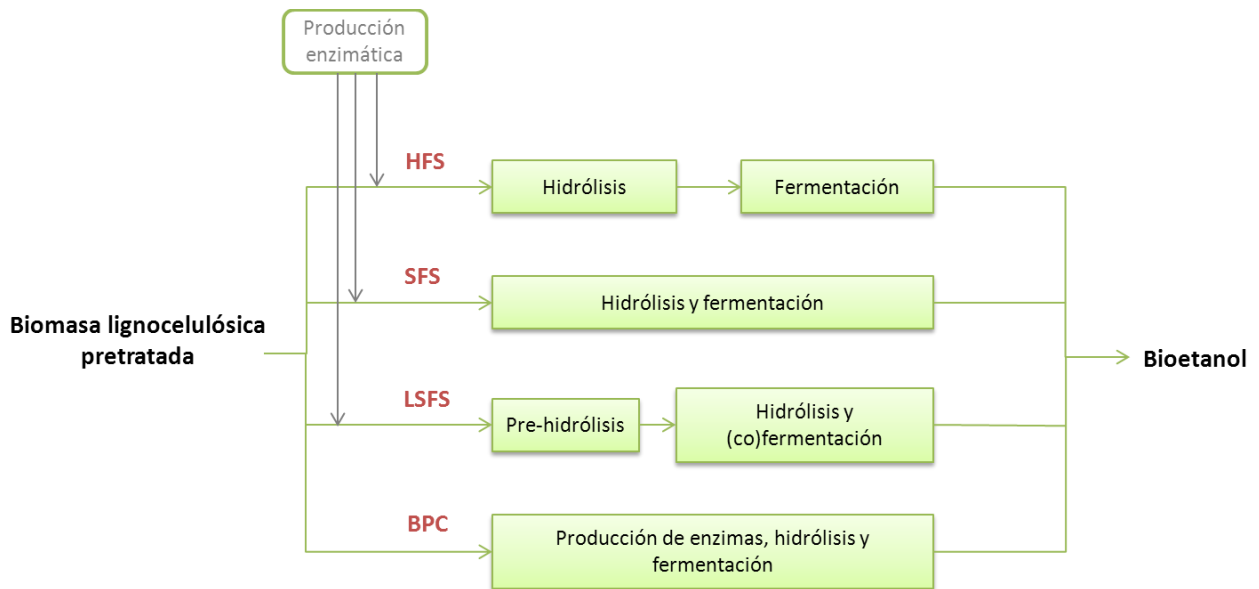


Figura 14- Esquema de las diferentes configuraciones posibles de las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación dentro de la ruta bioquímica para la producción de bioetanol de segunda generación.

Para solucionar el problema de la inhibición por producto final y avanzar en la integración de las distintas etapas del proceso, se planteó la estrategia de **sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)**. Esta estrategia, en la que ambos procesos ocurren a la vez a una temperatura de compromiso, cercana al óptimo de la fermentación, ofrece ventajas tanto desde el punto de vista energético como operacional (Olofsson *et al.*, 2008a), puesto que los azúcares son consumidos a medida que se van liberando por hidrólisis de los polisacáridos, evitando así el efecto inhibitorio de éstos sobre las propias enzimas. El etanol también puede llegar a tener un efecto inhibitorio de la hidrólisis, sin embargo, éste es mucho menor que el de la glucosa y la celobiosa. Además, la utilización de un único reactor donde se lleven a cabo las dos etapas representa una simplificación del proceso, reduciendo los costes de inversión (Ballesteros *et al.*, 2004). En el lado de los inconvenientes estarían la dificultad para recuperar los microorganismos tras la fermentación, debido a la presencia de la lignina. Otro de los retos importantes planteados a la hora de abordar el proceso de producción de etanol mediante SFS es la de llevar a cabo el proceso en condiciones de alta carga de sólidos. El empleo de altas cargas de sólidos en el proceso de hidrólisis y fermentación de la biomasa lignocelulósica es necesario para mejorar el balance económico y energético del proceso, ya que la concentración de azúcares (y en consecuencia la concentración final de etanol) son mayores, lo cual tiene un impacto

significativo en la reducción del tamaño de los equipos y de la cantidad de energía utilizada. La concentración de etanol mínima después de la fermentación se estima que debería ser de al menos un 4% v/v, para que el proceso sea económicamente viable, lo que implica usar concentraciones de sólidos de un 15% p/p o mayores (Jørgensen et al., 2007b).

Una forma de afrontar las altas cargas de sólidos es cambiar el modo tradicional de operar en SFS, de operación por lotes, a una alimentación progresiva o "**fed-batch**". En los casos en que hay presencia de compuestos derivados del pretratamiento inhibidores de la fermentación, con la estrategia *fed-batch* se consigue mantener los niveles de inhibidores más bajos al inicio de la SFS y durante todo el proceso, debido a la metabolización continua de estos compuestos por parte de los microorganismos. Además, la adición secuencial del sustrato consigue que la viscosidad del medio nunca sea demasiado alta (generando problemas de transferencia de masa y calor), ya que las fibras se van hidrolizando gradualmente.

Los avances realizados durante los últimos años en el desarrollo de enzimas y microorganismos más robustos en cuanto a la presencia de inhibidores (azúcares y/u otros productos) han minimizado la relevancia de la SFS como estrategia para la reducción de la inhibición por producto en la hidrólisis, e impulsado los esfuerzos investigadores hacia otras estrategias alternativas, tales como la **licuefacción más sacarificación y fermentación simultáneas (LSFS)**. Ésta comprende una etapa corta de pre-hidrólisis o licuefacción a la temperatura óptima de las enzimas, seguida por la inoculación e incubación a la temperatura óptima del microorganismo fermentador. La LSFS es especialmente adecuada para las altas cargas de sólidos, ya que se consigue una reducción de la viscosidad del medio durante las primeras horas, a la vez que se producen mayores concentraciones de azúcares, debido a que las enzimas trabajan en su óptimo durante la fase de licuefacción.

Un mayor nivel de integración se consigue con la licuefacción **sacarificación y co-fermentación simultáneas (LSCFS)**, donde se usan cultivos mixtos o microorganismos recombinantes para llegar a una co-fermentación de las pentosas y las hexosas. En un primer momento se investigaron los cultivos mixtos de especies compatibles en términos de condiciones de operación (pH y temperatura). Sin embargo, además de la dificultad en la selección de las especies, pueden aparecer problemas debido a la baja velocidad de crecimiento de los microorganismos fermentadores de pentosas, lo que lleva a una conversión mayor de las hexosas a etanol. La otra posibilidad es el uso de un microorganismo modificado genéticamente para asimilar hexosas y pentosas y convertirlas a etanol (ver apartado 4.3.). En el caso de la LSCFS el empleo de una técnica *fed-batch* presenta una ventaja añadida a las ya expuestas: el hecho de que se mantengan los niveles de glucosa bajos durante todo el proceso promueve la asimilación de la xilosa (Olofsson et al., 2008b).

Por último, el mayor grado de integración del proceso de conversión biológica de bioetanol, es el **bioproceso consolidado (BPC)**. Consiste en la utilización de un único microorganismo que sea el productor de las enzimas para la hidrólisis y a la vez fermentador de los azúcares producidos a etanol. Sin embargo, no existe en la naturaleza un microorganismo ideal capaz de transformar directamente la lignocelulosa a etanol de forma eficiente y por ello se requiere desarrollar nuevos microorganismos mediante ingeniería genética y metabólica. Actualmente existen dos líneas de investigación abiertas en este campo. Una de ellas implica la modificación genética de organismos productores de celulasas para mejorar sus propiedades respecto al producto (reprimiendo la producción de sub-productos como el ácido láctico o el lactato y aumentando la tolerancia al etanol). Dentro de los microorganismos celulolíticos, son particularmente interesantes algunos organismos termofílicos anaerobios del género *Clostridium* (Manzanares, 2010). Concretamente, una gran parte de los estudios sobre BCP utilizaron *Clostridium thermocellum* para la producción de enzimas, la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de la glucosa, mientras que *C. thermosaccharolyticum* es un microorganismo capaz de fermentar tanto glucosa como pentosas a etanol. La segunda línea de investigación sobre manipulación genética de microorganismos para emplearlos en un proceso BCP consiste en la modificación de fermentadores con altos rendimientos de etanol para que produzcan también celulasas (Hasunuma *et al.*, 2013). Dentro de esta estrategia, ha sido especialmente estudiada la expresión de enzimas hidrolíticas de polisacáridos en *S. cerevisiae*. Ambas estrategias (la nativa y la recombinante celulolíticas) siguen en etapa de investigación en el laboratorio (Lynd *et al.*, 2005) y las dos merecen ser estudiadas. Yan y Wyman (2007) reconocen un potencial del BPC para disminuir los costes del proceso, sobre todo en cuanto a los costes asociados a la producción de enzimas, pero es una tecnología que todavía necesita avanzar en cuanto a la selectividad y rendimientos probados en sustratos reales.

4. 5. Recuperación y purificación del etanol

El caldo después de la fermentación está compuesto mayoritariamente por agua y una fracción de etanol que varía normalmente entre el 2,5 y el 10% en peso. Además, dependiendo del proceso de obtención del bioetanol, puede contener: células de los microorganismos fermentadores, azúcares no fermentados, oligosacáridos provenientes de la hidrólisis incompleta de la celulosa y hemicelulosa, lignina, sub-productos de la fermentación como el glicerol, ácido láctico por la contaminación con bacterias, ácido acético, CO₂ disuelto, sales y productos del metabolismo celular, etc. (Sánchez y Cardona, 2007).

El método más sencillo y ampliamente utilizado para la recuperación del etanol después de la fermentación es la destilación acoplada con una rectificación y una

deshidratación (Sánchez y Cardona, 2008). Un esquema representativo de este proceso, siendo la etapa de deshidratación mediante tamices moleculares, se muestra en la figura 15.

La destilación convencional a presión atmosférica o por encima de ésta es el método convencional usado para la separación del etanol. A pesar de haber sido cuestionado su uso para esta aplicación por su alto coste, las tecnologías de destilación más avanzadas la convierten en un proceso viable y con un consumo energético bajo para la producción de etanol de grado carburante (Madson, 2003).

La etapa de destilación, a su vez, comprende al menos dos columnas: una columna de concentración, que alcanza concentraciones de etanol a la salida de hasta 35-45% en peso, y la de rectificación, donde se llega, dependiendo de la eficacia de la columna, hasta un 90-92% en peso de etanol (Sánchez y Cardona, 2008) (Figura 15).

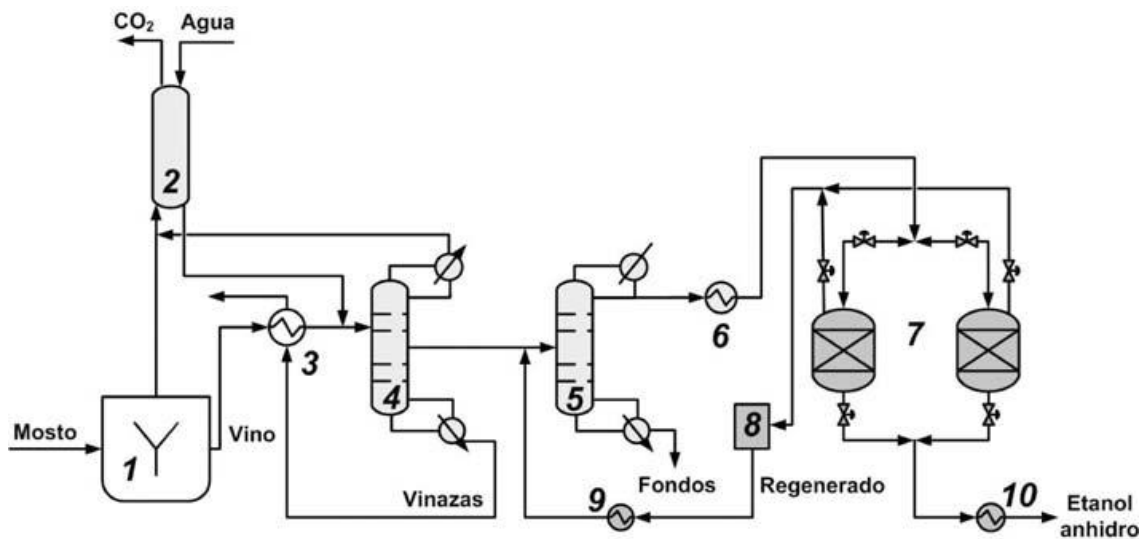


Figura 15- Esquema tecnológico para la separación y deshidratación de etanol por adsorción usando tamices moleculares. 1. Fermentador. 2. Lavador de gases. 3. Precalentador. 4. Columna de concentración. 5. Columna de rectificación. 6,9. Intercambiadores de calor. 7. Tamices moleculares. 8. Tanque de regenerado. 10. Enfriador del producto.

En el esquema mostrado en la figura 15, el fermentador (1) presenta una salida de gases (CO_2 , etanol, vapor de agua y otras sustancias volátiles) que lleva a un lavador por *stripping* con agua (2), donde se recupera hasta el 98% del etanol volatilizado y se vuelve a mezclar con el caldo de entrada a la primera torre de destilación (4), que previamente ha sido precalentado (3). En la columna de concentración (4), la corriente de etanol concentrado hasta un 35-45% se saca por un lateral, las cabezas de la torre se llevan al lavador de gases (2) y en los fondos se acumulan todos los sólidos insolubles presentes en el caldo de la fermentación. El calor de estos fondos puede

usarse para precalentar el mosto a la entrada de la torre. A continuación, la corriente de etanol pasa a la rectificación (5), donde se llega a concentrar hasta un 90-92% en peso en cabezas. Los fondos de esta columna son prácticamente agua pura, con una pequeña concentración de etanol, aproximadamente un 1% en peso.

Mediante rectificación, la máxima concentración de salida del etanol alcanzable estará siempre por debajo de la mezcla azeotrópica con el agua (95,6% en peso), por eso se necesitan métodos no convencionales adicionales que permitan separar el agua del etanol, como las destilaciones azeotrópica y extractiva, la adsorción o la pervaporación. En esta etapa de deshidratación se concentra el etanol obtenido a partir de la fermentación hasta el grado de etanol anhidro, 99% en peso.

Las **destilaciones azeotrópica y extractiva** se basan en el uso de un tercer componente que permite la remoción de etanol casi puro (mediante la creación de un nuevo azeótropo ternario o mediante la modificación de la volatilidad relativa de la mezcla etanol-agua, respectivamente), e incluyen una etapa de destilación de este tercer componente para reciclarlo al proceso. El problema de este tipo de destilaciones es su alto coste energético y la selección del tercer componente. En el caso de la destilación azeotrópica se ha venido usando sobre todo benceno, aunque más recientemente se ha intentado sustituir por el ciclohexano, menos contaminante y no cancerígeno. Por su parte, el disolvente más empleado en la destilación extractiva es el etilenglicol, pero el consumo energético es aún mayor que para la destilación azeotrópica (Sánchez y Cardona, 2007). La destilación azeotrópica fue durante mucho tiempo la tecnología estándar empleada en la industria de los biocarburantes para la deshidratación del etanol, pero el coste de los equipos, sus dificultades de operación y ajuste y el alto consumo energético, además del empleo de disolventes orgánicos con riesgos para la salud como el benceno, hicieron que progresivamente haya sido sustituida por tecnologías más baratas y menos peligrosas potencialmente (Bibb Swain, 2003).

La **adsorción** se basa en el paso de la corriente de etanol-agua por un lecho cuyas partículas tienen una mayor afinidad con el agua, por lo que ésta queda retenida dentro del equipo. Tradicionalmente, se han empleado como adsorbentes diferentes biomateriales sub-productos del proceso de producción de bioetanol, sobre todo el almidón modificado. Sin embargo, dentro de las tecnologías de adsorción, son los **tamices moleculares** (Figura 15 (7)) los que mayor desarrollo han tenido en los últimos años y los que plantean una alternativa real y ventajosa para sustituir la destilación azeotrópica en la industria de los biocarburantes debido a su bajo coste energético. Los tamices están compuestos por aluminosilicatos de potasio, en forma de gránulos microporosos que se disponen como un lecho a través del cual pasa la mezcla etanol-agua. Se clasifican de acuerdo con el diámetro nominal de sus microporos, siendo el tamaño normal para la deshidratación del etanol 3Å (Quintero *et al.*, 2007).

Normalmente se trabaja con dos lechos en paralelo, uno de ellos trabaja mientras que el otro está en regeneración, la cual se lleva a cabo por cambios de presión. Los tamices moleculares pueden diseñarse para una gran variedad de especificaciones y existen en un gran rango de capacidades de producción. Una vez ajustadas las condiciones de operación, los tamices moleculares no requieren mucho mantenimiento y son bastante flexibles en cuanto a variaciones en la alimentación (Bibb Swain, 2003).

Una última alternativa a nivel industrial es la **pervaporación**, que emplea membranas selectivas para separar dos componentes bajo un gradiente de presión. El permeado que atraviesa la membrana lo hace en forma de vapor, mientras que el retenido, con una mayor concentración del componente deseado, permanece en fase líquida. Las ventajas de esta tecnología respecto de la destilación azeotrópica son que no usa un tercer componente, que es muy flexible respecto de las concentraciones de la alimentación, que es un equipo compacto y su bajo coste energético (Sánchez y Cardona, 2007). Su desarrollo depende mucho de los avances en las tecnologías de fabricación de membranas.

Esta etapa tiene un gran consumo energético y para reducirlo lo más posible es necesario partir de un medio de fermentación con una alta concentración de etanol. Para ello es fundamental optimizar el rendimiento del proceso en todas sus fases; desde el pretratamiento, consiguiendo un sustrato con una gran accesibilidad enzimática, hasta la hidrólisis enzimática, trabajando con elevadas cargas de sólidos y una mezcla de enzimas adecuadas, de modo que se maximice la concentración de azúcares tras la HE, y la fermentación, mediante la utilización de levaduras que alcancen altos rendimientos y sean capaces de fermentar tanto C6 como C5.

5. Bibliografía

Agbor, V. B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A., y Levin, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals towards application. *Biotechnology Advances*. 2011, núm. 29, p. 675-85.

Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M., y Negro, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology. Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives*. 2010, núm. 101, p. 4851-4861.

Antongiovanni, M., y Sargentini, C. Variability in chemical composition of straws. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires*. 1991, núm. 16, p. 49-53

Bai, F.W.; Anderson, W.A., y Moo-Young, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. 2008, núm. 26, p. 89-105.

Ballesteros, M.; Oliva, J.M.; Negro, M.J.; Manzanares, P., y Ballesteros, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*. 2004, núm. 39, vol. 12, p. 1843-1848.

Bezerra, R. M. F., y Dias, A. A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis – inhibition by ethanol and cellobiose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005, núm. 126, vol. 1, p. 49-59.

Bidlack, J.; Malone, M., y Benson, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*. 1992, núm. 72, p. 51-56.

Bibb Swain, R. L. Development and operation of the molecular sieve: an industry standard. En *The Alcohol Textbook*. Editado por Jacques, K. A.; Lyons, T. P., y Kelsall, D. R. Nottingham: Nottingham University Press. 2003, p. 337-342.

Brett, C. T., y Waldron, C. W. Chapter 2. The molecular component of the wall. En *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. Segunda edición. London: Chapman & Hall, 1996, p. 4-44.

Brown, R. M. Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science*. 2004, núm. 42, p. 487-495.

Cardona, E.; Rios, J.; Peña, J., y Rios, L. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. *Fuel*. 2014, núm. 118, p. 41-47.

Chandra, R. P.; Bura, R.; Mabee, W. E.; Berlin, A.; Pan, X., y Saddler, J. N. Substrate pretreatment : the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2007, núm. 108, p. 67-93.

Chen, W-H.; Xu, Y-Y.; Hwang, W-S., y Wang, J-B. Pretreatment of rice straw using an extrusion/extraction process at bench-scale for producing cellulosic ethanol. *Bioresource Technology*. 2011, núm. 102, p. 10451-10458.

Choi, C. H., y Oh, K. K. Application of a continuous twin-screw driven process for dilute acid pretreatment of rape straw. *Bioresource Technology*. 2012, núm. 110, p. 349-354.

Choi, C. H.; Um, B-H., y Oh, K. K. The influence of screw configuration on the pretreatment performance of a continuous twin screw-driven reactor (CTSR). *Bioresource Technology*. 2013a, núm. 132, p. 49-56.

Choi, C. H.; Kim, J. S., y Oh, K. K. Evaluation the efficacy of extrusion pretreatment via enzymatic digestibility and simultaneous saccharification & fermentation with rapeseed straw. *Biomass and Bioenergy*. 2013b, núm. 54, p. 211-218.

Comunicación de la Comisión “Energía para el Futuro: Fuentes de Energía Renovables”. Libro Blanco para una Estrategia y un Plan de Acción Comunitarios. (COM(97)0599 - C4-0047/98). 1998. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, Luxemburgo.

Coutinho, P. M.; Andersen, M. R.; Kolenova, K.; van Kuyk, P. A.; Benoit, I.; Gruben, B. S.; Trejo-Aguilar, E.; Visser, H.; van Solingen, P.; Pakula, T.; Seiboth, B.; Battaglia, E.; Aguilar-Osorio, G.; de Jong, J. F.; Ohm, R. A.; Aguilar, M.; Henrissat, B.; Nielsen, J.; Stalbrand, H., y de Vries, R. P. Post-genomic insights into plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*. 2009, núm. 46, supl. 1, p. S161-S169.

Da Silva, A. S.; Teixeira, R. S. S.; Endo, T.; Bon E. P. S., y Lee, S-H. Continuous pretreatment of sugarcane bagasse at high loading in an ionic liquid using a twin-screw extruder. *Green Chemistry*. 2013, núm. 15, p. 1991-2001.

Dale, B.E.; Weaver, J., y Byers, F.M. Extrusion processing for ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999; núm. 77, vol. 1-3, p. 35-45.

De Vries. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, núm. 61, p. 10-20.

De Vrije, T.; De Haas, G.G.; Tan, G.B.; Keijsers, E.R.P., y Claassen, P.A.M. Pretreatment of *Miscanthus* for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002, núm. 27, p. 1381-1390.

Dien, B. S.; Hespell, R. B.; Ingram, L. O., y Bothast, R. J. Conversion of corn milling fibrous co-products into ethanol by recombinant *Escherichia coli* strains K011 and SL4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1997, núm. 13, p. 619-625.

Doherty, W.O.S.; Mousavioun, P., y Fellows, C.M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products*. 2011, núm. 33, vol. 2, p. 250-276.

Duque, A.; Manzanares, P.; Ballesteros, I.; Negro, M. J.; Oliva, J. M.; Sáez, F., y Ballesteros, M. Optimization of integrated alkaline-extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. 2013, núm. 48, p. 775-781.

Duque, A.; Manzanares, P.; Ballesteros, I.; Negro, M. J.; Oliva, J. M.; González, A., y Ballesteros, M. Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. *Bioresource Technology*. 2014a, núm. 158, p. 262-268.

Duque, A.; Manzanares, P.; Ballesteros, I.; Negro, M. J.; Oliva, J. M.; Sáez, F., y Ballesteros, M. Study of process configuration and catalyst concentration in integrated alkaline extrusion of barley straw for bioethanol production. *Fuel*. 2014b, núm. 134, p. 448-454.

Eckard, A.D.; Muthukumarappan, K., y Gibbons, W. Pretreatment of extruded corn stover with polyethylene glycol to enhance enzymatic hydrolysis: optimization, kinetics and mechanism of action. *Bioenergy Resource*. 2011, núm. 5, p. 424-438

El-Banna, M. N.; Nassar, M. M. A. A. E-G. ; Mohjamed, M. N., y Boseely, M. A. E-A. Evaluation of 16 Barley Genotypes under Calcareous Soil Conditions in Egypt. *Journal of agricultural Science*. 2001, núm. 1, vol. 3, p. 105-121.

Eliasson, A.; Christensson, C.; Wahlbom, C. F., y Hahn-Hägerdal, B. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. *Applied Environmental Microbiology*. 2000, núm. 66, vol. 8, p. 3381-3386.

EurObserv'ER. *Biofuels Barometer*, julio 2014. Disponible on-line en: <http://www.eurobserv-er.org/> [Consulta: 25-08-2014]

European Biofuels Technology Platform- Support for Advanced Biofuels Stakeholders (EBTS-SABS). *Advanced biofuels and conversion technologies*, 2007-2014.

Disponible on-line en: <http://www.biofuelstp.eu/fuels-conversion.html> [Consulta: 27-08-2014]

Galbe, M., y Zacchi, G. Pretreatment. The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*. 2012, núm. 46, p. 70-78.

Gírio, F. M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L. C.; Marques, S., y Bogel-Łukasik, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, Special Issue on Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Perspectives. 2010, núm 101, vol. 13, p. 4775-4800.

Gourlay, K.; Hu, J.; Arantes, V.; Andberg, M.; Saloheimo, M.; Penttilä, M., y Saddler, J. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. *Bioresource Technology*. 2013, núm. 142, p. 498–503

Han, M.; Kang, K.E.; Kim, Y., y Choi, G.W. High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor. *Process Biochemistry*. 2013, núm. 48, p. 488-495.

Hasunuma, T.; Okazaki, F.; Okai, N.; Hara, K. Y.; Ishii, J., y Kondo A. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology*. 2013, núm. 135, p. 513-522.

Horn, S. J.; Vaaje-Kolstad, G.; Westereng, B., y Eijsink, G. H. Novel enzymes for degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, núm. 5, p. 45.

Ingram, L. O.; Gomez, P. F.; Lai, X.; Moniruzzaman, M.; Wood, B. E.; Yomano, L. P., y York, S.W. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 1998, núm. 58, vol. 2-3, p. 204-214.

Jørgensen, H.; Bach Kristensen, J., y Felby, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefineries*. 2007a, núm. 1, p. 119-134.

Jørgensen, H.; Vibe-Pedersen, J.; Larsen, J., y Felby, C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007b, núm. 96, vol. 5, p. 862-870.

Kalyon, D. M., y Malik, M. An integrated approach for numerical analysis of coupled flow and heat transfer in co-rotating twin screw extruders. *International Polymer Processing*. 2007, núm. 22, vol. 3, p. 293-302.

Kang, K.E.; Han, M.; Moon, S. K.; Kang, H. W.; Kim, Y.; Cha, Y. L. *et al.* Optimization of alkali-extrusion pretreatment with twin-screw for bioethanol production from *Miscanthus*. *Fuel*. 2013, núm. 109, p. 520-526.

Karhumaa, K.; Hahn-Hägerdal, B., y Gorwa-Grauslund, M.F. Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. *Yeast*. 2005, núm. 22, vol. 5, p. 359-368.

Karki, B.; Maurer, D., y Jung, S. Efficiency of pretreatments for optimal enzymatic saccharification of soybean fiber. *Bioresource Technology*. 2011, núm. 102, vol. 11, p. 6522-6528.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Effect of extruder parameters and moisture content of switchgrass, prairie cord grass on sugar recovery from enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010a, núm. 162, p. 1785-1803.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Influence of extruder temperature and screw speed on pretreatment of corn stover while varying enzymes and their ratios. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010b, núm. 162, p. 264-279.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Optimization of switchgrass and extruder parameters for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Industrial Crop Production*. 2011a, núm. 33, p. 188-199.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Optimization of alkali soaking and extrusion pretreatment of prairie cord grass for maximum sugar recovery by enzymatic hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*. 2011b, núm. 54, p. 71-82.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Optimization of alkali, switchgrass and extruder parameters for maximum sugar recovery. *Chemical Engineering and Technology*. 2011c, núm. 9, p. 1413-1426.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Optimization of alkali, big bluestem particle size, and extruder parameters for maximum enzymatic sugar recovery using response surface methodology. *BioResources*. 2011d, núm. 6, vol.1, p. 762-790.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Influence of extruder and feedstocks variables on torque requirements during pretreatment of different types of biomass – A response surface analysis. *Biosystems Engineering*. 2011e, núm. 109, p. 37-51.

Karunanithy, C., Muthukumarappan, K. y Gibbons, W.R. Extrusion pretreatment of pine wood chips. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, núm. 167, p. 81-99.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Thermo-mechanical pretreatment of feedstocks. En *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production SE - 2*. Editado por G. Tingyue. Países Bajos: Springer DA, 2013, p. 31-65.

Kim, T. H.; Choi, C. H., y Oh, K. K. Bioconversion of sawdust into ethanol using diluted sulfuric acid- assisted continuous twin screw-driven reactor pretreatment and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. 2013, núm. 130, p. 306-313.

Kim T.H.; Taylor F., y Hicks K.B. Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresource Technology*. 2008, núm. 99, p. 5694-5702.

Kötter, P.; Amore, R.; Hollenberg, C. P., y Ciriacy, M. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xyloitol dehydrogenase gene, XYL2, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Current Genetics*. 1990, núm. 18, vol. 6, p. 493-500.

Kötter, P., y Ciriacy, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1993, núm. 38, vol. 6, p. 776-783.

Kretschmer, B.; Allen, B., y Hart, K. *Mobilising Cereal Straw in the EU to Feed Advanced Biofuel Production*. Report produced for Novozymes. Londres: IEEP, 2012.

Kuyper, M.; Hartog, M. M. P.; Toirkens, M. J.; Almering, M. J. H.; Winkler, A.A.; van Dijken, J. P., y Pronk, J. T. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research*. 2005, núm. 5, vol. 45, p. 399-409.

Lamsal, B.; Yoo, J.; Brijwani, K., y Alavi, S. Extrusion as a thermo-mechanical pretreatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 2010, núm. 34, vol. 12, p. 1703-1710.

Lee S.H.; Teramoto, Y., y Endo, T. Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process I – Effect of additives with cellulose affinity. *Bioresource Technology*. 2009, núm. 100, p. 275-279.

Lee, S.H.; Inoue, S., Teramoto, Y., y Endo, T. Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process II: Effect of hot-compressed water treatment. *Bioresource Technology*. 2010, núm. 101, p. 9645-9649.

Limayem, A., y Ricke, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012, vol. 38, p. 449-467.

Liu, C-F., y Sun, R-C. Chapter 5. Cellulose. En *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose*. Editado por R-C. Sun. Amsterdam: Elsevier Science & Technology Books, 2010, p. 131-167.

Liu, C.; Van der Heide, E.; Wang, H.; li, B., Yu, G., y Mu, X. Alkaline twin-screw extrusion pretreatment for fermentable sugar production. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, núm. 6, p. 97.

Lu, F., y Ralph, J. Chapter 6. Lignin. En *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose*. Editado por R-C. Sun. Amsterdam: Elsevier Science & Technology Books, 2010, p. 169-207.

Lynd, L. R.; Elander, R. T., y Wyman, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1996, núm. 57-58, p. 741-761.

Lynd, L. R.; van Zyl, W. H.; McBride, J. E., y Laser, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. 2005, núm. 16, p. 577-583.

Madson, P. W. Ethanol distillation: the fundamentals. En *The Alcohol Textbook*. Editado por Jacques, K. A.; Lyons, T. P., y Kelsall, D. R. Nottingham: Nottingham University Press. 2003, p. 319-336.

Manzanares, P. Integrated hydrolysis, fermentation and co-fermentation of lignocellulosic biomass. En *Bioalcohol production: Biochemical conversion of lignocellulosic biomass*. Editado por Waldron, K. Woodhead publishing series in energy. 2010, núm. 3, p. 205-223.

McCann, M.C., y Roberts, K. Architecture of the primary cell wall. En *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*. Editado por C.W. Lloyd. New York: Academic, 1991, p. 109-129.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). *Avances de superficies y cultivos: diciembre 2012*. Madrid: Secretaría General Técnica MAGRAMA, 2012. (Publicaciones de la Administración General del Estado) [Consulta: 20-05-2013]
Disponible on-line en: <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/avances-superficies-producciones-agricolas/>

Mittal, A.; Katahira, R.; Himmel, M. E., y Johnson, D. K. Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes on crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*. 2011, núm. 4, p. 41

Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R., Lee, Y.Y.; Holtzapple, M., y Ladisch, M. Features of promising technologies for pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2005, núm. 96, p. 673-686.

Mueller-Harvey, I., y Hartley, R. D. Linkage of *p*-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydrate Research*. 1986, núm. 148, p. 71-85.

Mussatto, S. I.; Dragone, G.; Guimarães, P. M. R.; Silva, J. P. A.; Carneiro, L.M.; Roberto, I. C., y Vicente *et al.* Technological trends, global markets, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology advances*. 2010, núm. 28, vol. 6, p. 817-830.

Narasimhalu, P.; Kong, D., y Choo, T. M. Straw yields and nutrients of seventy-five Canadian barley cultivars. *Canadian Journal of Animal Science*. 1998, núm. 78, vol. 1, p. 127-134.

Olofsson, K.; Bertilsson, M., y Lidén, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. 2008a, núm. 1, p. 7.

Olofsson, K.; Rudolf, A., y Lidén, G. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. 2008b, núm. 134, p. 112-120.

Quinlan, R. J.; Teter, S., y Xu, F. Chapter 7. Development of cellulases to improve enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. En *Bioalcohol production: Biochemical conversion of lignocellulosic biomass*. Editado por Waldron, K. Woodhead publishing series in energy. 2010, núm. 3, p. 178-201.

Quintero, J. A.; Montoya, M. I.; Sánchez, O. J., y Cardona C. A. Evaluación de la deshidratación de alcohol carburante mediante simulación de procesos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 2007, núm. 5, p. 72-83.

Quiroz-Castañeda, R. E., y Folch-Mallol, J. L. Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Biotecnología Aplicada* . 2011, núm. 28, p. 194.

Ren, J-L., y Sun, R-C. Chapter 4. Hemicelluloses. En *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose* . Editado por R-C. Sun. Amsterdam: Elsevier Science & Technology Books, 2010, p. 73-130.

Ritter, S. K. Lignocellulose: a complex biomaterial. *Plant Biochemistry*. 2008, núm. 86, p. 15.

Robelius, Fredrik. *Giant Oil Fields - The Highway to Oil: Giant Oil Fields and their Importance for Future Oil Production*. Tesis doctoral. Uppsala University, Department of Nuclear and Particle Physics. Uppsala, 2007

Salisbury, F.B., y Ross, C.W. Plant physiology and plant cells. En *Plant Physiology*. Belmont, CA: Wadsworth Inc., 1992, p. 3-26.

Sánchez, O. J., y Cardona, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 2008, núm. 99, p. 5270-5295.

Sánchez, O. J., y Cardona, C. A. *Producción de alcohol carburante: Una alternativa para el desarrollo agroindustrial*. Editado por la Gobernación de Caldas, Secretaría de Educación, Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, PNUD y la Universidad Nacional de Colombia. Manizales (Colombia).

Sathitsuksanoh, N.; George, A., y Zhang, Y. H. P. New lignocellulose pretreatments using cellulose solvents: A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2013, núm. 88, p. 169-80.

Scheller, H. V., y Ulvskov, P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*. 2010, núm. 61, p. 263-289.

Scott, C. T.; Samaniuk, J. R., y Klingenberg, D. J. Rheology and extrusion of high-solids biomass. *Tappi Journal*. 2011, mayo, p. 47-53.

Senturk-Ozer, S.; Gevgilili, H., y Kalyon, D. M. Biomass pretreatment strategies via control of rheological behavior of biomass suspensions and reactive twin screw extrusion processing. *Bioresource Technology*. 2011, núm. 102, vol. 19, p. 9068-9075.

Singh, P.; Suman, A.; Tiwari, P.; Arya, N.; Gaur, A., y Shrivastava, A.K. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008, núm. 24, vol. 5, p. 667-673.

Sluiter, J.B.; Ruiz, R.O.; Scarlata, C.J.; Sluiter, A.D., y Templeton, D.W. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, núm. 58, vol. 16, p. 9043–9053.

Sun, R. C., y Sun, X. F. Separation and characterization of lipophilic extracts from barley straw. *Separation Science and Technology*. 2001a, núm. 36, p. 3027-3048.

Taherzadeh, M. J., y Karimi, K. Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. En *Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes*. Editado por Pandey, A.; Larroche, C.; Ricke, S. C.; Dussap, C-G., y Gnansounou, E. Burlington: Academic Press. 2011, p. 287-311.

Tomás-Pejó, E.; Alvira, P.; Ballesteros, M., y Negro, M.J. Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion Biofuels. En *Biofuels. Alternative Feedstocks and Conversion Processes*. Editado por A. Pandey, C. Larroche, S. C. Ricke, C-G. Dussap y E. Gnansounou. Países Bajos: Academic Press, 2011, p. 149-176.

Um, B.H.; Choi, C.H.; Oh, K.K. Chemicals effect on the enzymatic digestibility of rape straw over the thermo-mechanical pretreatment using a continuous twin screw-driven reactor (CTSR). *Bioresource Technology*. 2013, núm. 130, p. 38-44.

Unión Europea. *Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 23 de abril de 2009 relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables y por la que se modifican y se derogan las Directivas 2001/77/CE y 2003/30/CE*. Diario Oficial de la Unión Europea, 5 de junio de 2009, núm. 140, p. 16-62.

Unión Europea. *Energy, transport and environment indicators. Pocketbooks*. Luxemburgo: Publications Office of the European Union, 2012, ISSN 1725-4566. Disponible en línea en: http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/release_calendars/publications

Vandenbossche, V.; Brault, J.; Vilarem, G.; Hernández-Meléndez, O.; Vivaldo-Lima, E.; Hernández-Luna, M., Barzana, E.; Duque, A.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; Mata, J.; Castellón, E., y Rigal, L. A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Industrial Crops and Products*. 2014, núm. 55, p. 258-266.

Van den Brink, J., y de Vries, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, núm. 91, p. 1477-1492.

Walfridsson, M.; Anderlund, M.; Bao, X., y Hahn-Hägerdal, B. Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* XYL1 and XYL2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilisation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997, núm. 48, vol. 2, p. 218-224.

Wyman, C.E. (editor). *Handbook on bioethanol: production and utilization*. Washington DC: Taylor & Francis, 1996. Applied Energy Technology Series.

Yan, B., y Wyman, C. E. Biotechnology for cellulosic ethanol. *APBN*. 2007, núm. 11, vol. 9, p. 555-563.

Yoo, J.; Alavi, S.; Vadlanil, P., y Amanor-Boadu V. Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. *Bioresource Technology*. 2011, núm. 102, p. 7583-7590.

Yoo, J.; Alavi, S.; Vadlani, P., y Behnke, K. C. Soybean hulls pretreated using thermo-mechanical extrusion – Hydrolysis efficiency, fermentation inhibitors, and ethanol yield. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, núm. 166, p. 576-589.

Zhang, S.; Xu, Y., y Hanna, M. A. Pretreatment of corn stover with twin-screw extrusion followed by enzymatic saccharification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012a, núm. 166, p. 458-469.

Zhang, S.; Keshwanil, D.R.; Xu, Y., y Hanna, M.A. Alkali combined extrusion pretreatment of corn stover to enhance enzyme saccharification. *Industrial Crops and Products*. 2012b, núm. 37, vol. 1, p. 352-357.

Zhao, X.; Zhang, L., y Liu, D. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuel, Bioproducts and Bioresources*. 2012, núm. 6, p. 561-579.

OBJETIVO E INTERÉS DEL TEMA

El presente trabajo de tesis doctoral se enmarca dentro de las actividades de investigación de la **Unidad de Biocarburantes del Ciemat**, cuyo objetivo es desarrollar procesos para la producción de etanol combustible a partir de biomasa lignocelulósica.

La producción y utilización de biocombustibles líquidos a partir de materias primas lignocelulósicas (biocarburantes de segunda generación), se vislumbra actualmente como una opción realista y prometedora para asegurar el aprovisionamiento de energía en el sector transporte, reducir las emisiones de gases invernadero y constituir una alternativa sostenible a largo plazo a los combustibles fósiles. Mientras que los biocarburantes de primera generación ya contribuyen en gran medida a la transición de combustibles fósiles a renovables, los biocarburantes de segunda generación surgen con la expectativa de acelerar esta transición, sin los costes sociales y medioambientales asociados a la primera generación (entre ellos, el abastecimiento de alimentos).

Dentro de este campo, el etanol producido a partir de biomasa lignocelulósica (también denominado etanol celulósico) se considera un elemento clave para acelerar la implementación del bioetanol en el mercado actual de combustibles. Sin embargo, las características estructurales de los materiales lignocelulósicos hacen que el proceso para su conversión en etanol sea un procedimiento complejo que necesita de diferentes etapas de pretratamiento, hidrólisis y fermentación para la obtención del producto final. De entre estas etapas, el pretratamiento de la biomasa resulta esencial para alterar la compleja red estructural que forman los carbohidratos y la lignina y, en el caso del empleo de enzimas en la etapa de hidrólisis, modificar el área superficial y la porosidad de las fibras, facilitando así la acción de las mismas.

Las tecnologías de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica han sido ampliamente estudiadas en los últimos años y se han conseguido desarrollos muy prometedores, incluso a escala industrial. Sin embargo, muchos de estos pretratamientos alcanzan su objetivo solubilizando hemicelulosas y/o lignina, que pueden degradarse a compuestos inhibidores para las enzimas y microorganismos, debido a las elevadas temperaturas y/o concentraciones de reactivos utilizadas. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de desarrollar pretratamientos que permitan reducir estos efectos negativos, y que a la vez permitan avanzar en la integración de las distintas etapas del proceso de producción de etanol, lo que ha sido señalado como uno de los retos tecnológicos más importantes. En este sentido, el tratamiento de extrusión objeto de este trabajo, presenta un gran potencial ya que puede operarse a temperaturas moderadas, además de poder llevarse a cabo en continuo y en diferentes configuraciones de proceso, lo que le confiere una elevada adaptabilidad a diferentes sustratos y condiciones. Si bien ya existe una cierta información de su utilización en los procesos de producción de etanol de biomasa lignocelulósica, algunas de las posibilidades de su aplicación no han sido todavía investigadas y su estudio

puede contribuir a mejorar el alcance de su efectividad como pretratamiento para la producción de etanol celulósico.

El objetivo general de la presente tesis es evaluar el potencial del pretratamiento de extrusión de paja de cebada, combinada con agentes químicos y biológicos, para la producción de azúcares fermentables y su posterior transformación a etanol. Con este fin, se estudian diferentes configuraciones para hacer de esta tecnología un proceso altamente integrado y potencialmente escalable. Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Optimizar las condiciones de operación para la extrusión alcalina de paja de cebada, de manera que se alcance el máximo rendimiento de producción de azúcares.
- Obtener un sustrato pretratado adecuado para su incubación directa con las enzimas hidrolíticas, para lo cual se integra una etapa de neutralización dentro del proceso de extrusión alcalina.
- Avanzar en la integración las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática, combinando los efectos de la extrusión alcalina con la adición de enzimas en el extrusor, con el fin de mejorar la mezcla de las enzimas con la biomasa y promover la acción enzimática.
- Evaluar la producción de azúcares y etanol de los sustratos pretratados en las diferentes configuraciones de pretratamiento mediante procesos de hidrólisis enzimática y licuefacción más sacarificación y fermentación simultáneas (LSFS) con enzimas comerciales y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como criterio de evaluación del pretratamiento y para el cálculo del potencial de producción de etanol a partir de la paja de cebada.
- Realizar balances de materia y energía del proceso altamente integrado de producción de etanol a partir de paja de cebada mediante bioextrusión y LFSF, sirviéndose para ello de herramientas informáticas de simulación de procesos.

Una gran parte del trabajo recogido en esta tesis se llevó a cabo en el marco de las actividades de investigación realizadas en la Unidad de Biocarburantes del Ciemat dentro del proyecto europeo **Babethanol**.

El proyecto Babethanol '*New feedstock and innovative transformation process for a more sustainable development and production of lignocellulosic ethanol*' (Nuevas

materias primas y un innovador proceso de transformación para un desarrollo y una producción de etanol lignocelulósico más sostenibles), es un proyecto de investigación en el que participaron trece instituciones (universidades, centros de investigación y otras entidades) de once países diferentes de Europa y América Latina, entre ellos la Unidad de Biocarburantes del Ciemat.

El proyecto se basa en el desarrollo de un nuevo pretratamiento para la biomasa lignocelulósica, que es descrito como Extrusión y Sacarificación Combinadas (*Combined Extrusion and Saccharification*, CES), lo que correspondería a la tecnología de **bioextrusión** presentada en esta tesis. Esta tecnología fue desarrollada en paralelo por tres laboratorios participantes en el proyecto, cada uno trabajando sobre una materia prima de origen local previamente seleccionada. En el caso de la Unidad de Biocarburantes del Ciemat, esta materia prima fue la paja de cebada. El proyecto Babethanol abarcaba toda la cadena de producción de bioetanol, ya que partía de la identificación de posibles materias primas de origen lignocelulósico, a partir de su disponibilidad local y potencial para la producción de bioetanol, pasando por el desarrollo tecnológico en escala de laboratorio y semi-piloto del proceso de pretratamiento y producción de etanol, y llegando hasta el análisis de ciclo de vida y perspectivas industriales del proceso.

Como resultado de los trabajos llevados a cabo durante el desarrollo del proyecto, que constituyen el núcleo de esta tesis, se han publicado cuatro trabajos en revistas científicas, uno de los cuales se hizo en conjunto con los miembros de los otros laboratorios colaboradores. Estos artículos están recogidos en el Anexo I como I, II, III y IV. Asimismo, se obtuvo una patente internacional del proceso CES para material lignocelulósico, bajo licencia PCT/FR2013/051317.

**CAPÍTULO I: MATERIA PRIMA Y
PUESTA A PUNTO DEL
EQUIPO DE EXTRUSIÓN**

1. Introducción

En este capítulo se describen la materia prima y el equipo de extrusión utilizados en este trabajo. En primer lugar, se presenta la materia prima empleada y se describen los protocolos de análisis seguidos para su caracterización. A continuación se describe el equipo de extrusión y los experimentos llevados a cabo para la puesta a punto del mismo.

2. Materia prima

2. 1. Materiales y métodos

2. 1. 1. Material

A lo largo de este trabajo se emplearon dos lotes de paja de cebada (lote 1 y lote 2). Ambos fueron cedidos por el Centro de Desarrollo de Energías Renovables (CEDER, Soria, España). El contenido en humedad de la paja, medido en laboratorio, se encontraba alrededor del 6% para el lote 1 y fue un 10% para el lote 2. La paja de ambos lotes se molió a un tamaño de partícula de 5 mm usando un molino de martillo de laboratorio (Retsch) y se homogeneizó y almacenó hasta el momento de su uso (Figura 1.1).



Figura 1.1- Paja de cebada molida a 5 mm.

El primer lote de materia prima corresponde a todos los experimentos llevados a cabo íntegramente en el Ciemat, reflejados en los Capítulos I, II, y III (en la primera parte de caracterización y ensayos de HE). El lote 2 de paja de cebada fue el empleado en la experimentación en planta piloto desarrollada en Francia (capítulo II, apartado 3.4.) y en los ensayos que se realizaron con los extrusados producidos allí (Capítulo III, parte de LSFS).

2. 1. 2. Análisis de la materia prima

Para analizar la composición de la paja de cebada se siguieron los protocolos NREL/TP-510-42618, NREL/TP-510-42619, NREL/TP-510-42620 y NREL/TP-510-42622 del *National Renewable Energies Laboratory* (NREL, CO) para la determinación de carbohidratos estructurales, lignina y grupos acetilo, para la determinación de extractivos, para la preparación de muestras y para la determinación de cenizas en biomasa, respectivamente (ver Anexo II).

En el caso del análisis de una biomasa como la paja de cebada, se realizó una preparación previa de la muestra que incluye una molienda y una separación por tamizado en una fracción de gruesos y otra de finos. Este es un paso previo que establece la metodología descrita por el NREL para ajustar el tamaño de partícula de la muestra analizada a un intervalo determinado. Este método de preparación es especialmente adecuado para biomasa con un elevado contenido en cenizas, como lo es la paja de cebada. El análisis de carbohidratos y lignina se efectúa sólo sobre la fracción de gruesos, haciéndose después una composición matemática entre las dos fracciones para estimar la composición de la biomasa completa, asumiendo que la composición química de la fracción de finos es idéntica la de gruesos, excepto en el contenido en cenizas.

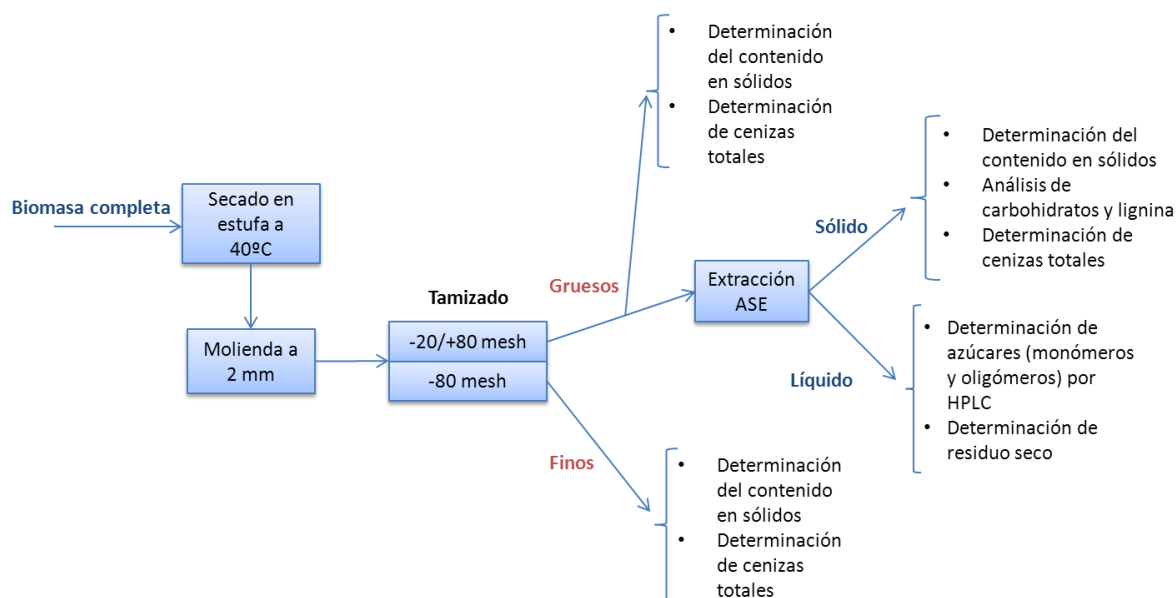


Figura 1.2- Esquema de la primera fase del proceso analítico para la determinación de la composición de la paja de cebada: preparación de la muestra y análisis de extractos.

Como se ve en la figura 1.2, el procedimiento analítico comienza con un secado en una estufa a 40°C y posteriormente una molienda a 2 mm. A continuación, se

toman 50 g de la biomasa, y se tamizan usando dos tamices de número de malla 20 (850 μm) y 80 (180 μm). La fracción <180 μm es considerada como la fracción de finos y sobre ella se determina el contenido en sólidos totales (mediante una balanza termogravimétrica) y en cenizas totales (mediante diferencia de pesos tras calcinación a 575°C en una mufla). La fracción cuyo tamaño se encuentra entre las mallas nº 20 y 80 es la fracción de gruesos, sobre ésta se determinan también las cenizas totales y los sólidos totales, de la misma forma que se hizo sobre la fracción de finos.

A continuación se realiza primero una doble extracción de la fracción de gruesos de la biomasa con agua y con etanol en un equipo de extracción automática (*Automatic Solvent Extractor, ASE*), en las condiciones óptimas de extracción fijadas por la experiencia analítica del laboratorio de la Unidad de Biocarburantes de Ciemat. La extracción se lleva a cabo en tres ciclos consecutivos (dos con agua y uno con etanol) a 1500 psi y 100 °C, con un tiempo de calentamiento de 5 min y un tiempo estático de 7 min. Después de la extracción acuosa, se recoge el total de líquido extraído y se toma una muestra para la medida de azúcares simples y azúcares totales (tras una hidrólisis ácida suave, 3% v/v H₂SO₄, 121°C, 30 min) por HPLC. El líquido restante se evapora y se pesa el residuo sólido, el cual, previa corrección con el volumen retirado para la medida cromatográfica de azúcares, constituye el peso de extractos acuosos. De la misma manera se determina el peso del extracto obtenido con etanol, si bien en este caso no se analiza el extracto obtenido.

En un segundo paso (Figura 1.3), la fracción de gruesos extraída se somete a una hidrólisis ácida en dos etapas, seguida por la separación del residuo insoluble y determinación de azúcares en el líquido por HPLC. A partir de la cantidad de azúcares encontrada en el medio de hidrólisis, teniendo en cuenta el peso de biomasa utilizado en el análisis, se calcula el contenido en carbohidratos celulosa y hemicelulosas (xilano, arabinano, galactano) de la muestra, siguiendo el método de cálculo recogido en el procedimiento. Además, el líquido recuperado se usa para determinar el contenido en grupos acetilo por HPLC y cuantificar la lignina ácido soluble (mediante espectrofotometría a 250 nm de longitud de onda). La lignina ácido insoluble se determina por pesada del mencionado residuo tras la hidrólisis ácida.

La metodología analítica empleada en la determinación de azúcares por HPLC, tanto en el líquido de extracción acuoso como en el medio de hidrólisis en dos etapas, se detalla en el Anexo III. Igualmente, se incluye en dicho anexo la determinación de ácido acético por HPLC.

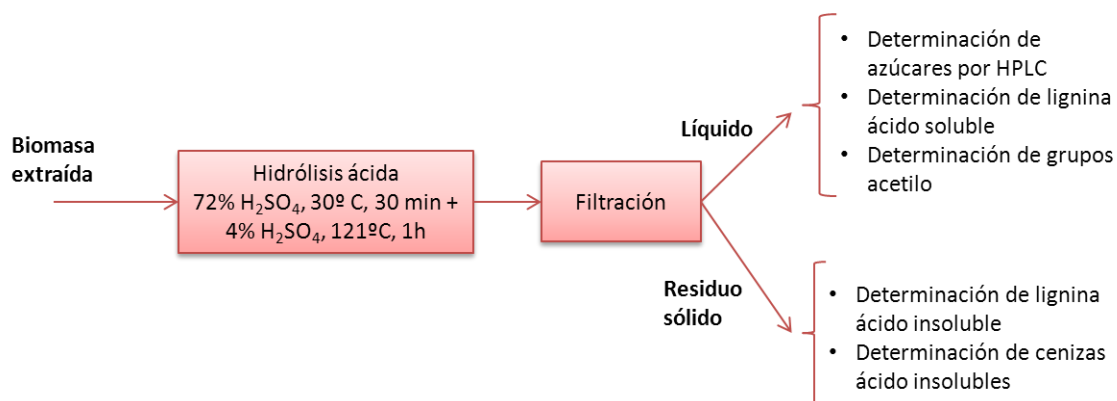


Figura 1.3- Determinación de carbohidratos y lignina en la biomasa lignocelulósica extraída.

Todos los análisis se realizan por triplicado y se calculan tanto el valor medio como la desviación estándar.

2. 2. Resultados y discusión

2. 2. 1. Composición de la materia prima

Los resultados de los análisis de composición de la paja de cebada de los lotes 1 y 2 (Tabla 1.1) muestran que es un material constituido por carbohidratos hidrolizables en más de un 50% (celulosa y hemicelulosa, 64,79% (lote 1) y 60,8 (lote 2)), con un contenido en lignina no muy alto, de alrededor del 15%, similar al de otros residuos agrícolas como la paja de trigo (17%) (Pérez *et al.*, 2007) y las hojas y tallo del maíz (17-19%) (Kim y Holtzaple, 2005). La fracción hemicelulosa está constituida mayoritariamente por xilano (21,3%) y en menores cantidades por arabinano y galactano (3,3 y 1,4%, respectivamente). Los grupos acetilo suponen un 1,8/1,4% del peso total de la biomasa y se encontrarán unidos a la hemicelulosa, ya que las xilosas se encuentran frecuentemente acetiladas en las plantas herbáceas (Scheller y Ulvskov, 2010). La fracción de cenizas y extractos, que suma un 17% y un 14,4% del total en los lotes 1 y 2, respectivamente, está formada por compuestos solubles en agua y etanol (extractos, 10,2/8,4%) y por un residuo inorgánico (cenizas, 6,8/6%), en cuya composición es posible que se encuentre el silicio, ya que se ha descrito que éste es el componente mineral mayoritario en la paja de cereal (Olanders y Steenari, 1995).

Tabla 1.1- Composición de la paja de cebada de los lotes 1 y 2 en % de peso seco. Valores medios y desviación estándar de tres replicados.

Componente	Lote 1 (% ps)	Lote 2 (% ps)
Glucano	39,1 ± 0,7	33,9 ± 1,1
Hemicelulosa	25,7 ± 0,3	26,9 ± 0,7
<i>Xilano</i>	21,3 ± 0,2	22,3 ± 0,6
<i>Arabinano</i>	3,3 ± 0,05	3,2 ± 0,1
<i>Galactano</i>	1,4 ± 0,02	1,5 ± 0,2
Lignina ácido insoluble	15,2 ± 0,01	13,6 ± 0,7
Lignina ácido soluble	1,2 ± 0,03	4,2 ± 0,7
Grupos acetilo	1,8 ± 0,01	1,4 ± 0,04
Extractos	10,2 ± 0,9	8,4 ± 0,8
Cenizas	6,8 ± 0,2	6,0 ± 0,1

La composición de la paja de cebada usada en este trabajo está en el rango de los valores hallados por otros investigadores para este material: 34-40% de celulosa y 21-27% de hemicelulosa. El contenido en lignina se encuentra entre el 17 y el 21%, mientras que el contenido en cenizas insolubles varía entre 2,5 y 6%. (Linde *et al.*, 2007; Persson *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Pronyk y Mazza, 2012; Han *et al.*, 2013; Iroba *et al.*, 2014)

3. Puesta a punto del equipo de extrusión

3. 1. Equipo de extrusión

Para el pretratamiento de extrusión se empleó un extrusor de doble husillo co-rotativo (Clextal Processing Platform Evolum® 25 A110, Clextal, Francia) compuesto por 6 módulos de 100 mm de longitud cada uno (Figura 1.4). El extrusor dispone de un módulo de filtración intercambiable, que fue inicialmente instalado en la posición nº 5, es decir, en el módulo anterior al de la salida del material extrusado. Además, los módulos tienen un sistema de control de temperatura compuesto por un sistema de calentamiento por resistencias eléctricas acopladas sobre la superficie y un encamisado de refrigeración que funciona con agua de la red, de modo que la temperatura se puede fijar individualmente para cada sección del extrusor.

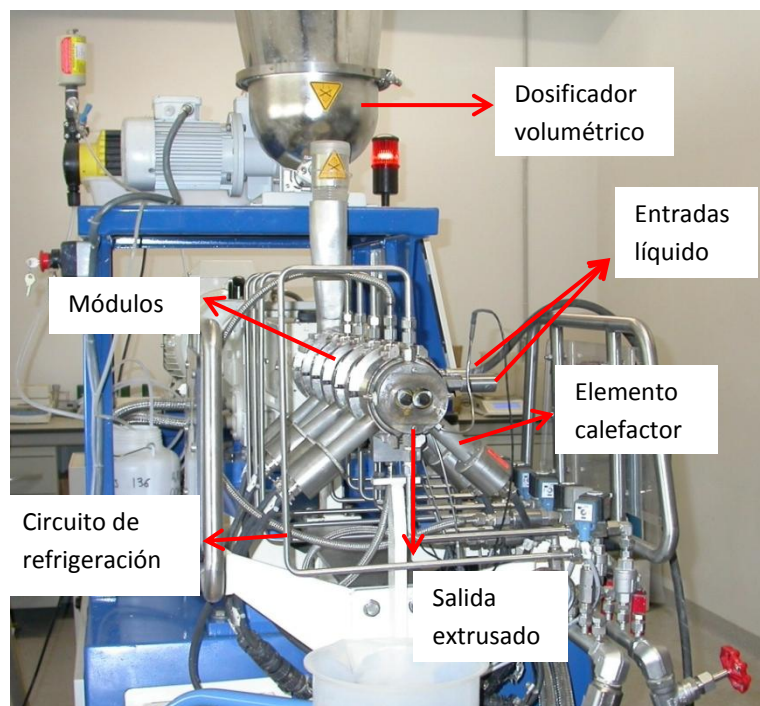


Figura 1.4- Imagen del equipo de extrusión Evolum EV25 usado en Ciemat.

La alimentación de la biomasa se realiza en el primer módulo, a través de un dosificador volumétrico KMV KT20 (Coperion K-tron, NJ, EEUU) provisto de agitación interna para evitar la formación de bóvedas y acumulaciones.

Además, el extrusor dispone de conexiones para bombas en cada módulo, de forma que se puede bombear un fluido en un punto deseado. En este caso se dispone de dos bombas de desplazamiento positivo Super J PP12 (DKM-Cleextral, Francia): una especialmente resistente a la corrosión, por lo que se usó exclusivamente para alimentar el catalizador alcalino empleado en los experimentos de extrusión reactiva, y otra de calidad normal que se usó en un principio para la adición de agua. Además, se recurrió a una tercera bomba (Milton Roy, MA, USA) para la dosificación de ácido en un estudio posterior (Capítulo II- apartado 2.2).

Como se mencionó anteriormente, los husillos son co-rotativos y de interpenetración total. Están compuestos por el montaje sobre los ejes de elementos de tornillo de 25 mm de diámetro con diferentes longitudes y perfiles, orientados a funciones específicas. Así, existen elementos que producen transporte, mezcla o presión por rozamiento, y se disponen uno tras otro, en múltiples combinaciones posibles, dando lugar a lo que se denomina el perfil del tornillo (Figura 1.5).



Figura 1.5- Imagen de la sección final del perfil de los tornillos co-rotativos del extrusor EV 25.

3. 2. Calibración y puesta a punto del equipo de extrusión

3. 2. 1. Calibración de la alimentación y de las bombas

3. 2. 1. 1. *Calibración de la alimentación*

Uno de los problemas que plantea el trabajo con biomasa del tipo de la paja de cebada es cómo realizar con ella la alimentación de los equipos que trabajan en continuo, debido a su heterogeneidad y a sus propiedades físicas tales como la densidad. La utilización de equipos de alimentación convencionales suele ocasionar problemas de creación de bóvedas y agujeros de ratón en los depósitos y tolvas, lo cual puede influir en la homogeneidad del flujo. El equipo extrusor utilizado en este trabajo dispone de un dosificador K-tron con un sistema de agitación interior para contrarrestar este problema. Además, se intenta trabajar con un tamaño de partícula homogéneo y de unas dimensiones que garanticen una alimentación constante.

Para calibrar el dosificador se llenó la tolva con 500 g de paja de cebada y se midió el peso a la salida de la misma cada 5 min, probando diferentes capacidades de suministro, que se establecen variando la velocidad del tornillo. Se hicieron diez repeticiones de cada medida (Figura 1.6).

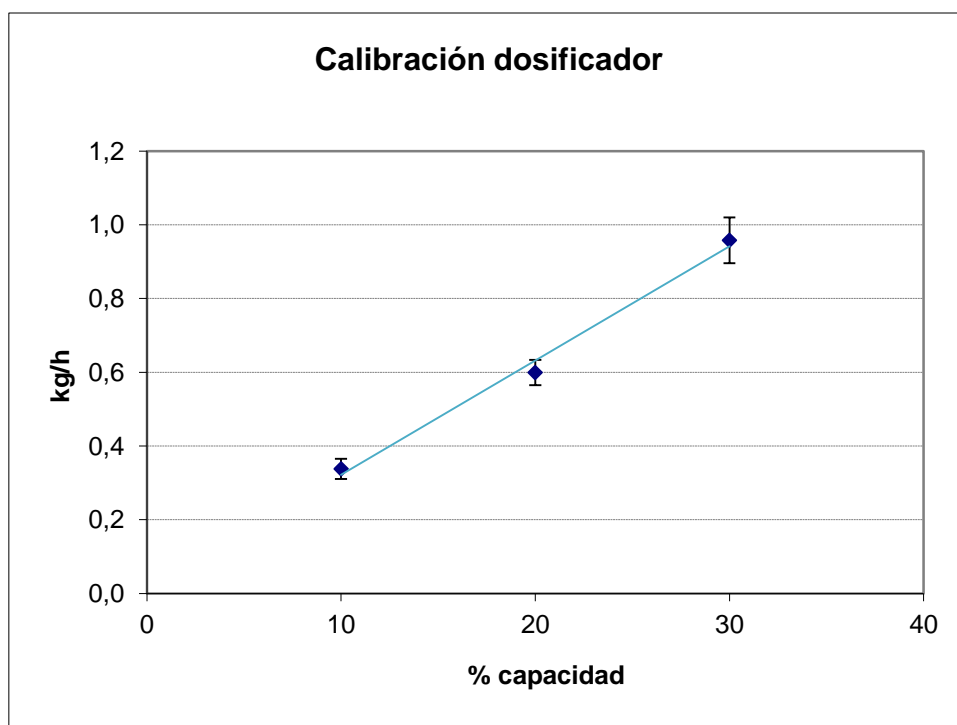


Figura 1.6- Flujo de biomasa de paja de cebada alimentado al equipo de extrusión en función de la capacidad del dosificador.

Como se puede observar en la figura 1.6, hasta un 30% de la capacidad del dosificador, el flujo de alimentación es lineal, con un ajuste $R^2 = 0,9918$. En este rango, el flujo de paja de cebada se encuentra entre 0,3 y 0,96 kg/h. Fuera de este rango se comprobó que el comportamiento del dosificador dejó de ser lineal. Se escoge una capacidad del dosificador del 20% (una capacidad media dentro del intervalo lineal de operación), lo que supone trabajar con un flujo aproximado de 0,6 kg/h de paja de cebada.

3. 2. 1. 2. Calibración de las bombas

El equipo de extrusión dispone de dos bombas de pistón con amortiguador DKM-Clextral (Francia), una para introducir la disolución alcalina y otra para añadir el agua a la etapa de lavado y filtración. Posteriormente, se acopló una bomba de pistón adicional (LMI-Milton Roy, EEUU) para la adición de ácido fosfórico 0,01M en la etapa de neutralización.

La dosificación de las bombas es proporcional, alcanzándose unos caudales máximos de 10 -11 L/h, en el caso de las bombas DKM-Clextral, y de 9,5 L/h, en el caso de la bomba Milton Roy.

3. 2. 2. Parámetros de operación en el extrusor

Para el estudio de la influencia de los parámetros de operación del equipo, tales como la relación líquido/sólido (L/S) y la velocidad del tornillo, es necesario establecer una configuración de partida en el extrusor que permita definir los intervalos de operación más adecuados.

Para ello, se utilizó una configuración de tornillo basada en la experiencia previa del grupo del *Laboratoire de Chimie Agroindustrielle* del *Institut National Polytechnique de Toulouse* (INPT), uno de los socios implicados en el proyecto BABETHANOL, quienes cuentan con una larga trayectoria de estudio de la extrusión aplicada a la biomasa (N'Diaye y Rigal, 2000; Rouilly *et al.*, 2006; Evon *et al.*, 2007; Zeitoun *et al.*, 2010). Esta configuración en concreto (Figura 1.7) había demostrado su efectividad en materiales herbáceos en ensayos previos realizados por este grupo. Posteriormente, esta configuración fue adaptada para los experimentos de extrusión alcalina de la paja de cebada en la primera parte del trabajo experimental de esta tesis (Capítulo II).

La configuración seleccionada (Figura 1.7) cuenta con tres zonas diferenciadas:

- zona de alimentación (módulo 1)
- zona de reacción (módulos 2 a 4)
- zona de lavado-filtración (desde el módulo 4 hasta el final).

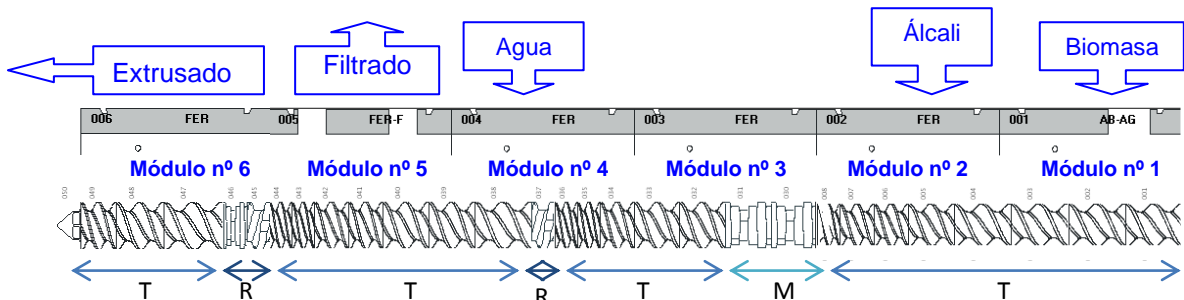


Figura 1.7- Configuración 1 para la extrusión de paja de cebada en el extrusor de doble tornillo co-rotativo. En la figura se muestran los elementos de tornillo empleados (T-transporte, M-mezcla, R-rozamiento) y se señalan las entradas y salidas.

En la zona de alimentación se montaron elementos de transporte de gran capacidad para facilitar la entrada de la biomasa. La zona de reacción comienza con la entrada del álcali al final del segundo módulo y combina elementos de transporte y mezcla, acabando en un elemento de sentido invertido (reversa), el cual actúa como tapón, aumentando la presión y el tiempo de residencia en el primer tramo del extrusor. A continuación, se encuentra la entrada del agua de lavado en el módulo 4. En el módulo 5 se produce la filtración, por lo que a la altura de su final se sitúa de

nuevo una reversa para crear la presión suficiente para la filtración. A partir de ese punto, nuevos elementos de transporte trasladan la biomasa pretratada hasta la salida del extrusor.

Para esta Configuración 1, se presentan a continuación los límites operacionales en cuanto a relación L/S y velocidad del tornillo.

3. 2. 2. 1. *Relación de flujos dentro del extrusor*

El funcionamiento del equipo está limitado por los flujos de líquido y sólido que es capaz de manejar. Se define la relación L/S como el flujo total de líquido introducido en el extrusor (kg/h de disolución de NaOH más el agua de lavado), dividido por los kilogramos de paja de cebada seca alimentados por hora. Se denominó $(L/S)_r$ a la relación entre los kg/h de disolución de NaOH y los kg/h de paja de cebada seca, es decir, a la relación de flujo líquido a sólido en la zona de reacción. Exclusivamente para las pruebas presentadas en este capítulo, los flujos de sosa son sustituidos por agua, a fin de simular este flujo de líquido sin utilizar el reactivo químico. El efecto de la sosa sobre el flujo dentro del extrusor no es el mismo que el del agua, pero esta simulación sirve para detectar los límites de operación en el extrusor con un margen de seguridad, ya que, en todo caso, la sosa facilitaría el flujo y podría añadirse más cantidad.

La relación L/S es uno de los parámetros que más influencia tienen en la operabilidad del equipo. En el caso de sobrepasar la relación máxima L/S, se pueden producir tapones dentro del extrusor y retrocesos del líquido, llevando a paradas de la operación. Yoo *et al.* (2012), por ejemplo, detectaron estos problemas cuando intentaron alimentar vainas de soja con un 50% de humedad en un extrusor de doble husillo y se vieron forzados a disminuir el flujo de alimentación para conseguir una operación correcta. En la configuración estudiada en el presente trabajo, el punto crítico es la entrada de la disolución de NaOH, ya que el agua se añade al final del proceso de extrusión (módulo nº 4) con el único propósito de lavar, y su exceso se eliminará en la filtración sin dar problemas operacionales, provocando simplemente un aumento de la cantidad de líquido filtrado.

Se realizaron unas pruebas preliminares de factibilidad de manera que, manteniendo constante el flujo de biomasa de 0,6 kg/h seleccionado en el apartado 3.2.1.1, se varió la cantidad de agua añadida con la Bomba 1 (la bomba que suministraría el flujo de la disolución de sosa en una operación normal), con el fin de obtener diferentes ratios $(L/S)_r$. El objetivo de estos ensayos fue encontrar el flujo máximo de líquido que se puede alimentar con la Bomba 1, y que permite una operación continua y regular del equipo de extrusión. Esto se repitió para diferentes velocidades del tornillo: 100, 150 y 200 rpm. Como resultado de estos ensayos, se pudo concluir que la $(L/S)_{r\text{máx}}$ a la velocidad de 100 rpm es igual a 0,75. Una velocidad

de tornillo superior permite en este caso trabajar con un flujo de líquido mayor, siendo el $(L/S)_r$ máx = 1 cuando la velocidad aumenta a 150 o 200 rpm.

Por otra parte, se construyó una tabla teórica en la que se calcularon los valores de $(L/S)_r$ que se originarían dentro del extrusor, en función de la masa de NaOH añadida por unidad de masa de paja de cebada seca (R) que se desea conseguir y de la concentración de la disolución de sosa que se use. Con base en el valor de la relación $(L/S)_r$ máx determinado experimentalmente en los ensayos previos, se puede establecer una línea divisoria que separa la región en la que la operación es factible de la que no lo es (Tabla 1.2, paneles A y B).

Tabla 1.2- Relaciones $(L/S)_r$ alcanzadas en función de la concentración de la R seleccionada y la concentración de sosa en la disolución añadida al extrusor, para 100 y 150 rpm. En verde, valores seleccionados como factibles para una correcta operación del equipo.

A) 100 rpm:

Concentración disolución de NaOH (p/v)				R (g NaOH/100g MS)
5%	10%	20%	40%	
0,5	0,25	0,13	0,06	3
1,0	0,5	0,25	0,13	5
2,0	1,0	0,50	0,25	10
3,0	1,5	0,75	0,38	15
4,0	2,0	1,00	0,50	20
5,0	2,5	1,25	0,63	25
6,0	3,0	1,50	0,75	30
7,0	3,5	1,75	0,88	35
8,0	4,0	2,00	1,00	40

B) 150 rpm:

Concentración disolución de NaOH (p/v)				R (g NaOH/100g MS)
5%	10%	20%	40%	
0,5	0,25	0,13	0,06	3
1,0	0,5	0,25	0,13	5
2,0	1,0	0,50	0,25	10
3,0	1,5	0,75	0,38	15
4,0	2,0	1,00	0,50	20
5,0	2,5	1,25	0,63	25
6,0	3,0	1,50	0,75	30
7,0	3,5	1,75	0,88	35
8,0	4,0	2,00	1,00	40

Cuando se aumenta la velocidad del tornillo a 200 rpm, las relaciones y concentraciones permitidas son muy similares a las del caso de 150 rpm (Tabla 1.2,

panel B) (datos no presentados), por lo que se asumen los mismos límites de factibilidad que a 150 rpm.

Para construir la tabla 1.2, se calcularon teóricamente los valores de $(L/S)_r$ en función de un amplio rango de concentraciones de la disolución de NaOH y de R; sin embargo, no todas las condiciones resultan adecuadas desde un punto de vista operativo. En el presente estudio, se escogió trabajar con una disolución de NaOH al 10% (p/v) para mantener valores de la concentración de sosa moderadas y evitar los riesgos derivados de trabajar con disoluciones concentradas, y, al mismo tiempo, tener un mayor grado de libertad en cuanto al parámetro R que si se empelase una disolución del 5% p/v. Con este valor de concentración de la disolución de NaOH de 10% (p/v), se eligió trabajar a 150 ó 200 rpm, ya que estas velocidades permitían ensayar valores de R de hasta 10%, cifra establecida como límite máximo de cantidad de sosa por peso de la biomasa. Tanto la concentración de la disolución de sosa (10% p/v) como la R máxima (10 g NaOH/ 100 g biomasa seca) son valores escogidos por razones medioambientales y de seguridad que se mantuvieron durante todo el trabajo.

La relación L/S es un parámetro considerado importante para la operación del equipo, pero cuya influencia sobre la efectividad de la extrusión no ha sido muy estudiada. Por un lado, una alta proporción de líquido ayuda a ablandar las fibras, pero por otro, disminuye la energía efectiva aplicada sobre el material. En el caso de extrusores de un solo husillo, se esperaría una disminución del rendimiento a medida que aumenta la relación L/S, ya que el medio se hace más viscoso y disminuiría el rozamiento (Chen *et al.*, 2010). Karunanithy y Muthukumarappan (2011) observaron la disminución del torque, es decir, del requerimiento energético del proceso, a medida que aumentaron la humedad (entre el 10 y el 50%) de forraje de maíz, pasto varilla, *Andropogon gerardii*, *Spartina pectinata* y astillas de madera de pino.

Para el caso de extrusores de doble husillo, no existen muchos estudios sobre el efecto de la relación L/S. Yoo *et al.* (2012) alimentaron vainas de soja con un contenido en humedad del 40, 45 y 50% ($L/S = 0,66, 0,82$ y 1) a un extrusor de doble husillo con un perfil de temperatura de 40 a 80°C, y hallaron un efecto significativo de la humedad en el rendimiento en base glucosa; a mayor humedad, se obtuvieron mejores rendimientos. Los autores atribuyen este efecto a que la combinación de calor y humedad ayudó a ablandar las fibras de lignocelulosa, de forma similar a los procesos de producción de pulpa de madera. Sin embargo, también advirtieron que un exceso de humedad puede conducir a la formación de una especie de lodo, reduciendo la energía efectiva aplicada y disminuyendo la eficacia del pretratamiento. En la misma línea, Um *et al.* (2013) observaron una relación directa entre el ratio L/S (entre 1 y 4) y la concentración de celulosa en paja de colza pretratada por extrusión con agua caliente. Así mismo, observaron un ligero descenso de la cristalinidad de la celulosa a medida que aumentó la relación L/S, lo cual conllevaría una mejora de la digestibilidad

enzimática. Por otra parte, Zhang *et al.* (2012a) no obtuvieron una relación significativa entre la humedad y el rendimiento de azúcares, en bagazo de maíz. El rango de humedades que probaron (entre 22,5 y 27,5%) es, según estos autores, demasiado pequeño como para que se aprecie algún efecto.

Un análisis de las relaciones L/S empleadas en los artículos más recientes no permite extraer conclusiones acerca de la conveniencia de trabajar en un rango de valores determinado. Existe mucha variación en los valores de L/S utilizados: 13,4 en paja de colza y serrín de chopo (Choi *et al.*, 2013a, b; Kim *et al.*, 2013), de 6 a 8 en *Miscanthus* (Kang *et al.*, 2013), de 6 a 10 en paja de cebada (Han *et al.*, 2013), 2 (Liu *et al.*, 2013) y 0,5 (Zhang *et al.*, 2012b) en bagazo de maíz, etc., y parecen ser seleccionadas más de acuerdo con criterios operativos, en función de la materia prima y tipo de equipo empleado, que a un efecto deseado sobre la biomasa.

3. 2. 2. 2. Tiempo de residencia

El tiempo de residencia es uno de los parámetros que pueden influir en el proceso de extrusión y está relacionado con la relación L/S y el perfil del tornillo, aunque la mayor influencia es la de la velocidad del tornillo. Así, para una alimentación de 0,6 kg/h, con un flujo de sosa de 0,3 L/h ($R = 5\%$, $L1/S = 0,5$) y un flujo de agua de 5 L/h ($L/S = 10$), se midió el tiempo de residencia en el extrusor a diferentes velocidades de tornillo (Figura 1.8).

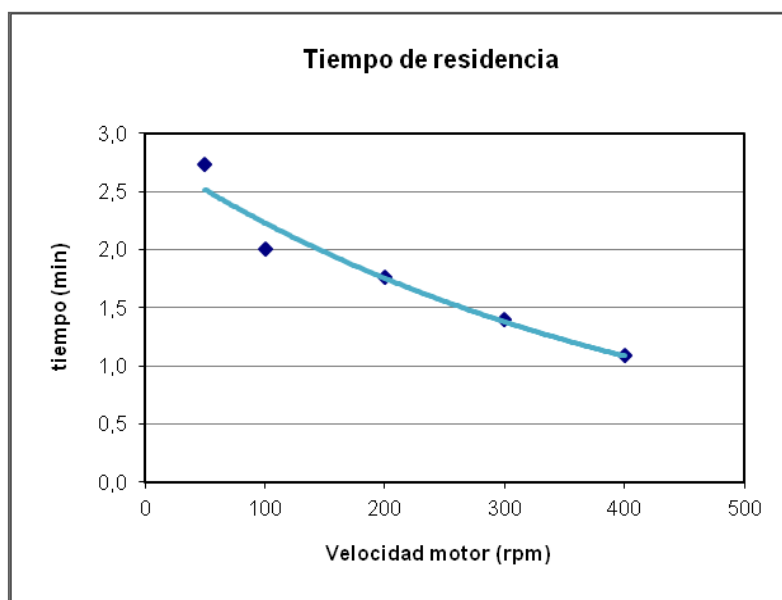


Figura 1.8- Tiempo de residencia de la biomasa dentro del extrusor en función de la velocidad del tornillo.

Como se ve en la Figura 8, el tiempo de retención disminuye con la velocidad del tornillo de forma exponencial. En el rango de condiciones probadas, el máximo tiempo de residencia alcanzado no llega a los 3 min. Se escoge trabajar a una velocidad de 150 rpm, ya que el tiempo de residencia, aproximadamente 2 min, es algo mayor que a 200 rpm, lo que favorecerá el pretratamiento. Este valor se mantuvo constante durante todo el trabajo.

El tiempo de residencia en el extrusor EV25 disponible en las instalaciones de Ciemat (en las condiciones probadas) es más corto que el que describen Choi *et al.* (2013a,b) y Um *et al.* (2013) en sus artículos (entre 7,3 y 10,2 min), pero estos autores emplearon en su equipo velocidades de tornillo muy bajas. Otros investigadores que usaron velocidades similares a las empleadas en el presente trabajo no aportan datos sobre el tiempo de residencia en el extrusor, por lo que no es posible establecer una comparación.

Como resultado de la calibración y puesta a punto del extrusor se establecieron unas condiciones de operación básicas para los ensayos de extrusión alcalina en cuanto a flujo de alimentación de biomasa, rango de relaciones $(L/S)_r$ factibles y velocidad del tornillo, tal y como se resume en la tabla a continuación (Tabla 1.3).

Tabla 1.3- Variables de operación analizadas y valores seleccionados.

Variables analizadas	Valor de operación	Determinación
Flujo de biomasa	0,6 kg/h	Experimental
$(L/S)_r$	0 - 1	Experimental
Velocidad tornillo	150 rpm	Experimental

Otros parámetros, como la temperatura y la R de operación, se estudiarán en el resto de capítulos de la presente memoria.

4. Bibliografía

Chen, F.L.; Wei, Y.M.; Zhang, B., y Ojokoh, A. O. System parameters and product properties response of soybean protein extruded at wide moisture range. *Journal of Food Engineering*. 2010, núm. 96, p. 208–213.

Choi, C. H.; Um, B-H., y Oh, K. K. The influence of screw configuration on the pretreatment performance of a continuous twin screw-driven reactor (CTSR). *Bioresource Technology*. 2013a, núm. 132, p. 49-56.

Choi, C. H.; Kim, J. S., y Oh, K. K. Evaluation the efficacy of extrusion pretreatment via enzymatic digestibility and simultaneous saccharification & fermentation with rapeseed straw. *Biomass and Bioenergy*. 2013b, núm. 54, p. 211-218.

Evon, P.; Vandebossche, V.; Pntalier, P.Y., y Rigal, L. Direct extraction of oil from sunflower sedes by twin-screw extruder according to an aqueous extraction process: Feasibility study and influence of operating conditions. *Industrial Crops and Products*. 2007, núm. 26, p. 351-359.

Han, M.; Kang, K.E.; Kim, Y., y Choi, G.W. High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor. *Process Biochemistry*. 2013, núm. 48, p. 488-495.

Iroba, K.L.; Tabil, L.G.; Sokhansanj, S., y Dumonceaux, T. Pretreatment and fractionation of barley straw using steam explosion at low severity factor. *Biomass and Bioenergy*. 2014, núm. 66, p. 286-300.

Kang, K.E.; Han, M.; Moon, S. K.; Kang, H. W.; Kim, Y.; Cha, Y. L. *et al.* Optimization of alkali-extrusion pretreatment with twin-screw for bioethanol production from Miscanthus. *Fuel*. 2013, núm. 109, p. 520-526.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Influence of extruder and feedstock variables on torque requirement during pretreatment of different types of biomass: A response surface analysis. *Biosystems Engineering*. 2011, núm. 109, vol. 1, p. 37-51.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Influence of extruder and feedstocks variables on torque requirements during pretreatment of different types of biomass – A response surface analysis. *Biosystems Engineering*. 2011d, núm. 109, p. 37-51.

Kim, S., y Holtzapple, M. T. Lime pre-treatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*. 2005, núm. 96, vol. 18, p. 1994-2006.

Kim, T. H.; Choi, C. H., y Oh, K. K. Bioconversion of sawdust into ethanol using diluted sulfuric acid- assisted continuous twin screw-driven reactor pretreatment and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. 2013, núm. 130, p. 306-313.

Li, Z.; Liu, Y.; Liao, W.; Chen, S., y Zemetra, R. S. Bioethanol production using genetically modified and mutant wheat and barley straws. *Biomass and Bioenergy*. 2011, núm. 35, vol. 1, p. 542-548.

Linde, M.; Galbe, M., y Zacchi, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, núm. 40, vol. 5, p. 1100-1107.

Liu, C.; Van der Heide, E.; Wang, H.; li, B., Yu, G., y Mu, X. Alkaline twin-screw extrusión pretreatment for fermentable sugar production. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, núm. 6, p. 97.

N'Diaye, S., y Rigal, L. Factors influencing the alkaline extraction of poplar hemicelluloses in twin-screw reactor: correlation with specific mechanical energy and residence time distribution of the liquid phase. *Bioresource Technology*. 2000, núm. 75, p. 13-18.

NREL. *Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures*. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2007.

Olanders, B., y Steenari, B.M. Characterization of ashes from wood and straw. *Biomass and Bioenergy*. 19995, núm. 8, p. 105-115.

Pérez, J.A.; González, A.; Oliva, J.M.; Ballesteros, I., y Manzanares, P. Effect of process variables on liquid hot water pre-treatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, núm. 82, p. 929-938.

Persson, T. ; Ren, J. L. ; Joelsson, E., y Jönsson, A-S. Fractionation of wheat and barley straw to access high-molecular-mass hemicelluloses prior to ethanol production. *Bioresource Technology*. 2009, núm. 100, vol. 17, p. 3906-3913.

Pronyk, C., y Mazza, G. Fractionation of triticale, wheat, barley, oats, canola, and mustard straws for the production of carbohydrates and lignins. *Bioresource Technology*. 2012, núm. 106, p. 117-124.

Rouilly, A.; Jorda, J., y Rigal, L. Thermo-mechanical processing of sugar beet pulp. I. Twin-screw extrusion process. *Carbohydrate Polymers*. 2006, núm. 66, p. 81-87.

Scheller, H. V., y Ulvskov, P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*. 2010, núm. 61, p. 263-289.

Um, B.H.; Choi, C.H.; Oh, K.K. Chemicals effect on the enzymatic digestibility of rape straw over the thermo-mechanical pretreatment using a continuous twin screw-driven reactor (CTSR). *Bioresource Technology*. 2013, núm. 130, p. 38-44.

Yoo, J.; Alavi, S.; Vadlani, P., y Behnke, K. C. Soybean hulls pretreated using thermo-mechanical extrusion – Hydrolysis efficiency, fermentation inhibitors, and ethanol yield. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, núm. 166, p. 576-589.

Zeitoun, R.; Pontalier, P.Y.; Marechal, P., y Rigal, L. Twin-screw extrusión for hemicellulose recovery: Influence on extract purity and purification performance. *Bioresource Technology*. 2010, núm. 101, p. 9348-9354.

Zhang, S.; Xu, Y., y Hanna, M. A. Pretreatment of corn stover with twin-screw extrusion followed by enzymatic saccharification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012a, núm. 166, p. 458-469.

Zhang, S.; Keshwanil, D.R.; Xu, Y., y Hanna, M.A. Alkali combined extrusion pretreatment of corn stover to enhance enzyme saccharification. *Industrial Crops and Products*. 2012b, núm. 37, vol. 1, p. 352-357.

CAPÍTULO II: EXTRUSIÓN ALCALINA DE PAJA DE CEBADA

1. Introducción

Los tratamientos alcalinos se basan en el efecto que producen agentes básicos como NaOH, Ca(OH)₂ y NH₄⁺ sobre la biomasa. El principal efecto de los pretratamientos alcalinos es la solubilización de la lignina y, en menor grado, de las hemicelulosas (en su mayor parte en forma de oligómeros), dependiendo de las condiciones empleadas. Se trata de un tipo de pretratamiento más efectivo para biomasa de tipo herbáceo, debido a su moderado contenido en lignina (Galbe y Zacchi, 2012). El mecanismo del proceso consiste en que los agentes alcalinos actúan sobre los enlaces lignina-carbohidratos, en concreto rompiendo los enlaces alquil-aril, en una reacción controlada por la estructura del enlace (Park y Kim, 2012). Durante el pretratamiento alcalino tienen lugar reacciones de saponificación y solvatación que producen un efecto de esponjamiento de las fibras, haciendo la biomasa más accesible para las enzimas (Hendriks y Zeeman, 2009). Este esponjamiento da lugar además a un aumento del área superficial, mientras que disminuyen el grado de polimerización y la cristalinidad (Galbe y Zacchi, 2012). Por otra parte, se ha descrito que los álcalis atacan a las sustituciones acetilo y ácido urónico de la hemicelulosa (Chang y Holtzapple, 2000). Cuando se trabaja con concentraciones de álcali muy elevadas, se puede producir una separación de los grupos terminales y una hidrólisis alcalina, si bien se puede originar también una degradación y descomposición de los polisacáridos solubles (Hendriks y Zeeman, 2009). Aparte de estas potenciales pérdidas de carbono, la extracción alcalina puede provocar la redistribución y condensación de la lignina, así como modificaciones del estado cristalino de la celulosa, que contrarrestarían los efectos positivos de la eliminación de la lignina y el esponjamiento de la celulosa (Gregg y Saddler, 1996).

Una de las formas de llevar a cabo un pretratamiento alcalino es empleando tiempos cortos y temperaturas y presiones elevadas. Por ejemplo, Pedersen *et al.* (2010) llevaron a cabo un pretratamiento alcalino severo que consistió en añadir NaOH a una muestra de paja de trigo al 5% p/v hasta alcanzar un pH de 13, y calentar en autoclave la mezcla durante 10 min a 140°C. Con este método se alcanzó una solubilización del 68% de la lignina inicial de la paja de trigo. Por otra parte, el pretratamiento alcalino también se puede llevar a cabo en condiciones más moderadas de presión y temperatura, disminuyendo el coste energético del proceso. En estos pretratamientos alcalinos suaves la biomasa se impregna con una solución alcalina a temperatura y presión ambiente, si bien se requieren tiempos de residencia largos. En ambos casos existe el problema del tratamiento de los efluentes, así como que una parte del álcali se transforma en sales irrecuperables, que pueden llegar a quedar incorporadas a la propia biomasa (Mosier *et al.*, 2005).

Una forma de disminuir los largos tiempo de reacción, manteniendo condiciones de presión y temperatura moderadas, es combinar el tratamiento alcalino

suave con el efecto termo-mecánico de la extrusión. En la literatura científica se describen dos formas de combinar la extrusión con un pretratamiento alcalino: la impregnación de la biomasa con el álcali y posterior introducción de la mezcla en el extrusor (Dale *et al.*, 1999; De Vrije *et al.*, 2002; Karunanithy y Muthukumarappan, 2011b; Lamsal *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012b), y la adición directa del reactivo dentro del equipo (Duque *et al.*, 2013; Um *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2013; Liu *et al.* 2013). Sólo esta última podría ser considerada propiamente un proceso de extrusión reactiva y resulta un proceso más realista desde el punto de vista operacional. La acción de la sosa dentro del extrusor se ve limitada por los bajos tiempos de residencia, pero por otro lado se produce una mezcla mucho más intensa, acompañada por fuerzas mecánicas que actúan sobre el material, lo que puede favorecer la penetración de la sosa.

Una limitación de trabajar con pretratamientos alcalinos es que es necesaria una etapa de neutralización para ajustar el pH a los valores adecuados para las siguientes etapas del proceso (hidrólisis enzimática y fermentación), aunque algunos autores no consideran necesario este paso cuando la concentración de álcali es muy baja (hasta un 3% respecto al peso de biomasa) (Karunanithy y Muthukumarappan, 2013; Zhang *et al.*, 2012b). Normalmente, se opta por neutralizar el extrusado mediante un lavado (De Vrije *et al.*, 2002; Lamsal *et al.* 2010; Duque *et al.*, 2013; Liu *et al.* 2013; Kang *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2013). De esta forma se consigue separar una gran parte de los compuestos solubles presentes tras el pretratamiento. Esto conduce a una concentración de la fracción de celulosa (Duque *et al.*, 2013), algo muy deseable de cara a su utilización para la producción de bioetanol. Sin embargo, con el agua de lavado también pueden arrastrarse azúcares solubles; además, no resulta un proceso práctico desde el punto de vista industrial, debido al gasto de agua y tiempo que conlleva y a la necesidad de añadir un equipo específico para realizar este paso intermedio. La alternativa al lavado externo sería realizar una neutralización con ácido dentro del propio equipo (Duque *et al.*, 2014), teniendo en cuenta que permanecerían en el extrusado todos los compuestos solubles más las sales resultantes del tratamiento alcalino y la neutralización.

En este capítulo se describe el desarrollo de un pretratamiento de extrusión reactiva alcalina para la paja de cebada, y se estudia su potencial para la producción de azúcares fermentables y posterior conversión a etanol, en diferentes condiciones de proceso. En una primera parte se lleva a cabo la optimización de las condiciones de extrusión para una configuración de extrusión alcalina con lavado posterior del sustrato producido. En una segunda parte se integra una etapa de neutralización en el proceso de extrusión y se ajustan las condiciones de operación para establecer una configuración de proceso que sirva como referencia para la paja de cebada. Esta misma estrategia se ensayó en un equipo de extrusión a escala piloto.

En estos estudios, la efectividad del pretratamiento se evaluó en función de la composición de los sustratos pretratados y de su digestibilidad enzimática mediante ensayos de hidrólisis con enzimas comerciales. Finalmente, en un sustrato pretratado en las mejores condiciones, se realizó una evaluación preliminar del potencial de producción de etanol en un proceso de licuefacción y sacarificación y fermentación simultáneas con la levadura *S. cerevisiae*.

2. Materiales y métodos

2.1. Ensayos de extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor

Para los primeros ensayos de extrusión se utilizó la configuración de partida ya explicada en el Capítulo I, apartado 3.2.2. (configuración 1, figura 2.1), que comprende la neutralización del extrusado alcalino producido mediante lavado fuera del extrusor. Cuenta con tres zonas diferenciadas: la zona de alimentación (módulo 1), la zona de reacción (módulos 2 a 4) y la zona de lavado-filtración (desde el módulo 4 hasta el final).

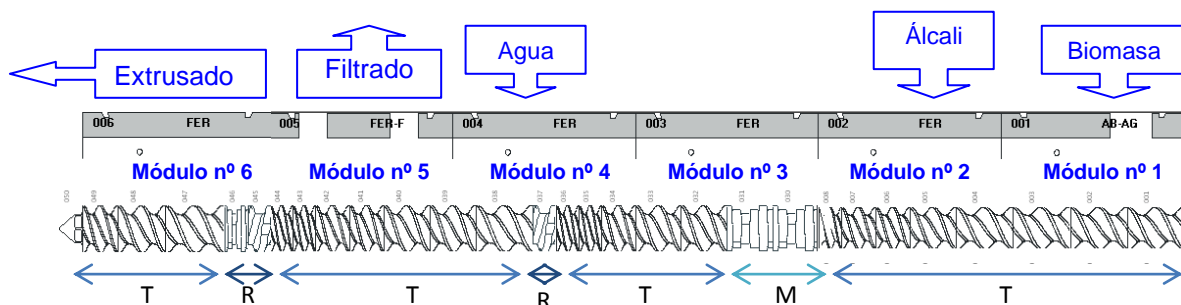


Figura 2.1- Configuración 1 para la extrusión de paja de cebada en el extrusor de doble tornillo co-rotativo. En la figura se muestran los elementos de tornillo empleados y se señalan las entradas y salidas. T-transporte, M-mezcla, R-rozamiento (ver detalle en Figura 11, Introducción).

En la zona de alimentación (módulo 1), se montaron elementos de transporte para facilitar la entrada de la biomasa. La zona de reacción comienza con la entrada de la disolución alcalina al final del segundo módulo y combina elementos de transporte y mezcla, a lo largo de los módulos 2 y 3, acabando en un elemento de sentido invertido (reversa) hacia la mitad del módulo 4, el cual actúa como tapón. De esta manera, se aumenta la presión y el tiempo de residencia en el primer tramo del extrusor. A continuación, se introduce el agua de lavado en el módulo 4. En el módulo 5 se produce la filtración, por lo que a la altura de su final se sitúa de nuevo una reversa

para crear la presión suficiente para la filtración. A partir de ese punto, nuevos elementos de transporte trasladan la biomasa pretratada hasta la salida.

El equipo se alimentó con 0,6 kg/h de paja de cebada molida (ver Capítulo I). Se añadió una disolución de NaOH al 10% (p/v), modificando el flujo de alimentación para conseguir las proporciones de álcali respecto a la materia prima (R, % p/p) ensayadas en este trabajo. Con una segunda bomba se añadieron 6 L/h de agua para el lavado dentro del extrusor. Como control se realizó un ensayo de extrusión añadiendo agua en vez de la solución de sosa. Al final del proceso se obtiene un material sólido con un alto grado de humedad y en condiciones de pH muy básico (**extrusado**) y un líquido también básico con una parte de sólidos finos que no quedaron retenidos en el filtro (**filtrado**). Estos materiales se procesaron y analizaron como se describe más adelante en el apartado 2.3.

2.1.1. Diseño de experimentos

Para estudiar las variaciones en la composición y digestibilidad enzimática de la paja de cebada por el efecto de la extrusión en esta configuración y para determinar las condiciones óptimas de extrusión que conducen a una máxima digestibilidad enzimática, se llevó a cabo un diseño de experimentos. Para ello, se escogieron dos parámetros influyentes en la extrusión alcalina: la cantidad de hidróxido sódico añadida en relación a la biomasa (R), medida en g NaOH/100g biomasa seca, y la temperatura de extrusión (T), en °C.

Se utilizó el programa StatGraphics Plus 5.0 Enterprise Edition (Statistical Graphics Corporation, Princenton, NY) para desarrollar un diseño de experimentos factorial 2^3 con dos variables, R y T. Los niveles de optimización fueron 2,5 - 5 - 7,5 % para R y 50 – 75 – 100 °C para T. Estos intervalos se escogieron de acuerdo con el criterio de mantener condiciones moderadas durante la extrusión y por las restricciones de R halladas durante la puesta a punto del equipo de extrusión (apartado 3.2.2.1). El diseño dio lugar a 9 experiencias (Tabla 2.1) distribuidas al azar, para evitar el efecto de variables distorsionadoras.

Tabla 2.1- Condiciones experimentales para la extrusión alcalina de la paja de cebada de acuerdo con el diseño de experimentos factorial 2³ usado en este estudio.

DISEÑO DE EXPERIMENTOS		
Experimento	A: Temperatura	B: NaOH/MS
	°C	% w/w
1	50	2,5
2	50	5
3	50	7,5
4	75	2,5
5	75	5
6	75	7,5
7	100	2,5
8	100	5
9	100	7,5

2.2. Ensayos de extrusión alcalina con neutralización integrada en el extrusor

En una etapa más avanzada del trabajo, se planteó alcanzar una mayor integración del proceso y realizar una neutralización directa con ácido dentro del propio extrusor, prescindiendo así del lavado del extrusado fuera del mismo. Para neutralizar el extrusado directamente dentro del extrusor con un ácido se escogió un ácido con un pKa elevado y triprótico, el ácido fosfórico, que es además menos corrosivo que el ácido sulfúrico. El H₃PO₄ se empleó diluido, en una concentración 0,1M, para evitar problemas de manejo y resultar menos agresivo para los equipos.

En una primera aproximación a la extrusión integrada con neutralización, se ensayaron las condiciones determinadas como óptimas en el apartado 3.1.1.3 con extrusados lavados, en la configuración 1 (Figura 2.1), sustituyendo la entrada de agua por la disolución de ácido fosfórico. Estos resultados (no presentados) mostraron que los rendimientos obtenidos con extrusados neutralizados dentro del extrusor eran algo más bajos que los obtenidos sólo con la extrusión alcalina y lavando después de la extrusión. Esto podría ser debido en parte a un acortamiento de la zona de reacción al introducir la neutralización y por otro lado debido a que se prescinde del lavado posterior de los extrusados, que ya se encuentran neutralizados. Frente a este hecho se plantearon dos estrategias diferentes: actuar sobre la configuración del extrusor, o actuar sobre la relación R, cantidad de NaOH por peso de materia prima.

Para el estudio de la configuración del extrusor, se modificó la configuración básica 1 (Figura 2.1), de dos formas diferentes. En la primera variación, el álcali se introdujo inmediatamente después de la biomasa en el módulo 1, llegando la zona de

reacción hasta el módulo 3 y se añadieron más elementos de mezcla para compensar en parte la reducción del espacio (configuración 2, figura 2.2). La zona de neutralización comprendió los módulos 4 y 5, siendo el 5 un módulo de filtración. Así, esta estrategia plantea la factibilidad de retirar parte del líquido en exceso, contando con el arrastre de compuestos solubles (azúcares, parte de extractivos, cenizas y sales inorgánicas), mediante una filtración.

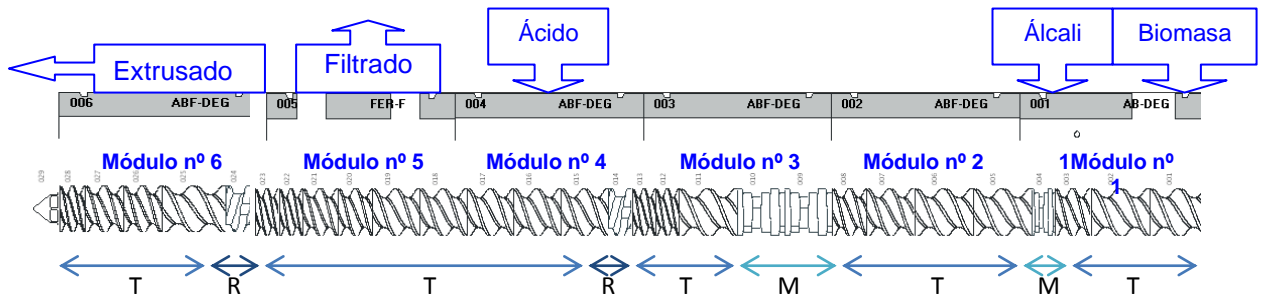


Figura 2.2- Configuración 2 para la extrusión de paja de cebada con una etapa de neutralización y filtración dentro del extrusor. En la figura se muestran los elementos de tornillo empleados y se señalan las entradas y salidas. T-transporte, M-mezcla, R-rozamiento (ver detalle en Figura 11, Introducción).

En la segunda variación (configuración 3, figura 2.3), se eliminó la etapa de filtración y se añadieron más elementos de mezcla y una reversa adicional para mejorar la mezcla biomasa-sosa en la zona de reacción. Después del segundo elemento de paso inverso, al final del módulo 4, se añadió la disolución ácida y a continuación se estableció una sección de mezcla intensa que consiguió la neutralización completa del extrusado.

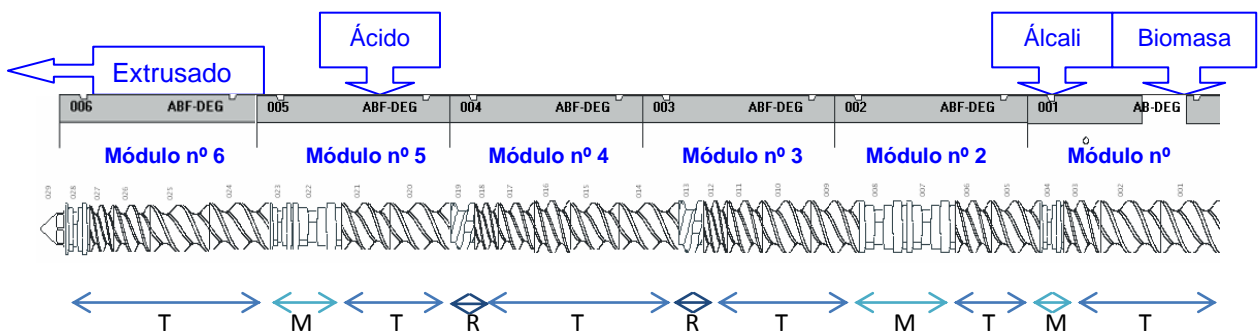


Figura 2.3- Configuración 3 para la extrusión alcalina de paja de cebada con una etapa de neutralización. En la figura se muestran los elementos de tornillo empleados y se señalan las entradas y salidas. T-transporte, M-mezcla, R-rozamiento (ver detalle en Figura 11, Introducción).

A partir de estas configuraciones, se obtienen los denominados extrusado filtrado (EF, configuración 2) y extrusado completo (EC, configuración 3).

La segunda aproximación a la optimización del proceso de extrusión y neutralización integradas consistió en intensificar la acción del tratamiento alcalino, incrementando ligeramente la proporción de álcali por encima del óptimo anteriormente establecido. Para ello, se diseñó un experimento en el que se probaron tres niveles de R (6, 8 y 10% p/p) en las dos configuraciones de proceso 2 y 3 anteriormente descritas.

Los extrusados generados en los ensayos de las configuraciones 2 y 3 en los distintos niveles de R, así como los líquidos correspondientes a los ensayos de la configuración 2 con filtración, se analizaron como se describe en el apartado 2.3. más adelante.

2.2.1. Ensayos en planta piloto

Dentro de las actividades del proyecto Babethanol, se llevó a cabo la producción de un sustrato extrusado en la planta piloto de Agromat en Tarbes, perteneciente al INPT. Esta planta piloto consiste en un extrusor Clextral Evolum HT53 con 9 módulos (Figura 2.4), acoplada a un alimentador gravimétrico con una capacidad nominal de carga de hasta 100 kg/h, dependiendo del tipo de material (Figura 2.5).



Figura 2.4- Vistas lateral y frontal del extrusor HT53 de la planta piloto Agromat.



Figura 2.5- Dosificador gravimétrico del extrusor HT53.

La configuración de proceso que se utilizó para producir el extrusado en la planta piloto se basó en la configuración 3 empleada en las instalaciones del Ciemat, adaptando la configuración del tornillo y los flujos de sólido y líquido a los nueve módulos del equipo (Figura 2.6). Las condiciones de extrusión, en cuanto a temperatura y masa de NaOH por masa de biomasa empleada, fueron las que dieron como resultado un sustrato con la mejor digestibilidad enzimática para la extrusión alcalina con neutralización en ensayos realizados en el Ciemat (ver apartado 3.1.2.2 más adelante): extrusión con filtración, 8% R y 68°C.

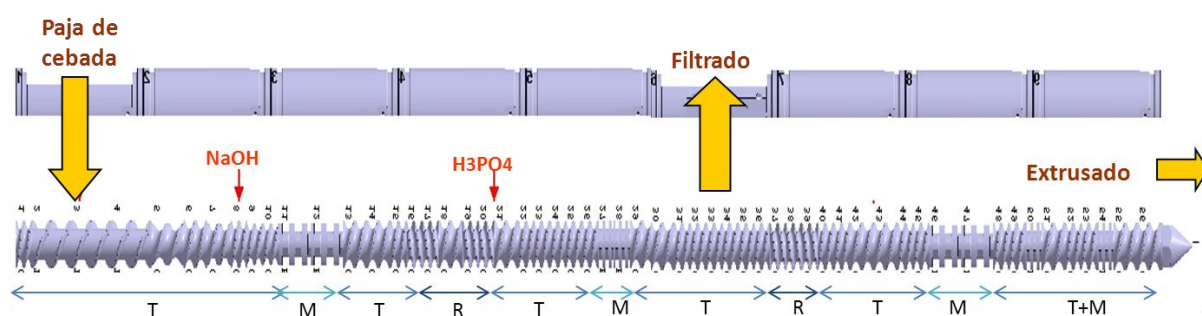


Figura 2.6- Configuración para la extrusión alcalina con neutralización en el extrusor HT53 de la planta piloto Agromat.

La densidad de la paja de cebada provocó algunos problemas en la alimentación, por lo que, para poder lograr una alimentación continua y regular, se fijó el flujo de paja en 12 kg/h (peso húmedo). Para lograr un $R = 8\%$, se alimentaron 8 L/h de una disolución de NaOH al 10% y a continuación se neutralizó el extrusado añadiendo 40 L/h de una disolución de ácido fosfórico 0,5M. Como salidas se obtuvieron un 15,3 L/h de filtrado y 39,8 kg/h de extrusado (peso húmedo). El pH de ambos sustratos a la salida fue 5.

2.3. Análisis de los materiales extrusados y del líquido de filtración

El acondicionamiento de los materiales extrusados sólidos para el análisis de composición varió en función del tipo de configuración empleada en la extrusión. Así, los extrusados alcalinos generados en la configuración 1, que no incluía la neutralización dentro del extrusor, fueron lavados mediante filtración a vacío con agua destilada tibia hasta pH neutro.

Los extrusados ya neutralizados dentro del extrusor (configuraciones 2 y 3, sustratos filtrado y completo) no requieren este lavado y por tanto se podrían analizar directamente, ya que no hay presencia de álcali que pueda interferir con el análisis. No obstante, debido a que estos materiales tienen una importante cantidad de compuestos solubles, particularmente sales en el caso de los extrusados completos, se realizó una prueba para analizar su efecto en los resultados del análisis. Para ello, por una parte se realizó un análisis directo de ambos tipos de materiales extrusados siguiendo la metodología descrita en el capítulo I, punto 2.1.2, y por otra parte se llevó a cabo un procedimiento de separación previa de la fracción soluble antes del análisis siguiendo el procedimiento NREL/TP-510-48825, según se describe en el capítulo III, apartado 2.2. Los resultados de ambos análisis fueron muy similares y por tanto se pudo concluir que el análisis directo de los extrusados denominados filtrado y completo era adecuado para determinar su composición.

La humedad de los extrusados se midió según el procedimiento NREL/TP-510-42621 en una termo-balanza Precisa XM 120 (Suiza). Tras esta medida, una porción de cada tipo de extrusado se dejó secar en estufa a 45°C para los análisis de composición y el resto se almacenó refrigerado a 4°C para su uso en los ensayos de hidrólisis enzimática.

Los líquidos filtrados recogidos durante el proceso de extrusión en las configuraciones 1 y 2 se analizaron en cuanto a su contenido en sólidos totales, solubles e insolubles, así como a su contenido en azúcares monoméricos y oligoméricos. La cantidad de sólidos totales en los filtrados se determinó mediante análisis con una balanza de microondas (Sartorius). A continuación, una alícuota de estos filtrados se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min, y se midieron los sólidos solubles en el sobrenadante con la misma balanza. Por diferencia entre ambos valores se hallaron los sólidos insolubles en los líquidos filtrados. En cuanto al contenido en azúcares solubles, una alícuota de los filtrados se midió por HPLC para la determinación de azúcares monoméricos (ver Anexo III). Los azúcares en forma de oligómeros se calcularon por diferencia entre la cantidad de monómeros (medida igualmente por HPLC) obtenida tras una hidrólisis ácida suave del filtrado (3% v/v, 121 °C y 30 min) y los monómeros presentes inicialmente en él.

2.4. Hidrólisis enzimática de los extrusados

En este apartado se describen los ensayos realizados para la evaluación de la digestibilidad enzimática de los distintos extrusados producidos a lo largo de este capítulo: extrusado alcalino lavado (producido en la configuración 1), extrusado neutralizado filtrado (configuración 2) y extrusado neutralizado completo (configuración 3). Los extrusados utilizados en este apartado fueron los producidos en el Ciemat en las configuraciones 1, 2 y 3, ya que el material extrusado procedente de los ensayos en la planta piloto se utilizó para la realización de parte de los ensayos de producción de etanol en bioextrusado (ver Capítulo III – apartado 3.3).

Por una parte, la digestibilidad enzimática de los extrusados alcalinos lavados se evaluó mediante ensayos de hidrólisis enzimática en las condiciones estándares empleadas habitualmente en el laboratorio para la evaluación inicial de la efectividad del pretratamiento en la digestibilidad del sustrato pretratado. Así, los ensayos se llevaron a cabo en tampón citrato 0,05M (pH 4,8), en Erlenmeyer de 100 mL y en un agitador orbital (Certomat-R B-Braun, Alemania) a 150 rpm y 50°C. Como cóctel enzimático se utilizó una mezcla de celulasas y xilanasas comerciales cedidas por Novozymes A/S (Dinamarca). Concretamente, se usó una combinación de Cellic CTec y Cellic Htec en una proporción 9:1 calculada tomando como base el contenido en proteínas. La dosis empleada fue de 38 mg de proteína (15 FPU)/g sustrato seco. La cantidad de sustrato empleada fue de un 2,5% en peso de sólido seco en el volumen del medio de hidrólisis. La duración de los ensayos fue de 72 h; transcurrido este tiempo, se tomaron muestras, se hirvieron durante 10 min para desactivar el enzima y se centrifugaron en una centrífuga 5415D Eppendorf AG (Alemania) a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se analizó mediante HPLC para la cuantificación de glucosa y xilosa según se describe en el Anexo III.

Por otra parte, la digestibilidad enzimática de los extrusados neutralizados dentro del extrusor se llevó a cabo en las mismas condiciones estándares descritas anteriormente para los extrusados alcalinos, si bien en este caso se usó una nueva versión más avanzada de las enzimas empleadas anteriormente, Cellic CTec2 y Cellic HTec2, añadiendo 20 mg de proteína (8 FPU)/g extrusado seco en una proporción 9:1 con base en su contenido en proteínas. En esta serie de experimentos se tomaron muestras a 0, 24 y 48 h para ver el efecto del tipo de configuración y del incremento de R en la digestibilidad enzimática. Como en el ensayo anterior, las muestras se hirvieron durante 10 min para desactivar las enzimas previamente al análisis cromatográfico. La muestra a tiempo 0 h sirve para determinar la cantidad de azúcares solubilizados durante la extrusión, si bien hay que tener en cuenta que la preparación enzimática contiene azúcares como conservantes. Para la cuantificación de este contenido se prepararon blancos de la mezcla enzimática. Este valor se restó de los azúcares medidos a tiempo 0 h para cuantificar los procedentes de la solubilización durante la

extrusión, a efectos de calcular el rendimiento de la hidrólisis enzimática en fase de incubación del extrusado con las enzimas.

Adicionalmente, a modo de comparación se realizó un ensayo de hidrólisis en la materia prima sin extrusar, así como en el extrusado control producido en la configuración 1, añadiendo agua en vez de la disolución de álcali.

La digestibilidad enzimática se evaluó tomando como base el rendimiento de hidrólisis (RHE), que se define como el porcentaje de glucosa/xilosa liberada durante la HE en relación a la glucosa/xilosa potencial, calculada ésta última tomando como referencia el contenido en glucano/xilano del extrusado (Ec. 1). En el caso de los extrusados neutralizados EC y EF, la cantidad de azúcar inicial (t = 0 h) se sustrae de la glucosa y xilosa finales medidas. Igualmente no se considera la cantidad de glucosa soluble procedente de la mezcla enzimática.

$$RHE_{\text{glucano/xilano}} = \frac{(g \text{ glucosa/xilosa por HE} - g \text{ azúcar enzima} - g \text{ azúcar } t=0h)}{(g \text{ glucosa/xilosa en extrusado} - g \text{ azúcar } t=0h)} \times 100 \quad [\text{Ec. 1}]$$

Los resultados se analizaron estadísticamente con el programa StatGraphics. En el caso de la extrusión alcalina con lavado externo, se llevó a cabo la optimización del diseño de experimentos y se analizó estadísticamente la bondad del ajuste del modelo creado. Para analizar los resultados de la digestibilidad enzimática de los extrusados neutralizados (filtrado y completo) se empleó un análisis ANOVA.

2.4.1. Ensayos de hidrólisis a altas cargas de sólidos

Con el fin de evaluar el potencial para la producción de azúcares de los extrusados producidos en las configuraciones 2 y 3, en condiciones que permitan obtener elevadas concentraciones de azúcares, se evaluó el comportamiento del extrusado neutralizado en la HE en condiciones de altas cargas de sólidos en el medio. Para ello se seleccionó el sustrato pretratado que había dado mejores resultados de digestibilidad enzimática en los ensayos anteriores, realizados a 2,5% de carga de sólidos. Este sustrato es el extrusado producido en la configuración 2 con un 8% R. Se emplearon las mismas condiciones experimentales estándares para la hidrólisis (50°C, 150 rpm) y se probaron cinco cargas de sólido diferentes por triplicado: 2,5, 5, 10, 15 y 20% (p/v). Al tratarse de cargas de sólidos elevadas, la dosis de enzima del cóctel enzimático Cellic CTec2 + Cellic HTec 2 (9:1 en contenido en proteínas) se aumentó hasta 25 mg proteína (10 FPU)/ g sustrato.

La toma de muestras y la evaluación del rendimiento se llevaron a cabo de forma similar a la explicada anteriormente (Ec. 1) para este sustrato, excepto que en estos ensayos también se determinó la concentración de azúcares en forma de azúcares totales (monómeros y oligómeros) en los medios de hidrólisis. Para ello, se realizó una hidrólisis ácida suave (3% v/v H₂SO₄, 121°C, 30 min) y se midió el contenido en azúcares por HPLC. Por diferencia con el contenido en azúcares monoméricos se pudo calcular la producción de oligómeros. A partir de estos datos se calculó el rendimiento de producción de azúcares, como los g de azúcar (glucosa o xilosa) producidos (de los que se sustrae la glucosa añadida con el enzima, tal y como se explica en el apartado anterior) por g de extrusado seco (Ec. 2). Este parámetro comprende los azúcares producidos durante la extrusión (medidos al inicio de la hidrólisis) y también los producidos durante la incubación. El rendimiento de producción se calcula tanto para azúcares monoméricos como en forma de oligómeros.

$$\text{Rdto. producción glucosa/xilosa} = \frac{(\text{g gluc/xil en el medio} - \text{g azúcar enzima})}{\text{g extrusado seco}} \times 100 \quad [\text{Ec. 2}]$$

2.5. Experimentos de sacarificación y fermentación simultáneos

Con el fin de obtener una primera evaluación del potencial para la producción de etanol en el extrusado alcalino neutralizado producido en las mejores condiciones (EF, 8% R, 68°C), se realizaron ensayos de sacarificación y fermentación simultáneas con una etapa previa de 24h de licuefacción. Se realizaron ensayos al 2,5, 15 y 20% (p/v) de carga de sólidos. Se empleó la misma mezcla enzimática que en caso anterior Cellic CTec2 + Cellic HTec 2 (9:1) y 25 mg (10 FPU)/ g sustrato.

Los extrusados se incubaron primero a 50°C con el cóctel enzimático durante 24h en matraces Erlenmeyer de 100 mL. A continuación se inocularon los matraces con 1 g/L de *Saccharomyces cerevisiae* (Ethanol Red de Fermentis, Francia) previamente crecido como se explica a continuación. Los matraces se incubaron durante 72h adicionales a 35°C. Se tomaron muestras de glucosa y etanol cada 24h, que se cuantificaron por HPLC y cromatografía de gases, respectivamente, como se describe en el Anexo III.

Se preparó un inóculo con *S. cerevisiae* Ethanol Red (Fermentis, Francia) rehidratando la levadura liofilizada en un medio de crecimiento que contenía 30 g/L de glucosa, 4 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de (NH₄)SO₂, 1 g/L de KH₂PO₄ y 0,3 g/L de MgSO₄·7H₂O. El microorganismo se dejó crecer durante 16h en un agitador orbital a 150 rpm y 35°C. Posteriormente, se centrifugó el medio y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se redisolvió en 1 mL de tampón citrato pH 4,8 y se repartió entre

los distintos experimentos de modo que la concentración de microorganismo en el medio fuese 1 g/L.

La eficiencia de producción de etanol en los extrusados se evaluó a través del rendimiento de LSFS, que considera las dos etapas de licuefacción y sacarificación y fermentación simultáneas. Este rendimiento se calculó como la cantidad de etanol producida durante la SFS, dividida por la producción potencial de etanol a partir del extrusado y se expresa en %. El etanol potencial se calculó como la cantidad máxima de etanol que podrían producir los extrusados, considerando una hidrólisis del 100% y un factor de conversión estequiométrico de 0,51 g etanol/g glucosa (Ec. 3). Se tuvo en cuenta la cantidad de etanol que se produciría a partir de la glucosa contenida en la mezcla enzimática.

$$Rdto.LSFS = \frac{(g \text{ etanol} - (g \text{ gluc enzimática} \times 0,51))}{(g \text{ gluc en extrusado} \times 0,51)} \times 100 \quad [\text{Ec. 3}]$$

3. Resultados y discusión

3.1. Efecto de los parámetros de proceso de extrusión alcalina en la efectividad del pretratamiento

Como ya se comentó anteriormente, con objeto de determinar el efecto de las condiciones de proceso (R y T) en la efectividad del pretratamiento, con vistas a su utilización en el proceso de producción de bioetanol, se estudiaron como parámetros la composición de los extrusados y los filtrados y la digestibilidad enzimática del material pretratado.

3.1.1. Extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor

3.1.1.1. *Composición de los extrusados y filtrados*

Se analizó la composición de los materiales extrusados y líquidos filtrados obtenidos en cada experimento de extrusión en la configuración 1. En la tabla siguiente (Tabla 2.2) se presentan en las tres primeras columnas los resultados obtenidos en cuanto al contenido en componentes principales de los extrusados sólidos y su comparación con la caracterización de la paja de cebada (PC) realizada anteriormente (Capítulo I, Tabla 1.1).

Tabla 2.2- Composición de la paja de cebada y de los extrusados (%ps) y contenido en azúcares hemicelulósicos de los filtrados (g/L) para diferentes temperaturas y relaciones NaOH/MS (%p/p), según los experimentos descritos en la Tabla 1. Los valores son la media de triplicados \pm la desviación típica.

Experimento (T,R)	Composición (% p/p)			Azúcares hemicelulósicos totales (g/L)
	Glucano	Xilanos	LAI	
1 (50°C, 2,5%)	43,7 \pm 0,2	26,8 \pm 0,1	19,1 \pm 0,1	1,4
2 (50°C, 5%)	46,5 \pm 0,5	25,7 \pm 0,4	15,0 \pm 0,1	5,4
3 (50°C, 7,5%)	64,5 \pm 0,1	14,5 \pm 0,1	13,7 \pm 0,4	8,6
4 (75°C, 2,5%)	52,3 \pm 1,7	26,8 \pm 0,7	18,2 \pm 0,3	1,9
5 (75°C, 5%)	53,4 \pm 1,0	26,3 \pm 0,9	14,3 \pm 0,2	7,4
6 (75°C, 7,5%)	58,3 \pm 0,2	20,8 \pm 0,2	12,4 \pm 0,2	18,0
7 (100°C, 2,5%)	45,6 \pm 1,5	26,1 \pm 1,1	19,5 \pm 0,3	0,8
8 (100°C, 5%)	51,4 \pm 1,9	25,1 \pm 1,0	13,2 \pm 0,1	7,2
9 (100°C, 7,5%)	61,0 \pm 0,3	15,6 \pm 1,6	12,1 \pm 0,3	11,7
PC	39,1 \pm 0,7	21,3 \pm 0,3	15,2 \pm 0,01	n.a.

n.a. – no aplicable

LAI – lignina ácido insoluble

PC – paja de cebada

Un primer análisis de los resultados muestra que el contenido en glucano de todos los sustratos analizados es superior al de la materia prima, si bien este efecto es más acusado a altas concentraciones de álcali. Esta concentración también se produce en el caso del xilano y la lignina a las condiciones menos severas en cuanto a temperatura y proporción sosa/peso seco. Este efecto está en parte relacionado con la solubilización durante la extrusión, y retirada mediante filtración y posterior lavado, de una gran parte los extractivos contenidos en la paja de cereal, así como de la fracción de cenizas solubles, que representan hasta un 17% del total del peso de la biomasa inicial. Teniendo en cuenta esta consideración, se puede inferir que en las condiciones que dan como resultado valores que corresponderían a los de la materia prima libre de extractivos y cenizas (47% glucano, 25,4% xilano y 18,2% lignina), no se habría producido desestructuración y solubilización de componentes principales. Por el contrario, los valores en los extrusados por debajo de los valores en materia prima

libre de solubles, serían indicativos de cierta solubilización de componentes principales.

Así, en el caso del xilano, componente mayoritario de las hemicelulosas, y de la lignina, se encuentran valores cercanos o por encima de los de la MP libre de solubles hasta un cierto nivel de R, a partir del cual la cantidad de xilano y lignina es inferior, indicando la solubilización de una parte de estos componentes. La cantidad de álcali a partir de la cual comienza la solubilización es diferente para el xilano (a partir de un 7,5% R) y para la lignina (a partir de un 5% R). No obstante, aun considerando esta solubilización, una gran parte del xilano permanece en el sólido, pudiendo ser hidrolizado en la siguiente etapa. Esto supone una ventaja de la extrusión alcalina sobre otros pretratamientos en los que los azúcares hemicelulósicos son degradados o solubilizados y, por lo tanto, no están disponibles para la fermentación. A medida que la concentración de lignina y hemicelulosa disminuyen por efecto de la T y la R, aumenta el glucano en el sólido, hasta un máximo cercano al 65% a 50°C y 7,5% R. El hecho de que la concentración de glucano en el extrusado aumente, comparada con la materia prima, es una ventaja importante de cara a la producción de etanol, ya que el sustrato que pasa a la etapa de hidrólisis enzimática se encuentra enriquecido en glucano respecto del material sin tratar.

En cuanto al efecto de los parámetros estudiados, en general, parece que la relación R produce mayor efecto que la temperatura en la composición de los extrusados lavados, ya que las variaciones encontradas entre las distintas temperaturas para un mismo valor de R no siguen una tendencia definida.

Los resultados del análisis de la fracción líquida (Tabla 2.2, última columna), muestran que la recuperación de azúcares hemicelulósicos en esta fracción es variable dependiendo de las condiciones. Una mayor cantidad de estos azúcares se recupera a valores de R elevados, lo que concuerda con una mayor solubilización de xilanos del sólido. Por otra parte, hay que destacar que casi todos los azúcares de los filtrados se encontraban en forma oligomérica, independientemente de la temperatura de extrusión. Esta capacidad de producir una alta fracción de oligómeros es típica de los pretratamientos alcalinos suaves (Galbe y Zacchi, 2012). Dentro de estos azúcares hemicelulósicos se encontró mayoritariamente xilosa, en una proporción variable con el nivel de R que fue desde valores de alrededor del 50% en las condiciones de álcali más suaves, hasta cerca del 80% en las más severas. Además, se encontraron arabinosa (10-20%) y galactosa (5-10%).

El efecto de la exposición de la biomasa a sustancias alcalinas durante el pretratamiento en la solubilización de las hemicelulosas, ha sido descrito en la literatura científica por varios autores que realizaron experimentos con diferentes materiales y condiciones de tratamiento alcalino. Por ejemplo, McIntosh y Vancov

(2010) obtuvieron un 18,5% de solubilización de la hemicelulosa para la paja de sorgo, cuando se trató con un 0,75% de NaOH en autoclave a 121°C durante 60 min. Otros estudios demostraron la efectividad del pretratamiento de materiales lignocelulósicos con un álcali diluido para la retirada de xilano, impregnando soja o paja de trigo a temperatura ambiente por un período de tiempo determinado (McIntosh y Vancov, 2010; Wan *et al.*, 2011). Sin embargo, todos estos resultados son difíciles de comparar con los obtenidos en el presente trabajo, debido a las diferentes condiciones empleadas. Cuando se realiza la integración del pretratamiento alcalino en el extrusor, la acción del álcali se combina con los efectos de mezcla y cizallamiento producidos por la extrusión, durante los 2 min que la biomasa tarda en pasar por el equipo, frente a un contacto prolongado sin efectos mecánicos como ocurre en los tratamientos de impregnación.

Como se ha comentado anteriormente, el contenido en lignina no se ve afectado a valores bajos de R, pero a partir del 5% se comienza a detectar una cierta solubilización de la lignina, que aumenta con la cantidad de sosa empleada. Esto significa que condiciones más suaves llegan a conseguir una cierta solubilización de la lignina, en comparación con la hemicelulosa, lo que sugiere una mayor efectividad de la extrusión alcalina sobre la lignina, en las condiciones probadas en este trabajo. Este hecho concuerda con una de las características de los pretratamientos alcalinos descrita en la bibliografía, que es que producen una cierta deslignificación (Mosier *et al.*, 2005; Pedersen *et al.*, 2010; Park *et al.* 2012). Zhang *et al.* (2012) registraron tan sólo pequeñas pérdidas de lignina durante el lavado del sustrato resultante de un pretratamiento secuencial, consistente en impregnación con sosa (hasta 0,04 g NaOH/g biomasa) y posterior extrusión de bagazo de maíz, si bien encontraron una mejora de los rendimientos en su proceso. En cambio, Liu *et al.* (2013), sí observaron una reducción significativa en el contenido de la lignina del bagazo de maíz al aumentar la concentración de sosa de 0,04 a 0,1 g NaOH/g biomasa. Estos datos parecen indicar que existe un umbral de concentración de álcali por debajo del cual no se produce una deslignificación efectiva de la biomasa.

Para evaluar la significación del efecto de las condiciones de extrusión (R y T) sobre la composición del extrusado, se construyeron los gráficos de superficie-respuesta y de Pareto para el contenido en glucano, hemicelulosa y lignina de los extrusados.

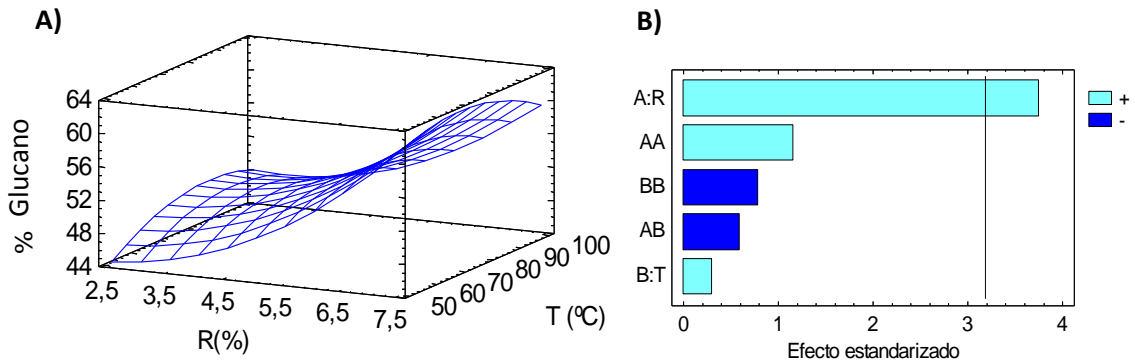


Figura 2.7- Gráfico de superficie respuesta (A) y gráfico de Pareto (B) del efecto de T y R sobre el contenido en glucano de los extrusados.

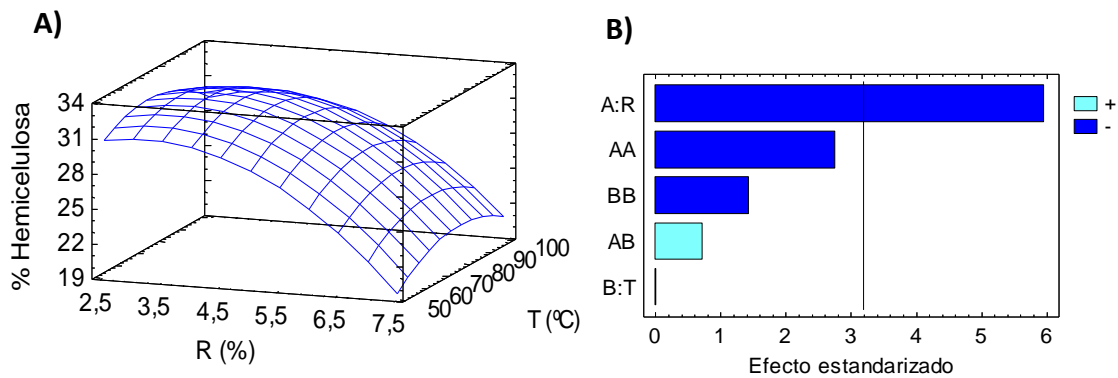


Figura 2.8- Gráfico de superficie respuesta (A) y gráfico de Pareto (B) del efecto de T y R sobre el contenido en hemicelulosa de los extrusados.

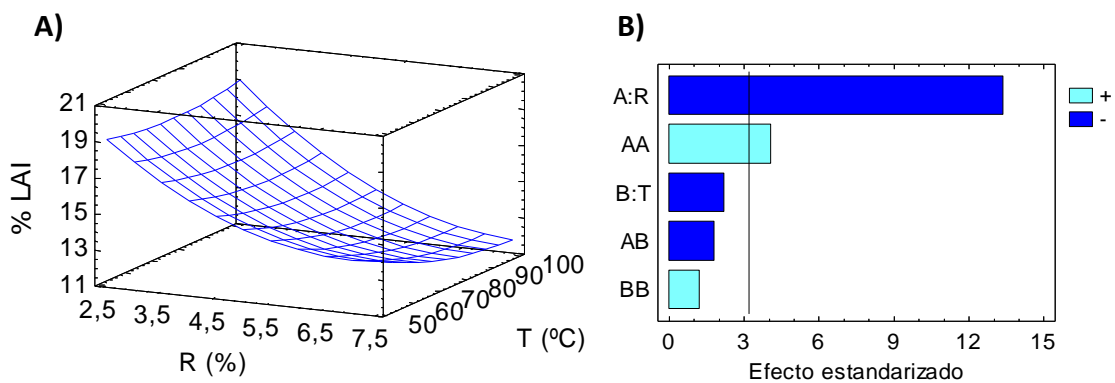


Figura 2.9- Gráfico de superficie respuesta (A) y gráfico de Pareto (B) del efecto de T y R sobre el contenido en lignina ácido insoluble de los extrusados.

Las gráficas (Figuras 2.7, 2.8 y 2.9, paneles A) muestran una clara influencia del parámetro R y, en mucha menor medida, de T sobre la composición en glucano, hemicelulosa y lignina del extrusado. El contenido en celulosa aumenta con R superiores a 2,5%, mientras que el contenido en hemicelulosa y lignina disminuyen. Esto se ve corroborado por los gráficos de Pareto, donde el efecto de R es el único

significativo para un nivel de confianza del 95% en el caso del contenido en celulosa y hemicelulosa, mientras que en la lignina también tiene una cierta influencia el término cuadrático de R. En cualquier caso, la temperatura no llega a tener un efecto estadísticamente significativo en ninguna de las respuestas consideradas, en el rango de valores ensayados.

Han *et al.* (2013), llevaron a cabo un estudio similar sobre la paja de cebada pretratada por extrusión alcalina, variando la temperatura (entre 50 y 100 °C) y la cantidad de sosa añadida (entre 5,6 y 25,6% R). Al analizar la composición de los extrusados, estos autores obtuvieron resultados similares a los del presente trabajo: un aumento del contenido de glucano y una disminución del xilano y de la lignina a medida que aumentó la cantidad de álcali añadida. Esta solubilización se dio en diferente medida en todas las concentraciones de álcali que probaron. Además, los resultados sugieren igualmente que el efecto de la temperatura fue de menor importancia respecto al de la cantidad de sosa.

3.1.1.2. Digestibilidad enzimática

Los extrusados se sometieron a ensayos de hidrólisis enzimática, tal y como se explica en el apartado 2.4, y los resultados de digestibilidad enzimática con base en el rendimiento de hidrólisis de los dos carbohidratos principales, glucano y xilano, se muestran en la tabla 2.3. Se incluyen los resultados obtenidos sobre la paja de cebada sin extrusar (PC) y extrusada con agua (EAG), realizados como control.

Tabla 2.3- RHE basados en la glucosa y la xilosa liberadas por los extrusados con álcali, para diferentes temperaturas y relaciones de sosa, según el diseño de experimentos descrito en la Tabla 2. Se incluyen extrusado con agua (EAG) y paja de cebada sin extrusar (PC) como controles. Valores medios de triplicados \pm desviación estándar.

Experimento (T,R)	Rendimiento de hidrólisis enzimática (% del teórico)	
	Glucano	Xilano
1 (50°C, 2,5%)	31,2 \pm 0,003	18,8 \pm 0,02
2 (50°C, 5%)	83,8 \pm 0,4	68,8 \pm 0,2
3 (50°C, 7,5%)	82,2 \pm 0,7	74,8 \pm 1,8
4 (75°C, 2,5%)	50,3 \pm 0,2	45,5 \pm 0,02
5 (75°C, 5%)	81,7 \pm 0,6	68,4 \pm 0,2
6 (75°C, 7,5%)	74,7 \pm 1,7	88,2 \pm 0,6
7 (100°C, 2,5%)	35,8 \pm 0,4	34,6 \pm 0,2
8 (100°C, 5%)	90,3 \pm 0,8	64,8 \pm 0,4
9 (100°C, 7,5%)	71,0 \pm 1,4	88,3 \pm 0,1
EAG	15,9 \pm 0,04	13,6 \pm 1,4
PC	17,4 \pm 2,7	10,2 \pm 0,1

A la vista de los resultados, se puede concluir que el pretratamiento de extrusión alcalina consigue mejorar la digestibilidad de los materiales extrusados respecto a la materia prima sin tratar y el extrusado control con agua, en todas las condiciones ensayadas. Este aumento alcanza valores de hasta 5 veces más, en el caso del contenido en glucano, y 9 veces más, en el del xilano, en las mejores condiciones (100°C, 5% R y 75/100°C, 7,5% R, respectivamente).

Como se puede observar en la tabla 2.3, el rendimiento de hidrólisis respecto a glucano se ve afectado por la cantidad de sosa usada en el pretratamiento, factor R. Así, en el nivel más bajo, R = 2,5 %, donde apenas se observan cambios en la composición del extrusado, el aumento de la digestibilidad enzimática es relativamente pequeño, en comparación con la obtenida en la materia prima sin tratar y el extrusado control, como resultado de una menor desestructuración del material

en estas condiciones. Es a un R del 5% y una temperatura de 100°C cuando el rendimiento de la hidrólisis en términos de glucosa alcanza su máximo, un 90% del teórico. A la concentración de 7,5%, el incremento de temperatura de 50°C a 75°C y 100°C provoca una disminución del rendimiento de 82 a 71% del teórico. Este hecho se podría atribuir a reacciones de condensación o repolimerización de la hemicelulosa y la lignina, debido a unas condiciones de operación más severas. A estas concentraciones de NaOH, 5 y 7,5%, se encontró una cierta solubilización de la lignina (Tabla 3), lo que puede ser considerado como un indicador de la ruptura de las fuertes uniones de la matriz celulosa-hemicelulosa-lignina.

Por otra parte, en el caso del xilano, el RHE aumenta a medida que se incrementa el valor de R, encontrándose un valor máximo de 88% del teórico cuando R = 7,5% y la T alcanza 75 o 100°C (Tabla 2.3). Esto quiere decir que el proceso de extrusión alcalina mejora mucho la digestibilidad del xilano, lo que demuestra el potencial de este pretratamiento para alterar la matriz lignocelulósica y facilitar la acción de las enzimas hemicelulolíticas.

El efecto positivo del parámetro R en la digestibilidad se confirma estadísticamente mediante gráficos de superficie-respuesta y de Pareto, que permiten evaluar la importancia de los parámetros estudiados (T y R) sobre el rendimiento de hidrólisis y encontrar tendencias de comportamiento.

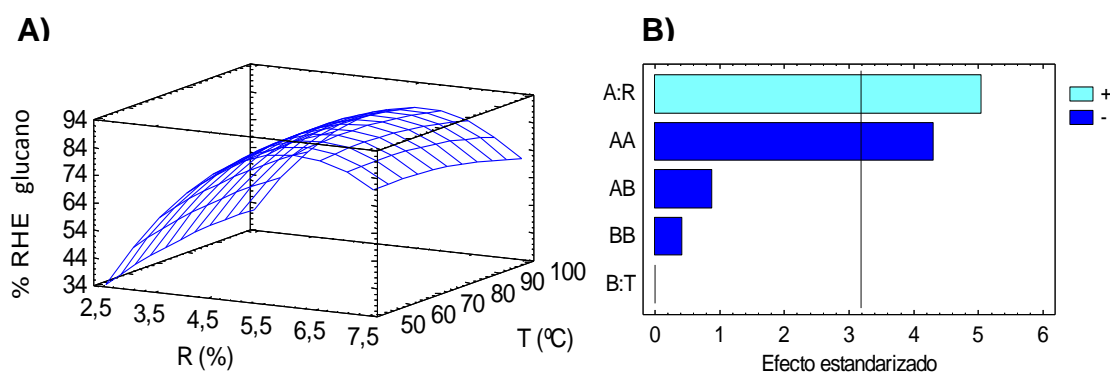


Figura 2.10- Gráfico de superficie respuesta (A) y gráfico de Pareto (B) del efecto de T y R sobre el rendimiento de hidrólisis enzimática de glucano en extrusados alcalinos con lavado fuera del extrusor.

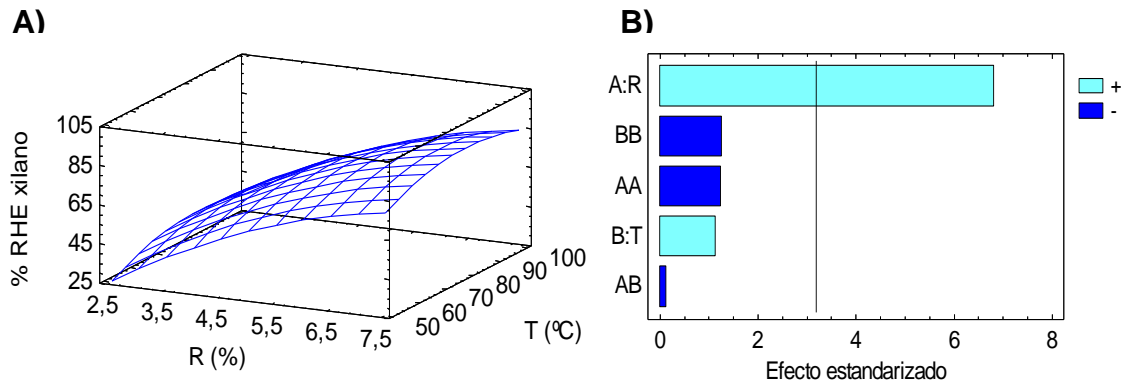


Figura 2.11- Gráfico de superficie respuesta (A) y gráfico de Pareto (B) del efecto de T y R sobre el rendimiento de hidrólisis enzimática de xilano en extrusados alcalinos con lavado fuera del extrusor.

En las figuras 2.10 y 2.11 se observa un marcado efecto de la concentración del álcali en ambas respuestas de RHE, glucano y xilano. Los gráficos de Pareto confirman que el único efecto significativo para un nivel de confianza del 95% es el de R.

El efecto positivo de la extrusión sobre la digestibilidad enzimática de los materiales lignocelulósicos se ha mostrado también en otras biomásas. De Vrije *et al.* (2002) estudiaron una combinación de pretratamientos mecánicos y químicos para la producción de azúcares fermentables a partir de *Miscanthus* y concluyeron que la combinación más favorable fue la extrusión combinada con NaOH, basándose en los mayores rendimientos de conversión de glucano a glucosa.

Respecto al mecanismo detrás de este efecto positivo de la extrusión en la digestibilidad enzimática, no se ha elaborado completamente una teoría, aunque se han formulado diferentes hipótesis. Según (Yoo *et al.*, 2011), la extrusión provoca la ruptura de la pared de las células, debido a la combinación de energías térmica y mecánica. Este efecto combinado llevaría a la exposición de una mayor área superficial y también a la deconstrucción de las cadenas hemicelulósicas que interfieren con la accesibilidad enzimática (Lamsal *et al.*, 2010). En el proceso de extrusión alcalina presentado en este trabajo, el efecto de la extrusión se vería incrementado por la acción del agente básico, el cual promueve la conversión de la celulosa por la degradación de los enlaces éster y por la ruptura de los enlaces glicosídicos de la pared celular, llevando a una reducción del complejo lignina-hemicelulosa y a una apertura de la celulosa (Eckard *et al.*, 2011).

Otros autores han estudiado la extrusión alcalina, en dos etapas o integrada dentro del extrusor, y han observado también este efecto positivo, generalmente dominante sobre otras variables. Se ha descrito que la concentración de álcali influye positivamente sobre la digestibilidad enzimática de varias biomásas como el pasto varilla, el *Andropogon gerardii*, el bagazo de maíz, o el *Miscanthus* (Karunanithy y

Muthukumarappan, 2011c, 2001d; Zhang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2013). Este efecto de la concentración de NaOH sobre la producción de azúcares por HE fue siempre significativo en estos estudios, independientemente de lo que sucedió con otras variables estudiadas por estos investigadores. Concretamente, Zhang *et al.* (2012) comprobaron que el efecto de la concentración de sosa era significativo por encima de 1,2% R hasta 4% R para el bagazo de maíz. Por otra parte Liu *et al.* (2013) observaron una cierta degradación del xilano del bagazo de maíz a la mayor concentración de sosa empleada (10% R), por lo que fijaron este valor como el máximo para un pretratamiento efectivo. Por último, Kang *et al.* (2013) obtuvieron una pérdida de sólidos mayor cuando aumentaron la cantidad de NaOH y la temperatura del pretratamiento de *Miscanthus*, lo que influyó negativamente en el rendimiento global del proceso. Las conclusiones de los experimentos de Kang y Liu, indican que unas condiciones moderadas de temperatura y catalizador en la extrusión alcalina son suficientes y convenientes para obtener un pretratamiento efectivo sin que se produzcan pérdidas de material.

3.1.1.3. Optimización de las condiciones de pretratamiento

De los diferentes parámetros estudiados en la biomasa extrusada (composición y rendimiento en la hidrólisis enzimática), un aspecto fundamental desde el punto de vista de la producción de bioetanol es el rendimiento de hidrólisis del glucano. Con el fin de maximizar la conversión de glucano a glucosa, se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos en el diseño de experimentos mediante el programa StatGraphics Plus. Este análisis genera un modelo matemático que permite predecir el comportamiento del sistema.

El programa devolvió la siguiente ecuación de predicción para el rendimiento de hidrólisis del glucano:

$$RHE_{Gluc} = -107,406 + 55,723 R + 0,96727 T - 4,3597 (R)^2 - 0,06332 RT - 0,00434133 T^2$$

El programa también proporciona las ecuaciones de comportamiento para el resto de variables (composición en cuanto a contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina, y rendimiento de hidrólisis del xilano), que no se muestran aquí.

Analizando la ecuación para el RHE_{gluc} , los coeficientes tan bajos para la temperatura y su término cuadrático confirman una relación débil de ésta con el rendimiento de hidrólisis. Con un coeficiente negativo $< 0,1$, la interacción entre R y temperatura tampoco tiene un gran peso en el comportamiento del sistema. El mayor efecto, como ya se dedujo del análisis de la Figura 10, es el del parámetro R, y en

mucho menor medida su término cuadrático. Al ser positivo, implica que un aumento de R conlleva una mejora del RHE_{gluc} .

Mediante el mismo programa informático se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el ajuste del modelo de predicción (Tabla 2.4).

Tabla 2.4- Análisis de varianza para el modelo ajustado a la respuesta del rendimiento de hidrólisis de glucano.

Fuente	Suma de los cuadrados	g.d.l.	Media cuadrada	F	p
R	2040,6	1	2040,6	25,5	0,015
T	0,001	1	0,001	0,0	0,9973
RR	484,9	1	484,9	18,6	0,0230
RT	62,6	1	62,6	0,8	0,4414
TT	14,7	1	14,7	0,2	0,6969
Error total	240,1	3	80,0		
Correlación total	3893,0	8			

El coeficiente de ajuste fue $R^2 = 0,937$, lo que significa que el modelo es capaz de predecir el 93,7% de las variaciones del rendimiento de hidrólisis de glucano, expresado como glucosa liberada. El R^2 ajustado = 0,833 es comparable al de otros estudios de optimización con diferente número de variables independientes realizados para la extrusión alcalina (Kang *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2013). Los valores de *p* confirman que para un nivel de confianza del 95%, tan sólo el parámetro R y su término cuadrático tienen un efecto significativo en el rendimiento de hidrólisis calculado en base a la glucosa producida.

De acuerdo con el criterio de maximizar el rendimiento de hidrólisis del glucano, las condiciones de pretratamiento óptimas según el modelo fueron **6 g NaOH/100 g paja de cebada y 68°C**. En estas condiciones el valor de RHE_{Gluc} alcanza un **90%**, valor máximo. Este valor es comparable a los obtenidos por Karunanithy y Muthukumarappan (2011b,c), Zhang *et al.* (2012) y Liu *et al.* (2013), en extrusiones con

sosa de otras materias primas como el pasto varilla, el *Andropogon gerardii*, y el bagazo de maíz. Todos estos investigadores obtuvieron rendimientos de hidrólisis entre un 80 y un 90% del teórico.

3.1.1.4. Validación del modelo

Una vez hallado el modelo que representa el comportamiento de la hidrólisis enzimática del glucano, se procedió a su validación mediante la producción por duplicado de un extrusado en las condiciones óptimas de R = 6% y T = 68°C. Estos extrusados se evaluaron de igual forma que los anteriores, hallándose su composición y la eficiencia de la hidrólisis enzimática de glucano y xilano.

A continuación (Tabla 2.5), se presenta una comparación entre el valor medio de los resultados de los extrusados producidos en las condiciones óptimas y los valores predichos por el modelo.

Tabla 2.5- Comparación entre la composición de los extrusados y los rendimientos de hidrólisis dados por el modelo matemático para las condiciones óptimas de 68°C y 6%R, y la media de un sustrato extrusado en dichas condiciones, por duplicado.

		Modelo	Media Extrusados
Glucano	% (ps)	54,9	56,8 ± 0,2
Hemicelulosa	% (ps)	28,1	30,3 ± 0,9
Lignina	% (ps)	14,7	14,3 ± 0,2
RHE glucano	% (del teórico)	89,9	88,9 ± 1,9
RHE xilano	% (del teórico)	78,1	71,3 ± 1,4

Se observa que el modelo se ajusta correctamente para la composición de los extrusados y el rendimiento en glucosa; sin embargo, los valores predichos se desvían ligeramente en el caso del rendimiento en xilosa.

El análisis del contenido en azúcares y otros productos en los filtrados de los experimentos en las condiciones óptimas reveló la presencia de ácido acético, indicador la desacetilación de las hemicelulosas. Un cálculo de la pérdida de ácido acético respecto de la materia prima situó esta proporción en torno al 50%. No se detectaron ni furfural ni HMF, y otros compuestos tóxicos, como los ácidos cumárico y ferúlico o la vainillina, fueron detectados tan sólo en cantidades despreciables (Tabla

2.6). La ausencia de furfural y HMF es esperable, debido a las temperaturas moderadas que se emplearon y a la elección de un catalizador básico, en vez de ácido.

Tabla 2.6. Producción de azúcares, ácido acético y compuestos de degradación (en g/100g MS) en el líquido filtrado durante la extrusión en las condiciones óptimas de 68°C y 6%R.

	g/100g MS
Glucosa	0,75
Xilosa	2,95
Total azúcares hemicelulósicos	3,97
Ácido acético	1,19
Ácido cumárico	0,09
Ácido ferúlico	0,07
Ácido vanílico	0,003
Vainillina	0,002
Hidroxi-benzaldehído	0,001
HMF	n.d.
Furfural	n.d.

n.d.- no detectado

En cuanto a la cantidad de azúcares recogidos en el filtrado del extrusado en condiciones óptimas, se encontró una pequeña cantidad de glucosa que puede provenir de la presencia de almidón en la paja de cebada, por una contaminación de ésta con grano. Respecto a los azúcares hemicelulósicos, constituyen aproximadamente el 4% del peso seco, siendo la xilosa el azúcar mayoritario (74,3% del total de azúcares hemicelulósicos), al igual que sucedía en los filtrados de los ensayos correspondientes al diseño de experimentos.

A partir de los datos de azúcares en el filtrado y la composición de los materiales extrusados, se calculó un balance de materia cuyos resultados se presentan en el apartado 3.3.1.

3.1.2. Extrusión alcalina con neutralización dentro del extrusor

3.1.2.1. *Caracterización de los extrusados neutralizados y los líquidos de filtración*

Los valores de la composición en carbohidratos, lignina y cenizas totales de los extrusados producidos en las configuraciones 2 y 3 (filtrado y completo) a los tres niveles de R (6, 8 y 10% p/p) se presentan en la tabla 2.7. Para comparación se incluyen los valores de composición de la paja de cebada sin tratar (PC).

Tabla 2.7- Composición (% peso seco) de la paja de cebada sin tratar (PC) y de los extrusados, según la configuración de proceso y la cantidad de NaOH añadida por peso seco de biomasa. EC- extrusado completo; EF- extrusado filtrado; 6, 8 y 10 (% R p/p).

% peso seco	PC	EC-6	EF-6	EC-8	EF-8	EC-10	EF-10
Glucano	39,1 ± 0,7	36,2 ± 0,6	41,3 ± 0,6	36,6 ± 0,4	45,6 ± 0,7	36,6 ± 0,4	45,5 ± 0,5
Glucosa	43,0 ± 0,7	39,8 ± 0,6	45,6 ± 0,7	40,3 ± 0,5	50,2 ± 0,8	40,3 ± 0,5	50,1 ± 0,5
Hemicelulosa	25,7 ± 0,7	23,8 ± 0,4	25,4 ± 0,2	24,6 ± 0,5	28,6 ± 0,4	24,2 ± 0,1	29,4 ± 0,9
Xilosa	23,8 ± 0,6	22,3 ± 0,2	24,7 ± 0,2	23,0 ± 0,4	27,8 ± 0,3	24,3 ± 0,2	28,8 ± 0,1
Lignina	15,2 ± 0,8	13,9 ± 0,5	15,7 ± 0,1	14,6 ± 0,1	17,0 ± 0,1	16,1 ± 0,2	17,6 ± 0,1
Cenizas	6,8 ± 0,4	12,8 ± 0,5	4,3 ± 0,3	13,2 ± 0,1	4,5 ± 0,1	14,3 ± 0,1	4,5 ± 0,6

En general, la concentración de carbohidratos en los extrusados completos, EC, fue muy similar, independientemente de la cantidad de sosa añadida. Los valores estuvieron ligeramente por debajo de los hallados para la materia prima (36 frente a 39% de glucano y 24% frente a 26% hemicelulosa), lo que se justifica porque los EC contienen no sólo la biomasa extrusada, sino también el ácido y la sosa añadidos, actuando éstos como un cierto factor de dilución de los carbohidratos. Este hecho se refleja en que las cenizas totales fueron mayores en los EC respecto de la materia prima (6,8%) y aumentaron con el aumento de la cantidad de NaOH y H₃PO₄ añadidos, de 12,8 a 14,3%, cuando se pasó de un 6 a un 10% de R.

Los extrusados filtrados (EF), en cambio, sí presentaron un contenido mayor en glucano y hemicelulosa respecto a la paja de cebada sin tratar (hasta un 45% de glucano y un 28% de hemicelulosa en los EF, comparada con los 39% y 26% de la paja de cebada). Esta concentración se debe a la filtración que se lleva a cabo en esta configuración y que arrastra sobre todo componentes solubles no estructurales (las cenizas totales disminuyen hasta un 4,5%).

El análisis de los líquidos filtrados (Tabla 2.8) muestra una cierta cantidad de azúcares (expresados como glucosa y xilosa totales tras una hidrólisis ácida suave del líquido) que proceden de la solubilización de los carbohidratos. Hay que señalar que un 96% de la xilosa solubilizada se encontró originalmente en forma oligomérica, mientras que la fracción de oligómeros de glucosa fue un 64%, lo que es consistente con los efectos de los pretratamientos alcalinos suaves sobre la hemicelulosa recogidos por Galbe y Zacchi (2012).

La cantidad de glucosa hallada es pequeña, entre 1 y 2 g/L, lo que, refiriéndolo al volumen del filtrado recogido en cada ensayo, supondría un 1,9-2,8% de la glucosa contenida en la materia prima. No se apreciaron diferencias significativas entre la glucosa solubilizada para diferentes niveles de R en la extrusión. Como ya se comentó

en el apartado 3.1.1.4, estas pequeñas cantidades de glucosa podrían provenir de la presencia de almidón en la materia prima, debido a una contaminación por grano de cereal. Sin embargo, la solubilización de la xilosa es mayor, llegando a alcanzar 5 g/L y aumentando a medida que aumenta la cantidad de sosa desde un 6-8% R a un 10% R. Estas diferencias supondrían un 6,5 – 17,3% de la xilosa en la materia prima, dependiendo de nuevo del volumen de filtrado. En total, sumando los azúcares C6 y C5, la cantidad de carbohidratos solubilizados respecto a su contenido en la paja de cebada sin tratar varió entre un 4 y un 8,5%. A pesar de esta pequeña pérdida de azúcares solubilizados en el líquido filtrado, la filtración demostró su capacidad para concentrar hasta un cierto punto los carbohidratos estructurales en los sustratos EF (Tabla 2.7), debido a la solubilización de componentes minoritarios no estructurales como son los extractivos y las cenizas solubles.

Tabla 2.8- Concentración (g/L) de azúcares totales (glucosa y xilosa), ácido acético y fenoles en el filtrado (F) según la cantidad de NaOH añadida por peso seco de biomasa. F-extrusado filtrado. 6, 8 y 10% p/p.

g/L	F-6	F-8	F-10
Glucosa	2,1	1,5	1,1
Xilosa	3,9	3,4	4,9
Ácido acético	3,8	3,3	4,0
Fenoles	0,08	0,17	0,19

En cuanto a la presencia de potenciales inhibidores, no se detectaron furfural ni HMF en los líquidos filtrados. Éste es un resultado común a los experimentos de extrusión a baja temperatura (Karunanithy y Muthukumarappan, 2010a, 2011a; Yoo *et al.*, 2012) y una de las mayores ventajas de este pretratamiento frente a otros métodos termo-químicos que se llevan a cabo a más alta temperatura. Sí se encontraron pequeñas cantidades de fenoles, todas por debajo de 0,1 g/L, niveles equivalentes a menos de un 0,01% de la materia prima, por lo que no afectarían a la fermentación. En cambio, la concentración de ácido acético encontrada fue en torno a 4 g/L, lo que, referido al volumen de filtrado y al peso seco de la materia prima, significa una desacetilación de más de un 95% respecto al contenido en grupos acetilos de la paja de cebada sin tratar (1,8%, Capítulo I, tabla 1.1), en las condiciones más severas. La alta desacetilación de las hemicelulosas debido a la extrusión alcalina concuerda con los mecanismos de actuación de los pretratamientos alcalinos, que son capaces de saponificar los enlaces acetil-éster (Hendriks y Zeeman, 2009). Esta cantidad de ácido acético que se elimina en los filtrados, se encontraría todavía en los EC, lo cual podría afectar hasta un cierto punto a la hidrólisis de estos sustratos. Sin embargo, la magnitud de este efecto depende fuertemente de la concentración, tal y como demostraron Hodge *et al.* (2008), los cuales han descrito una inhibición de la

actividad enzimática a concentraciones de ácido acético tres veces mayores que las halladas en el presente estudio.

En cuanto al material producido en la planta piloto a partir del segundo lote de materia prima (ver apartado 2.2.1), se presentan a continuación la composición del extrusado respecto al peso seco (Tabla 2.9) y la concentración de azúcares y potenciales inhibidores en el filtrado obtenido (Tabla 2.10).

Tabla 2.9- Composición (% peso seco) de la paja de cebada sin tratar del lote 2 (PC2) y del extrusado en planta piloto (EP).

% peso seco	PC2	EP
Glucano	33,9 ± 1,1	33,2 ± 0,3
Glucosa	37,3 ± 1,0	36,5 ± 0,4
Hemicelulosa	26,9 ± 0,7	26,7 ± 0,7
Xilosa	22,3 ± 0,3	24,1 ± 0,5
Lignina	13,6 ± 0,7	13,1 ± 0,3
Cenizas	6,0 ± 0,1	11,6 ± 1,1

Tabla 2.10- Concentración (g/L) de azúcares (glucosa y xilosa), ácido acético y fenoles en el filtrado del extrusado en planta piloto (FEP).

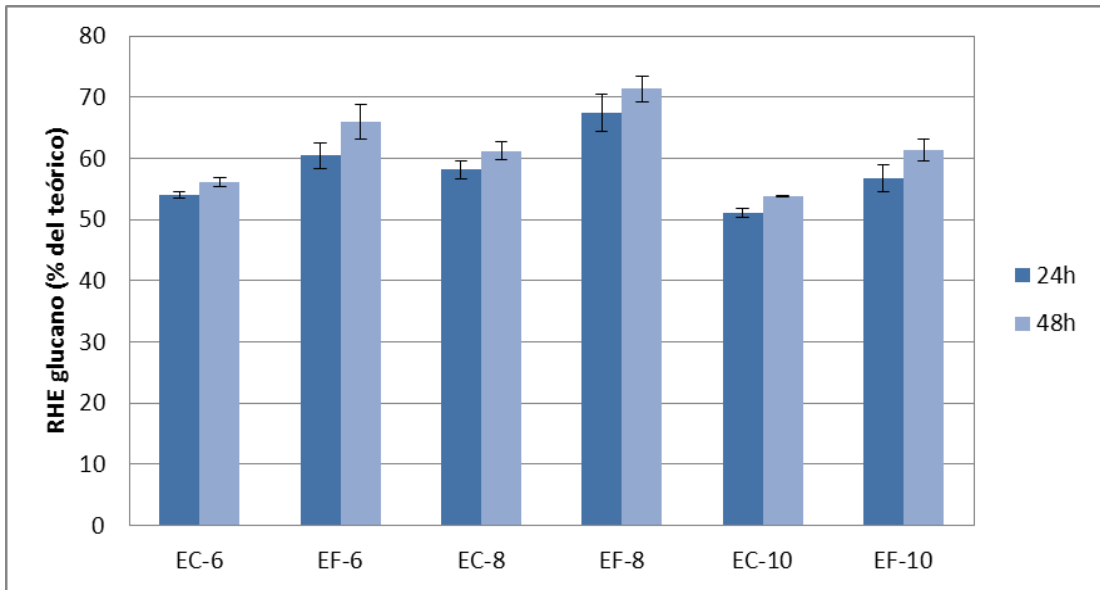
g/L	FEP
Glucosa	4,6
Xilosa	4,7
Ácido acético	9,7
Fenoles	0,4

Se puede observar que la composición del extrusado producido en planta piloto (Tabla 2.9) no difiere mucho de la paja de cebada sin tratar, esto se debe a una baja efectividad del filtrado en este ensayo, a diferencia de lo ocurrido en el equipo del Ciemat. De hecho, los compuestos presentes en el filtrado (Tabla 2.10) se hayan mucho más concentrados que en los filtrados producidos en el Ciemat, ya que el volumen de líquido recogido fue mucho menor en comparación. Así, la proporción de azúcares (glucosa y xilosa) solubilizados suponen sólo un 1,9% respecto de los azúcares en la materia prima. La baja eficiencia del filtrado en este caso también afectó a la cantidad de ácido acético retirada con el filtrado, que fue alrededor de un 50%. Nuevamente no se encontraron ni furfural ni HMF y la concentración de fenoles encontrados fue pequeña.

3.1.2.2. Digestibilidad enzimática de los extrusados alcalinos neutralizados

Los resultados de digestibilidad enzimática de los extrusados alcalinos neutralizados en el extrusor completos (C) y filtrados (F) para los diferentes valores de R ensayados, determinada tomando como base el RHE del glucano y del xilano (paneles A y B, respectivamente), se muestra en la Figura 2.12 a continuación.

A)



B)

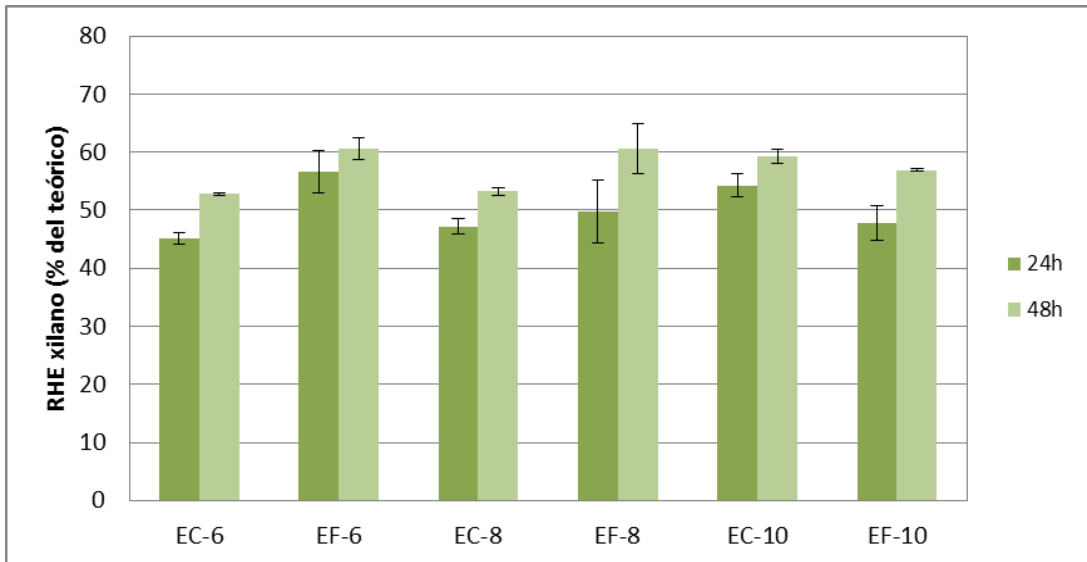


Figura 2.12- Digestibilidad enzimática a 24 y 48h de los extrusados EC y EF al 6, 8 y 10%R, tomando como referencia el RHE del glucano (A) y del xilano (B) (en % del teórico).

Los resultados muestran que en el caso de la hidrólisis del glucano, la mayor parte de los azúcares se liberan durante las primeras 24h de la hidrólisis, lo que es coherente con la baja carga de sólidos empleada (2,5%) y la cantidad de enzima añadida (8 FPU/g extrusado seco). Los valores de rendimiento de glucano en los extrusados completos oscilan entre el 52 y el 61% del teórico, mientras que se obtienen valores más altos para los EF, que oscilan entre 61 y 71%. El valor más alto de RHE_{gluc} , aproximadamente un 71% respecto de la glucosa potencial en el extrusado, se obtuvo en el EF a 8% R. Esto supone un rendimiento alrededor de 4 veces mayor que para la hidrólisis de la materia prima (17,4%) y del extrusado control con agua (15,9%), lo que corrobora el efecto positivo de la extrusión alcalina, en este caso, con neutralización dentro del extrusor, en la digestibilidad enzimática de los sustratos. En el caso de la hidrólisis de los xilanos, los rendimientos obtenidos fueron menores, entre un 52 – 60% del teórico en ambos extrusados, completo y filtrado. Esto significa una mejora de hasta 5,9 sobre el valor del rendimiento de hidrólisis de la materia prima (10,2%) y hasta 4,8 veces sobre el extrusado control (13,6%). El hecho de que el extrusado contenga prácticamente todo el xilano contenido inicialmente en la materia prima y que la eficiencia de hidrólisis de éste sea buena, implica la liberación de una cantidad significativa de xilosa al medio. Esta xilosa estaría disponible en una etapa posterior para su posible conversión a etanol, aumentando la cantidad total de azúcares producida en una sola etapa de hidrólisis enzimática.

Si se comparan los resultados anteriores con los de la extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor (Tabla 2.3), resulta evidente que la neutralización dentro del mismo interfiere de alguna manera con el efecto positivo del aumento de la cantidad de sosa en la digestibilidad enzimática discutido en el apartado anterior. El parámetro R resultó ser el parámetro más significativo en la optimización de la extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor, y al introducir la neutralización dentro del mismo, deja de ser significativo para los valores ensayados, tanto en los EC como en los EF. De hecho, el análisis estadístico de los rendimientos de la hidrólisis del glucano no muestra diferencias significativas entre los distintos niveles de R para un nivel de confianza del 95%, ni en los EC ni en los EF. Además, los resultados de $RHE_{gluc \text{ y } xil}$ fueron más bajos en esta configuración integrada incluso a los valores de R más elevados (8 y 10% p/p). Esto puede deberse a la reducción de la zona de reacción con el álcali y, por lo tanto, a una disminución del tiempo de contacto sosa-biomasa, debido a la introducción de una zona de neutralización. Otra posible causa de esta disminución en el rendimiento podría ser la acumulación en los extrusados de sales derivadas de la neutralización y otros productos liberados durante la extrusión, que podrían afectar al funcionamiento de la hidrólisis y la fermentación.

Al hilo de esta última reflexión, es destacable que, en cuanto a la configuración del proceso, sí se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre EC y EF en todos los niveles de álcali ensayados para el glucano, y al 6 y 8% R para el xilano, siendo en

general mayores los rendimientos cuando se filtró dentro del extrusor. El hecho de que los extrusados filtrados obtengan en general mejores rendimientos de hidrólisis enzimática indica que la filtración tiene un efecto positivo sobre la digestibilidad enzimática de los extrusados, que puede estar relacionado con la cantidad de compuestos solubles que se eliminarían al filtrar. Hodge *et al.* (2008), en un estudio sobre hidrólisis enzimática desarrollado sobre bagazo de maíz pretratado con ácido diluido, concluyeron que la inhibición de la hidrólisis a bajas cargas de sólido se debe fundamentalmente a la presencia de compuestos solubles y no a otros factores como la transferencia de materia. Teniendo en cuenta los resultados del análisis de los líquidos filtrados (Tabla 2.8), se puede considerar que los azúcares y el ácido acético que se detectaron en estos líquidos se encontrarían incorporados dentro de los materiales completos en la configuración sin filtración, por lo que estarían presentes en el inicio de la HE en estos sustratos. Como se comentó anteriormente en el análisis de los líquidos filtrados en la configuración 2 (Tabla 2.8), la mayor parte de estos azúcares se encontraron en forma oligomérica, sobre todo la xilosa, y según Qing *et al.* (2010) los xilooligómeros tienen un gran efecto inhibitorio sobre la actividad de las celulasas. Además, la mezcla de oligómeros solubles y ácido acético puede tener un efecto combinado que esté perjudicando a la hidrólisis (Hodge *et al.*, 2010).

En la literatura sobre extrusión alcalina no se han encontrado referencias de otros autores a la neutralización del extrusado dentro del extrusor, por lo que resulta un aspecto novedoso de esta tecnología. Tras la extrusión alcalina, la mayoría de autores llevan a cabo un lavado con agua para poder ajustar el pH en la etapa de hidrólisis y muchos no estudian cuál es el efecto de este lavado. En el presente estudio, la filtración que tiene lugar en una de las configuraciones estaría actuando como una especie de lavado con respecto a la configuración completa, por lo que puede resultar interesante comparar este comportamiento con los efectos de un lavado clásico. Por ejemplo, Lamsal *et al.* (2010) pretrataron salvado de trigo y vainas de soja solo con extrusión o impregnando antes las materias primas con una mezcla de disolventes alcalinos (hidróxido de sodio, urea y tiourea) o con una disolución de cloruro de calcio. En todos los casos, el rendimiento de hidrólisis medido en azúcares reductores fue mayor cuando se lavaron los extrusados antes de la HE. Los autores sostienen la hipótesis de que el lavado elimina los restos del tratamiento químico y además los posibles inhibidores enzimáticos producidos durante la extrusión, pero no profundizan más en este tema. Por otro lado, Zhang *et al.* (2012b) impregnaron bagazo de maíz con disoluciones de diferentes concentraciones de NaOH y a continuación pasaron estos sustratos por un extrusor de doble husillo. Los extrusados se dividieron en dos fracciones, una de las cuales se lavó con agua destilada y otra no se lavó, y se realizaron experimentos de HE con ellas. Al comparar los extrusados lavados con los no lavados, hallaron que el lavado mejoraba el rendimiento de hidrólisis cuando el pretratamiento alcalino fue más concentrado (disoluciones de más de un 5% NaOH),

mientras que a concentraciones bajas el lavado llegó incluso a afectar negativamente al rendimiento. No obstante, los autores piensan que estos resultados pueden estar parcialmente influenciados por los efectos del secado al aire sobre los extrusados.

Estos resultados encontrados en la literatura fundamentan la idea de que una filtración, que supone una retirada efectiva de determinados compuestos solubles, actúa como un cierto lavado, produciendo un efecto positivo sobre la digestibilidad enzimática de los extrusados. Por ello, esta configuración se eligió para continuar los trabajos planteados en esta tesis. En cuanto al efecto del parámetro R en la efectividad del pretratamiento para la producción de azúcares, si bien no se encontraron diferencias significativas entre los valores ensayados, se seleccionó el valor R = 8% por ser en el que se encontraron los mejores rendimientos.

El siguiente paso fue probar la efectividad de estos extrusados a mayores concentraciones de sólidos en el medio de hidrólisis y su efectividad en cuanto a la producción de etanol.

3.1.2.3. Ensayos de digestibilidad enzimática a altas cargas de sólidos

Con el fin de evaluar la digestibilidad enzimática del mejor extrusado (EF, 8% R) en condiciones de producción de elevadas concentraciones de azúcares, se realizaron ensayos de hidrólisis enzimática aumentando progresivamente la carga de sólidos desde un 2,5 hasta un 20% p/v. En esta serie de experimentos se aumentó la carga enzimática hasta 25 mg de proteína (10 FPU)/g sustrato seco. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 2.13, para la hidrólisis del glucano y en la figura 2.14 para la hidrólisis del xilano.

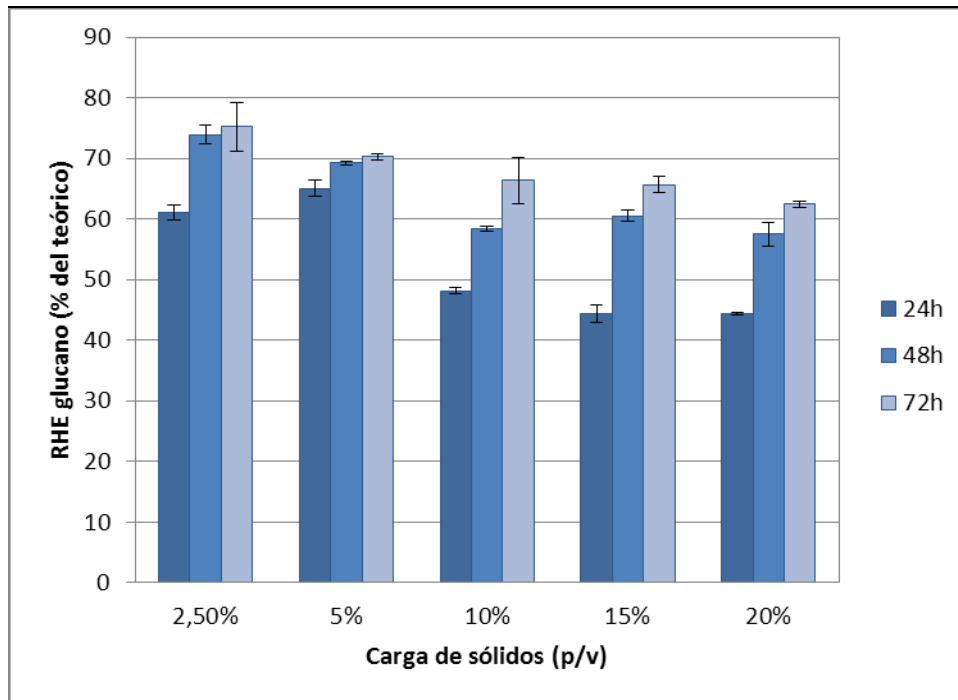


Figura 2.13- Rendimiento de hidrólisis enzimática del glucano (en % del teórico) del extrusado filtrado a 8% R a 24, 48 y 72h, en ensayos de HE al 2,5, 5, 10, 15 y 20% (p/v) de carga de sólidos.

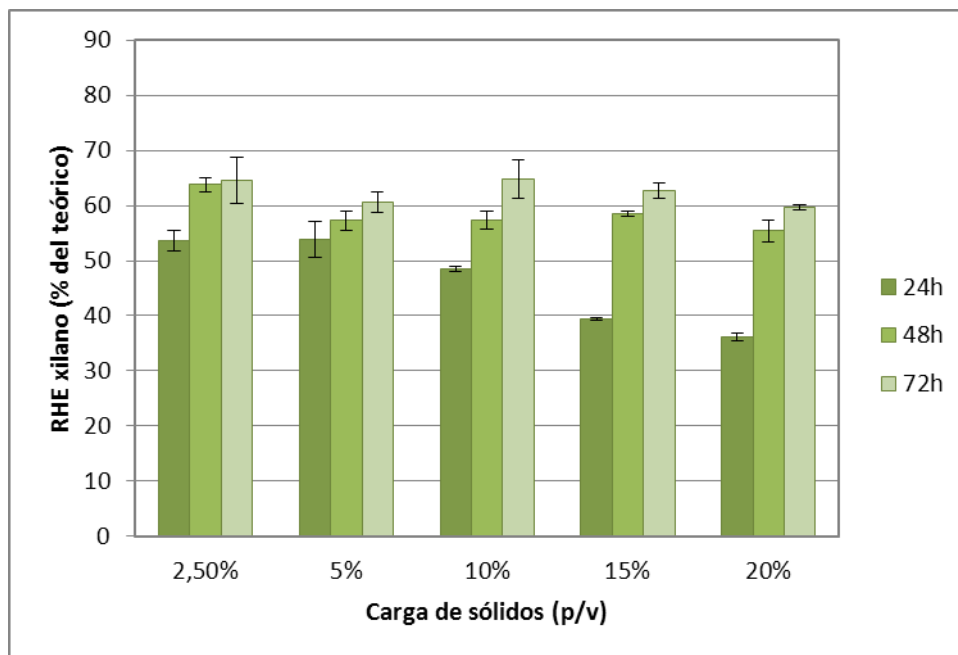


Figura 2.14- Rendimiento de hidrólisis enzimática del xilano (en % del teórico) del extrusado filtrado a 8% R a 24, 48 y 72h, en ensayos de HE al 2,5, 5, 10, 15 y 20% (p/v) de carga de sólidos.

El aumento de la carga de enzima respecto de los experimentos descritos en el apartado 3.1.2.2., incrementó ligeramente el RHE tanto de glucano como de xilano, alcanzando rendimientos de hasta un 75 y un 65% respecto a la glucosa y xilosa

potenciales, en comparación con un 71 y un 60%, respectivamente, obtenidos en los experimentos anteriores. Los resultados muestran que al aumentar la carga de sólidos a partir del 10%, se requieren tiempos de incubación más largos para alcanzar el máximo rendimiento, a diferencia de lo que ocurre a cargas menores, de 2,5 y 5% (p/v).

Por otro lado, el aumento de la cantidad de sólidos en los experimentos produce una disminución significativa ($\alpha = 0,05$) del rendimiento en base glucosa desde el 2,5 hasta el 20% de sólidos (p/v). A la mayor carga de sólidos, el rendimiento disminuye hasta un 63%, comparado con el 75% que se alcanza a la carga de sólidos de 2,5% p/v. Este efecto en la HE a altas cargas de sólidos está ampliamente documentado en la literatura científica (Jørgensen *et al.*, 2007; Modenbach y Nokes, 2012). Se ha descrito que el incremento de la carga de sólidos presenta dificultades añadidas a la hidrólisis enzimática como son una alta viscosidad, inhibición por producto (glucosa y celobiosa) en las enzimas y limitaciones a la transferencia de materia, especialmente en ensayos a escala laboratorio en matraces.

Sin embargo, a pesar de la disminución de los rendimientos, al emplear mayores cargas de sólido, la concentración de glucosa en el medio aumenta, desde aproximadamente 9,4 g/L de glucosa al 2,5% de sólidos hasta los 62,7 g/L que se alcanzan al 20% de sólidos, lo que incrementa el potencial de producción de etanol.

La hidrólisis del xilano no se ve afectada de igual modo, ya que los rendimientos oscilan alrededor del 60% en todas las cargas de sólido ensayadas. Este resultado permite aumentar la carga de sólidos en la hidrólisis de los extrusados (y con ella la concentración de xilosa en el medio), sin perder eficiencia, lo cual es muy significativo. Las concentraciones de xilosa alcanzadas son bastante elevadas, llegando a 33 g/L en condiciones del 20% de sólidos.

En esta etapa del trabajo, se planteó el interés de analizar la presencia de oligómeros en los medios de hidrólisis enzimática, ya que el estudio de los cromatogramas del análisis de azúcares monoméricos permitió detectar que en la mayoría de los medios analizados se encontraba una cierta cantidad de azúcares oligoméricos. Estos se cuantificaron realizando una hidrólisis ácida suave en el medio de hidrólisis para la medida por cromatografía de los azúcares totales y, por diferencia con los azúcares monoméricos, se pudo determinar la cantidad de oligómeros presentes. Los resultados se analizaron utilizando el parámetro producción de glucosa/xilosa, descrito en el apartado 2.4.1 (Ec. 3), que se calculó tanto para monómeros como para oligómeros. Estos resultados se muestran en las Figuras 2.15 y 2.16 a continuación.

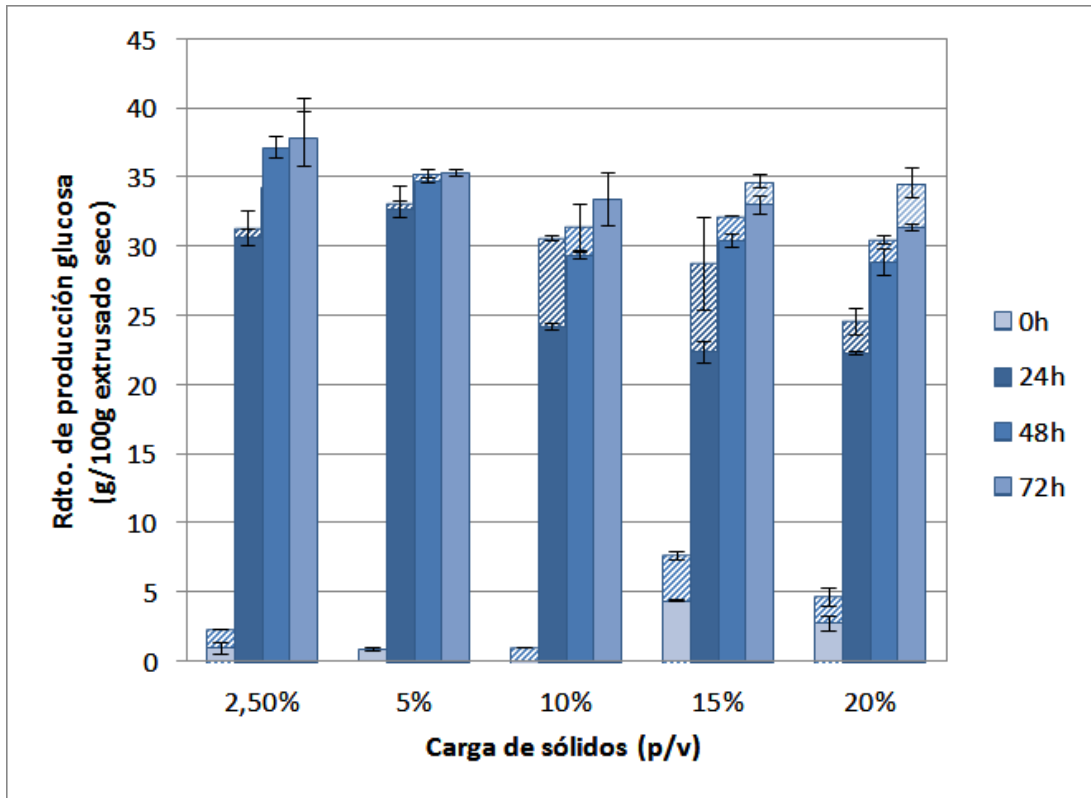


Figura 2.15- Producción de glucosa (en g/100g extrusado seco) a 0, 24, 48 y 72h, al someter al extrusado EF, 8%R a ensayos de HE a 2,5, 5, 10, 15 y 20% (p/v). Barras uniformes – producción de monómeros. Barras rayadas – producción de oligómeros.

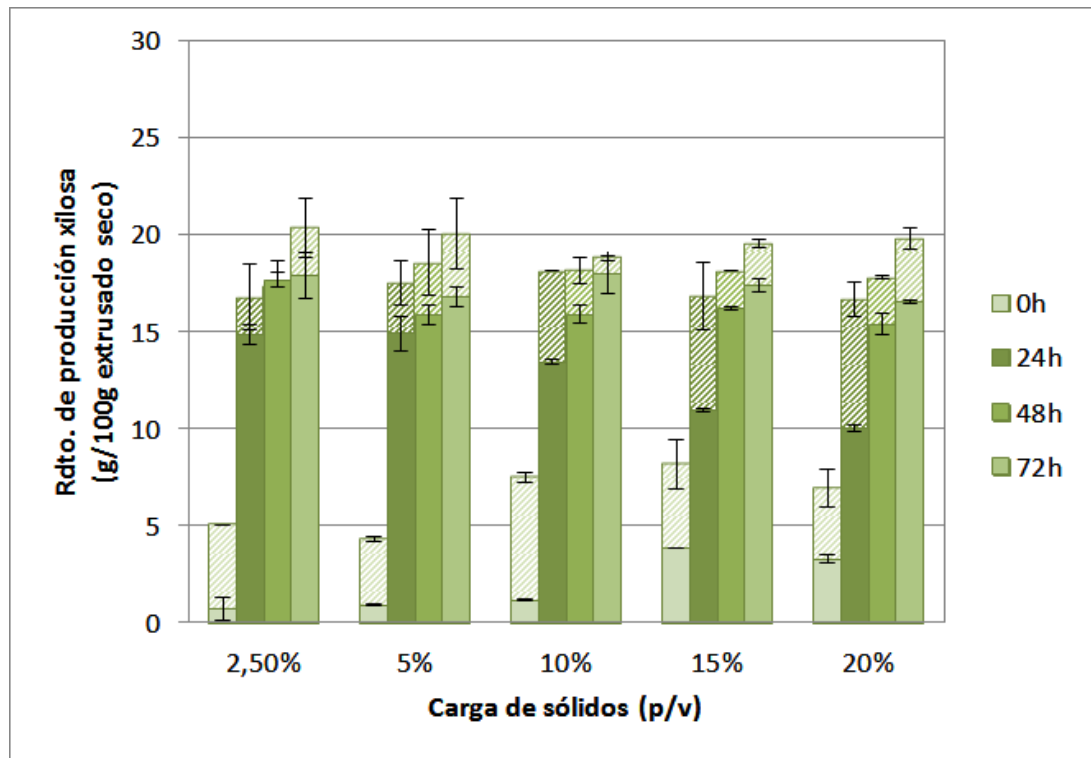


Figura 2.16- Producción de xilosa (en g/100g extrusado seco) a 0, 24, 48 y 72h, al someter al extrusado EF, 8%R a ensayos de HE a 2,5, 5, 10, 15 y 20% (p/v). Barras uniformes – producción de monómeros. Barras rayadas – producción de oligómeros.

Al analizar los resultados de producción de glucosa (Figura 2.15), se ve que el mayor rendimiento se produce a la carga de 2,5% p/v de sólidos (37,7 g glucosa/100 g extrusado seco), siendo todos en forma monomérica. En términos de monómeros, la producción disminuye al aumentar la carga de sólidos, como sucedía en el caso de los rendimientos de hidrólisis mostrados en las figuras 2.13 y 2.14. Sin embargo, el comportamiento de la producción total de azúcares (sumando monómeros y oligómeros) es diferente, ya que se llegan a alcanzar valores que oscilan alrededor de 35 g glucosa total/100 g extrusado seco a cargas del 10, 15 o 20% p/v, igualando la producción del extrusado al 5% de carga de sólidos. Este comportamiento se debe al aporte de la cantidad de oligómeros de glucosa producidos. Traducidos a datos de concentración de glucosa, la producción de glucosa al 2,5% p/v alcanzó 9,4 g/L, mientras que al 20% de carga de sólidos se encontraron 69 g/L de glucosa, contando con monómeros y oligómeros, por lo que las condiciones de altas cargas de sólidos son claramente ventajosas desde un punto de vista de lograr una mayor cantidad de azúcares.

Como se puede ver en la Figura 2.15, a las cargas de sólidos más bajas (2,5 y 5% p/v) la cantidad de oligómeros de glucosa producidos es muy pequeña y desaparecen totalmente a las 72h. En el caso de la carga del 10%, aunque se producen cantidades más apreciables de oligómeros, de nuevo a las 72h se encuentran completamente hidrolizados. Sin embargo, cuando se sigue aumentando la carga de sólidos, queda una fracción residual de oligómeros que no se hidrolizan después de 72h y que suponen un 5% y un 9% de la producción total de azúcares al 15 y 20% de carga de sólidos, respectivamente.

En el caso de la producción de xilosa (Figura 2.16), es notable el hecho de que la producción total de azúcares es mayor que la producción de monómeros en todos los casos, siendo aproximadamente 20 g de xilosa/100 g extrusado seco contando con monómeros y oligómeros, frente a 16-18 g xilosa/100 g extrusado seco en monómeros. En términos de concentración de xilosa, se encontraron 5,1 g/L al 2,5% de carga de sólidos, mientras que al 20% p/v, la concentración de xilosa total fue casi 40 g/L, por lo que también desde el punto de vista de la xilosa las altas cargas de sólidos son más favorables, al producirse una mayor cantidad de azúcares. En este caso, desde el tiempo 0h se detectaron oligómeros en todas las cargas de sólidos ensayadas. Estos oligómeros se encontraron en proporciones que variaron de 53 a 86% de la xilosa total en las distintas cargas de sólido. A lo largo de la hidrólisis se encontró una cierta fracción de oligómeros de xilosa en todas las muestras analizadas. Así, a las 72h quedaba en torno a un 16% de oligómeros no hidrolizados en todas las cargas de sólidos ensayadas y los rendimientos de producción alcanzados fueron los mismos en todas las concentraciones de sólido utilizadas.

La acumulación de una determinada proporción de azúcares en forma oligomérica indica una cierta dificultad para hidrolizar completamente los oligómeros de xilosa y glucosa que se van produciendo a lo largo de las 72h de hidrólisis, con las dosis de enzima empleadas en este trabajo. Las propias características del material extrusado empleado, que conserva una parte de las sales y otros productos derivados del pretratamiento alcalino, podrían estar influyendo en esta acumulación de oligómeros. Este aspecto se estudia con más detalle en el siguiente capítulo (Capítulo III- Bioextrusión).

Los resultados de la producción de azúcares muestran que se podrían llegar a alcanzar hasta 54 g azúcares totales/100 g extrusado seco, contando con la producción de monómeros y oligómeros de glucosa y xilosa, lo que representa un 70% del total de azúcares potenciales.

3.2. Evaluación de la producción de etanol en los extrusados alcalinos neutralizados

Se llevó a cabo un estudio preliminar del potencial de producción de etanol del extrusado neutralizado de paja de cebada en condiciones óptimas (8%R, 68°C), en ensayos de sacarificación y fermentación simultáneas con 24h de licuefacción previa. El objetivo de la etapa de licuefacción es hidrolizar parcialmente el glucano a glucosa antes de la adición del microorganismo, lo que aumentaría la velocidad de producción de etanol al inicio de la SFS, y a la vez facilita el mezclado durante la fermentación, especialmente a altas cargas de sólidos. Esta estrategia ha sido probada con éxito en la producción de etanol en condiciones de altas cargas de sólidos en varios materiales, tales como abeto pretratado mediante explosión de vapor o tallos de sorgo dulce molidos (Hoyer *et al.*, 2013; Matsakas y Christakopoulos, 2013).

En la figura 2.17 se representa el rendimiento de producción de etanol en base al rendimiento de LSFS (Ec. 2, apartado 2.4) de los extrusados a una carga de sólidos baja, 2,5% (p/v), que representaría las condiciones más favorables, y a dos cargas más elevadas, 15 y 20% (p/v).

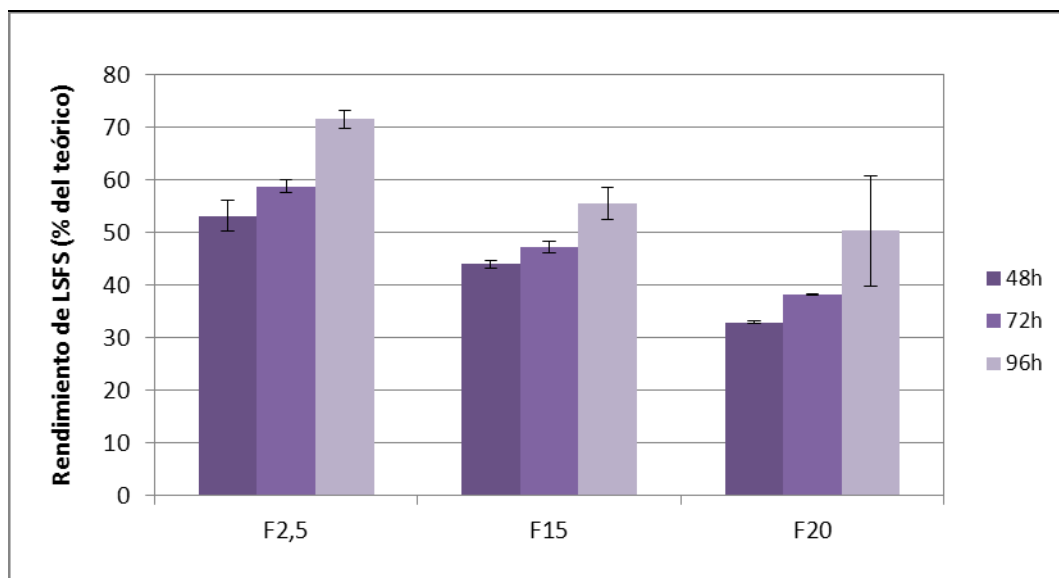


Figura 2.17- Rendimiento de producción de etanol (en % del teórico) después de 48, 72 y 96 h de incubación del extrusado filtrado a 8% R, al someterlo a ensayos de LSFS al 2,5, 15 y 20% (p/v) de carga de sólidos.

Con una concentración de etanol a las 72h de 4,5 g/L, los experimentos con un contenido en sólidos de 2,5% (p/v) obtuvieron el mayor rendimiento, alrededor de un 70% del etanol que podrían producir teóricamente. El rendimiento disminuyó a medida que se aumentó la carga de sólidos a 15 y 20% (p/v), hasta valores de 56 y 50% del teórico, respectivamente. Esta bajada está influenciada por la disminución de la eficiencia de la HE en estas condiciones, ya discutida en el apartado anterior. Sin embargo, estas elevadas cargas de sólidos permiten aumentar la concentración de etanol en el medio, que fue 21 g/L al 15% de sólidos y 25 g/L al 20% de sólidos.

La fermentabilidad de los extrusados es un tema que no ha sido muy estudiado, aunque ya existen algunas referencias en la literatura científica. Por ejemplo, Yoo *et al.* (2002) extrusaron vainas de soja a una temperatura por debajo de 100°C, ensayando diferentes condiciones de humedad y velocidades de tornillo, y posteriormente realizaron ensayos de hidrólisis enzimática y fermentación de forma separada sobre los extrusados. Partiendo de una concentración de sólidos en el medio del 10% p/v, llegaron a obtener una concentración de etanol de 15,4 g/L. Este valor se puede comparar con el presente estudio, ya que se obtuvo aproximadamente una concentración 1,5 veces mayor (25 g/L) al doble de carga de sólidos (20%). Yoo *et al.* (2002) discuten en su trabajo el posible efecto inhibitorio (dependiendo de la concentración y el pH) de la liberación de ácido acético durante la extrusión y la HE sobre la producción de etanol. En el presente estudio, una de las ventajas del uso de un extrusado filtrado es que el ácido acético producido durante la extrusión se separa antes de llegar a la hidrólisis y fermentación.

Concretamente trabajando en paja de cebada, Han *et al.* (2013) evaluaron la capacidad de producción de etanol de este material extrusado con NaOH. En las condiciones óptimas de pretratamiento (86,6°C y 16,4% NaOH/g paja de cebada), la paja extrusada fue capaz de producir un 70% de la cantidad teórica de etanol y una concentración de 28 g/L en un experimento al 10% (p/v) de sólidos, con 16 FPU/g extrusado y 7% (v/v) de *S. cerevisiae* CHY 1011. Por otro lado, Kang *et al.* (2013) produjeron un extrusado alcalino de *Miscanthus* a 200°C y 12,8% R, al que sometieron a ensayos de SFS al 25% (p/v) de carga de sólidos y con 30 FPU/g celulosa. En estas condiciones experimentales, estos autores obtuvieron una concentración de 67 g/L y una conversión de etanol del 88%. Por último Kim *et al.* (2013) estudiaron el potencial de producción de etanol mediante ensayos de SFS sobre serrín de chopo extrusado con ácido sulfúrico. Estos autores observaron una disminución del rendimiento de producción de etanol a cargas de sólido superiores al 6% (p/v), por lo que emplearon una estrategia *fed-batch* para aumentar la carga de sólidos hasta un 11% (p/v) sin perder eficiencia. Usando esta estrategia y una carga enzimática de 30 FPU/g celulosa, Kim *et al.* obtuvieron una concentración máxima de etanol de 40 g/L y un rendimiento del 77,3% (calculado sobre la materia prima).

La mayor producción de etanol que alcanzaron los investigadores anteriormente citados, en comparación con la obtenida en el presente trabajo, puede deberse a motivos asociados al proceso de pretratamiento, como son la severidad de éste, el tipo de biomasa empleado, el hecho de que los extrusados se laven después del pretratamiento y a diferencias en la forma de llevar a cabo los ensayos de hidrólisis y fermentación. Así, los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden considerarse relevantes, aunque susceptibles de mejora, teniendo en cuenta las condiciones de alta integración del proceso, con neutralización dentro del extrusor y ausencia de lavado, así como la carga de enzima empleada (20 FPU/g celulosa). De hecho, una condición común a los tres trabajos anteriormente examinados es el uso de una mayor carga enzimática en sus ensayos de SFS que la empleada en el presente trabajo. Han *et al.* (2013) añaden un 50% más de actividad enzimática, mientras que Kang *et al.* (2013 y Kim *et al.* (2013) añaden un 58% más. Además, en este último trabajo se demostró que el aumento de la carga enzimática mejoraba la producción de etanol, por lo que ésta es una posible vía de mejora.

3.3. Balances de materia

3.3.1. Balace de materia del proceso de extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor

El balance de materia de la extrusión alcalina con lavado en las condiciones óptimas de operación descritas en el apartado 3.1.1.3, para los principales componentes de la biomasa, se presenta en la figura 2.18.

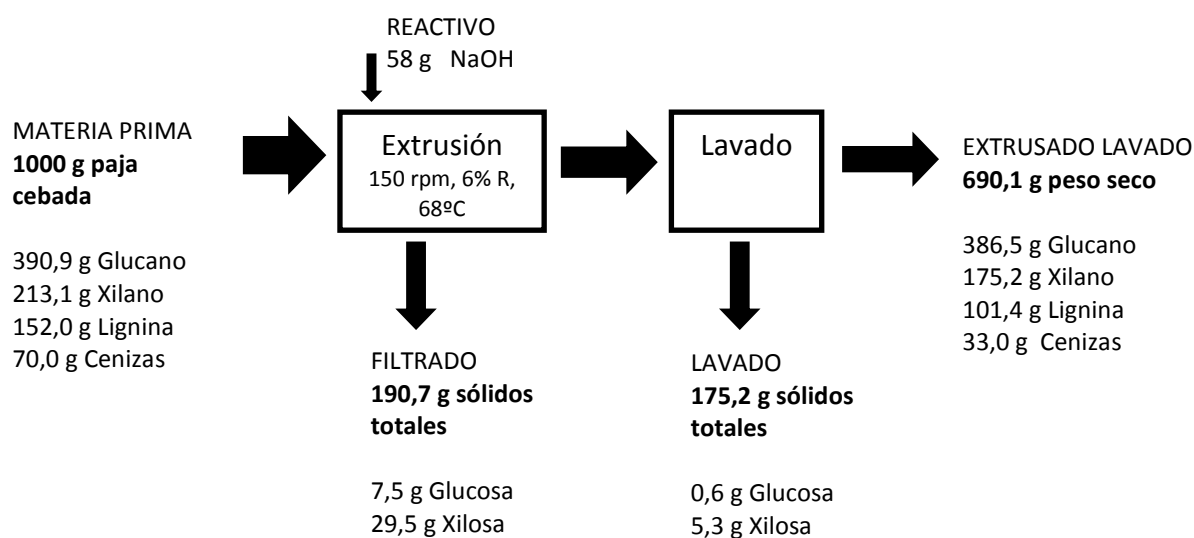


Figura 2.18- Balance de materia para 1 kg de paja de cebada pretratado por extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor.

En este proceso de extrusión alcalina seguido de un lavado, la recuperación de sólidos en el extrusado fue de un 65,2%, teniendo en cuenta el peso de reactivo añadido. Los balances de glucano y xilano no cierran completamente, debido a desviaciones en la medida tanto de las composiciones de los materiales, como del flujo de alimentación en el extrusor. Teniendo esto en cuenta, la mayor parte del glucano se recuperaría en el extrusado lavado, produciéndose pequeñas solubilizaciones durante el filtrado (alrededor de un 1,7%) y, en mucha menor medida, durante el lavado. En cuanto al xilano, se recuperó aproximadamente un 82,2% en el extrusado lavado, produciéndose unas pérdidas de un 12,2% durante el filtrado y un 2,2% durante el lavado. Por otra parte, al final del proceso se obtuvo una deslignificación de un 33,3% con respecto a la paja de cebada sin tratar. La recuperación total de sólidos del proceso fue 99,8%, por lo que se puede considerar que no se produjeron pérdidas durante la extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor.

En la literatura científica existen referencias a balances de materia calculados para la extrusión alcalina de diferentes materiales (Karunanithy y Muthukumarappan,

2011c; De Vrije *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). Estudiando los resultados obtenidos por estos autores, se pueden hallar unas tendencias generales para los efectos producidos sobre los compuestos estructurales principales de la biomasa (glucano, xilano, lignina) durante la extrusión con álcali. Así, la recuperación de glucosa suele ser muy alta, aunque se ve afectada cuando la proporción de NaOH respecto de la materia prima aumenta significativamente. Por ejemplo, Karunanithy y Muthukumarappan (2001c) lograron recuperar el 100% del glucano en el extrusado después de aplicar un pretratamiento secuencial (impregnación con NaOH 2% seguida por extrusión en extrusor de husillo simple) a la biomasa de *Andropogon gerardii*. También De Vrije *et al.* (2002) obtuvieron una recuperación de glucano muy alta (97,2%) sobre *Miscanthus* extrusado a 100 rpm, 100°C y con un 12% R. Kang *et al.* (2013) trabajaron igualmente con *Miscanthus* en condiciones cercanas a las del trabajo de De Vrije *et al.* (2002) (80 rpm, 95°C y 12,8% R), pero en este caso la recuperación de glucano fue algo menor (88,3%). Al usar una proporción de sosa a materia prima más elevada (16,4% R) en la extrusión alcalina de paja de cebada a 100 rpm y 87°C, la recuperación de glucano fue menor que en los casos anteriores, un 76,6% (Han *et al.*, 2013).

En cuanto al xilano, las recuperaciones descritas en la bibliografía son altas cuando la cantidad de sosa es pequeña (Karunanithy y Muthukumarappan, 2011c) y disminuyen cuando se emplean R altas, pero siempre se encuentran por encima del 50% (54% según De Vrije *et al.*, 2002; 64,4% según Kang *et al.*, 2013).

El comportamiento de la lignina es coherente con los efectos esperados del álcali. Así, a mayores proporciones de NaOH respecto a la biomasa, se produce una mayor deslignificación de los sustratos, que puede llegar hasta un 75% (De Vrije *et al.*, 2002). En cambio, las condiciones más suaves aplicadas por Karunanithy y Muthukumarappan (2011c), tan sólo produjeron un 25% de deslignificación.

Por último, un caso especial es el estudio realizado por Liu *et al.* (2013), ya que estos emplearon condiciones de pretratamiento muy similares a las usadas en el presente trabajo. Estos autores llevaron a cabo un pretratamiento de extrusión alcalina de bagazo de maíz al 6% R y 100°C, con la diferencia de que después del pretratamiento mantuvieron la temperatura del extrusado durante una hora para proseguir el tratamiento. Liu *et al.* (2013) obtuvieron resultados muy parecidos a los del presente trabajo en cuanto a recuperación de glucano (98,6%). Sin embargo, recuperaron menos cantidad de xilano (78,4%) y obtuvieron una deslignificación mucho mayor, un 71%. Este mayor efecto sobre el xilano y la lignina puede estar relacionado con el tipo de biomasa empleada como materia prima y también parece indicar que la prolongación durante una hora más del tiempo de contacto NaOH a la temperatura de tratamiento favorece la continuación del tratamiento alcalino.

Por lo tanto, a partir de los datos obtenidos y su comparación con otros ensayos de extrusión alcalina descritos en la literatura científica, se puede concluir que la extrusión alcalina con filtración intermedia y lavado fuera del extrusor es un método efectivo de pretratamiento que permite recuperar una proporción elevada de los carbohidratos contenidos en la biomasa, quedando éstos disponibles para la etapa siguiente de HE. En condiciones moderadas de álcali, permite recuperar casi toda la glucosa y obtener una recuperación de xilano alta, en comparación con otros pretratamientos tales como, por ejemplo, los tratamientos hidrotérmicos, además de producir una cierta deslignificación.

3.3.2. Balance de materia del proceso de extrusión alcalina con neutralización

A continuación se presenta el balance de materia para la extrusión alcalina con neutralización realizado en Cimat en las mejores condiciones seleccionadas en el apartado 3.1.2.2 (filtración dentro del extrusor, 8% R).

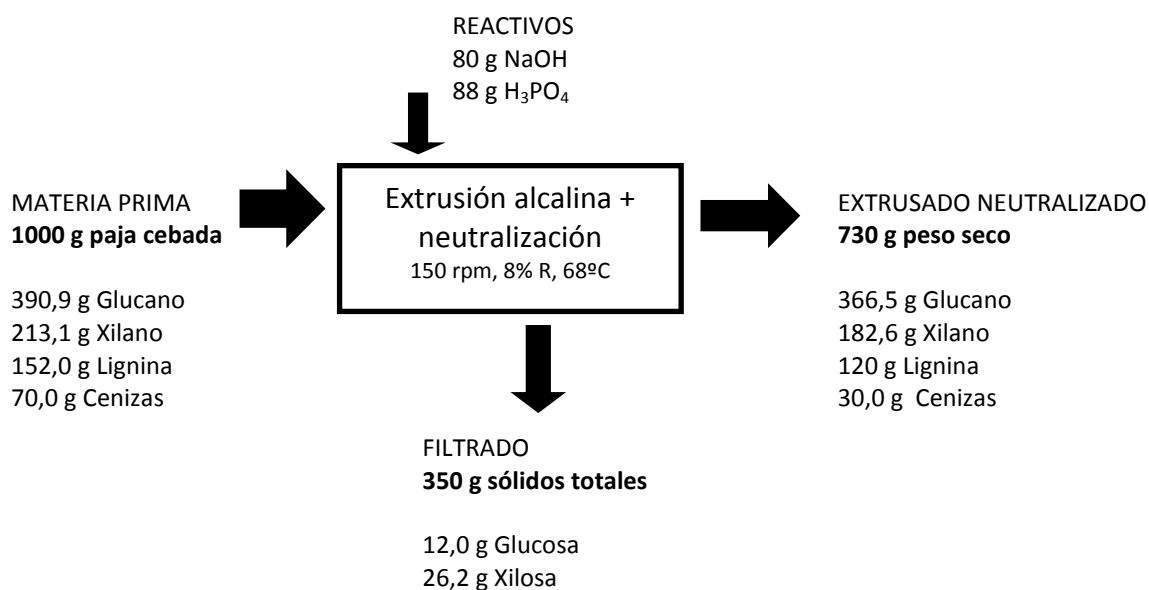


Figura 2.19- Balance de materia para 1 kg de paja de cebada pretratada por extrusión alcalina con neutralización dentro del extrusor.

En el caso de la extrusión alcalina con neutralización dentro del extrusor (Figura 2.19), los resultados se encuentran más o menos en el rango de los calculados para la extrusión alcalina con lavado externo. La cantidad de glucosa encontrada en el líquido de filtrado equivaldría a un 2,8% de pérdidas de glucano. La recuperación de xilano en el extrusado sólido fue un 85,7%, solubilizándose un 10,9% de xilano en el filtrado. El valor de la deslignificación correspondió a 20%. La recuperación de sólidos en el

extrusado fue 62,5%; en cuanto a la recuperación global de sólidos del proceso, su valor fue 92,5%, algo menor que en el caso anterior, pero también muy elevado.

3.3.3. Balance de materia del proceso de extrusión alcalina con neutralización en planta piloto

Se analizaron las composiciones del filtrado y el extrusado y con todos estos datos se calculó el balance másico del proceso, presentado en la figura 2.20.

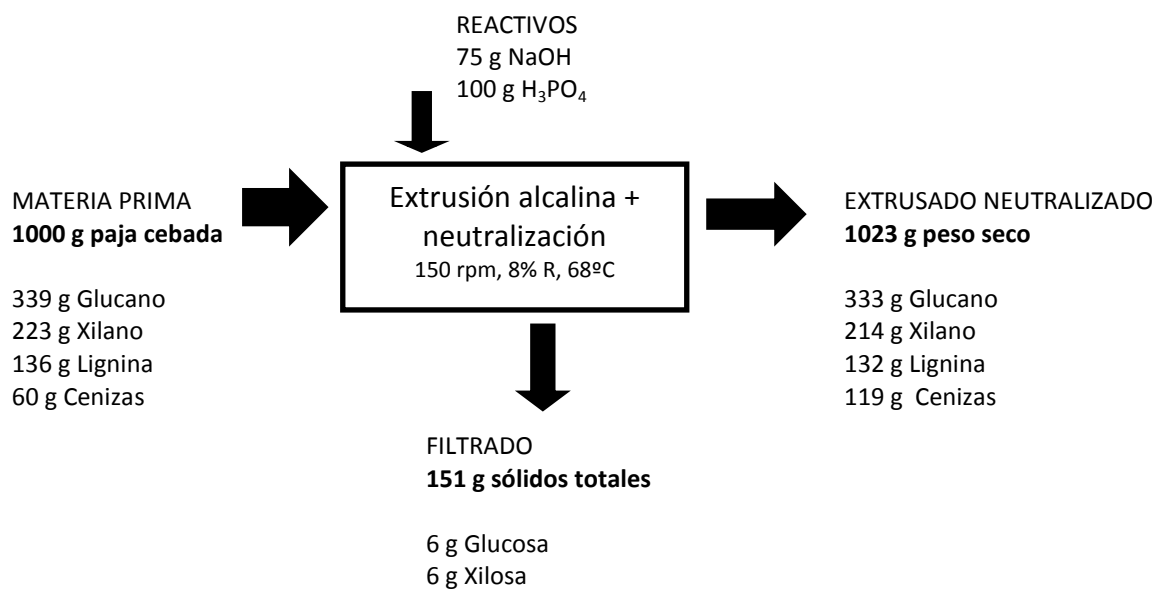


Figura 2.20- Balance de materia para 1 kg de paja de cebada pretratada por extrusión alcalina con neutralización, llevada a cabo en planta piloto.

Como se puede ver en la figura 2.20, en la planta piloto de extrusión, la proporción de filtrado obtenida es más pequeña que en el equipo de extrusión del Ciemat. Este diferente comportamiento de la filtración se puede deber a que, al escalar el proceso, la formación del tapón dinámico necesario para la filtración no es igual que en el extrusor más pequeño EV25, por lo que la eficiencia del prensado es menor. Esto afecta a la cantidad de sólidos que se arrastran mediante el filtrado y se puede ver en la elevada cantidad de lignina y cenizas que se encuentran en el extrusado sólido. Puesto que la recuperación total de sólidos fue del 99%, esta disminución de la cantidad de sólidos encontrada en el filtrado se tradujo en un aumento de los sólidos recuperados en el extrusado. Así, la recuperación de sólidos en el extrusado fue 87,1%. Por otro lado, mientras que la recuperación de glucano es similar a la obtenida en las dos configuraciones de extrusión (con lavado y con neutralización) utilizadas anteriormente en el Ciemat, en este caso la recuperación de

xilano es mayor, llegándose a recuperar en el extrusado hasta el 96% del xilano en la materia prima. Por lo tanto, el escalado de la extrusión alcalina con neutralización produjo algunos cambios en el balance de materia respecto a los ensayos realizados en el equipo de extrusión del Ciemat.

4. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el estudio realizado de extrusión alcalina de paja de cebada en distintas configuraciones de proceso, se puede concluir que, de forma general, este pretratamiento es un método efectivo para alterar la estructura de dicha biomasa y promover así la producción de azúcares fermentables a partir del material extrusado, mediante la utilización de enzimas hidrolíticas comerciales.

Como resultado del efecto de la combinación de extrusión y tratamiento alcalino, se produce una desacetilación de las hemicelulosas, así como una cierta solubilización de las mismas y una deslignificación, en un grado variable, dependiendo de la concentración de álcali y la configuración del proceso.

En la configuración de **extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor**, se obtiene un extrusado sólido enriquecido en glucano respecto a la materia prima, que es altamente susceptible al ataque enzimático, alcanzándose rendimientos máximos de hidrólisis de glucano y xilano alrededor del 90% y el 88%, respectivamente.

En esta configuración de proceso se ha estudiado el efecto del incremento de la temperatura (T) y la relación de álcali añadido respecto a la materia prima seca (R) en la composición de la biomasa y su digestibilidad enzimática mediante el empleo de enzimas comerciales, siendo R el factor que presenta un efecto significativo en los parámetros evaluados. Una optimización de las condiciones de operación para esta configuración, con el fin de maximizar la conversión de glucano a glucosa, da como resultado un valor de R del 6% y una temperatura de 68°C. En estas condiciones, la configuración permite llegar a rendimientos de hidrólisis de glucano cercanos al 90% y rendimientos de hidrólisis del xilano del 71%. El balance de materia del proceso permite establecer una recuperación global de sólidos de 99,8% y recuperaciones de azúcares en el extrusado sólido de 98% para el glucano y de 75% para el xilano.

La integración de una etapa de **neutralización dentro del extrusor** en la configuración básica de **extrusión alcalina**, permite obtener un extrusado con un pH neutro que se puede incubar directamente con las enzimas para la hidrólisis de los carbohidratos. De esta forma, se disminuyen las operaciones corriente abajo y se avanza en la integración del proceso.

Esta configuración integrada se ha estudiado en una doble vertiente, con una etapa de filtración, produciendo un extrusado filtrado y sin filtración alguna, produciendo el denominado extrusado completo. En general, el rendimiento de hidrólisis de los extrusados neutralizados es algo menor que el de los extrusados lavados fuera. En este caso, un incremento de R hasta un valor de 10% no se traduce en mejoras significativas de la digestibilidad enzimática, lo que puede deberse a un menor tiempo de contacto sosa-biomasa o a la presencia de sales derivadas de la neutralización. Sin embargo, la inclusión de una etapa de filtración dentro del extrusor sí mejora significativamente la capacidad de hidrólisis de los extrusados neutralizados, en comparación con los extrusados completos sin filtración. Así pues, se concluye que la etapa de filtración es necesaria en esta nueva configuración y se establecen 8% R y 68°C con filtración, como valores óptimos de pretratamiento para la continuación del trabajo. El balance de materia de esta configuración permite establecer una recuperación global de sólidos de 92,5% y recuperaciones de glucano y xilano en el extrusado sólido de 97 y 86%, respectivamente.

El ensayo de esta configuración y condiciones de operación óptimas en una planta piloto ha demostrado que el escalado de la extrusión alcalina más neutralización es factible, si bien se producen ciertos cambios en el balance de materia del proceso.

El estudio de la digestibilidad enzimática del extrusado alcalino neutralizado en el extrusor en condiciones de carga de sustrato del 2,5 al 20% (p/v), da como resultado rendimientos de hidrólisis de glucano que van desde el 75 al 63% del teórico, dependiendo de la carga de sólidos. El aumento de la carga de sólidos permite incrementar la concentración de glucosa en el medio de HE disponible para fermentación hasta 70 g/L, si bien el rendimiento de hidrólisis se ve negativamente afectado. Este hecho no se produce en la hidrólisis del xilano, encontrándose rendimientos de alrededor del 60% del teórico en todas las condiciones ensayadas y concentraciones de 35 g/L de xilosa al 20% de sólidos (p/v).

El análisis de la producción de azúcares totales (en forma de monómeros y oligómeros) en el medio de hidrólisis enzimática del extrusado anterior, ha dado como resultado la detección de una cierta cantidad de azúcares en forma oligomérica, tanto de glucosa como de xilosa, que dependiendo de las condiciones del ensayo, permanece sin hidrolizarse incluso a las 72 horas de hidrólisis. El cálculo de los rendimientos de producción incluyendo estas formas oligoméricas da como resultado rendimientos similares y cercanos a 35 g glucosa/100 g extrusado seco en todos los experimentos realizados del 5 al 20% de sólidos, siendo solo ligeramente superior al 2,5% de carga, donde se alcanzan cerca de 38 g/100 g. En el caso de la producción de xilosa, es notable el hecho de que la producción total de azúcares es mayor que la producción de monómeros en todos los casos, siendo aproximadamente 20 g de xilosa/100 g extrusado seco contando con monómeros y oligómeros en todas las

cargas de sólidos, frente a 16-18 g xilosa/100 g extrusado seco en monómeros. Los resultados de la producción de azúcares muestran que se podrían llegar a alcanzar hasta 54 g azúcares totales/100 g extrusado seco, contando con la producción de monómeros y oligómeros de glucosa y xilosa, lo que representa un 70% del total de azúcares potenciales.

El estudio preliminar del potencial de producción de etanol de los extrusados alcalinos neutralizados muestra que el rendimiento de LSFS disminuye desde el 70 % a 2,5 % (p/v) de sólidos hasta el 50% al 20% (p/v) de sólidos, condición a la que se obtienen 25 g/L de etanol. Estos resultados muestran la necesidad de mejorar estos rendimientos, incidiendo en la etapa de producción de azúcares, bien sea variando el tipo de reactor de hidrólisis, o aumentando la dosis de enzima empleada.

5. Bibliografía

Chang, V. S., y Holtzaple, M. T. Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000, núm. 84-86, vol. 1-9, p. 5-37.

Dale, B.E.; Weaver, J., y Byers, F.M. Extrusion processing for ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999; núm. 77, vol. 1-3, p. 35-45.

De Vrije, T.; De Haas, G.G.; Tan, G.B.; Keijsers, E.R.P., y Claassen, P.A.M. Pretreatment of *Miscanthus* for hydrogen production by Thermotoga elfii. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002, núm. 27, p. 1381-1390.

Duque, A.; Manzanares, P.; Ballesteros, I.; Negro, M. J.; Oliva, J. M.; Sáez, F., y Ballesteros, M. Optimization of integrated alkaline-extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. 2013, núm. 48, p. 775-781.

Duque, A.; Manzanares, P.; Ballesteros, I.; Negro, M. J.; Oliva, J. M.; Sáez, F., y Ballesteros, M. Study of process configuration and catalyst concentration in integrated alkaline extrusion of barley straw for bioethanol production. *Fuel*. 2014, núm. 134, p. 448-454.

Eckard, A.D.; Muthukumarappan, K., y Gibbons, W. Pretreatment of extruded corn stover with polyethylene glycol to enhance enzymatic hydrolysis: optimization, kinetics and mechanism of action. *Bioenergy Resource*. 2011, núm. 5, p. 424-438

Fan, Z.; South, C.; Lyford, K.; Munsie, J.; Van Walsum, P., y Lynd, L.R. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2003, núm. 26, vol. 2, p. 93-101.

Galbe, M., y Zacchi, G. Pretreatment. The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*. 2012, núm. 46, p. 70-78.

Gregg, D., y Saddler, J.N. A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1996, núm. 57-58, vol. 1, p. 711-727.

Han, M.; Kang, K.E.; Kim, Y., y Choi, G.W. High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor. *Process Biochemistry*. 2013, núm. 48, p. 488-495.

Hendriks, A.T.W.M., y Zeeman, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2009, núm. 100, vol. 1, p. 10-18.

Hodge, D.B.; Karim, M.N.; Schell, D.J., y McMillan, J.D. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresource Technology*. 2008, núm. 99, p. 8940-8948.

Hoyer, K.; Galbe, M., y Zacchi, G. Influence of fiber degradation and concentration of fermentable sugars on simultaneous saccharification and fermentation of high-solids spruce slurry to ethanol. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, núm. 6, p. 145-153.

Jørgensen, H.; Vibe-Pedersen, J.; Larsen, J., y Felby, C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, núm. 96, p. 862-870.

Kang, K.E.; Han, M.; Moon, S. K.; Kang, H. W.; Kim, Y.; Cha, Y. L. *et al.* Optimization of alkali-extrusion pretreatment with twin-screw for bioethanol production from *Miscanthus*. *Fuel*. 2013, núm. 109, p. 520-526.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Effect of extruder parameters and moisture content of switchgrass, prairie cord grass on sugar recovery from enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010a, núm. 162, p. 1785-1803.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Optimization of switchgrass and extruder parameters for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Industrial Crop Production*. 2011a, núm. 33, p. 188-199.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Optimization of alkali soaking and extrusion pretreatment of prairie cord grass for maximum sugar recovery by enzymatic hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*. 2011b, núm. 54, p. 71-82.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Optimization of alkali, big bluestem particle size, and extruder parameters for maximum enzymatic sugar recovery using response surface methodology. *BioResources*. 2011c, núm. 6, vol.1, p. 762-790.

Karunanithy, C., y Muthukumarappan, K. Thermo-Mechanical Pretreatment of Feedstocks. En *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production SE - 2*. Editado por G. Tingyue. Países Bajos: Springer DA, 2013, p. 31-65.

Lamsal, B.; Yoo, J.; Brijwani, K., y Alavi, S. Extrusion as a thermo-mechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 2010, núm. 34, vol. 12, p. 1703-1710.

Liu, C.; Van der Heide, E.; Wang, H.; li, B., Yu, G., y Mu, X. Alkaline twin-screw extrusion pretreatment for fermentable sugar production. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, núm. 6, p. 97.

Matsakas, L., y Christakopoulos, P. Optimization of ethanol production from high dry matter liquefied dry sweet sorghum stalks. *Biomass and Bioenergy*. 2013, núm. 51, p. 91-98.

McIntosh, S., y Vancov, T. Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology*. 2010, núm. 101, vol. 17, p. 6718-6727.

Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R., Lee, Y.Y.; Holtzapple, M., y Ladisch, M. Features of promising technologies for pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2005, núm. 96, p. 673-686.

Modenbach, A.A., y Nokes, S.E. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment – A review. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, núm. 109, p. 1430-1442.

NREL. *Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures*. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2007.

Park, Y. C., y Kim, J. S. Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. *Energy*. 2012, núm. 47, p. 31-35.

Pedersen, M.; Viksø-Nielsen, A., y Meyer, A. S. Monosaccharide yields and lignin removal from wheat straw in response to catalyst type and pH during mild thermal pretreatment. *Process Biochemistry*. 2010, núm. 45, vol. 7, p. 1181-1186.

Qing, Q.; Yang, B., y Wyman, C.E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology*. 2010, núm. 101, p. 9624-9630.

Um, B.H.; Choi, C.H., y Oh, K.K. Chemicals effect on the enzymatic digestibility of rape straw over the thermo-mechanical pretreatment using a continuous twin screw-driven reactor (CTSR). *Bioresource Technology*. 2013, núm. 130, p. 38-44.

Wan, C., Zhou, Y., y Li, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. *Bioresource Technology*. 2011, núm. 102, p. 6254-6259.

Yoo, J.; Alavi, S.; Vadlanil, P., y Amanor-Boadu V. Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. *Bioresource Technology*. 2011, núm. 102, p. 7583-7590.

Yoo, J.; Alavi, S.; Vadlani, P., y Behnke, K. C. Soybean hulls pretreated using thermo-mechanical extrusion – Hydrolysis efficiency, fermentation inhibitors, and ethanol yield. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, núm. 166, p. 576-589.

Zhang, S.; Keshwanil, D.R.; Xu, Y., y Hanna, M.A. Alkali combined extrusion pretreatment of corn stover to enhance enzyme saccharification. *Industrial Crops and Products*. 2012b, núm. 37, vol. 1, p. 352-357.

CAPÍTULO III: BIOEXTRUSIÓN

1. Introducción

En este trabajo se utiliza el término bioextrusión para denominar a un tipo de extrusión reactiva que conlleva el uso de catalizadores biológicos, i.e. enzimas hidrolíticas.

Existen antecedentes de la utilización de enzimas en combinación con un proceso de extrusión, para la producción de bioetanol de 1ª generación a partir de almidón. En esta aplicación en concreto, la extrusión se ha usado sola o combinada con enzimas (α -amilasas) para licuar el almidón y reducir así el tiempo de sacarificación del jarabe de glucosa, o preparar el sustrato para la fermentación (Linko *et al.*, 1983; Govindasamy *et al.*, 1997).

Sin embargo, la utilización directa de enzimas en el pretratamiento de extrusión para su aplicación en el proceso de producción de bioetanol de segunda generación no ha sido explorada hasta el momento. La hipótesis en la que se basa esta estrategia es que la mezcla intensa y la alta exposición de las fibras que produce la extrusión, junto con la mejora en la digestibilidad enzimática que proporciona el pretratamiento alcalino, podrían ayudar a la penetración de las enzimas en las fibras, promoviendo así su acción en una incubación posterior de la mezcla sustrato extrusado-enzimas.

Por otra parte, esta nueva configuración de proceso supone un avance en la integración de las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática, ya que las enzimas se añaden en el mismo reactor donde se lleva a cabo el pretratamiento y la mezcla sustrato extrusado-enzima puede pasar directamente al reactor de incubación para completar la hidrólisis. Esto es posible gracias a la integración de la etapa de neutralización en el extrusor, que permite que las enzimas se mezclen con el sustrato en un pH adecuado para la hidrólisis. La integración de las diferentes etapas del proceso para la producción de etanol a partir de lignocelulosa ha sido señalada como una de las aproximaciones más importantes en el diseño de configuraciones de proceso eficientes en cuanto al coste económico y energético. Según Cardona *et al.* (2007), la integración de las operaciones implicadas en la producción de etanol biocarburrante se podría conseguir mediante el desarrollo de bioprocesos integrados que combinen diferentes etapas en una sola unidad.

En este apartado se estudia el efecto de un proceso de extrusión alcalina y enzimática, denominado bioextrusión, sobre la paja de cebada. Se analizan las características del sustrato producido (bioextrusado) en cuanto a composición y distribución granulométrica, y se describen los resultados de los experimentos de producción de azúcares y etanol a partir de éste.

En una primera fase del trabajo, se realizaron ensayos de incubación del extrusado en matraces Erlenmeyer a diferentes concentraciones de sólidos para determinar el rendimiento de producción de azúcares a partir del mismo. En una etapa

posterior, se llevó a cabo la incubación del bioextrusado sin diluir en un reactor especialmente concebido para trabajar a altas cargas de sólidos, con el fin de optimizar las condiciones del ensayo. Por otra parte, la detección de oligómeros en el medio de hidrólisis, como ocurrió en el caso del extrusado alcalino neutralizado, motivó la realización de una serie de ensayos destinados a evaluar si una suplementación con enzimas específicas de la hidrólisis de formas oligoméricas (β -glucosidasa y β -xilosidasa) podría resultar en una mayor hidrólisis de las mismas, y a la vez evaluar su efecto en la producción de azúcares sencillos. Finalmente, se evaluó la capacidad de producción de etanol a partir del bioextrusado, mediante dos ensayos de licuefacción más sacarificación y fermentación simultáneas (LSFS), con y sin dilución del sustrato.

2. Materiales y métodos

2.1. Ensayos de bioextrusión

Los primeros experimentos de bioextrusión se llevaron a cabo intentando realizar el pretratamiento alcalino, la neutralización y la extrusión con enzimas en un solo pase de extrusión. Sin embargo, se comprobó que la longitud (número de módulos) del equipo de extrusión EV25 del Ciemat no permite acoplar correctamente todas las fases del proceso en un solo pase, por lo que se optó por una configuración de proceso en dos pases por el extrusor (Figura 3.1), simulando un proceso continuo en un equipo de extrusión de mayores dimensiones.

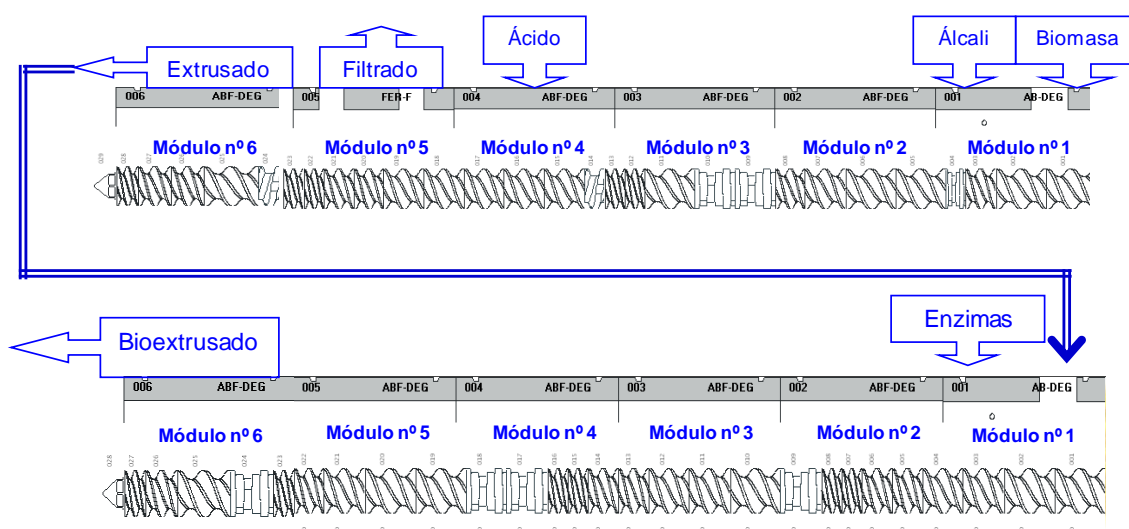


Figura 3.1- Configuración en dos pases, extrusión alcalina más neutralización seguida por bioextrusión, llevado a cabo en el EV25 del Ciemat.

En un primer pase por el extrusor se lleva a cabo una extrusión alcalina con neutralización en las condiciones fijadas en el Capítulo II (150 rpm, 68°C, 8% R). A continuación esta paja de cebada extrusada es alimentada de nuevo al extrusor, usando en esta segunda vuelta una configuración sólo con elementos de transporte y mezcla y añadiendo la mezcla enzimática en el módulo 1 para un mayor tiempo de contacto dentro del equipo. La temperatura en esta segunda extrusión se mantuvo a 50°C, un valor de trabajo adecuado para las enzimas.

La mezcla enzimática usada fue nuevamente una combinación de Cellic CTec2 con Cellic HTec2 (Novozymes A/S, Dinamarca) en proporción 9:1 tomando como base el contenido en proteínas. Las enzimas fueron diluidas de manera que la relación L/S en el extrusor en el segundo pase fue de 4, de acuerdo con los resultados de ensayos previos que determinaron que con esta relación se conseguía un funcionamiento adecuado del extrusor.

A lo largo del trabajo se produjeron varios lotes de material bioextrusado. El primer lote (B1) se generó utilizando en el primer pase de extrusión el lote 1 de paja de cebada y una carga de enzimas de 25 mg proteína (10 FPU)/g sustrato en la segunda vuelta de extrusión. Ambos pases de extrusión se llevaron a cabo en el equipo EV25 del Ciemat. Este material, con un contenido en sólidos del 23% (p/p), se empleó en los ensayos de producción de azúcares descritos en el apartado 2.4, así como en la caracterización del bioextrusado que se describe a continuación. El segundo lote (B2) se generó en el equipo EV25 del Ciemat con una carga de enzimas de 40 mg proteína (16 FPU)/g sustrato, pero en este caso usando como alimentación en la etapa de bioextrusión el extrusado alcalino producido a mayor escala en la planta de Agromat en Tarbes con el lote 2 de paja de cebada (ver Capítulo II – apartado 2.2.1). Este material tuvo un contenido en sólidos del 27% (p/p) y se empleó en los ensayos de LSFS.

2. 2. Caracterización del bioextrusado

El bioextrusado es un sustrato formado por una fracción soluble retenida en las fibras que componen la fracción insoluble. Al estar compuesto por estas dos fases, se siguió el protocolo NREL/TP-510- 48825 para muestras de material pretratado o “*slurry*”. En este trabajo, para obtener la fracción de sólidos insolubles se lleva a cabo un lavado por centrifugación. Para ello, se toman 5 g en peso seco de bioextrusado en una cápsula y se añaden 30 mL de agua destilada. Se agita hasta conseguir una mezcla homogénea y se centrifuga a 9000 rpm durante 15 min (Centrifuga Hendriks, Alemania). A continuación se separa la fracción sobrenadante (fracción soluble del bioextrusado, FSB) y se miden los azúcares monoméricos y oligoméricos por HPLC. Esto se lleva a cabo mediante el procedimiento denominado post-hidrólisis que consiste en

la realización de una hidrólisis ácida suave sobre la muestra (3% H₂SO₄, 121°C, 30 min), tras la cual se cuantifican los azúcares totales. Por diferencia con la concentración de azúcares monoméricos, se calcula la concentración de azúcares oligoméricos. El proceso de lavado y centrifugación se repite hasta obtener en la fracción líquida una concentración de glucosa < 0,05 g/L. Este procedimiento se llevó a cabo en el bioextrusado B1.

El sólido restante después de los sucesivos lavados es la fracción insoluble del bioextrusado (FIB) y se procede con él según los procedimientos estándares para el análisis de composición de biomasa lignocelulósica, concretamente, los métodos 42620 para la preparación de muestras, 42627 para la determinación de sólidos insolubles, el 42618 para la determinación de carbohidratos y lignina, 42621 para la determinación de sólidos totales y 42622 para la determinación de cenizas (Anexo II).

La fracción líquida se analiza mediante HPLC para la determinación de azúcares simples y azúcares totales (tras post-hidrólisis ácida), tal y como se detalla en el anexo III. A partir de los resultados del análisis, y teniendo en cuenta los volúmenes de lavado, se calcula el peso de azúcares en la fracción soluble y su porcentaje respecto al peso seco inicial de bioextrusado.

Con el fin de comparar y distinguir los efectos propios de la bioextrusión, el procedimiento anteriormente descrito también se llevó a cabo en el extrusado alcalino neutralizado utilizado como alimentación en el segundo pase de extrusión.

2. 2. 1. Ensayos de granulometría

Con el objetivo de conocer las características del bioextrusado B1 en cuanto a la distribución del tamaño de partícula, se llevaron a cabo ensayos de granulometría del material bioextrusado y, para comparación, del extrusado alcalino neutralizado y la paja de cebada sin tratar, siguiendo el *European Standard Method 15149* (European Standard Norm, 2010).

2. 3. Producción de azúcares en el bioextrusado mediante incubación en diferentes condiciones

2. 3. 1. Ensayos en matraz

La producción de azúcares en el bioextrusado se evaluó llevando a cabo ensayos incubación del material en matraces Erlenmeyer de 100 mL en agitador orbital a 50°C. Las incubaciones se realizaron en un volumen total de 25 mL y con diferentes cargas de sólidos; 2,5, 5, 10, 15 y 20% (p/v). El bioextrusado se diluyó con agua destilada hasta alcanzar la carga de sólidos deseada. Las mezclas se incubaron durante un tiempo total

de 72h, tomando muestras a 0, 24, 48 y 72h para la medición de azúcares monoméricos por HPLC y de azúcares totales (monómeros y oligómeros) tras post-hidrólisis ácida, también por HPLC. La muestra a $t = 0h$ se analiza para cuantificar la cantidad de azúcares solubilizados durante la bioextrusión, antes de la incubación a $50^{\circ}C$, y el rendimiento calculado a partir de estos valores se denomina en este trabajo rendimiento a $t = 0h$.

El protocolo seguido para la toma de muestras a cargas de sólidos superiores a 10% p/v y tiempo 0 y 24h de incubación, es el descrito en el punto 2.4.1 del Capítulo II. Este método se basa en la toma de 1 g de muestra, dilución con agua destilada en una proporción 1:10 (p/p), centrifugación a 9000 rpm durante 15 min y utilización del sobrenadante para las mediciones cromatográficas.

2. 3. 2. Ensayos en reactor de altas cargas de sólidos

Para realizar la incubación en condiciones de alta carga de sólidos se cuenta con un biorreactor Terrafors-IS de 15 l (InforsHT, Suiza), que de ahora en adelante se denominará RACS (reactor de altas cargas de sólidos). Éste tiene una capacidad de carga de 3-4 kg de sólidos o semisólidos, o 7 l en el caso de líquidos. La cámara contiene placas deflectoras en su interior para una mejor mezcla y está unida a un motor cuya velocidad de rotación se puede variar entre 0,1 y 10 rpm. El RACS dispone, además, de un encamisado de agua, que permite fijar la temperatura de incubación (Figura 3.2).



Figura 3.2- Reactor de alta carga de sólidos, modelo Terrafors-IS (InforsHT).

El bioextrusado (1 kg), que tenía un 23% de peso seco (p/p), se introdujo sin diluir en el biorreactor, lo que es equivalente a una concentración de sólidos de un 30% p/v. El sustrato se incubó a $50^{\circ}C$ durante 72h. Siguiendo el protocolo para altas cargas de sólido se tomaron muestras de 1 g a 0, 24, 48 y 72h, se hirvieron para

inactivar las enzimas, se diluyeron 1:10 con agua destilada, se centrifugaron y se midió la concentración de azúcares monoméricos por HPLC. Una parte de la muestra se reservó para realizar con ella una post-hidrólisis ácida y así poder medir la cantidad de glucosa y xilosa en forma monomérica y oligomérica de la muestra.

2. 3. 3. Ensayos con suplementación de enzimas

Para los ensayos con suplementación de enzimas, se realizaron incubaciones al 10% de carga de sólidos del bioextrusado producido con 25 mg proteína/g sustrato (B1), adicionando dos enzimas accesorias diferentes: Novozyme 188 (Novozymes A/S, Dinamarca), cuya actividad principal es la β -glucosidasa, y E-BXSRB de Megazyme International (Irlanda), con actividad β -xilosidasa. Estas enzimas se añadieron en los ensayos en una proporción de 6 mg proteína/g bioextrusado, en el caso de la Novozyme-188, y 7 mg proteína/g glucano en bioextrusado, en el caso de la E-BXSRB.

Se realizaron tres ensayos: uno con el bioextrusado suplementado con Novozyme-188, incubado a 50°C, y dos con el bioextrusado suplementado con E-BXSBR a dos temperaturas diferentes, la óptima de la β -xilosidasa (40°C) y la óptima del cóctel enzimático del bioextrusado (50°C). Los ensayos se llevaron a cabo en viales Eppendorf de 2mL, con un volumen total de hidrólisis de 1,5 mL. Se prepararon tantas incubaciones como tiempos de muestreo, por duplicado. Cada muestra por duplicado se agitó en agitador orbital Certomat-R B-Braun (Alemania) a 200 rpm dentro de un matraz de 250 mL; cada uno de estos matraces se retiró a los tiempos 0, 6, 24 y 48h. Los duplicados se hirvieron durante 10 min para inactivar las enzimas y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min en una centrífuga 5415D Eppendorf AG (Alemania). Una alícuota del sobrenadante se empleó para medir azúcares simples por HPLC y en el resto se realizó una post-hidrólisis, tras la que se midieron azúcares totales también por cromatografía HPLC (ver Anexo III).

El parámetro empleado para evaluar el rendimiento en los ensayos de incubación del bioextrusado fue el rendimiento de producción de azúcares, calculado tanto para azúcares en forma monomérica como oligomérica. En el caso del bioextrusado, a diferencia de lo que ocurría en el extrusado alcalino neutralizado, el propio azúcar contenido en la preparación enzimática se encuentra incorporado en el sustrato, por lo que no se sustrae en el cálculo del rendimiento. La fórmula de cálculo del rendimiento de producción de azúcares se muestra en la Ec. 1 a continuación.

$$\text{Rdto. producción glucosa xilosa} = \frac{\text{g glucosa xilosa en el medio}}{\text{g bioextrusado seco}} \times 100 \quad [\text{Ec. 1}]$$

2. 4. Ensayos de sacarificación y fermentación simultáneos

Los ensayos de LSFS se realizaron incubando el bioextrusado B2 en el RACS a 50°C y 8 rpm durante 24h. Se realizaron dos ensayos, uno diluyendo el bioextrusado hasta el 20% p/v de sólidos y un segundo ensayo sin diluir, es decir, con una carga de sólidos equivalente al 37% p/v. Tras la licuefacción se trasladó el hidrolizado a un reactor de tanque agitado (RTA) de escala laboratorio, de volumen total 1 l con control de temperatura, pH y toma de muestras (Biostat B plus, Sartorius, Figura 3.3), para su inoculación con el microorganismo *S. cerevisiae* previamente activado como se describe a continuación. Una vez inoculado, el sustrato se incubó durante 72h adicionales a 35°C.



Figura 3.3- Reactores de tanque agitado y consola de control de pH y temperatura (Biostat B plus).

Se preparó un inóculo con *S. cerevisiae* Ethanol Red (Fermentis, Francia) rehidratando la levadura liofilizada en un medio de crecimiento (30 g/L de glucosa, 4 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$, 1 g/L de KH_2PO_4 y 0,3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). El microorganismo se dejó crecer durante 16h en un agitador orbital a 150 rpm y 35°C. Posteriormente, se centrifugó el medio y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se redisolvió en 1 mL de tampón citrato pH 4,8 y se repartió entre los distintos experimentos, de modo que la concentración de microorganismo en el medio fuese 1 g/L.

Se tomaron muestras de glucosa y etanol al inicio de los ensayos y cada 24h, las cuales se centrifugaron a 10.000rpm durante 10 min en una centrífuga 5415D Eppendorf AG (Alemania). Se tomaron alícuotas que se midieron por HPLC, para la cuantificación de azúcares, y por cromatografía de gases, para el contenido de etanol, como se describe en el Anexo III.

La eficiencia de producción de etanol en el bioextrusado se evaluó a través del rendimiento de LSFS, como la cantidad de etanol producida durante la SFS, dividida por la producción potencial de etanol a partir del extrusado, y expresada en % (Ec. 2).

$$Rdto.LSFS = \frac{g \text{ etanol}}{g \text{ gluc en bioextrusado} \times 0,51} \times 100 \quad [Ec. 2]$$

3. Resultados y discusión

3. 1. Características del bioextrusado

3. 1. 1. Composición del bioextrusado: fracción soluble e insoluble

Los resultados de la composición del bioextrusado **B1** y de las fracciones soluble e insoluble del mismo, así como del extrusado alcalino neutralizado utilizado como sustrato en la fase de bioextrusión, se muestran en la tabla 3.1 a continuación.

Tabla 3.1- Composición del sustrato completo y de las fracciones soluble e insoluble (FS, FI) del extrusado alcalino con neutralización (EF, 8% R, 68°C) y del bioextrusado B1 producido a partir de éste con 25 mg proteína/ sustrato.

	Extrusado			Bioextrusado		
	Completo	FI	FS	Completo	FI	FS
Fracción (% peso total)	100	99	1	100	65	35
Componente						
Glucosa (% peso completo)	50,1 ± 0,5	51,0 ± 0,7	0,2	47,4 ± 1,6	38,0 ± 0,9	8,7
Xilosa (% peso completo)	27,7 ± 0,3	25,4 ± 0,3	0,7	24,5 ± 0,8	17,6 ± 0,2	6,8
Galactosa (% peso completo)	1,3 ± 0,03	1,2 ± 0,02	0,1	1,3 ± 0,03	0,7 ± 0,06	0,5
Arabinosa (% peso completo)	3,2 ± 0,02	2,8 ± 0,1	0,2	3,1 ± 0,1	2,0 ± 0,07	1,0
Lignina (% peso completo)	17,9 ± 0,04	18,8 ± 0,3	-	17,6 ± 1,3	25,4 ± 0,3	-
Cenizas(% peso completo)	6,7 ± 0,1	5,0 ± 0,4	-	4,9 ± 0,1	4,2 ± 0,03	-

A la vista de los resultados, se comprueba que la bioextrusión no altera significativamente la composición del bioextrusado respecto del extrusado. Hay que tener en cuenta que la recuperación de sólidos en el bioextrusado respecto del extrusado es mayor del 100% debido al peso añadido con la solución enzimática (enzimas y tampón). Así, existe un factor de 1,08 en la relación de pesos entre el bioextrusado y el extrusado, lo que hace que el contenido en lignina y carbohidratos del bioextrusado (expresados en % del peso del bioextrusado) sea algo menor que en el caso del extrusado. Además, hay que tener en cuenta que el contenido en glucosa determinado en el bioextrusado incluye el azúcar añadido con la preparación enzimática, cuya contribución sería alrededor de 2,2 g glucosa/100 g bioextrusado.

El análisis de las fracciones solubles e insolubles de ambos materiales (Tabla 3.1) indica que se ha producido una redistribución de los componentes entre la fase soluble e insoluble. En concreto, el bioextrusado tiene una fracción soluble (FS) que supone el 35% del peso seco total del bioextrusado, mientras que en el extrusado, esta fracción es de tan sólo un 1%. Esto significa que durante la bioextrusión se produjo la solubilización de un 34% de componentes que se encontraban en la matriz insoluble en el extrusado.

Analizando la FS del bioextrusado, un 8,7% de la glucosa y un 6,8% de la xilosa (en peso seco total del bioextrusado) se encontraron en forma soluble. Estos valores representan, respectivamente, un 18% y un 28% del contenido en glucosa y xilosa del bioextrusado completo (que tiene un 47,4% glucosa y un 24,5% de xilosa). Una gran parte de la xilosa soluble se encontró en forma oligomérica (un 60%), mientras que la fracción de oligómeros de glucosa fue mucho menor, un 12% de la glucosa soluble total. Los azúcares glucosa y xilosa, junto con pequeñas cantidades (no mostradas) de galactosa y arabinosa suponen casi la mitad (un 48%) de los sólidos solubles medidos en el bioextrusado.

Por lo tanto, se demostró que la acción combinada de las enzimas con el pretratamiento de extrusión fue capaz de hidrolizar una parte de los carbohidratos contenidos en el material extrusado, en un corto espacio de tiempo (aproximadamente 2 min). Esta es la mayor diferencia respecto del extrusado y la evidencia de la acción de las enzimas. Además, al contar con una FS mayor, el bioextrusado presenta una cierta ventaja para la fluidificación de la mezcla durante las primeras horas de incubación en la HE.

Este mismo efecto de solubilización durante la bioextrusión se ha descrito en otros materiales lignocelulósicos ensayados dentro del proyecto Babethanol (Vandenbossche *et al.*, 2014). En concreto, se bioextrusaron residuos de maíz dulce (*sweet corn*, SC), bagazo de agave (*blue agave bagasse*, BAB) y residuos de la industria del aceite de palma (*oil palm empty fruit bunch*, OPEFB), además de la paja de cebada correspondiente al lote 2 de este trabajo. Aunque las condiciones de extrusión fueron

optimizadas para cada material y difieren entre sí, se demostró que en todos los casos se había producido una solubilización parcial de las cadenas de polisacáridos en los bioextrusados. Tomando como referencia un ensayo de solubilización de compuestos mediante agua caliente, estos autores hallaron un aumento de la solubilidad en los bioextrusados respecto de los extrusados alcalinos de 1,6 veces en SC, 2,4 veces en paja de cebada, y 4,9 veces en OPEFB. Además, en este estudio se realizó también un análisis mediante la técnica de ADF-NDF de Van Soest y Wine (1967), que dio como resultado el aumento de la fracción soluble neutro detergente (NDS) en los bioextrusados de los cuatro materiales es comparación con sus respectivos extrusados alcalinos. Por ejemplo, para la paja de cebada, la fracción NDF soluble aumentó de 19,9% a 47,3% en el bioextrusado.

3. 1. 2. Distribución de partículas en el bioextrusado

En cuanto a la distribución de partículas en el bioextrusado, en la figura 3.4 se compara la distribución de tamaños de partícula del extrusado y del bioextrusado B1, así como de la paja de cebada sin extrusar como muestra de referencia.

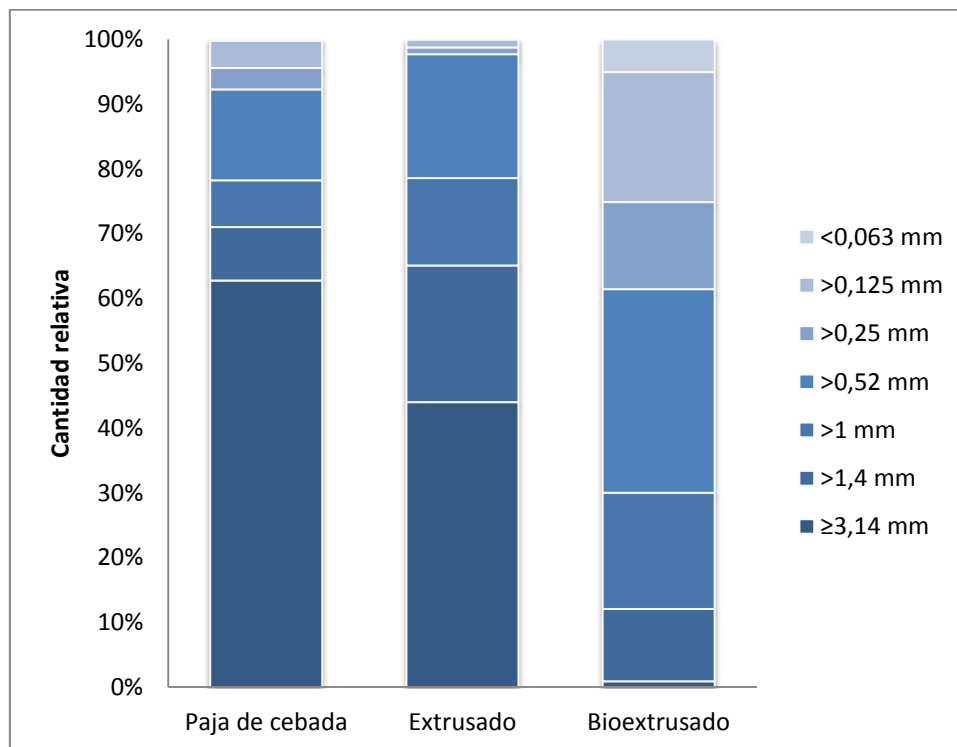


Figura 3.4- Distribución del tamaño de partícula (en mm) en la paja de cebada sin tratar, en el extrusado alcalino neutralizado y en el bioextrusado B1.

Los resultados evidencian un cambio significativo en la distribución del tamaño de partícula por efecto de la extrusión. Como se puede ver en la figura 3.4, la fracción mayoritaria en la paja de cebada sin pretratar fue el conjunto de partículas mayores o iguales a 3,14 mm (59,6%), un resultado que concuerda con la molienda previa de la materia prima, realizada a 5 mm. La segunda fracción más abundante en la materia prima fue la de partículas entre 1 y 0,52 mm, que suman un 13,3% del total. Por debajo de este tamaño se encontraron un 7,3% de las partículas.

En la segunda columna de la figura 3.4 se refleja el análisis granulométrico del extrusado alcalino neutralizado. Aunque la mayor fracción correspondió a las partículas mayores de 3,14 mm, igual que en el caso de la paja de cebada sin tratar, su cantidad se redujo hasta un 41,7% a su paso por el extrusor. En cambio, aumentó la cantidad de partículas de tamaño medio, entre 3,14 y 0,52 mm. También se puede apreciar el efecto de la filtración, ya que tan solo se encontró un 2,2% de partículas menores de 0,52 mm, a diferencia del 7,3% de la materia prima. Esta cantidad de finos perdida correspondería a los sólidos insolubles encontrados en el filtrado.

Por último, en un segundo paso por el extrusor con enzimas, el tamaño de partícula se vio mucho más afectado, desapareciendo casi por completo la fracción mayor de 3,14 mm, que se quedó en un 0,8%, y aumentando la proporción de tamaños medios y finos. Las partículas entre 1 y 0,52 mm fueron las mayoritarias en el bioextrusado, suponiendo 28,2% del total y las fracciones de finos menores de 0,52 mm sumaron entre todas 37,4%. Es también destacable la aparición dentro de los finos de una fracción con un tamaño de partícula aún más reducido que los alcanzados en la materia prima y el extrusado (0,063 mm), que supuso un 4,5% del total de las partículas.

Como tratamiento termo-mecánico, uno de los principales efectos de la extrusión es la reducción del tamaño de partícula (Lee *et al.*, 2009, 2010; Chen *et al.*, 2011; Um *et al.*, 2013; Duque *et al.*, 2014; Vandenbossche *et al.*, 2014) debido al rozamiento y fricción desarrollados dentro del equipo. Varios autores han estudiado la variación del tamaño de partícula en los sustratos pretratados por extrusión y concluido que se produce un cambio significativo. Por ejemplo, Chen *et al.* (2011) utilizaron paja de arroz con un tamaño ≤ 1 mm y llegaron a un tamaño medio de partícula entre 0,4 y 0,5 mm, cuando emplearon la extrusión sola, y entre 0,09 y 0,3 mm cuando usaron una combinación de extrusión con extracción acuosa. Estos valores de tamaño medio son mucho menores que el encontrado en el análisis granulométrico de la paja de cebada extrusada en el presente trabajo (2,2 mm). Las diferencias pueden atribuirse al tamaño de partida en cada material, a las características propias de la materia prima y a particularidades de cada equipo de extrusión. Por otra parte, Um *et al.* (2013) estudiaron la distribución del tamaño de partícula de la paja de colza extrusada a diferentes temperaturas. Utilizaron una materia prima con un tamaño de

partícula pequeño, entre 1,4 y 2,4 mm, y encontraron un 77,8% de partículas entre 0,125 y 1,4 mm después de la extrusión, a la temperatura más baja que ensayaron. En comparación, en el presente estudio, se encontró un 38,1% de partículas de paja de cebada extrusada en este intervalo de tamaños. Por lo tanto, hay una evidencia clara de que la extrusión tiene un marcado efecto en la distribución del tamaño de partícula. No obstante, es difícil establecer un patrón de cambio, ya que las condiciones de operación, el tamaño de partida y la materia prima influyen mucho en la distribución final.

A simple vista se pueden observar estas variaciones en el tamaño de las fibras entre la materia prima, el extrusado y el bioextrusado, además de otras características diferenciadoras en su aspecto (Figura 3.5). La observación de la morfología del bioextrusado revela diferencias notables con respecto al extrusado alcalino, que a su vez se diferencia de la paja de cebada sin tratar.



Figura 3.5- Aspecto físico de la paja de cebada sin tratar (A), el extrusado alcalino neutralizado (B) y el bioextrusado (C).

El cambio de color provocado por el tratamiento alcalino se aprecia en la imagen del extrusado, a pesar de encontrarse ya neutralizado (Figura 3.5, B). Su textura es esponjosa y todavía se encuentran restos de fibras enteras. En cambio, en el bioextrusado (Figura 3.5, C) ya no se observan fibras completas, el color es más oscuro y el sustrato es pegajoso y tiende a agregarse, lo que puede ser debido a cambios en la estructura de polisacáridos y lignina, y a la solubilización de algunos carbohidratos.

Resumiendo todo lo anterior, el bioextrusado es un material pretratado con un aspecto y unas características propias que lo distinguen de la materia prima y del extrusado alcalino neutralizado a partir del cual se produce. En cuanto a su composición, el bioextrusado tiene una fracción soluble potenciada respecto al extrusado alcalino neutralizado, llegando a alcanzar el 35% del peso total. Casi la mitad de estos sólidos solubles son azúcares, lo cual es un efecto de la acción de las enzimas durante la bioextrusión. Respecto a la distribución de partículas, se observa el efecto mecánico de la extrusión multiplicado en el bioextrusado, ya que pasa dos veces por el extrusor. Este efecto mecánico reduce el tamaño medio de partícula y aumenta la proporción de las partículas de menor tamaño en el bioextrusado respecto del extrusado alcalino neutralizado y de la paja de cebada sin tratar. Estas diferencias también se pueden observar visualmente y se reflejan en un cambio de color, consistencia y reducción del número de fibras observables.

3. 2. Estudio de la producción de azúcares en el bioextrusado

Una de las características de la bioextrusión es que se consigue una buena mezcla entre el sustrato y las enzimas dentro del extrusor, por lo que en el bioextrusado la biomasa está totalmente impregnada por el cóctel enzimático, a diferencia de las dificultades de mezcla que surgen inicialmente cuando las enzimas se añaden al sustrato pretratado en los sistemas tradicionales de agitación. Para evaluar la producción de azúcares en el bioextrusado, el material B1 se incubó a 50°C en distintas condiciones de ensayo: concentración de sólidos, tipo de reactor, etc., para la hidrólisis enzimática completa de los carbohidratos. En todos los casos se evaluó la producción de glucosa y xilosa, tanto en monómeros como en oligómeros.

3. 2. 1. Ensayos en matraz

En el capítulo anterior ya se discutió la necesidad de trabajar a altas cargas de sólidos para que el proceso de producción de bioetanol sea económicamente viable. Esto implica conocer el comportamiento del bioextrusado en estas condiciones, por lo que se ensayó la producción de azúcares en el bioextrusado en ensayos con cargas de sólidos, desde 2,5 a 20%, en matraces Erlenmeyer agitados en un agitador orbital.

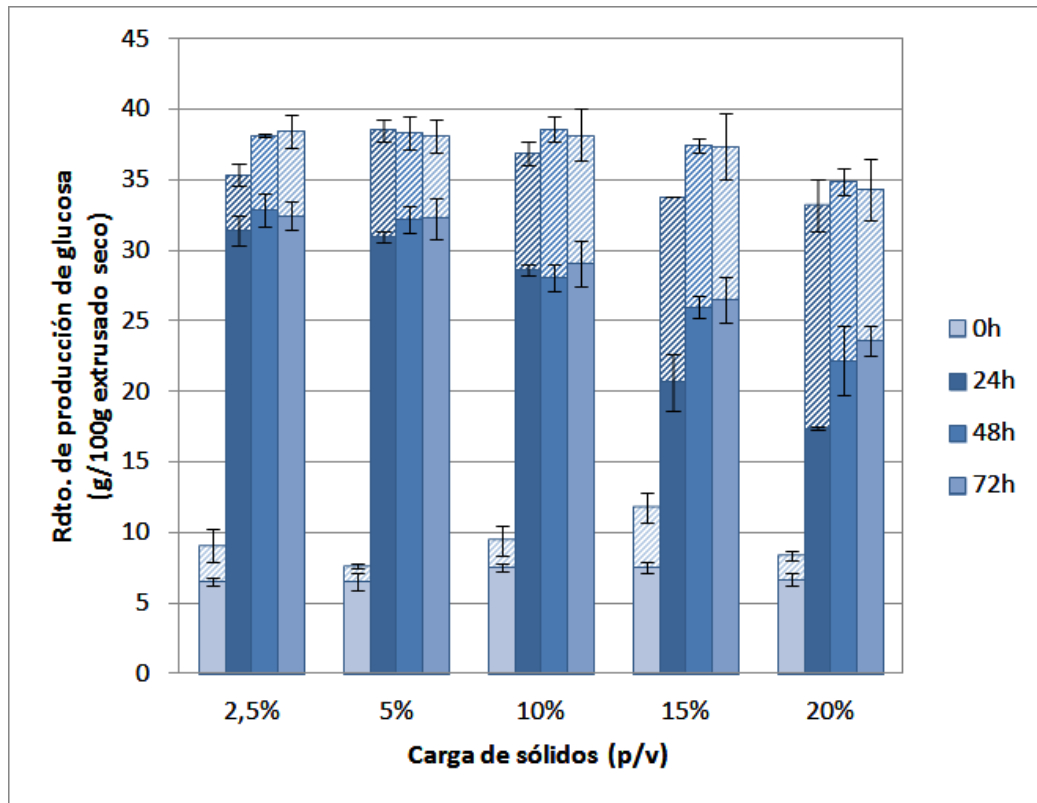


Figura 3.6- Rendimiento de producción de glucosa a 0, 24, 48 y 72h (en g/100 g de peso seco) de incubación del bioextrusado B1 a 50°C, a diferentes cargas de sólidos: 2,5, 5, 10, 15 y 20% p/v. Columnas de color uniforme – producción de monómeros. Columnas rayadas – producción de oligómeros.

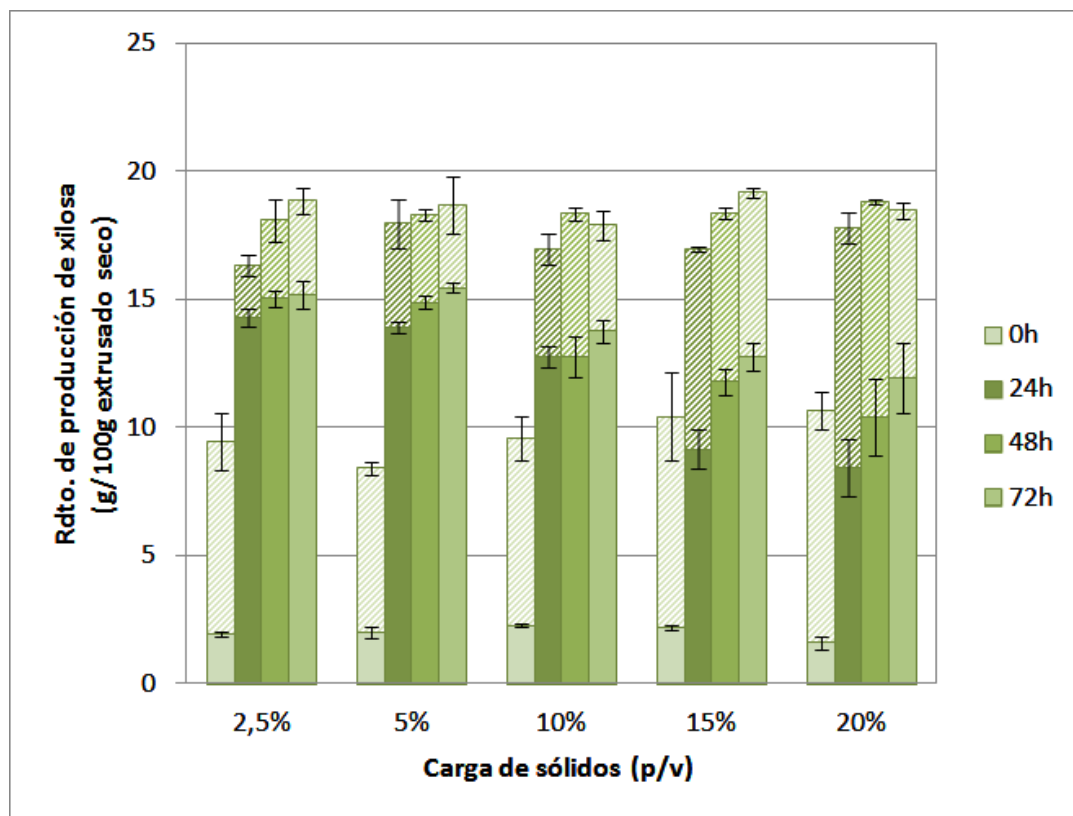


Figura 3.7- Rendimiento de producción de xilosa a 0, 24, 48 y 72h (en g/100 g peso seco) de incubación del bioextrusado B1 a 50°C, a diferentes cargas de sólidos: 2,5, 5, 10, 15 y 20% p/v. Columnas de color uniforme – producción de monómeros. Columnas rayadas – producción de oligómeros.

Como se puede observar en las figuras 3.6 y 3.7, al tiempo 0h de incubación ya se puede estimar una cierta producción de azúcares (tanto glucosa como xilosa) en el medio, que provienen de la fracción solubilizada durante la bioextrusión. Estos rendimientos, entre 7,6 y 11,8 g glucosa/100g bioextrusado seco y entre 8,5 y 10,5 g xilosa/100 g bioextrusado seco, son mayores que los que se encontraron a 0h en los sustratos extrusados alcalinos neutralizados (Capítulo II – Figuras 2.15 y 2.16), donde los valores alcanzaron alrededor de 5 g de glucosa y 7 g xilosa/100 g de extrusado seco. Este hecho demuestra nuevamente que la hidrólisis de los carbohidratos se ha iniciado ya durante la bioextrusión.

Otra diferencia notable respecto del extrusado alcalino neutralizado es la gran cantidad de oligómeros presentes durante la incubación de los bioextrusados desde el inicio de la misma. Esta fracción de oligómeros a tiempo 0h llega a suponer desde 14 hasta 36% de la glucosa total medida, dependiendo de la carga de sólidos empleada, y alrededor del 80% de la xilosa total medida. A lo largo del tiempo de incubación, la proporción de oligómeros se fue reduciendo, pero esta disminución es menor a las mayores cargas de sólidos, y en todos los casos hubo una fracción oligomérica que

permaneció tras las 72h de incubación. A diferencia de lo que ocurrió en el caso del extrusado alcalino neutralizado de partida, donde a 2,5, 5 y 10% (p/v) de carga de sólidos no se encontraron oligómeros a 72h, en el bioextrusado se encontraron valores de producción de oligómeros de glucosa de entre un 15 y un 23% de la producción total de glucosa a 72h. A cargas de sólidos superiores, la producción de oligómeros del bioextrusado se vio aumentada hasta 6,3 veces respecto de la del extrusado alcalino neutralizado. En el caso de la xilosa, la producción de oligómeros del extrusado alcalino neutralizado se multiplicó entre 2 y 4 veces en la incubación del bioextrusado. De acuerdo con estos resultados, se puede decir que la producción de oligómeros en los bioextrusados está potenciada con respecto al extrusado alcalino neutralizado, y esto a su vez permite mejorar los rendimientos en azúcares totales.

Otra característica diferenciadora del bioextrusado en comparación con el extrusado alcalino neutralizado es un acortamiento del tiempo de incubación necesario para alcanzar la producción máxima de glucosa, efecto que se ve principalmente a cargas de sólidos hasta el 10% (p/v). Así, a 2,5, 5, y 10% p/v de carga de sólidos en la incubación de los bioextrusados, se alcanza la máxima liberación de glucosa a las 24h y al 15% p/v se llega a esta producción máxima a las 48h. Estos tiempos se retrasarían 24h al hablar de la incubación con enzimas de un extrusado alcalino neutralizado (Capítulo II- Figuras 2.15 y 2.16), donde, hasta el 10% de carga de sólidos, la producción máxima se alcanza a las 48h y a partir de esta concentración de sólidos son necesarias 72h para llegar al máximo. En el caso de la producción de xilosa el comportamiento del bioextrusado y del extrusado alcalino neutralizado fue similar en términos de tiempo necesario para llegar a la producción máxima en todas las cargas de sólido ensayadas.

La producción total de glucosa alcanzó valores similares en las cargas de sólido de 2,5 a 15% p/v, manteniéndose alrededor de 38 g/100 g de bioextrusado seco, mientras que disminuye ligeramente hasta los 34 g/100 g de bioextrusado seco al pasar al 20% de sólidos, lo que podría deberse a que la transferencia de materia es peor debido a la alta concentración de sólidos empleada. En relación con el potencial de glucosa presente en el bioextrusado, estos datos corresponden a un 80 y un 72%, respectivamente. La comparación con los rendimientos de producción en el extrusado alcalino neutralizado es favorable, ya que la producción total de glucosa del bioextrusado es similar o incluso ligeramente superior a la del extrusado alcalino neutralizado en todas las cargas de sólido ensayadas, que fue 35 y 37 g glucosa total/100g bioextrusado seco (Capítulo II – Figura 2.15).

En cuanto a las concentraciones alcanzadas a las 72h del ensayo, que se muestran en la tabla 3.2, la glucosa en forma de monómeros alcanza 47,2 g/L al 20% (p/v) de carga de sólidos, lo que supone 5,8 veces más que la concentración de glucosa monomérica medida en el ensayo a 2,5% (p/v) de sólidos (8,1 g/L). En el caso de la

glucosa total (monómeros más oligómeros), la concentración aumentó 7 veces desde la menor carga de sólidos a la mayor, alcanzándose 68,7 g/L a la concentración de sólidos de 20%.

Tabla 3.2- Concentraciones de glucosa y xilosa, monoméricas y totales, (en g/L) a las 72h de incubación del bioextrusado B1.

Carga de sólidos (p/v)	Glucosa monomérica (g/L)	Glucosa total (g/L)	Xilosa monomérica (g/L)	Xilosa total (g/L)
2,5%	8,1	9,6	3,8	4,7
5%	16,1	19,1	7,7	9,3
10%	29,1	38,2	13,7	17,9
15%	39,7	56,0	19,2	28,8
20%	47,2	68,7	23,9	36,9

Respecto al rendimiento de producción de xilosa, al igual que lo que ocurría en el extrusado alcalino neutralizado, su producción total (contando con monómeros y oligómeros) se mantiene constante para todas las cargas de sólidos ensayadas, en torno a 18 g xilosa/100 g bioextrusado seco. Este valor es cercano al alcanzado en los extrusados alcalinos neutralizados y corresponde a un 73% del potencial de xilosa en el bioextrusado. La producción de xilosa en este tipo de materiales pretratados por extrusión mediante hidrólisis enzimática puede ser elevada, en comparación con otro tipo de pretratamientos, como los hidrotérmicos, en los que se solubiliza y/o degrada una parte de la hemicelulosa durante los mismos. Esta contribución de azúcares en forma de xilosa y xilooligómeros permitiría aumentar los rendimientos de producción de etanol en un proceso de co-fermentación y es una de las ventajas del pretratamiento de extrusión, que permite recuperar en el material pretratado prácticamente todo el xilano presente inicialmente en la materia prima.

Las concentraciones de xilosa aumentaron al aumentar la carga de sólidos en el medio, al igual que en el caso de la glucosa. Así, la concentración de xilosa monomérica fue 6 veces mayor al 20% (p/v) de sólidos, 23,9 g/L, que al 2,5% (p/v), donde se llegó a una concentración de 3,8 g/L. En términos de xilosa monomérica y oligomérica, el aumento con la carga de sólidos fue 7,8 veces, desde 4,7 a 36,9 g/L.

La producción total de azúcares (glucosa y xilosa) en los bioextrusados alcanzó 52 g de azúcar/100 g de bioextrusado seco al 20% p/v de sólidos, lo que supone una producción de azúcares casi 5 veces mayor que la del extrusado control con agua (10,7 g azúcar/100 g de peso seco). En términos de la concentración de azúcares, habría más de 70 g/L de azúcares simples disponibles para la fermentación y alrededor de 106 g/L considerando la glucosa y xilosa en forma monomérica y oligomérica. Estos resultados positivos sobre la digestibilidad enzimática ya se observaron en los extrusados alcalinos neutralizados, pero en el caso del bioextrusado se añade la mezcla eficiente enzima-sustrato a altas cargas de sólidos. En un artículo publicado dentro del contexto

del proyecto Babethanol, Vandenbossche *et al.* (2014) recogen los estudios de bioextrusión llevados a cabo sobre diferentes materiales y llegan a conclusiones similares a las presentadas hasta el momento: el proceso produjo un aumento significativo de la capacidad de hidrólisis de los materiales. Además, la introducción de las enzimas favoreció la alteración de la estructura de la biomasa, observándose que durante la bioextrusión dio comienzo la hidrólisis enzimática. Entre las biomásas ensayadas, los mejores resultados se obtuvieron con BAB y los peores con OPEFB. Tanto la paja de cebada como el SC mostraron un comportamiento similar tras la bioextrusión.

3. 2. 2. Ensayos en reactor de altas cargas de sólidos

En el apartado anterior, se mostró que la incubación en matraces Erlenmeyer del bioextrusado se ve dificultada debido a la elevada viscosidad del material a concentraciones por encima de 10% p/v. Este hecho provoca problemas de mezclado, dificultando la transferencia de materia y energía como ha sido descrito por Fan *et al.*, 2003. Igualmente, las altas cargas de sólidos conllevan efectos de inhibición de las enzimas por producto (glucosa y celobiosa), que pueden afectar a la eficiencia final de la hidrólisis enzimática (Lu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Por ello, estas condiciones requieren de sistemas de agitación especiales, ya que los convencionales no consiguen afrontar exitosamente los retos de trabajar en altas cargas de sólidos. En el Ciemat se dispone de un reactor especialmente concebido para trabajar con concentraciones elevadas de sólidos (RACS) (Terrafors-IS, InforsHT, Suiza), que proporciona una mezcla mejorada por gravedad.

Se planteó la realización del experimento que se presenta a continuación: el equipo se cargó con el bioextrusado B1 sin diluir, lo que significa una carga de sólidos de 30% p/v, y se incubó durante 72h a 50°C. La evolución de la producción de azúcares se siguió tomando muestras a 0, 24, 48 y 72h. Los resultados se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3- Rendimientos de producción y concentraciones de azúcares (glucosa y xilosa) en monómeros y totales (monómeros y oligómeros) a 0, 24, 48 y 72h de incubación del bioextrusado B1 en reactor de alta carga de sólidos.

Tiempo de incubación	Rendimiento de producción de glucosa (g/100 g bioextrusado seco)		Rendimiento de producción de xilosa (g/100 g bioextrusado seco)		Concentración de glucosa (g/L)		Concentración de xilosa (g/L)	
	Monómeros	Total	Monómeros	Total	Monómeros	Total	Monómeros	Total
0h	5,04	7,18	1,09	4,42	15,12	21,54	3,27	13,27
24h	11,37	19,20	3,80	9,73	34,11	56,97	11,4	28,97
48h	23,20	30,38	9,07	15,79	69,61	91,13	17,21	47,37
72h	23,81	34,80	10,14	17,06	71,43	107,31	31,15	51,93

Como en el caso de los ensayos realizados en matraz, hay una cierta cantidad de azúcares solubilizados durante la bioextrusión que se encuentran inicialmente a tiempo 0h en la incubación posterior. En el caso de la incubación en RACS al 30% p/v de carga de sólidos, los azúcares medidos a tiempo 0h en la incubación de los bioextrusados corresponden a rendimientos de producción de 7 g glucosa total/100 g bioextrusado seco (de los cuales, aproximadamente 30% se encontraron en forma oligomérica) y 4 g xilosa/100 g bioextrusado seco (75% en forma de xilooligómeros) (Tabla 3.3). Esta producción de azúcares (11 g/100 g bioextrusado seco) es similar a la encontrada en los ensayos en matraz, si bien en este experimento se solubilizó una mayor proporción de glucosa frente a xilosa.

La producción total de glucosa a las 72h de incubación alcanzó 34,8 g/100 g bioextrusado seco, de los cuales aproximadamente 32% fueron oligómeros de glucosa (Tabla 3.3). Éste es un resultado muy positivo, ya que se mantuvo la producción máxima de glucosa total al aumentar la carga de sólidos desde el 20% hasta el 30% p/v, lo que implica que se alcanza una mayor concentración de glucosa total en el medio, 107 g/L (monómeros y oligómeros). En cuanto a la xilosa, la producción máxima a las 72h, contando con monómeros y oligómeros, fue 17 g/100 g bioextrusado seco, correspondiendo en torno a un 40% a la fracción oligomérica (Tabla 3.3). Al igual que ocurrió en el caso de la glucosa, la producción máxima de xilosa es similar a la alcanzada en los ensayos en matraz al 20% p/v de carga de sólidos (Figura 3.6) y por lo tanto, la concentración alcanzada es mayor, siendo en este caso 52 g/L de xilosa total. Estos datos de producción de glucosa y xilosa totales equivalen a rendimientos de 73% de la glucosa potencial y 72% de la xilosa potencial. Estos buenos resultados pueden estar relacionados con la mezcla mejorada que proporciona el RACS respecto de los matraces y agitadores orbitales.

La concentración de oligómeros, tanto de glucosa como de xilosa, y su proporción respecto al total de azúcares varía a medida que transcurre el tiempo de incubación. Así, al inicio de la incubación se encontraron 6 g/L de oligómeros de glucosa y 10 g/L de oligómeros de xilosa, siendo estas cantidades respectivamente un 43 y un 75% de la glucosa y la xilosa totales en el medio. A lo largo de las siguientes 48h de incubación la proporción de oligómeros varió, siendo la fracción total de estos un 34% de la glucosa y xilosa totales producidas al cabo de las 72h de incubación.

Como resultado de los experimentos de producción de azúcares en el bioextrusado, tanto en matraz como en RACS, se concluye que se forma una cantidad significativa de oligómeros de glucosa y xilosa durante la HE, que no pueden ser hidrolizados por el complejo enzimático utilizado. El efecto de estos oligómeros en la inhibición de la actividad celulasa y, como resultado, en la producción de glucosa, se ha descrito en la bibliografía. De acuerdo con Qing *et al.* (2010), los xilooligómeros tienen un efecto inhibitorio sobre las enzimas celulasas, lo que podría estar afectando el

rendimiento de producción de glucosa en forma monomérica. De hecho, se acumula una mayor proporción de oligómeros en el bioextrusado que en el extrusado alcalino, a la vez que disminuye el rendimiento en azúcares monoméricos. Estas evidencias motivaron el estudio que se describe a continuación, en el que se plantearon ensayos en los que se suplementó el bioextrusado con enzimas cuyas actividades principales son β -glucosidasa y β -xilosidasa, con el objetivo de llegar a hidrolizar estos azúcares en forma oligomérica. Qing y Wyman (2011) afirman que la suplementación con una xilanasa o β -xilosidasa externas podría reducir esta inhibición y aumentar la digestibilidad de los sustratos.

3.2.3. Ensayos de producción de azúcares en bioextrusado con suplementación de enzimas

Los resultados de los ensayos de adición de β -glucosidasa se muestran en las figuras 3.8 y 3.9, y los de los ensayos con β -xilosidasa, llevados a cabo a dos temperaturas de incubación diferentes, corresponden a las figuras 3.10, 3.11, 3.12 y 3.13.

3.2.3.1. Adición de β -glucosidasa

La suplementación del bioextrusado con actividad β -glucosidasa se llevó a cabo mediante la adición de la enzima Novozyme-188. Según describen Dien *et al.* (2008), la actividad principal de esta preparación enzimática comercial es la β -glucosidasa (665 U/mL), pero también contiene una cierta actividad xilanasa y β -xilosidasa, entre otras. Esta mezcla de actividades se refleja en los resultados obtenidos de los ensayos realizados al 10% (p/v) de sólidos (Figuras 3.8 y 3.9).

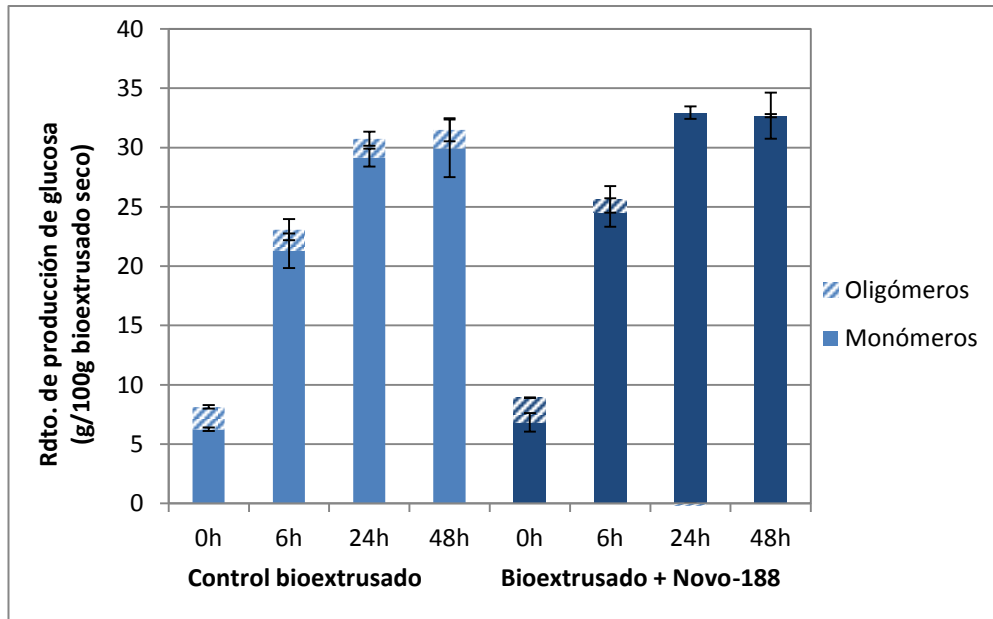


Figura 3.8- Rendimiento de producción de glucosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de Novozyme-188, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos. Columnas uniformes – glucosa monomérica. Columnas rayadas – glucosa oligomérica.

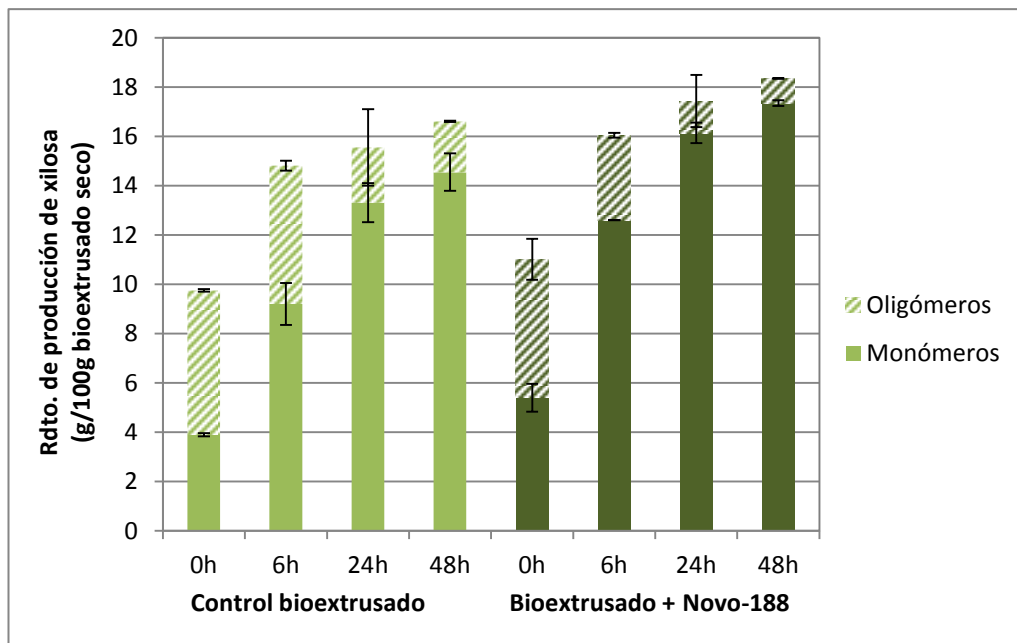


Figura 3.9- Rendimiento de producción de xilosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de Novozyme-188, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos. Columnas uniformes – xilosa monomérica. Columnas rayadas – xilosa oligomérica.

Los resultados del rendimiento de producción de glucosa (Figura 3.8) muestran que la adición del enzima Novozyme-188 da como resultado la hidrólisis de todos los oligómeros de glucosa a las 24 y 48h de incubación, si bien en este experimento no se encontró una proporción de oligómeros tan elevada como en las discutidas en el punto 3.2.1. Así, la producción de glucosa monomérica en el bioextrusado suplementado fue 32,7 g glucosa/100 g bioextrusado seco (equivalente a un rendimiento de 68,5% del teórico) frente a 30 g/100g bioextrusado seco, en el bioextrusado control (63% del teórico).

El efecto positivo de la suplementación con β -glucosidasa en la hidrólisis de oligómeros de glucosa ha sido estudiada por Pallapolu *et al.* (2011) en pasto varilla pretratado mediante diferentes técnicas. Los autores describen diferentes efectos en función del pretratamiento y la carga de enzima empleadas pero, en general, en los tratamientos alcalinos se demuestra un incremento de la digestibilidad enzimática a lo largo del proceso de hidrólisis, si bien en algunos de ellos sólo ocurre en las etapas iniciales de la HE. La reducción de la proporción de oligómeros de glucosa es significativa, aunque en algunos pretratamientos (CaO e impregnación con amoníaco en forma acuosa) no se consigue la hidrólisis total de los mismos.

Por otra parte, el rendimiento de producción de xilosa también se ve incrementado significativamente en el bioextrusado suplementado con Novozyme-188 frente al control (17,4 vs. 14,6 g xilosa/100g bioextrusado seco y 1 vs. 2 g oligómeros de xilosa/100 g bioextrusado seco) a las 48h. Este aumento de la producción de xilosa se debe a la actividad xilanasa y β -xilosidasa contenida en la preparación Novozyme-188, como se comentó anteriormente. Este mismo efecto de la suplementación con β -glucosidasa en el incremento de la producción de xilano ha sido descrito por Pallapolu *et al.* (2011) en materiales pretratados con agentes alcalinos, en los que se retiene una cantidad significativa de xilano en las fibras pretratadas.

Los resultados del presente trabajo muestran un efecto positivo de la adición de la enzima Novozyme-188 en la hidrólisis de los oligómeros de glucosa producidos durante la incubación del bioextrusado, que se traduce en un incremento de la producción de glucosa monomérica. Al mismo tiempo, debido a la actividad β -xilosidasa de esta preparación, se produce un efecto significativo en la producción de xilosa monomérica, si bien no se consigue la hidrólisis total de los oligómeros de xilosa. Estos resultados son prometedores desde el punto de vista de la preparación de mezclas enzimáticas “*tailor-made*” para el bioextrusado, pero sólo pueden considerarse una aproximación inicial que requiere de un estudio detallado en cuanto a la dosis de enzima, adición de otras actividades, etc.

3.2.3.2. Adición de β -xilosidasa

Como se vio en los apartados 3.2.1 y 3.2.2, tiene lugar una cierta acumulación de xilooligómeros durante la incubación del bioextrusado. En la bibliografía se ha descrito que estos xilooligómeros pueden tener un efecto inhibitorio sobre el complejo celulolítico, por lo que es conveniente minimizar su presencia. En los siguientes ensayos se probó el uso de una enzima específica para hidrolizar estos azúcares en forma oligomérica. La enzima escogida (E-BXSBR de Megazyme) tiene una temperatura óptima de incubación de 40°C, por lo que el primer ensayo se realizó a esta temperatura (Figuras 3.10 y 3.11).

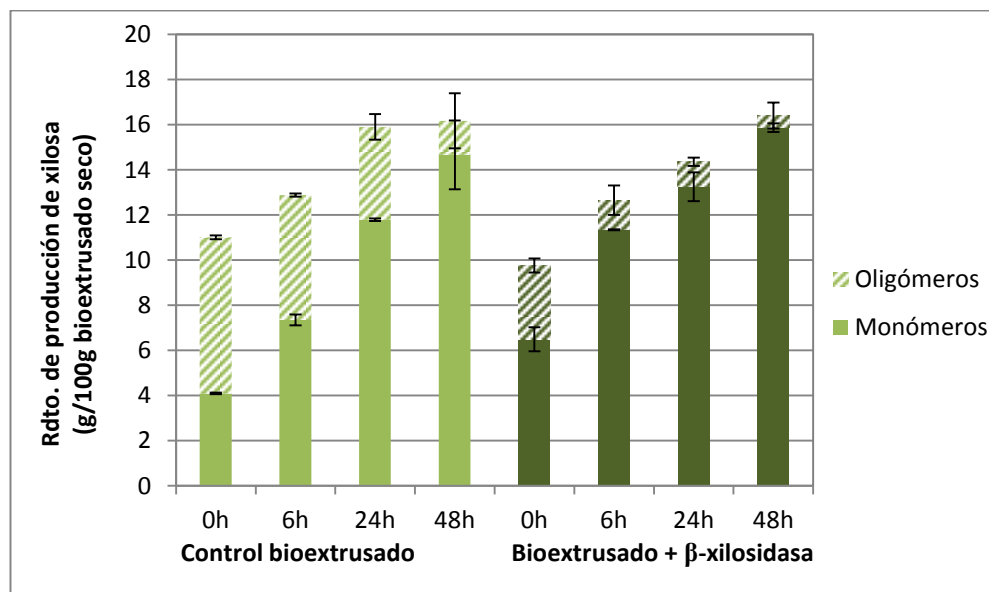


Figura 3.10- Rendimiento de producción de xilosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de β -xilosidasa, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos y 40°C. Columnas uniformes – xilosa monomérica. Columnas rayadas – xilosa oligomérica.

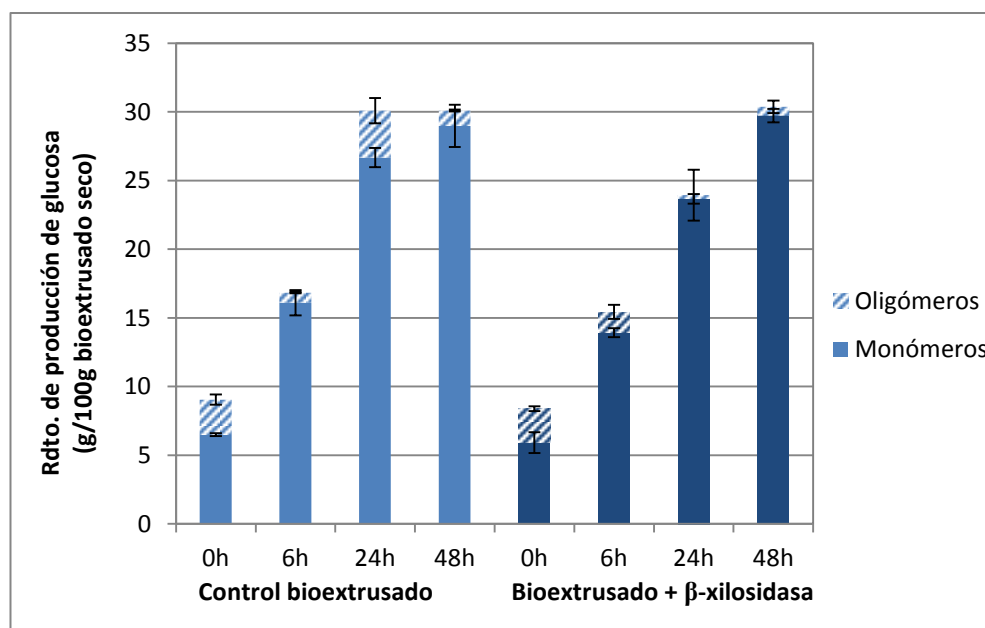


Figura 3.11- Rendimiento de producción de glucosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de β -xilosidasa, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos y 40°C. Columnas uniformes – glucosa monomérica. Columnas rayadas – glucosa oligomérica.

En los resultados de rendimiento de producción de xilosa mostrados en la figura 3.10 se puede ver cómo la adición de β -xilosidasa consigue reducir la cantidad de xilooligómeros respecto del ensayo control a 40°C. Así, a las 48h de incubación la cantidad producida de oligómeros en el medio tras la adición de β -xilosidasa fue 0,5 g/100 g bioextrusado seco, mientras que en el control la producción de oligómeros ascendió a 1,5 g/100 g bioextrusado seco. Esta pequeña proporción de oligómeros recalitrantes que la β -xilosidasa no consiguió hidrolizar, probablemente porque serían necesarias otras actividades enzimáticas accesorias para llegar a hidrolizarlos completamente. No obstante, la reducción conseguida con este ensayo es significativa y la proporción de oligómeros restante muy pequeña.

A pesar del efecto positivo de la adición de β -xilosidasa en la hidrólisis de los oligómeros de xilosa, no se encontró ningún efecto en el rendimiento de producción de glucosa a las 48h (Figura 3.11). Los valores de rendimiento de producción de glucosa alcanzados fueron similares en el control y el ensayo con β -xilosidasa y alcanzaron valores que apenas sobrepasaron los 30 g/100 g bioextrusado seco. El motivo de que no se observe esta mejora esperada en la hidrólisis del glucano puede deberse a que la temperatura de incubación utilizada no es la óptima para las enzimas contenidas en el bioextrusado, por lo que se repitió el mismo ensayo de adición de β -xilosidasa a una temperatura de 50°C. Los resultados se muestran en las figuras a continuación (Figuras 3.12 y 3.13).

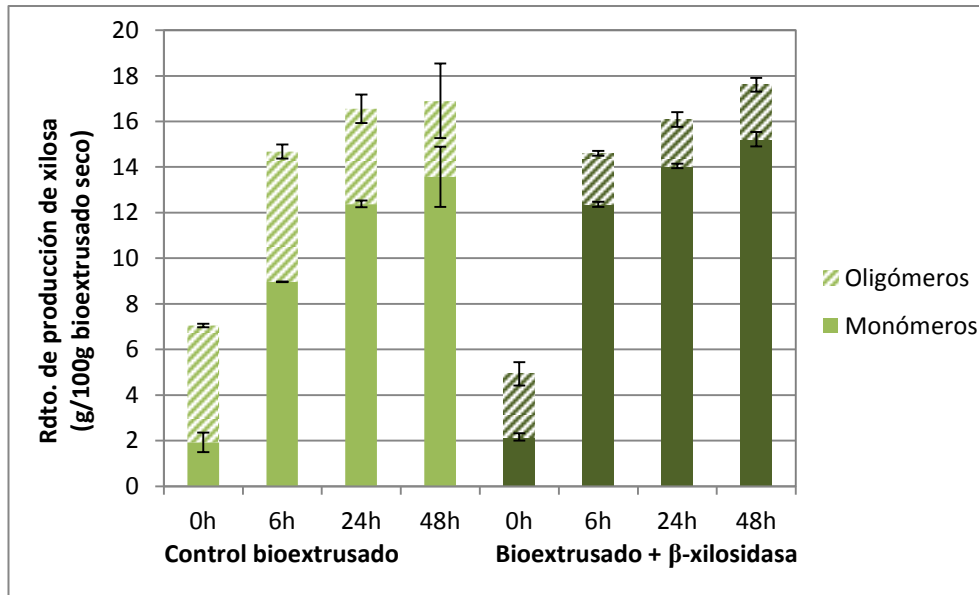


Figura 3.12- Rendimiento de producción de xilosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de β -xilosidasa, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos y 50°C. Columnas uniformes – xilosa monomérica. Columnas rayadas – xilosa oligomérica.

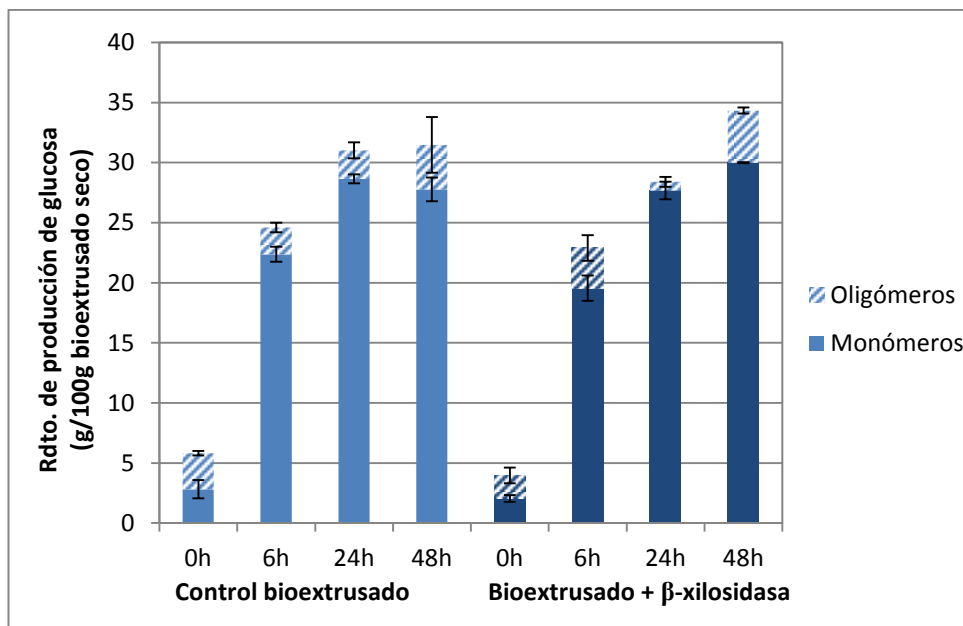


Figura 3.13- Rendimiento de producción de glucosa (en g/100g bioextrusado seco) del bioextrusado B1 sin y con suplementación de β -xilosidasa, a 0, 6, 24 y 48h de incubación al 10% (p/v) de carga de sólidos y 50°C. Columnas uniformes – glucosa monomérica. Columnas rayadas – glucosa oligomérica.

La incubación a 50°C, lejos de la temperatura óptima de incubación de la enzima E-BXSBR, parece que afectó al funcionamiento de ésta (Figuras 3.12 y 3.13). Así, a pesar de que los rendimientos conjuntos de monómeros y oligómeros de xilosa son

similares a los obtenidos cuando se realizó la incubación a 40°C, la cantidad de oligómeros hidrolizada respecto al control es muy pequeña, quedando aún 2,4 g/100 g bioextrusado seco en el bioextrusado suplementado a las 48h de incubación.

Respecto a su efecto en la producción de glucosa, la suplementación de β -xilosidasa a 50°C no dio como resultado un incremento de la glucosa monomérica respecto a la incubación a 40°C, apoyando la teoría de la baja efectividad de la utilización de la β -xilosidasa a 50°C.

En conclusión, la adición de la enzima E-BXSBR no es útil para mejorar la hidrólisis de los oligómeros presentes en la incubación del bioextrusado a 50°C, ya que su temperatura de funcionamiento óptimo no es compatible con la del cóctel enzimático empleado en el bioextrusado. Una alternativa que queda por explorar sería seleccionar una enzima con actividad β -xilosidasa con una temperatura óptima más cercana a 50°C. Como en el caso del punto anterior, este ensayo abre la posibilidad de un estudio detallado de la preparación de cócteles especialmente adecuados para este tipo de sustrato, teniendo en cuenta la presencia de una cantidad significativa de xilano retenida en el sustrato sólido, así como una producción favorecida de oligómeros de xilosa.

3. 3. Producción de etanol en bioextrusado

El potencial para la producción de bioetanol del bioextrusado se ensayó en experimentos de LSFS en el bioextrusado B2, en primer lugar, con el sustrato diluido al 20% (p/v). Como se mencionó en el punto 2.1, este bioextrusado se produjo a partir del extrusado alcalino neutralizado filtrado generado en la planta piloto de extrusión, que se transportó a los laboratorios del Ciemat y se extrusó con 40 mg proteína (16 FPU)/g sustrato en el extrusor EV25. Éste bioextrusado tenía un contenido en sólidos a la salida de 27% (p/p).

En esta configuración de LSFS la etapa de licuefacción se llevó a cabo en el reactor de altas cargas de sólido descrito en el apartado 2.3.2 y, después de 24h, se traspasó el sustrato a un reactor de tanque agitado de volumen 1 L para su inoculación y posterior incubación durante 72h adicionales a 35°C. Los resultados de concentración de etanol a lo largo del proceso de LSFS, así como el consumo de azúcares, se muestran en la figura (Figura 3.14).

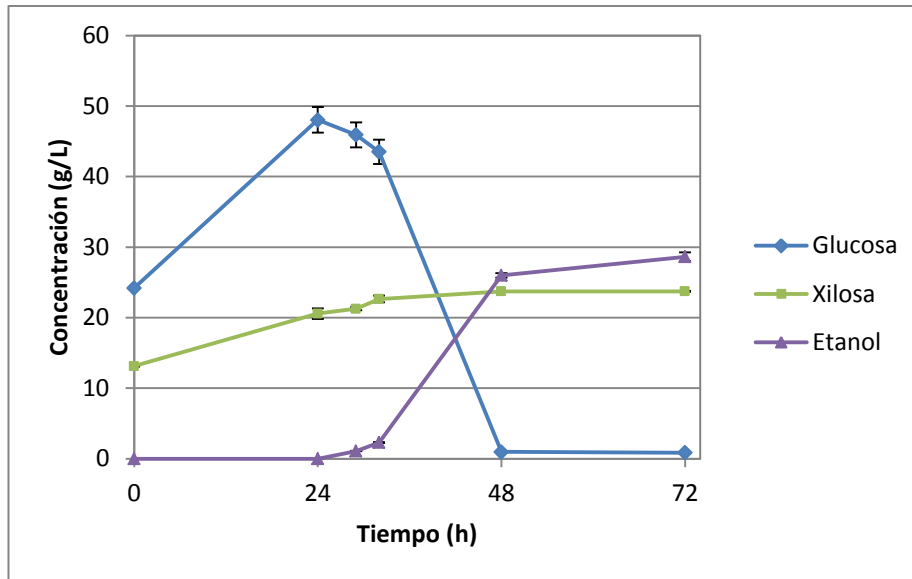


Figura 3.14- Concentraciones de glucosa, xilosa y etanol (en g/L) a lo largo del ensayo de LSFS en bioextrusado B2 diluido al 20% (p/v) de sólidos.

En la gráfica (Figura 3.14) se observa una cinética típica de las SFS con etapa previa de licuefacción. Durante las primeras 24h se produjo un fuerte incremento de la concentración de glucosa y xilosa hasta 48 y 20,6 g/L, respectivamente. A partir del momento de la inoculación, a las 24h, se comenzó a consumir glucosa, completándose la fermentación a las 72h desde el inicio del experimento y obteniéndose una concentración final de etanol de 28,6 g/L. Esta concentración es algo mayor que la resultante de la LSFS del extrusado alcalino neutralizado (Capítulo II – apartado 3.2.2), que fue 25 g/L.

Por otra parte, *S. cerevisiae* Ethanol Red es exclusivamente un fermentador de hexosas, por lo que toda la xilosa producida, que no puede ser metabolizada por esta levadura, queda al final del proceso con una concentración final en el medio de fermentación de 23,7 g/L. Esta xilosa podría ser fermentada conjuntamente con la glucosa si se emplease una estrategia de co-fermentación, aumentando así el rendimiento final de etanol del proceso. De esta manera, además, se conseguiría aprovechar totalmente el potencial del pretratamiento de extrusión alcalina/bioextrusión, que cuenta con la ventaja de producir materiales con prácticamente todo el xilano que tenía la materia prima inicialmente.

Las concentraciones mostradas en la figura 3.14 corresponden a los valores de glucosa y xilosa en forma monomérica; sin embargo, al analizar las concentraciones de azúcares totales a las 96h de la fermentación, se comprobó que, a pesar de consumirse prácticamente toda la glucosa monomérica, quedaron 5,3 g/L de glucosa en forma oligomérica que no fueron hidrolizados y, por lo tanto, no pudieron ser metabolizados por la levadura. Esta concentración equivale a una producción de 2,6 g/100 g

bioextrusado seco, que corresponde a un 7% de la glucosa potencial. En el caso de la xilosa, en el que a las 72h se encontraron monómeros y oligómeros, se cuantificaron 7,2 g/L de xilosa en forma oligomérica, que corresponden a un 23% de la xilosa total. Por lo tanto, en el bioextrusado B2 también se produjo una cierta acumulación de oligómeros de glucosa y xilosa, que se mantienen a lo largo de la fermentación.

En la tabla 3.4 se presentan los valores del rendimiento de producción de azúcares durante la bioextrusión (t = 0h), el rendimiento de producción de azúcares durante la etapa de licuefacción (t = 24h) y el rendimiento de LSFS, tal y como se describe en la metodología (apartado 2.4, Ec. 2).

Tabla 3.4- Rendimientos de producción de azúcares monoméricos y oligoméricos durante la bioextrusión y durante la etapa de licuefacción (en g glucosa o xilosa/100g bioextrusado seco) y rendimiento de LSFS (en % del etanol teórico), del bioextrusado B2 diluido al 20% (p/v) de sólidos.

	Rendimiento de producción de azúcares durante la bioextrusión		Rendimiento de producción de azúcares durante la etapa de licuefacción		Rendimiento de LSFS
	g glucosa/100g bioextrusado seco	g xilosa/100g bioextrusado seco	g glucosa/100g bioextrusado seco	g xilosa/100g bioextrusado seco	% etanol teórico
Monómeros	12,1	6,6	24,0	10,3	75,2
Oligómeros	3,1	2,9	2,9	3,2	

La presencia de azúcares a tiempo = 0h demuestra de nuevo que la hidrólisis enzimática ha comenzado durante la bioextrusión. Así, el rendimiento de producción de glucosa total (monómeros más oligómeros) durante la bioextrusión alcanzó 15,2 g/100 g bioextrusado seco, siendo un 20% oligómeros de glucosa. En el caso de la xilosa, se llegó a 9,5 g/100 g bioextrusado seco en forma monomérica y oligomérica, de los cuales 30% correspondieron a xilooligómeros. Esta proporción es menor que la encontrada en el bioextrusado B1 debido a la mayor carga de enzima empleada.

Por otro lado, los rendimientos de producción de azúcares durante la etapa de licuefacción, calculados a partir de las concentraciones medidas tras 24h de incubación, son algo menores que en el bioextrusado B1 incubado al 20% (p/v) de sólidos; 26,9 g glucosa total y 13,5 g xilosa total/100 g bioextrusado seco en el B2, frente a 33 g glucosa total y 18 g xilosa total/100 g bioextrusado seco en el B1. Sin embargo, la proporción de oligómeros encontrada a las 24h dentro de estos azúcares totales fue mucho menor en el caso del bioextrusado B2, siendo éstos un 11% y 24% de la glucosa y la xilosa totales, respectivamente. Mientras, en el B1, la proporción de oligómeros de glucosa a las 24h fue 48% y la proporción de oligómeros de xilosa fue 53%. Estas diferentes proporciones indican que la hidrólisis de los oligómeros está

funcionando mejor en el bioextrusado B2, lo que puede estar relacionado con la carga enzimática más alta.

En cuanto al rendimiento de LSFS, se alcanzó un 75,2% del etanol teórico, mejorando el rendimiento de LSFS del extrusado alcalino neutralizado (Capítulo II – apartado 3.2). Hay que tener en cuenta que el cálculo del etanol potencial se ve influenciado por la composición en glucano de los materiales pretratados, y ésta es menor en el bioextrusado B2, ya que se produjo con el lote 2 de paja de cebada, cuyo contenido inicial en glucano fue 33,9% frente a 39,1% en el lote 1. La mayor concentración de etanol en el medio de LSFS y el contenido en glucosa potencial menor, dan como resultado un mayor rendimiento respecto del extrusado alcalino neutralizado.

3.3.1. Producción de etanol en el bioextrusado sin diluir

A continuación se llevó a cabo un experimento incubando el bioextrusado B2 sin diluir, lo que supone una carga de sólidos del 37% (p/v), para probar su potencial de producción de etanol tal y como se produce en el extrusor. Al igual que en el caso anterior se muestra el seguimiento de las concentraciones de glucosa, xilosa y etanol durante la LSFS (Figura 3.15), y los rendimientos de producción de azúcares a las 0 y 24h y el rendimiento de LSFS (Tabla 3.5).

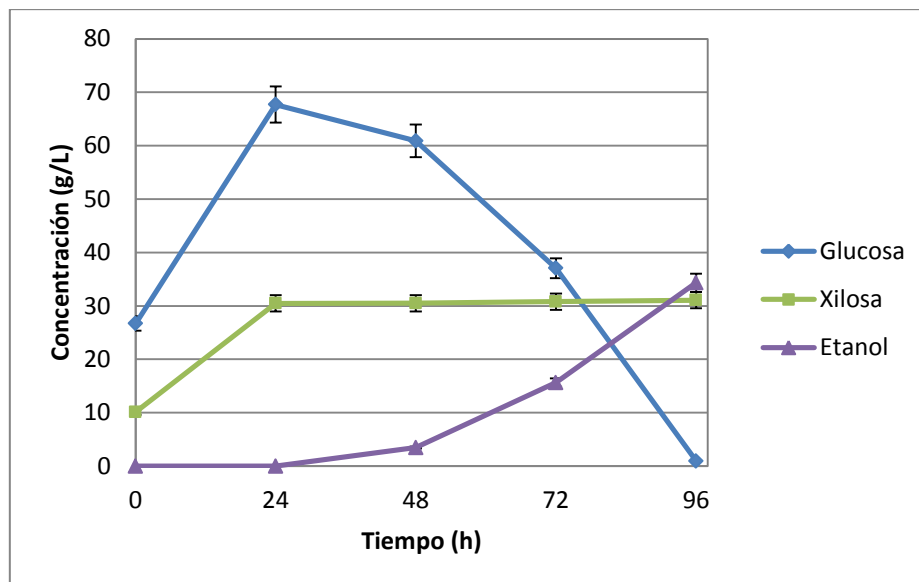


Figura 3.15- Concentraciones de glucosa, xilosa y etanol (en g/L) a lo largo del ensayo de LSFS en bioextrusado B2 sin diluir.

En estas condiciones de incubación, las concentraciones de glucosa y xilosa monoméricas a las 24h alcanzaron 67,7 y 30,5 g/L, respectivamente. La fermentación se retrasó 24h en comparación con el ensayo anterior al 20% (p/v) de sólidos, llegando a un tiempo total de incubación de 96h. La concentración final de etanol fue 34,3 g/L, que sería equivalente a una concentración volumétrica de etanol en el medio de 4,3% (v/v). Al final de la incubación se encontraron 31,1 g/L de xilosa, que, si fuese fermentada, equivaldría a un incremento de 15,9 g/L en la concentración final de etanol.

Al igual que en el caso anterior, se detectó en el medio de fermentación al final de la incubación una cierta cantidad de oligómeros de glucosa no hidrolizados (8,8 g/L), que equivaldrían al 6% de la glucosa potencial y a una producción de 2,3 g/100 g bioextrusado seco. También se encontraron oligómeros de xilosa a las 96h (16,7 g/L), constituyendo un 35% de la xilosa total. Estas proporciones de oligómeros acumuladas al final de la fermentación son mayores que las de la incubación del bioextrusado al 20% p/v de carga de sólidos, lo que puede estar afectando a la producción de azúcares monoméricos. Los datos de rendimientos de producción de azúcares se presentan en la tabla 3.5 a continuación.

Tabla 3.5. Rendimientos de producción de azúcares monoméricos y oligoméricos durante la bioextrusión y durante la etapa de licuefacción (en g glucosa/xilosa/100g bioextrusado seco) y rendimiento de LSFS (en % del etanol teórico), del bioextrusado B2 sin diluir.

	Rendimiento de producción de azúcares durante la bioextrusión		Rendimiento de producción de azúcares durante la etapa de licuefacción		Rendimiento de LSFS
	g glucosa/100g bioextrusado seco	g xilosa/100g bioextrusado seco	g glucosa/100g bioextrusado seco	g xilosa/100g bioextrusado seco	% etanol teórico
Monómeros	7,2	4,7	18,3	8,2	48,8
Oligómeros	1,5	2,7	1,7	2,8	

En comparación con el ensayo de producción de etanol anterior, la determinación de azúcares a t = 0h da como resultado un valor más bajo del rendimiento de producción de azúcares durante la bioextrusión, alcanzando un 8,7 g glucosa total/100 g bioextrusado seco y 7,4 g xilosa total/100 g bioextrusado seco, frente a 15,2 g glucosa total y 9,5 g xilosa total/100 g bioextrusado seco en el ensayo al 20% (p/v) de sólidos. Este hecho podría deberse a diferencias en la eficacia de extracción de azúcares que se lleva a cabo para la cuantificación de los mismos a t = 0h, debido a la mayor concentración de sólidos en el sustrato sin diluir. Los rendimientos de producción de azúcares durante la etapa de licuefacción (t = 24h), son

igualmente menores que los del ensayo a menor carga de sólidos, llegando a 20 g glucosa total y 11 g xilosa total/100 g bioextrusado seco. Lo que confirma el hecho de que la hidrólisis está dificultada al aumentar la carga de sólidos hasta el 37% p/v.

En cuanto al rendimiento de LSFS (48,8% del teórico), fue mucho menor que en el caso anterior, por lo que se concluye que es conveniente diluir hasta un cierto punto el bioextrusado para evitar los efectos negativos derivados del aumento de la carga de sólidos en el medio.

Los resultados de los ensayos de LSFS en el bioextrusado B2 muestran que este es un sustrato adecuado para su utilización en un proceso de producción de etanol mediante hidrólisis enzimática y fermentación, debido a la ventaja proporcionada por el elevado grado de integración alcanzado en la etapa de su producción y a los rendimientos alcanzados en las etapas de hidrólisis y fermentación. No obstante, los resultados también ponen de manifiesto que todavía hay posibilidades de mejora en el rendimiento global del proceso.

Por una parte, hay que considerar que la etapa de pretratamiento se ha realizado en unas condiciones muy moderadas en cuanto a dosis de catalizador y temperatura, y que un incremento de estas variables redundaría sin duda en una mayor digestibilidad enzimática del bioextrusado. Por otra parte, se puede actuar en la etapa de hidrólisis enzimática mediante el diseño de cócteles enzimáticos específicos para la hidrólisis en este sustrato bioextrusado, cuyas características se han mostrado bien diferentes a las de sustratos pretratados mediante otros tratamientos como, por ejemplo, los hidrotérmicos. La presencia de una cantidad significativa de xilano en el bioextrusado y la potenciación de la producción de oligómeros conforme se produce la hidrólisis hace preciso adaptar los cócteles enzimáticos actuales para proporcionar una mayor efectividad en la producción de azúcares fermentables. Finalmente, si bien el bioextrusado es un material que puede ser producido con una relativamente alta carga de sólidos totales de hasta 27% p/p, su dilución hasta concentraciones de alrededor del 20% (p/v) de sólidos proporciona una mejora de los rendimientos de LSFS, probablemente debido a una disminución del efecto negativo de la importante cantidad de solubles presente en el mismo. La disminución de la concentración de etanol que conlleva rebajar la carga de sólidos en el proceso se podría superar mediante el empleo de estrategias de alimentación tipo *fed-batch*, que permitieran añadir gradualmente el sustrato e incrementar la concentración final de etanol.

4. Conclusiones

El estudio de la bioextrusión llevado a cabo en este capítulo permite concluir que éste es un pretratamiento altamente integrado para producción de azúcares fermentables a partir de la incubación directa de los sustratos pretratados. Estos

materiales, denominados bioextrusados, tienen unas características propias y distintivas respecto de los extrusados alcalinos lavados o neutralizados, tanto a nivel físico como químico.

A nivel físico, los bioextrusados se caracterizan por un color más oscuro, una elevada viscosidad y una distribución de tamaño de partículas donde predominan los tamaños más pequeños (< 1mm). En cuanto a su composición, los bioextrusados cuentan con una fracción soluble (35% ps) incrementada respecto a los extrusados alcalinos neutralizados (FS = 1% ps). Casi la mitad de la FS en el bioextrusado, un 17% ps, son azúcares, siendo el contenido en glucosa un 8,7% del peso seco total del bioextrusado y la xilosa un 6,8%.

Durante los ensayos de producción de azúcares a partir del bioextrusado se observa que la producción de oligómeros está favorecida en estos sustratos, independientemente de la carga de sólidos empleada en la incubación. Considerando la producción de oligómeros, los rendimientos de producción total de glucosa y xilosa son similares o mejores que en el extrusado alcalino neutralizado, de hasta 38 g glucosa total y 18 g xilosa total/100 g bioextrusado seco. Además, estos rendimientos no se ven afectados por el incremento de la carga de sólidos hasta el 20% p/v. La incubación del bioextrusado al 30% p/v en un reactor especialmente diseñado para trabajar a altas cargas de sólido (RACS), dio como resultado un rendimiento de producción de azúcares ligeramente menor (35 g glucosa total y 17 g xilosa total/100 g bioextrusado seco), pero se alcanzaron concentraciones de hasta 160 g/L de glucosa y xilosa en forma monomérica y oligomérica.

Se realizaron ensayos de suplementación de enzimas con actividad β -glucosidasa y β -xilosidasa para estudiar si los oligómeros mencionados anteriormente podrían ser hidrolizados de forma que aumentase el rendimiento de producción en azúcares monoméricos. Los resultados de estos ensayos mostraron el potencial de estas enzimas accesorias para mejorar la hidrólisis de los oligómeros de glucosa y xilosa en el bioextrusado, abriendo una posible línea futura de investigación en cuanto al diseño de un cóctel enzimático específico para este material.

Se probó la capacidad de producción de etanol de los sustratos bioextrusados en ensayos de LSFS a una carga de sólidos del 20% p/v y a la del bioextrusado sin diluir, 37% p/v, y se comprobó que el aumento de la carga de sólidos hasta el 37% (p/v) produjo peores rendimientos de hidrólisis y, por lo tanto, un menor rendimiento de LSFS. Al 20% p/v de sólidos se alcanzó una concentración cercana a 30 g/L de etanol en el medio, siendo el rendimiento de LSFS 75% del teórico. A partir de estos resultados se concluyó que una cierta dilución del bioextrusado hasta el 20% p/v de carga de sólidos es necesaria para favorecer el rendimiento de producción de etanol.

5. Bibliografía

Chen, W-H.; Xu, Y-Y.; Hwang, W-S., y Wang, J-B. Pretreatment of rice straw using an extrusion/extraction process at bench-scale for producing cellulosic ethanol. *Bioresource Technology*. 2011, núm. 102, p. 10451-10458.

Dien, B.S.; Ximenes, E.A.; O'Bryan, P.J.; Moniruzzaman, M.; Li, XL.; Balan, V.; Dale, B., y Cotta, M.A. Enzyme characterization for hydrolysis of AFEX and liquid hot-water distillers' grains and their conversión to ethanol. *Bioresource Technology*. 2008, núm. 99, p. 5216-5225.

Du, J.; Li, Y.; Zhang, H.; Zheng, H., y Huang, H. Factors to decrease the cellulose conversion of enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high solid concentrations. *Cellulose*. 2014, núm. 21, vol. 4, p. 2409-2417.

Duque, A.; Manzanares, P.; Ballesteros, I.; Negro, M. J.; Oliva, J. M.; González, A., y Ballesteros, M. Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. *Bioresource Technology*. 2014, núm. 158, p. 262-268.

European Standard Norm 15149. Solid biofuels - Determination of particle size distribution. Brussels: European Committee for Standardization; 2010.

Fan, Z., South, C.; Lyford, K.; Munsie, J.; Van Walsum, P., y Lynd, L.R. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2003, núm. 26, vol. 2, p. 93-101.

Govindasamy, S.; Campanella, O.H., y Oates, C.G. Enzymatic hydrolysis of sargo starch in a twin-screw extruder. *Journal of Food Engineering*. 1997, núm. 32, p. 403-426.

Jørgensen, H.; Vibe-Pedersen, J.; Larsen, J., y Felby, C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, núm. 96, vol. 5, p. 862-870.

Lee S.H.; Teramoto, Y., y Endo, T. Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process I – Effect of additives with cellulose affinity. *Bioresource Technology*. 2009, núm. 100, p. 275-279.

Lee, S.H.; Inoue, S., Teramoto, Y., y Endo, T. Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process II: Effect of hot-compressed water treatment. *Bioresource Technology*. 2010, núm. 101, p. 9645-9649.

Linko, P.; Hakulin, S., y Linko, Y.Y. Extrusion cooking of barley starch for the production of glucose syrup and ethanol. *Journal of Cereal Science*. 1983, núm. 1, p. 275-284.

Lu, Y. ; Wang, Y. ; Xu, G. ; Chu, J. ; Zhuang, Y., y Zhang, S. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, núm. 160, p. 360-369.

Pallapolu, V.R.; Lee, Y.Y.; Garlock, R.J.; Balan, V.; Dale, B.E.; Kim, Y.; Mosier, N.S.; Ladisch, M.R.; Falls, M.; Holtzapple, M.T.; Sierra-Ramírez, R.; Shi, J.; Ebirk, M.A.; Redmond, T.; Yang, B.; Wyman, C.E.; Donohoe, B.S.; Vinzant, T.B.; Elander, R.T.; Hames, B.; Thomas, S., y Warner, J. Effects of enzyme loading and β -glucosidase supplementation on enzymatic hydrolysis of switchgrass processed by leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2011, núm. 102, p. 11115-11120.

Qing, Q., y Wyman, C.E. Hydrolysis of different chain length xylooligomers by cellulase and hemicellulose. *Bioresource Technology*. 2011, núm. 102, p. 1359-1366.

Qing, Q.; Yang, B., y Wyman, C.E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology*. 2010, núm. 101, p. 9624-9630.

Um, B.H.; Choi, C.H.; Oh, K.K. Chemicals effect on the enzymatic digestibility of rape straw over the thermo-mechanical pretreatment using a continuous twin screw-driven reactor (CTSR). *Bioresource Technology*. 2013, núm. 130, p. 38-44.

Vandenbossche, V.; Brault, J.; Vilarem, G.; Hernández-Meléndez, O.; Vivaldo-Lima, E.; Hernández-Luna, M.; Barzana, E.; Duque, A.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; Mata, J.; Castellón, E., y Rigal, L. A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Industrial Crops and Products*. 2014, núm. 55, p. 258-266.

Van Soest, P.J., y Wine, R.H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. *Journal of AOAC International*. 1967, núm. 50, p. 50-55.

Wang, W.; Kang, L.; Wei, H.; Arora, R., y Lee, Y.Y. Study on the decreased sugar yield in enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate at high solid loading. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011, núm. 164, p. 1139-1149.

CAPÍTULO IV: BALANCES DE MATERIA Y ENERGÍA

1. Introducción

Los balances másicos (BM) y energéticos (BE) se basan en los principios de conservación de masa y energía. Son una parte fundamental en el diseño de un proceso, ya que sirven para calcular la cantidad de producto que se puede llegar a obtener y cuánta energía se consume y/o produce para llegar a él, es decir, informan sobre la viabilidad técnica y energética del proceso. Estos balances, además, definen todos los flujos de entrada, salida e inter-etapas del proceso, por lo que son la base del diseño de equipos y servicios auxiliares. Cuando se trata de un proceso sencillo, los BM y BE pueden calcularse manualmente, pero cuando se trata de un proceso con numerosas corrientes y operaciones más complejas, existen herramientas que facilitan su cálculo.

La simulación de procesos es una herramienta que, partiendo de los datos experimentales de un proceso, permite realizar una evaluación técnica y económica del mismo. Se puede aplicar en el inicio de un proyecto industrial con el fin de evaluar su factibilidad, durante el desarrollo del proyecto, para optimizar el proceso y diseñar los equipos, o en plantas industriales ya operativas, con el objetivo de introducir mejoras en el proceso (Martínez *et al.*, 2000).

Los programas de simulación se pueden usar para llevar a cabo balances rigurosos de materia y energía, que incluyen modelos detallados de los equipos, y también para determinar todos los flujos másicos y energéticos y todas las composiciones de las corrientes del proceso. Además, se pueden usar para comparar diferentes configuraciones de proceso y escenarios y realizar análisis de sensibilidad del sistema con diferentes parámetros (Galbe *et al.*, 2007). Hay que tener en cuenta que la calidad de la simulación depende de lo adecuados que sean de los modelos que describen las diferentes etapas del proceso (Cardona y Sánchez, 2007), y estos modelos pueden estar basados en datos experimentales o ecuaciones teóricas.

Según Galbe *et al.* (2007), las etapas de construcción de un modelo de proceso con un programa de simulación son:

1. Construcción del diagrama de proceso: se plantean todas las corrientes de entrada al proceso, las unidades de operación y las corrientes entre ellas. El diagrama también debe incluir todas las corrientes de salida, que serán calculadas por el programa.
2. Definición de los componentes químicos: es preciso definir todos los compuestos químicos que intervienen en el proceso y sus propiedades físicas y termodinámicas (a menudo incluidas en las bases de datos del propio programa informático).

3. **Condiciones de operación:** se deben definir las condiciones de operación para cada unidad de proceso (temperatura, presión, consumos energéticos, etc.) y para todas las corrientes de entrada al sistema.

Existen algunas publicaciones en las que se describe la simulación de un proceso de producción de bioetanol lignocelulósico con diferentes pretratamientos, siendo el más común un pretratamiento de tipo ácido o hidro-térmico, cuyo modelo ha sido bien establecido (Wooley *et al.*, 1999; McAloon *et al.*, 2000; Humbird *et al.*, 2011; Quintero y Cardona, 2011; Sánchez y Cardona, 2012; Quintero *et al.*, 2013). Sin embargo, existen escasas referencias en la literatura sobre simulaciones de proceso de producción de etanol lignocelulósico utilizando pretratamientos mecánicos.

En este trabajo, se calculan los balances de materia y de energía del proceso de producción de bioetanol mediante bioextrusión a partir de paja de cebada, seguida por una LSFS y teniendo en cuenta la etapa posterior de recuperación de bioetanol. El proceso ha sido simplificado y no contempla integración energética ni cálculo de los servicios auxiliares. Para la realización de los cálculos, se ha contado con la ayuda del programa de simulación de procesos, Aspen Plus® (Aspen Technology Inc., EEUU) disponible a través de la Universidad de Valladolid.

2. Materiales y métodos

2. 1. Software de simulación

El programa Aspen Plus (Aspen Technology Inc., EEUU) es una de las herramientas de simulación más ampliamente utilizadas en la industria química. También ha sido el programa más usado en los últimos 10 años para llevar a cabo evaluaciones tecno-económicas del proceso de producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos (Galbe *et al.*, 2007). Algunos de los trabajos publicados usando este *software* son: Wooley *et al.* (1999), Mc Aloon *et al.* (2000), Aden *et al.* (2002), Humbird *et al.* (2011), Quintero y Cardona (2011), Sánchez y Cardona (2012), Moncada *et al.* (2013), o Quintero *et al.* (2013). El programa consta de una librería pre-configurada de unidades de operación que se van conectando entre sí y una extensa base datos de propiedades físicas de un gran número de componentes puros. Aspen Plus usa algoritmos de convergencia para solucionar los balances de masa y energía y resolver las ecuaciones de equilibrio, mediante una aproximación secuencial-modular, en la que los diferentes bloques operativos se computan secuencialmente. Una de las ventajas del uso del programa Aspen Plus para la simulación del proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica es que se puede definir una corriente sólida separada, la cual no interactúa con la fase líquida y nunca pasa a la fase vapor, por lo que no es necesario estimar las propiedades en fase vapor de los componentes definidos como sólidos (Galbe *et al.*, 2007).

Para la simulación de los equipos se usaron los módulos pre-diseñados de Aspen Plus para el cálculo de reactores, intercambiadores de calor, separadores, etc. Las columnas de destilación se simularon de forma rigurosa mediante el módulo RadFrac, que se basa en el método de equilibrio interno y externo y que utiliza ecuaciones MESH (*Mass, Equilibrium, Summation and Heat*) para resolver los balances.

A pesar de la amplia base de datos de propiedades físicas que incluye el programa, en ella faltan los datos de algunos compuestos imprescindibles en el proceso de producción de etanol lignocelulósico, como por ejemplo la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Por ello, el National Renewable Energy Laboratory (NREL, Colorado, EEUU) desarrolló en 1996 una base de datos con las propiedades físicas de los componentes más significativos de este proceso a partir de estimaciones, datos publicados en la literatura y determinaciones experimentales en laboratorio (Wooley y Putsche, 1996). En este trabajo se han usado ambas fuentes (las bases de datos incluidas en Aspen Plus y la publicada por el NREL) para definir las propiedades físicas de todos los compuestos implicados en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica.

Para la simulación del pretratamiento se utilizaron los parámetros y resultados del proceso de extrusión obtenidos en la planta piloto de extrusión Agromat (Tarbes, Francia) (Capítulo II), combinados con los datos proporcionados por los ensayos de bioextrusión llevados a cabo en el Ciemat con el extrusado alcalino neutralizado producido en dicha planta piloto (bioextrusado B2, Capítulo III). Los datos de entrada correspondientes a la etapa de licuefacción y fermentación se tomaron de los ensayos de LSFS realizados al 20% (p/v) de carga de sólidos descritos en el apartado 3.3 del Capítulo III. En una etapa más avanzada del estudio se plantearon diferentes alternativas al caso base, una de las cuales es la utilización del bioextrusado sin diluir, para cuya simulación se recurrió a los datos experimentales de los ensayos de LSFS realizados al 37% (p/v) de carga de sólidos presentados en el apartado 3.3.1 del Capítulo III. Por último, los datos iniciales para la simulación de la parte de recuperación y separación de etanol se obtuvieron del estudio tecno-económico de la producción de etanol a partir de bagazo de maíz llevado a cabo por Humbird *et al.* para el NREL (Humbird *et al.*, 2011) y del ejemplo publicado por la compañía ProSim para el diseño de una planta de producción de bioetanol a partir de bagazo de maíz, usando el programa ProSimPlus (ProSim, 2009).

2. 2. Descripción del proceso: caso base

El proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica por la ruta bioquímica consta de cuatro etapas principales: pretratamiento de la biomasa, hidrólisis enzimática, fermentación y recuperación y separación de etanol. A estas

etapas habría que sumar el transporte, almacenamiento y acondicionamiento de la biomasa previo al pretratamiento, el tratamiento de los efluentes del proceso y los posibles procesos de co-generación. Debido a su complejidad y la escasez de datos disponibles, estas etapas periféricas no se abordaron en la simulación llevada a cabo en este trabajo y los datos se calcularon fuera del modelo. De cualquier forma, el estudio de las etapas principales del proceso (pretratamiento, hidrólisis, fermentación y destilación) es suficiente para hacer una primera evaluación técnica del proceso de producción de bioetanol mediante bioextrusión de paja de cebada, identificar los principales cuellos de botella del proceso y comparar entre diferentes alternativas.

Para llevar a cabo esta simulación, se ha utilizado como biomasa lignocelulósica la paja de cebada del lote 2 utilizado en este trabajo (ver Capítulo I), cuya composición es 33,9% de glucano, 22,3% de xilano, 13,6% de lignina ácido insoluble y 6% de cenizas, en porcentaje sobre peso seco. Estos son los componentes que se utilizan para el cálculo de los balances de materia, obviándose la presencia de otros azúcares minoritarios y compuestos solubles de la paja de cebada, cuyo seguimiento a lo largo del proceso es menos relevante. La paja de cebada fue inicialmente molida a 5 mm. La molienda previa al pretratamiento es un proceso con un alto gasto energético, que depende tanto del tamaño de partícula del que se parte, como del tamaño final deseado. Aunque esta etapa no se toma en consideración en los cálculos efectuados, hay que tener en cuenta que los datos utilizados en este estudio han sido obtenidos en un equipo de laboratorio y que, en un extrusor industrial, el paso de los tornillos sería mayor y permitiría trabajar con moliendas menos intensivas.

En la figura 4.1 a continuación se muestra un diagrama simplificado en el que se especifica la configuración del proceso simulado.

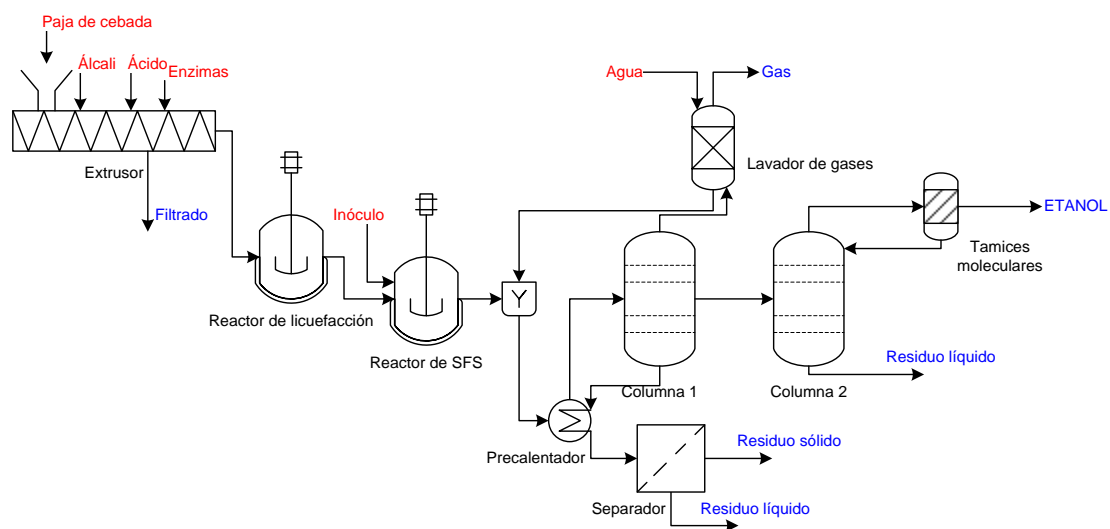


Figura 4.1- Diagrama de flujo simplificado del proceso de producción de bioetanol a partir de paja de cebada con pretratamiento por extrusión reactiva.

Aunque el pretratamiento en los experimentos realizados en el Ciemat se llevó a cabo en dos pases de extrusión, para realizar la simulación se asume que se lleva a cabo en un solo pase en un extrusor de manera análoga a los ensayos llevados a cabo en la planta Agromat, dividido en cuatro zonas: pretratamiento alcalino, neutralización, filtración y bioextrusión. El álcali utilizado para el **pretratamiento alcalino** es una disolución de NaOH al 10% (p/v), introducido en una proporción másica respecto de la paja de cebada de 8%. La temperatura en esta zona de reacción es 68°C y la velocidad del tornillo se fija en 150 rpm. La conversión de glucano a glucosa durante el pretratamiento alcalino es un 2,4% sobre la cantidad de glucano inicial y la de xilano a xilosa es un 3,6% del contenido en xilano de la materia prima. Para la **neutralización** se introduce una disolución de H₃PO₄ 0,5M, en una proporción en masa 2,4 veces respecto de la sosa añadida y se supone que reacciona el 99% de NaOH, produciéndose Na₃PO₄. A continuación se encuentra la zona de **filtración**, donde se producen 1,4 L de filtrado por cada kg de paja de cebada, volumen que contiene 1,0% de sólidos insolubles y 3,03% de sólidos solubles. En la zona de **bioextrusión** el catalizador es una solución enzimática de Cellic Ctec2 más Cellic HTec2 (Novozymes A/S, Dinamarca) en una proporción relativa 9:1 en contenido en proteínas. El cóctel enzimático se añade en una cantidad que es equivalente a la adición de 40 mg proteína/g sustrato seco y la temperatura en esta zona se ajusta a 50°C. Durante la bioextrusión se convierte a glucosa monomérica el 26,7% del glucano y un 31,1% del xilano pasa a xilosa monomérica.

A continuación, el bioextrusado pasa a un reactor de licuefacción, donde se añade agua para ajustar el contenido en sólidos al 20% y se incuba a 50°C, siendo el tiempo de residencia 24h. Durante esta incubación se hidroliza a glucosa el 56,5% del glucano presente en el bioextrusado y la conversión de xilano a xilosa fue un 28,6%. Este pre-hidrolizado se bombea a un fermentador, donde se inocula con *S. cerevisiae* (concentración del inóculo, 1 g/L) y se incuba a 35°C durante 72h adicionales. Durante la etapa de SFS continúa la hidrólisis del glucano, transformándose un 48,6% del restante a glucosa, y la hidrólisis del xilano, con una conversión del 12,6%. Así, las conversiones finales del proceso son 81,6 y 57,7% del glucano y el xilano, respectivamente, y la producción final de etanol es 15,8 kg/100 kg paja de cebada.

El sistema de separación y recuperación de etanol consiste en un tren de destilación acoplado a unos tamices moleculares. La zona de destilación comprende una primera columna de concentración del etanol hasta aproximadamente un 41% y una segunda columna de rectificación donde se llega a una pureza de etanol del 92% (p/p). La **columna 1** opera con una presión de cabezas de 2 bar, una relación de reflujo interna de 3 y cuenta con 34 etapas teóricas. La alimentación es la corriente de fermentado más la corriente líquida que sale del lavador de gases más adelante y se precalienta hasta 73,6°C con la corriente de vinazas. La entrada se hace en el plato 5 y la columna tiene 3 salidas, una en forma de vapor por cabezas, las vinazas por colas y

una corriente lateral que es el destilado 1 en el plato 9. El vapor contiene principalmente CO₂ producido durante la fermentación más vapor de agua y etanol y se conduce a un lavador de gases en el que se lava con una corriente de agua fresca que se recircula posteriormente a la alimentación de la columna. Las vinazas, después de usarse como fuente de calor para precalentar la alimentación se enfrían nuevamente hasta 45°C, temperatura a la cual pueden pasar a un sistema de filtración donde se separa una corriente sólida, que se secaría para quemarse y producir así energía, y una corriente líquida, la cual iría a una planta de tratamiento de aguas residuales, donde se aprovecharía su potencial para producir biogás. La **columna 2** consta de 45 etapas teóricas y opera a 1,7 bar de presión en cabezas y con una relación de reflujo interna de 3,5. Tiene dos entradas: el destilado 1, proveniente de la columna anterior, y una recirculación de la corriente de salida de la etapa de deshidratación. La entrada del destilado se sitúa en el plato 33 y la de la recirculación en el plato 17. Las salidas son el destilado, con un contenido másico en etanol de 92%, por cabezas, y las colas, que se conducen al tratamiento de aguas. El destilado 2 se lleva a un sistema de deshidratación por tamices moleculares, que tendría un tamiz funcionando mientras el otro se regenera, y donde se consigue una pureza del etanol a la salida de 99,5% (p/p).

Un resumen de los parámetros más importantes usados para la simulación se presenta en la tabla 4.1 a continuación.

Tabla 4.1- Datos de partida más importantes para realizar la simulación del caso base.

Etapa	Parámetro	Datos	Etapa	Parámetro	Datos
Alimentación			Destilación		
	Biomasa	Paja de cebada 2 [Tabla I-1]		Columna 1	
	Flujo	100 kg/h		Presión	2 bar
Pretratamiento				Nº de platos	34
	Velocidad tornillo	150 rpm		Relación de reflujo	3
	Agente alcalino	NaOH (10% p/v)		Concentración de etanol	41% (p/p)
	Relación sosa/biomasa	8% p/p		Columna 2	
	Temperatura reacción	68°C		Presión	1,7 bar
	Agente ácido	H ₃ PO ₄ (0,5M)		Nº de platos	45
	Filtración	Separa 36% líquido y 2% sólidos		Relación de reflujo	3,5
	Agente biológico	Cóctel enzimático (Cellic CTec2 + Cellic HTec2, 9:1 en proteínas)		Concentración de etanol	92% (p/p)
	Relación enzimas/biomasa	40 mg prot/g biomasa seca	Deshidratación		
	Temperatura bioextrusión	50°C		Tamices moleculares	
LSFS				Concentración de etanol	99,5% (p/p)
	Licuefacción		Lavado de gases		
	Temperatura	50°C		Nº de etapas	4
	Fermentación			Eliminación de CO ₂	99,9%
	Microorganismo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Ethanol Red, Fermentis)	Separación de vinazas		
	Temperatura	35°C		Filtración	Separa 99% líquido y 5% sólidos
Proceso global					
	Conversión final de glucano	81,6%			
	Conversión final de xilano	57,7%			
	Producción de etanol	15,7 kg/100 kg paja de cebada			

2. 3. Análisis energético

El proceso de producción de etanol lignocelulósico requiere un aporte de energía, en forma de electricidad, vapor y/o agua de refrigeración (Cardona y Sánchez, 2006). Además, durante el proceso se producen una serie de corrientes que pueden ser aprovechables desde el punto de vista energético y de esta manera compensar parte del gasto energético en el que se incurre durante la producción de bioetanol. En el caso base estudiado, se consideran dos formas de co-generación de energía: combustión del residuo sólido y producción de biogás por digestión anaerobia de las aguas residuales derivadas de la filtración y de la destilación. Ambas formas de recuperación de energía son aceptadas comúnmente en este tipo de procesos, siendo la digestión anaerobia una de las alternativas más prometedoras para el pretratamiento de las vinazas, si bien se necesitarían más datos experimentales para asegurar su viabilidad técnica (Wingren *et al.*, 2008).

El análisis energético del sistema, se llevó a cabo utilizando la aplicación Aspen Energy Analyzer incluida dentro del paquete Aspen Plus® (Aspen Technology Inc., EEUU), para el cálculo de los flujos de calor y servicios auxiliares en los intercambiadores de calor. Adicionalmente, se utilizó el valor de energía eléctrica consumida proporcionado por el equipo de extrusión (*specific mechanical energy*, SME) y datos de fuentes bibliográficas (Prakash *et al.*, 1998; Cardona y Sánchez, 2006; Wingren *et al.*, 2008) para el cálculo de la recuperación de energía a partir de la lignina y el biogás. Con el fin de calcular la producción de biogás, se midió el contenido en DQO total de las corrientes de filtrado y fracción líquida de las vinazas. Este análisis fue llevado a cabo por la Unidad de Procesos Biotecnológicos para la Producción de Energía del Instituto IMDEA Energía, mediante test en cubetas DQO de la marca Spectroquant® (EMD Millipore Corporation, USA). Además, se midió el potencial calorífico de la corriente sólida, rica en lignina, recuperada tras la fermentación. El poder calorífico superior en base seca se determinó siguiendo la norma BIOM-002 B del Laboratorio de Caracterización de Biomasa del Centro del Desarrollo de Energías Renovables (CEDER-Ciemat), mediante calorímetro automático LECO AC-300. Este procedimiento deriva de la norma EN-14918 "Biocombustibles sólidos. Determinación del poder calorífico".

2. 4. Limitaciones de la simulación

La base de cálculo tomada para esta simulación son 100 kg/h de alimentación de paja de cebada. Este es un valor muy pequeño para una planta industrial y se encontraría más cercano a la escala piloto; sin embargo, éste fue escogido debido a que los datos disponibles sobre el pretratamiento son los del extrusor HT53 (Clextral, Francia), cuya máxima capacidad son 100 kg/h. Los datos de producción se analizaron

siempre referidos a la masa de paja de cebada inicial o al etanol final, por lo que, a efectos de comparación con otros procesos de producción de bioetanol lignocelulósico encontrados en la literatura, la escala no resulta un factor relevante. No obstante, para evaluar los resultados en una escala más cercana a la comercialización, se realizó el estudio de una ampliación 1000 veces de la escala de producción de la planta. Las mayores diferencias entre ambas escalas se podrían encontrar sobre todo en el diseño de equipos y el coste económico, aspectos que no entran dentro del objetivo del presente estudio.

A lo largo del estudio llevado a cabo en los capítulos anteriores sobre el pretratamiento de bioextrusión con incubación posterior, se ha hallado una gran producción de azúcares en forma oligomérica, que son una fuente potencial de producción de glucosa y xilosa monoméricas, si se emplea un cóctel enzimático específicamente diseñado para su hidrólisis. Sin embargo, debido a su heterogeneidad y a que no han sido identificados, los oligómeros de glucosa o xilosa, como conjunto, no pueden introducirse en la simulación. Por ello, para los cálculos sólo se utilizaron los datos de glucosa y xilosa monoméricos, considerándose que el resto permanece en forma de glucano y xilano sólidos.

Además, la simulación se llevó a cabo suponiendo un tren continuo de operación, incluso en los equipos con un funcionamiento discontinuo (reactores de incubación).

En cuanto a las limitaciones del análisis energético llevado a cabo, hay que tener en cuenta que se parte de datos proporcionados por el programa Aspen Energy Analyzer o encontrados en la bibliografía, y tan sólo se dispone de un dato experimental, que es la energía mecánica ejercida por el equipo de extrusión. Además, el balance de energía no tiene en cuenta la energía eléctrica que consumirían otros equipos necesarios en el proceso como bombas, compresores, reactores de tratamiento de aguas residuales, etc. No obstante, con el balance de energía llevado a cabo es posible tener una idea aproximada de los requerimientos energéticos del proceso.

2. 5. Alternativas al caso base

Se estudiaron los resultados de la simulación del caso base y se identificaron las principales mejoras que se podrían hacer en su diseño. Así, se plantearon cuatro alternativas al caso base, que se analizaron tanto desde el punto de vista másico como energético:

Caso 1. Aumento de la capacidad de la planta hasta un flujo másico de tratamiento de 100 t/h de paja de cebada. Esta alternativa aborda

la primera limitación identificada de la simulación del proceso, llevando la escala hasta lo que sería una planta de tamaño industrial.

Caso 2. Empleo del microorganismo recombinante *Zymomonas mobilis* para la fermentación de todos los azúcares hidrolizados. Este microorganismo es capaz de fermentar la glucosa y la xilosa, siendo la conversión de glucosa a etanol del 92% y de xilosa a etanol del 85%, tras un período de incubación de 3 días, según Wooley *et al.* (1999). La utilización de un microorganismo capaz de fermentar tanto glucosa como xilosa, aborda una de las principales limitaciones tecnológicas del proceso, ya que permite aprovechar mejor las características propias del sustrato bioextrusado (con un alto contenido en hemicelulosa) y así mejorar los rendimientos globales del proceso.

Caso 3. Aumento de la carga de sólidos al inicio de la LSFS hasta un 37% (p/v). En este punto se han utilizado para los cálculos los datos del experimento con el bioextrusado sin diluir presentado en el Capítulo III, apartado 3.3.1. El aumento de la carga de sólidos en la hidrólisis y fermentación está muy relacionada con una reducción del consumo de agua y del gasto energético en las etapas de recuperación del etanol. No obstante, hay que tener en cuenta también el descenso en el rendimiento de producción de etanol debido a inhibiciones en las enzimas y los microorganismos, que se ven afectados por la elevada cantidad de compuestos solubles presentes en el medio.

Caso 4. Una combinación de los casos 2 y 3 en la que la carga de sólidos en el medio de incubación es un 37% (p/v) y se utiliza el microorganismo *Z. mobilis* para la fermentación conjunta de hexosas y pentosas, suponiendo los mismos rendimientos de producción de etanol que en el caso 2. Esta última premisa es una suposición que probablemente no se ajuste a la realidad, ya que en la actualidad todavía se debe mejorar la resistencia y los rendimientos de producción de los microorganismos fermentadores en condiciones de alta carga de sólidos. Sin embargo, la consecución de un biorreactor estable frente a variaciones en las condiciones de operación es un objetivo futuro razonable, que puede asumirse como caso de estudio límite en el presente trabajo.

3. Resultados y discusión

3. 1. Caso base

3. 1. 1. Diagrama de flujo

A continuación (Figuras 4.2-4.5) se presenta el diagrama de flujo del proceso estudiado, global y por partes, tal y como se diseñó con el programa Aspen Plus.

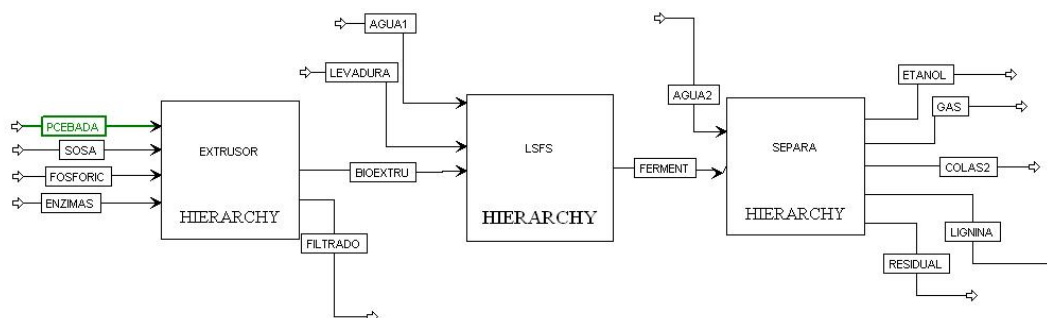


Figura 4.2- Diagrama de bloques del proceso de producción de bioetanol a partir de paja de cebada, caso base.

Como se ve en la figura 4.2, el proceso se ha dividido en tres bloques: pretratamiento por extrusión, hidrólisis y fermentación (mediante licuefacción más sacarificación y fermentación simultáneas), y separación y recuperación de etanol. En total existen 6 corrientes de entrada al proceso: la materia prima, en forma de corriente sólida de paja de cebada (PCEBADA), la disolución alcalina de NaOH (SOSA), la disolución de ácido fosfórico (FOSFORIC), la mezcla enzimática (ENZIMAS), el inóculo de *S. cerevisiae* (LEVADURA), el agua para diluir el bioextrusado al inicio de la incubación (AGUA1) y el agua empleada en el lavador de gases (AGUA2). Por otro lado, hay otras 6 corrientes de salida: el producto deshidratado (ETANOL), el filtrado que se produce durante el pretratamiento (FILTRADO), el gas, principalmente CO₂, que se produce en la primera columna de destilación y se limpia de restos de etanol en el lavador (GAS), la corriente de colas de la segunda columna de destilación (COLAS2), una corriente sólida, donde se recupera prácticamente toda la lignina (LIGNINA), y una corriente de agua residual que queda tras la separación de dicha corriente sólida (RESIDUAL). El producto del pretratamiento es el sustrato bioextrusado (BIOEXTRU) y el de la etapa de LSFS es la corriente de fermentado (FERMENT).

A continuación se muestra cada bloque en detalle, comenzando por la etapa de pretratamiento (Figura 4.3).

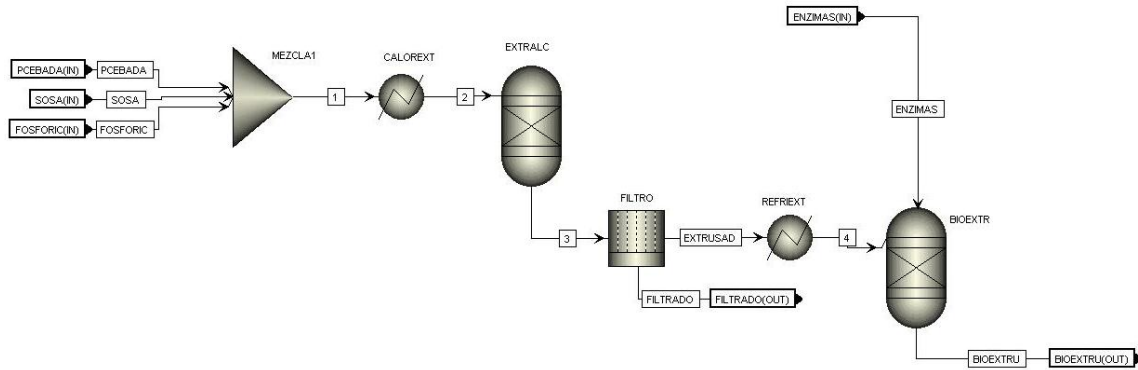


Figura 4.3- Diagrama de flujo simplificado del pretratamiento por extrusión reactiva de la paja de cebada.

En la figura superior se representa el diagrama de flujo del pretratamiento de la paja de cebada por extrusión. Puesto que el programa no incluye un modelo que describa el funcionamiento del extrusor, éste se ha simulado a partir de los datos experimentales de rendimientos. El equipo en sí se modeló como dos reactores (extrusión alcalina, EXTRALC, y bioextrusión, BIOEXTR) con una etapa de intercambio de calor antes de cada uno (calentamiento antes de la extrusión alcalina con neutralización, CALOREXT, y enfriamiento antes de la bioextrusión, REFRIEXT) y con una filtración entre ambos (FILTRO). Debido a las limitaciones de esta forma de simulación, la parte del pretratamiento se mantiene fija a la hora de buscar diferentes alternativas al proceso.

La figura 4.4 corresponde al bloque de hidrólisis y fermentación, que se llevaría a cabo mediante dilución del bioextrusado con agua fresca hasta una concentración inicial de sólidos del 20% (p/v) e incubación durante 24h a 50°C previa a la inoculación, tras la cual se incubaría la mezcla a 35°C durante 72h adicionales.

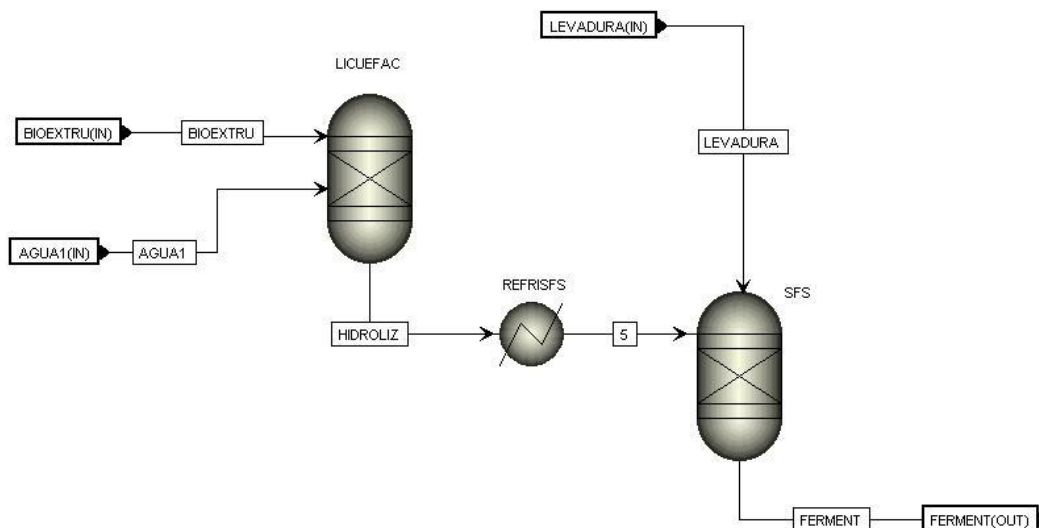


Figura 4.4- Diagrama de flujo simplificado de la etapa de licuefacción y sacarificación y fermentación simultáneas.

Así, este proceso consta de dos reactores, uno de licuefacción (LICUEFAC) y otro de fermentación (SFS), con una etapa de refrigeración intermedia (REFRISFS). A efectos de la simulación estos equipos se trataron como reactores continuos, un modo de operación que se podría reproducir a escala industrial empleando baterías de reactores que operasen en paralelo. Para el cálculo de los rendimientos se usaron los datos experimentales, tal y como se explica en el apartado de metodología; sin embargo, la cinética de las reacciones de hidrólisis y fermentación de los azúcares C6 y C5 es bien conocida, por lo que en un futuro podrían implementarse modelos cinéticos, adaptados para este tipo de sustrato en concreto.

Por último, la etapa de separación y recuperación del etanol (Figura 4.5) es la más compleja desde el punto de vista de número de equipos y corrientes y además no se dispone de datos experimentales de la misma; sin embargo, todas las operaciones unitarias que intervienen en ella están bien definidas en Aspen Plus.

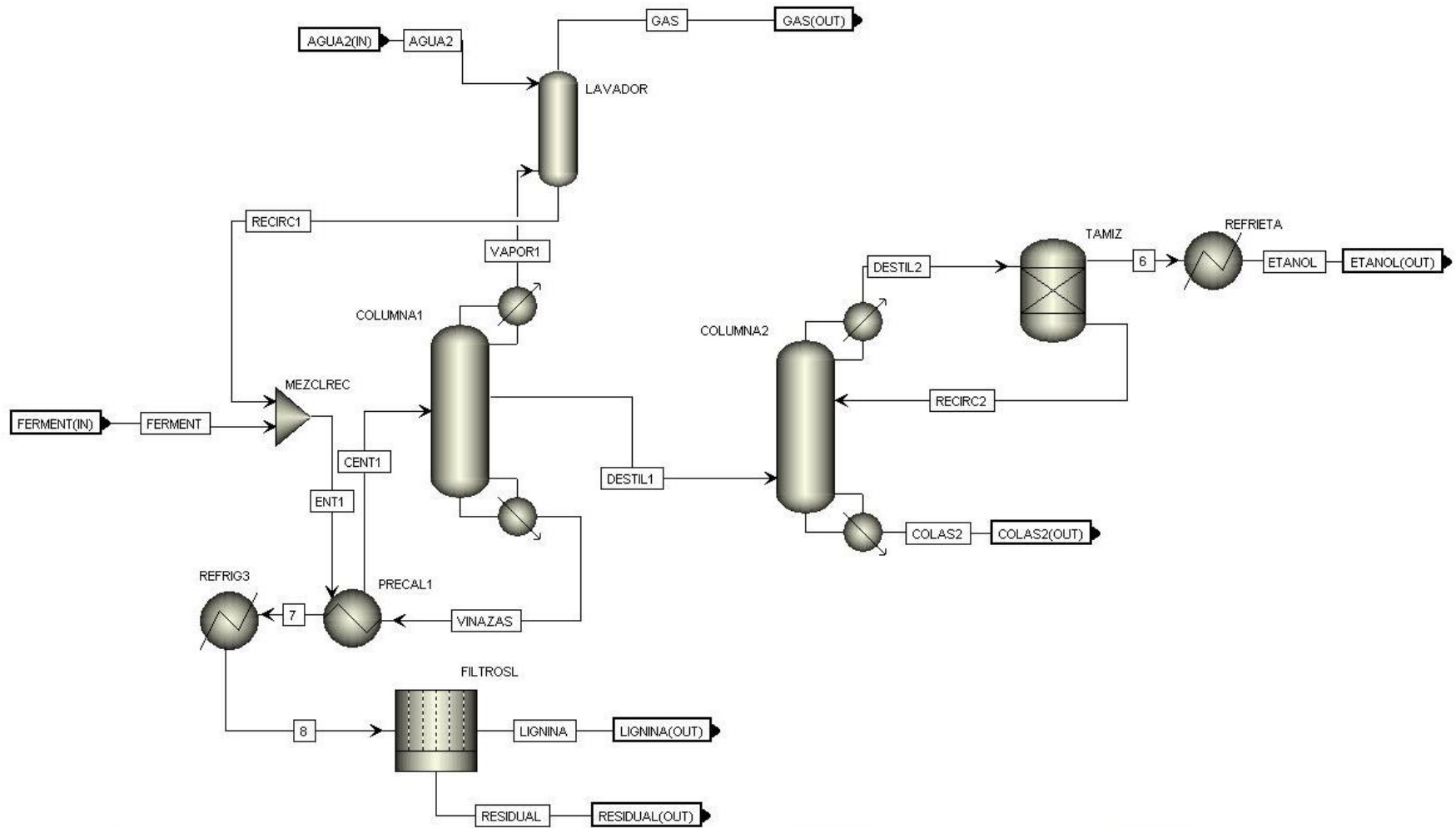


Figura 4.5- Diagrama de flujo simplificado de la etapa de separación y recuperación de bioetanol.

En la etapa de separación del etanol los equipos principales son las dos columnas de destilación (COLUMNA1 y COLUMNA2) y los tamices moleculares (TAMIZ). Aparte de estos equipos se cuenta con un tratamiento de las corrientes de colas y cabeza de la columna 1. Los vapores resultantes de la primera destilación (VAPOR1), constituidos mayoritariamente por CO₂, se llevan a un lavador de gases (LAVADOR) y las vinazas se usan para precalentar la alimentación a la primera columna (PRECAL1), tras lo cual se enfrían a 45°C (REFRIG3) y se separan en una corriente sólida (LIGNINA) y una líquida (RESIDUAL). Se plantean además dos recirculaciones: una donde se mezcla el etanol recuperado en el lavador con el fermentado que viene de la etapa anterior, para así volver a introducirlo en la columna 1 (RECIRC1), y otra donde se vuelve a destilar en la columna 2 la corriente resultante de la regeneración de los tamices moleculares (RECIRC2).

3. 1. 2. Tabla de corrientes (BM)

En la tabla 4.2 se presentan las corrientes más importantes del proceso y se muestra su temperatura, presión, flujo y componentes, según los resultados proporcionados por el programa Aspen Plus, tomando los datos de partida de la tabla 4.1.

Tabla 4.2- Tabla de corrientes con las especificaciones de las corrientes más importantes del caso base (módulos de pretratamiento e hidrólisis y fermentación).

Corriente	P.CEBADA	ÁLCALI	ÁCIDO	ENZIMAS	FILTRADO	BIOEXTRUSADO	AGUA1	HIDROLIZADO	LEVADURA	FERMENTADO
T (°C)	20	20	20	50	68	50	50	50	35	35
P (bar)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Flujo (kg/h)*	100,00	75,11	356,09	137,34	156,84	489,86	168,07	657,93	0,548	658,48
Glucano (%)	30,58				0,38	4,38		1,42		0,73
Xilano (%)	20,11				0,25	2,67		1,42		1,24
Lignina (%)	12,27				0,16	2,46		1,83		1,83
Cenizas (%)	5,41				0,07	1,07		0,79		0,79
NaOH (%)		9,72			0,01	0,01		0,01		0,01
H ₃ PO ₄ (%)			4,94		2,67	1,53		1,14		1,25
Na ₃ PO ₄ (%)					0,13	1,98		1,47		1,47
Enzimas (%)				15,47		4,34		3,23		3,25
Levadura (%)									100	0,06
Agua (%)	9,80	90,28	95,06	81,53	95,97	77,58	100	82,92		82,60
Glucosa (%)				3,00	0,19	2,69		4,04		0,07
Xilosa (%)					0,19	1,47		1,73		1,99
Etanol (%)										2,40
CO ₂ (%)										2,30

* El flujo de la paja de cebada está calculado en base húmeda y los flujos del resto de corrientes de entrada son los flujos de las disoluciones.

Tabla 4.2 (continuación). Tabla de corrientes con las especificaciones de las corrientes más importantes del caso base (módulo de separación).

Corriente	DESTILADO1	AGUA2	GAS	VINAZAS	LIGNINA	A.RESIDUAL	DESTILADO2	COLAS2	ETANOL
T (°C)	113,8	20	40,5	119,0	45	45	92	115,2	20
P (bar)	2	1	1	2	1	1	1,7	1,7	1
Flujo (kg/h)	38,50	32,62	15,73	636,86	64,36	572,50	17,10	22,77	15,73
Glucano (%)				0,75	7,09	0,04			
Xilano (%)				1,28	12,05	0,07			
Lignina (%)				1,89	17,79	0,10			
Cenizas (%)				0,82	7,68	0,05			
NaOH (%)				0,01	<0,01	0,01			
H ₃ PO ₄ (%)				1,30	0,13	1,43			
Na ₃ PO ₄ (%)				1,52	14,29	0,08			
Enzimas (%)				3,32	31,33	0,19			
Levadura (%)				0,10	0,84	<0,01			
Agua (%)	59,13	100	3,25	86,87	8,59	95,67	8,00	99,95	0,05
Glucosa (%)				0,07	<0,01	0,08			
Xilosa (%)	0,02			2,06	0,20	2,27		0,02	
Etanol (%)	40,85		0,50				92,00	0,03	99,5
CO ₂ (%)			96,25						

En la configuración de proceso propuesta, se producen 157 kg etanol anhidro/t paja de cebada, con una pureza del 99,5% (p/p), lo que es equivalente a 199 L etanol/t paja de cebada. Esta cantidad, supone una recuperación de etanol del 99,5%, lo que implica una alta eficiencia de los sistemas de separación y las recirculaciones diseñadas. En comparación con otros procesos similares simulados con Aspen Plus en la literatura, la producción de bioetanol obtenida en esta tesis está dentro del mismo rango. Por ejemplo, Wingren *et al.* (2003) plantearon dos configuraciones básicas para la producción de etanol a partir de astillas píceas pretratadas mediante explosión de vapor ácida: hidrólisis y fermentación separadas (HFS) o sacarificación y fermentación simultáneas (SFS). Las producciones de etanol que calcularon fueron 141 y 161 kg etanol/t biomasa húmeda, respectivamente. Un artículo posterior de los mismos autores (Wingren *et al.*, 2008) evaluaba diferentes configuraciones para el tratamiento de las vinazas de una planta de producción de bioetanol similar a la anterior, con un proceso SFS y una producción de 147 kg etanol/t biomasa. Por otro lado, Cardona y Sánchez (2006) obtuvieron una producción de 127 L etanol/t biomasa, en la simulación de una planta de producción de bioetanol, empleando astillas de madera dura como materia prima y un pretratamiento con ácido diluido. En esta discusión del presente trabajo y las siguientes, todos los rendimientos de producción de etanol están expresados por unidad de masa de biomasa húmeda. Sin embargo, Wingren *et al.* (2003, 2008) y Cardona y Sánchez (2006) expresan sus resultados originalmente en base húmeda, por lo que se transformaron a base seca para poder establecer comparaciones entre éstos y los del presente estudio. Calculados en base seca, los resultados de estos autores son mucho mayores, ya que el contenido en humedad de las astillas de píceas es un 50%; sin embargo, resulta un planteamiento más realista desde un punto de vista industrial considerar las producciones de etanol en función de la biomasa tal y como entra al proceso.

En cuanto al aprovechamiento de las materias primas hay que señalar que en las vinazas quedan un 16,6% de glucano y un 40,6% de xilano sin reaccionar. Además, hay que tener en cuenta que en el caso base la xilosa no se fermenta, por lo que es una corriente que se desecha. Por otra parte, en la reacción de neutralización planteada ($3\text{NaOH} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Na}_3\text{PO}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$), hay un exceso de ácido fosfórico, ya que tan sólo reacciona con el hidróxido de sodio el 34% del ácido añadido. Una parte del H_3PO_4 restante se emplea para llevar el pH del sustrato hasta 5 (valor adecuado para la HE), mientras que otra parte probablemente está reaccionando con algún compuesto de la biomasa, en una reacción que no se tiene en cuenta en esta simulación, como son las cenizas, cuyo contenido es relativamente alto en estas biomásas de tipo herbáceo.

Durante el proceso se producen además varias corrientes de salida, así, una de las salidas es la corriente gaseosa lavada que se origina a partir de los vapores de la primera destilación (GAS). Esta corriente contiene principalmente CO_2 , un pequeño porcentaje de agua y trazas de etanol, que suponen un 0,4% del etanol que entra en la

columna de destilación, teniendo en cuenta la recirculación. Además de esta corriente gaseosa, se produce una corriente sólida tras la filtración de las vinazas (LIGNINA), donde se recupera el 93,3% de la lignina inicialmente contenida en la biomasa. Por último, se producen varias corrientes líquidas de desecho (FILTRADO, RESIDUAL, COLAS2). En el filtrado se producen unas pérdidas de glucosa y xilosa de 0,87 y 1,3%, respectivamente, calculadas sobre el glucano y xilano iniciales y teniendo en cuenta sólo los azúcares en forma monomérica. Además, se separa una pequeña cantidad de sales de la neutralización (2%) y una parte del exceso de ácido fosfórico (36%). La corriente FILTRADO es la segunda corriente de salida con un mayor flujo y debido a todos los compuestos que arrastra sería necesario realizar un tratamiento antes de poder verterla al medio ambiente. La corriente RESIDUAL contiene agua, restos de compuestos solubles e insolubles del proceso y entre ellos la mayor parte de los azúcares no fermentados, yendo a esta corriente el 98,8% de la xilosa y 1,4% de la glucosa producidas durante el proceso. Esta corriente es la corriente de salida con mayor flujo, ya que contiene la mayor parte del agua del proceso (76,2%) y precisaría igualmente de un tratamiento. En cuanto a las colas de la segunda columna de destilación (COLAS2), son prácticamente agua (99,95%) y no precisarían ser tratadas de una forma especial, pudiéndose incluso recircular como agua de proceso en alguna de las etapas.

Un tema importante es la cantidad de agua implicada en el proceso de producción de bioetanol lignocelulósico, que generalmente se considera alta en comparación con los procesos de conversión termo-químicos o a partir del petróleo (Humbird *et al.*, 2011). Cardona y Sánchez (2006) también inciden en la importancia del reciclaje del agua, también desde un punto de vista energético, por ejemplo reduciendo el consumo energético en la evaporación en un 34,7% respecto de la configuración sin recirculación. En el caso base estudiado se gastan 7,2 t agua/t biomasa. Esta cantidad es muy elevada en comparación con los informes publicados por Humbird *et al.* (2011), que calculó un consumo de agua de 1,4 t/t biomasa, o Aden *et al.* (2002), quienes estimaron un consumo de 1,8 t/t biomasa. Esta gran diferencia se debe a que los valores anteriores incluyen circuitos de reciclaje y recirculación del agua de proceso, con el objetivo de minimizar y optimizar el consumo de agua fresca de la red. En el caso presente, el mayor aporte de agua tiene lugar con la disolución ácida, corriente en la que entra el 47,1% del agua total, y en segundo lugar se encuentra la entrada de agua fresca para diluir, AGUA1, que supone un 23,4% del total. El tercer mayor aporte de agua al proceso tiene lugar con la solución enzimática, un 15,6%. Por lo tanto, se podría reducir el consumo de agua aumentando la concentración de la disolución de ácido fosfórico y de la disolución enzimática (con los cambios en el comportamiento de la extrusión que conllevaría) y/o incubando el bioextrusado sin diluir (alternativa que se explora más adelante). En la configuración propuesta también se podría ahorrar agua directamente recirculando la corriente COLAS2 para compensar parcialmente la corriente de AGUA2. Sin embargo, este

ahorro sería muy pequeño, suponiendo tan sólo un 4,5% del aporte total de agua al proceso. Además, se podría plantear el reciclaje de una parte de la corriente AGUA RESIDUAL como corriente de dilución a la entrada del reactor de licuefacción. Para poder simular esta recirculación se necesitaría desarrollar un modelo de la hidrólisis y la fermentación más completo en el que se evaluase la influencia de la cantidad de compuestos solubles e insolubles recirculados en los rendimientos de esta etapa, ampliación que queda fuera del alcance de este trabajo.

3. 1. 3. Análisis energético

En el proceso estudiado se utilizan los tres tipos de energía, que se emplean para proporcionar la energía mecánica en el pretratamiento (electricidad), para calentar corrientes y en los calderines de las columnas de destilación (vapor de baja presión), y para enfriar corrientes (agua de refrigeración). Partiendo de los datos disponibles, se ha llevado a cabo una evaluación a grandes rasgos del gasto energético. Para ello se han considerado los datos de energía mecánica específica (SME =254 Wh/kg biomasa) que proporcionó el equipo de extrusión HT53 de la planta Agromat, así como los consumos de vapor y agua de refrigeración que calcula el programa Aspen Energy Analyzer. Los consumos energéticos debido a la agitación en los reactores de licuefacción y SFS se estimaron a partir de los valores dados por Wooley *et al.* (1999), tomándose 394 W/m³ para el reactor de licuefacción y 60 W/m³ para el reactor de SFS. Por otro lado se consideró el aprovechamiento energético de la corriente LIGNINA y se planteó la utilización de las corrientes RESIDUAL y FILTRADO para la producción de biogás mediante digestión anaerobia. De acuerdo con las medidas realizadas, la corriente sólida LIGNINA tiene un PCI = 14,9 MJ/kg en el caso base. Para la producción de biogás se consideró una producción de metano de 0,35 m³/kg DQO y una remoción del 50% de la DQO durante el tratamiento anaerobio (Wingren *et al.*, 2008). El biogás tiene un poder calorífico de 20-24 MJ/m³ y se alimentaría directamente a una caldera para producir energía térmica y eléctrica (Prakash *et al.*, 1998). El contenido en DQO total determinado en el filtrado y en el agua residual fue, respectivamente, 73,2 y 177,4 g/L. Con todos estos datos se calculó un balance de energía del proceso que se presenta en la tabla 4.3 a continuación.

Tabla 4.3- Balance energético del caso base para la producción de etanol lignocelulósico, referido a la energía consumida y producida en el proceso, clasificada según su tipo.

Tipo de energía	Consumo de energía (MJ/L etanol)	Recuperación de energía (MJ/L etanol)
Energía mecánica	4,6	
Calentamiento	4,3	
Refrigeración	28,6	
Combustión residuo sólido		48,1
Biogás		21,6
Total	37,5	69,7

El balance de energía del proceso, calculado como la energía invertida en el proceso a la que se le resta la energía producida por el mismo, arroja un valor de saldo energético positivo de 32,2 MJ/L etanol. El balance global de energía del proceso de producción de bioetanol a partir de paja de cebada, se calcula como la energía producida durante el proceso (combustión del residuo sólido, biogás y etanol) dividida entre la energía que produciría la combustión de la paja de cebada utilizada más la energía gastada en el proceso de producción de etanol. Teniendo en cuenta que el poder calorífico inferior de la paja de cebada es 15,14 MJ/kg (Somme *et al.*, 2013) y que la combustión de etanol produce 21,2 MJ/L, el balance de energía global es 0,70. Para ser un proceso eficaz energéticamente, la recuperación de energía debería acercarse a la unidad; sin embargo, esto no debería contemplarse como un factor decisivo para la consideración de esta estrategia de proceso, ya que también debe tenerse en cuenta el balance económico. No obstante, este resultado sí refleja claramente la necesidad de mejorar la integración energética del proceso, reduciendo en lo posible el consumo de energía.

Hay que tener en cuenta que este balance energético es una primera aproximación, ya que los cálculos de consumo de energía tienen ciertas limitaciones; por ejemplo, no se incluyen las etapas de transporte y acondicionamiento de la biomasa, previas al pretratamiento, ni los consumos eléctricos de los equipos (salvo el extrusor y la agitación de los reactores). Por otra parte, habría que estudiar la factibilidad de la utilización de la corriente LIGNINA como combustible adecuado en calderas. En cuanto a la producción de energía a partir del biogás, la estimación es algo pesimista, ya que se tomó el valor de poder calorífico más bajo. Otra posibilidad de mejorar el balance energético sería producir las enzimas en la propia fábrica, tal y como explican Cardona y Sánchez (2006), ya que los flujos de agua residual y de residuos sólidos para su combustión serían mayores, lo que conduciría a un aumento de la energía generada en el proceso.

Estos autores calcularon los costes energéticos de un proceso de producción de bioetanol a partir de astillas de madera dura aplicando diferentes configuraciones de pretratamiento, fermentación o reciclaje del agua del proceso, y obtuvieron valores entre 52,5 y 40,5 MJ/L etanol. Estos valores son entre un 40 y un 8% mayores que el consumo energético del proceso estudiado en este trabajo, lo cual puede ser debido al tipo de equipos instalados en la zona de separación del etanol. La recuperación de energía en el mejor caso (consumo 40,5 MJ/L etanol) son 40,6 MJ/L etanol, de los que un 80% vienen de la combustión de la lignina y el resto de la producción de biogás y el crédito eléctrico. En el artículo de Wingren *et al.* (2003), ya mencionado en el apartado 3.1.2, estos autores calcularon un consumo de energía entre 35,6 y 41,0 MJ/L etanol, dependiendo de la configuración de la zona de hidrólisis y fermentación, SFS o HFS. Estos valores son más cercanos al calculado en el presente trabajo (37,5 MJ/L etanol) y además se trata de un proceso más parecido al caso base, ya que sólo se fermenta la glucosa. Los mismos autores (Wingren *et al.*, 2008) ampliaron el análisis energético del proceso, optando por una planta con SFS en la zona de hidrólisis y fermentación y evaluando diferentes configuraciones en la zona de separación y recuperación del etanol: evaporador normal (caso base), evaporador con 8 efectos (EV8), recompresión mecánica del vapor aplicada al evaporador (MVR) o digestión anaerobia (DA). En el caso base la demanda total de energía en forma de vapor primario fue 19 MJ/L etanol, mientras que las diferentes configuraciones lograron reducir el consumo de energía hasta 16,1 MJ/L etanol (EV8), 10,2 MJ/L etanol (MVR) y 9,8 MJ/L etanol (DA). Por lo tanto, la configuración que incluye el tratamiento de digestión anaerobia de las colas de la torre de rectificación conlleva un ahorro de energía importante respecto del uso de un evaporador, apoyando la elección de este sistema de tratamiento en el presente estudio. Los consumos energéticos calculados por Wingren *et al.* en su publicación de 2008 son mucho menores que los que publicaron en 2003 para una planta similar, pero las diferencias entre estos cálculos no se explican en el texto. A pesar de que en términos de consumo de energía por litro de etanol producido, el proceso propuesto por Wingren *et al.* (2008) (19 MJ/L etanol) es mejor que el del presente trabajo (37,5 MJ/L etanol), a la hora de calcular la recuperación de energía a partir de la materia prima, tan sólo consiguen una eficiencia energética de 0,54 en su caso base frente al 0,70 en el presente estudio. Otras referencias calculan un consumo de energía de la planta en forma de vapor de 10,0 MJ/L etanol (Aden *et al.*, 2002).

En general no existen muchas publicaciones que traten exclusivamente el análisis energético de la producción de bioetanol lignocelulósico, sino que este tema suele ir ligado a una evaluación económica y no se dan muchos detalles sobre los cálculos de los consumos y producciones de energía. Sin embargo, si bien en los trabajos más antiguos el consumo energético es similar al de la planta simulada en esta tesis, los datos más recientes encontrados en la literatura tienden a una disminución significativa de la energía consumida por la planta. En este análisis hay que señalar que

en la simulación llevada a cabo no se ha realizado una integración energética, por lo existe un margen de mejora del balance de energía.

3. 2. Evaluación de alternativas

Tal y como se explicó en la metodología, se estudiaron cuatro alternativas al caso base en las que se modificó la capacidad de la planta o las condiciones de la etapa de LSFS. Para las simulaciones de los cuatro casos se mantuvo básicamente la misma configuración del proceso, con las siguientes particularidades, mostradas en la tabla 4.4.

Tabla 4.4- Modificaciones introducidas en la simulación de los casos alternativos respecto del caso base.

Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4
<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de la capacidad de la planta hasta 100 t/h y aumento proporcional del resto de corrientes de entrada al proceso. - Conversiones de glucano (81,6%) y xilano (57,7%) y rendimiento de fermentación de glucosa igual que en el caso base. 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacidad de la planta igual que en el caso base. - Conversiones finales de glucano y xilano igual que en el caso base (81,6 y 57,7%). - Rendimiento de fermentación de glucosa: 92%. - Rendimiento de fermentación de xilosa: 85%. 	<ul style="list-style-type: none"> - Capacidad de la planta igual que en el caso base. - Supresión de la entrada de agua de dilución (consistencia del bioextrusado a la salida = 37% p/v). - Conversión final de glucano: 50,7%. - Conversión final de xilano: 52,5%. - Rendimiento de fermentación de glucosa igual que en el caso base. 	<ul style="list-style-type: none"> -Capacidad de la planta igual que en el caso base. -Supresión de la entrada de agua de dilución (consistencia del bioextrusado a la salida = 37% p/v). -Conversión final de glucano: 50,7%. -Conversión final de xilano: 52,5%. -Rendimiento de fermentación de glucosa: 92%. -Rendimiento de fermentación de xilosa: 85%. -Se incluye un venteo a la salida del fermentador.

El aumento de la concentración de sólidos en la incubación no sólo afecta al rendimiento de la hidrólisis, sino que al modificar las proporciones de agua respecto del etanol y el CO₂ producidos, alteraría el equilibrio en la primera torre de destilación. Para mantener las condiciones y características de este equipo, se decidió incluir un venteo en la corriente de fermentado, que se hace en forma de separación *flash*, enviando la corriente de vapor al lavador de gases para recuperar el etanol arrastrado. En este venteo se separa una corriente gaseosa en la que va el 58,5% del CO₂ producido y pequeñas cantidades de agua y etanol. En la figura 4.6 se muestra el diagrama de flujo de la sección de la zona de separación modificada según las directrices explicadas anteriormente.

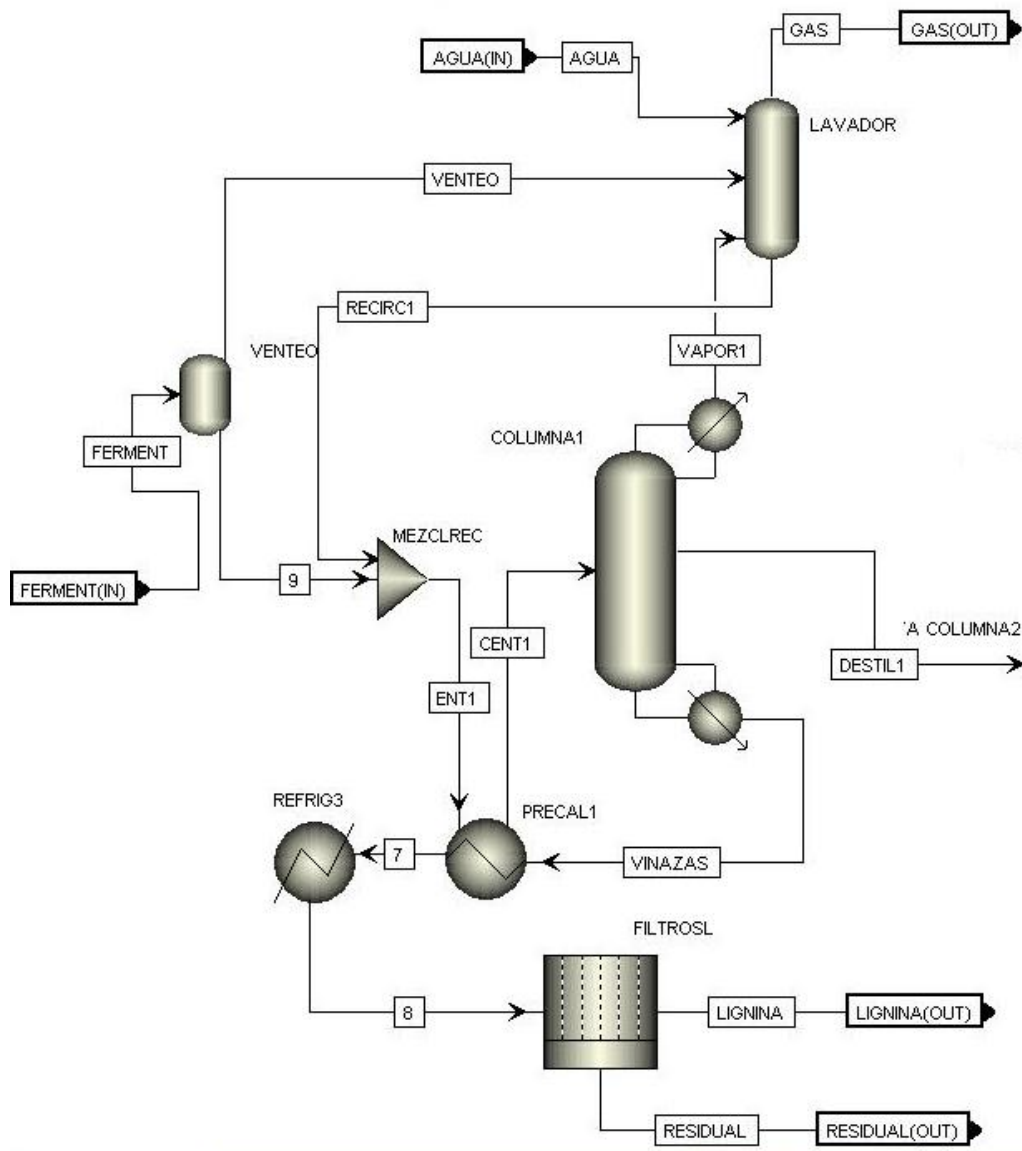


Figura 4.6- Diagrama de flujo parcial de la zona de separación para el caso 4, incluyendo venteo antes de la destilación.

Esta modificación del proceso (venteo previo a la destilación) tiene además una consecuencia sobre el consumo de agua, como se verá en los resultados de los balances de materia de los diferentes casos de estudio, presentados en la tabla 4.5. El caso 1 es particular, ya que, como se comentó anteriormente, el escalado del proceso supone un aumento proporcional de los flujos, que no afecta a los rendimientos y producciones específicas (calculados por unidad de masa de materia prima), ni al gasto energético calculado por unidad de producto. Por lo tanto, este caso no se incluye en las tablas comparativas 4.5, 4.6 y 4.7. En cambio, este caso 1, donde se aumenta la capacidad de la planta a 100 t/h, sí sería relevante para llevar a cabo una evaluación económica y/o un diseño de equipos del proceso, pero estos puntos no se encuentran dentro del objetivo de la presente tesis. La capacidad de tratamiento de materia prima de la planta de producción de bioetanol del caso 1 es del mismo orden que la de las plantas simuladas por Humbird *et al.* (2001) -83,3 t/h-, Wooley *et al.* (1999) y Cardona y Sánchez (2006) -160 t/h-. Comparando los resultados obtenidos en el presente estudio con los de estos autores, la producción de etanol de la planta simulada en el caso 1 (15719 kg/h de etanol), es menor que la de Cardona y Sánchez (16233 kg/h), Wooley *et al.* (28647 kg/h) y Humbird *et al.* (17357 kg/h), pero hay que tener en cuenta que todos ellos cuentan con una co-fermentación, mientras que en el caso 1 sólo se fermenta la glucosa.

Tabla 4.5- Resultados de los balances de materia para los diferentes casos de estudio alternativos planteados y comparación con el caso base.

	Unidades	Caso base	Caso 2	Caso 3	Caso 4
Producción etanol	L/h	19,92	25,67	12,89	18,22
Producción etanol	kg/t biomasa	157	203	102	144
Producción etanol	L/t biomasa	199	257	129	182
Agua consumida	t/t biomasa	7,190	6,990	4,459	8,469
Rdto. etanol sobre glucosa del proceso		0,816	0,768	0,528	0,494
Rdto. etanol sobre glucosa y xilosa del proceso		0,510	0,657	0,330	0,466

Comparando el caso base con el resto de casos planteados, la mayor producción de etanol se da en el caso 2, ya que se conseguiría fermentar la mayor parte de la xilosa producida, disminuyendo sólo ligeramente la fermentación de la glucosa. Esto es así porque el rendimiento de fermentación de glucosa de *S. cerevisiae* es mayor que el de *Z. mobilis*. El aumento de la proporción de etanol en el fermentado lleva a una destilación más eficiente, de forma que en la corriente de cabezas de la columna 1 de destilación sale menos etanol y es necesario añadir menos agua en el lavador de gases para su recuperación (un 61% menos). Debido a esto, el consumo específico de agua es algo menor en el caso 2 que en el caso base. Hay que señalar también, que pese a que el rendimiento global del proceso aumenta gracias a la fermentación de la xilosa hasta

casi un 66%, todavía queda casi un 41% de xilano no hidrolizado en las vinazas, lo que disminuye la eficacia del proceso (esta cifra corresponde, en parte, a xilooligómeros no simulados en el proceso). Tal y como se explicó en el capítulo de bioextrusión, el empleo de un cóctel enzimático específicamente diseñado podría conseguir hidrolizar esta fracción de xilooligómeros, lo cual podría influir positivamente en la hidrólisis enzimática no sólo del xilano, sino también del glucano, obteniéndose así una mejora significativa del proceso. La necesidad de mejora de la hidrólisis enzimática de los oligómeros de xilosa (y también de glucosa) a altas cargas de sólidos es un problema común a todas las configuraciones estudiadas, que se acentúa en los casos 3 y 4, cuando la concentración de sólidos en el medio, y por lo tanto la formación de azúcares en forma oligomérica, es aún mayor.

Así, al aumentar la carga de sólidos en la etapa de LSFS hasta un 37% (p/v) la digestibilidad enzimática se ve muy afectada, tal y como se ve en los casos 3 y 4, obteniéndose rendimientos de producción de etanol por debajo de los del caso base. Cuando sólo se fermenta la glucosa (caso 3), esta producción de etanol disminuye hasta 102 kg etanol/t biomasa. Si se fermenta también la xilosa, el rendimiento global del proceso mejora y se obtienen 144 kg etanol/t biomasa, un valor más cercano a los 155 kg etanol/t biomasa del caso base. La ventaja esperada de estos dos casos es un ahorro de la cantidad de agua consumida, así como un ahorro energético debido a la menor cantidad de agua en las destilaciones. El objetivo del ahorro de agua sí se cumple en el caso 3, donde la cantidad de agua consumida en el proceso es un 38% menor respecto del caso base. Sin embargo, como se comentó anteriormente, en el caso 4 fue necesario introducir un venteo para separar una parte del vapor en la corriente de fermentado; este vapor se condujo al lavador de gases junto con el vapor¹ de la columna¹ de destilación, aumentando la cantidad de agua necesaria para conseguir la eficacia de recuperación de etanol deseada (99%). El resultado de esto es un aumento de la cantidad de agua total consumida en el proceso en un 17,8% cuando se co-fermentan los C5 y C6 a altas cargas de sólidos.

En una gran parte de los procesos de producción de etanol lignocelulósico descritos en la literatura, incluyendo los estudios de referencia elaborados por el NREL (Wooley *et al.*, 1999; McAloon *et al.*, 2000; Humbird *et al.*, 2011) se incluye un proceso de co-fermentación de glucosa y xilosa mediante el microorganismo *Z. mobilis*. Las producciones de etanol encontradas en estos trabajos son comparables a las del caso 2. La producción de etanol en las publicaciones del NREL varían al alza a lo largo de los años debido a mejoras introducidas en el proceso, desde 227 L etanol/t biomasa en 1999, pasando por 243 L etanol/t biomasa en el año 2000, hasta 264 L etanol/t biomasa en 2011. El valor de producción de etanol obtenido en el caso 2 del presente estudio, 257 L etanol/t biomasa, estaría entre los dos últimos datos. Todos estos estudios del NREL sobre el diseño y balance económico de un proceso de conversión bioquímica de biomasa lignocelulósica a etanol se basan en el bagazo de maíz como

materia prima y cuentan con un pretratamiento con ácido diluido y un proceso de sacarificación de glucosa más fermentación simultánea de glucosa y xilosa. En otro estudio llevado a cabo por Quintero y Cardona (2011) a partir de cascarilla de arroz pretratada mediante una hidrólisis en dos fases (primero una hidrólisis con ácido diluido o una autohidrólisis de las pentosas, seguida por una segunda hidrólisis con ácido concentrado sobre la celulosa), se obtuvieron unas producciones de etanol mayores que las halladas en el presente trabajo, entre 286 L etanol/t biomasa cuando emplearon un proceso de reacción con agua caliente en la primera hidrólisis, y 319 L etanol/t biomasa, en el caso de llevar a cabo la primera hidrólisis con ácido diluido. Esta producción fue más elevada cuando además introdujeron una etapa de concentración antes de la destoxificación y fermentación de las corrientes de azúcares. Especialmente interesante es el estudio llevado a cabo por Yoo (2011), en el que compara los costes de dos plantas de producción de etanol a partir de vainas de soja: una con un pretratamiento de extrusión y la otra con un pretratamiento mediante ácido diluido. Los valores de producción de etanol que usa en sus cálculos son 312 L etanol/t biomasa en la ruta con pretratamiento de extrusión y 252 L etanol/t biomasa en la configuración con pretratamiento ácido. Estos valores tan elevados para la configuración con el pretratamiento de extrusión se deben al alto rendimiento que Yoo obtuvo en los ensayos realizados, aproximadamente un 95% de conversión del glucano inicial en las vainas de soja. Esta elevada digestibilidad enzimática, empleando además un pretratamiento de extrusión sólo con agua, indicaría que las vainas de soja son un material altamente adecuado para su pretratamiento en extrusor; sin embargo, en la propia tesis doctoral de Yoo se cita un trabajo de Karuppuchamy y Muthukumarappan (2009), donde el rendimiento de conversión de glucano a glucosa por HE de vainas de soja extrusadas es bastante menor, un 62,5%. Por lo tanto, los resultados de Yoo (2011) deben ser tomados con precaución. Por último, Quintero *et al.* (2013) evaluaron la producción de bioetanol a partir de diferentes materiales como tallos de café, cascarilla de arroz, residuos vegetales de la producción de aceite de palma y bagazo de caña de azúcar. Las producciones de etanol calculadas variaron mucho entre las diferentes materias primas, dependiendo sobre todo de la humedad de los materiales. Así, obtuvieron valores de producción de 75 L etanol/t bagazo de caña de azúcar, 101 L etanol/t residuo de palma, 225 L etanol/t cascarilla de arroz y 293 L etanol/t tallos de café. Los valores de producción de etanol obtenidos en el presente trabajo se comparan muy favorablemente con los del etanol a partir de caña de azúcar y de residuo de palma de los artículos mencionados anteriormente, en cualquiera de los 4 casos planteados, incluso si no se incluye la fermentación de las pentosas, como ocurre en el caso base y el caso 3. Por todo lo anterior se puede concluir que la producción de etanol del proceso estudiado (y particularmente la del caso 2) está dentro del rango de las calculadas en la literatura científica para otros materiales en plantas en las que se usan diferentes pretratamientos. Sin embargo, este proceso tiene un gran potencial de mejora, principalmente debido a la elevada cantidad de oligómeros de glucosa y xilosa

que se producen durante la LSFS y que podrían ser hidrolizados empleando un cóctel enzimático adecuado, mejorando los rendimientos globales de producción de azúcares y etanol.

3. 2. 1. Balance de energía

En cuanto a la energía consumida en el proceso, en la tabla 4.6 se muestra un desglose por zonas del gasto energético en MJ/h del caso base y los casos alternativos 2, 3 y 4.

Tabla 4.6- Desglose del consumo energético por etapas y conceptos de los casos 2, 3 y 4 y comparación con el caso base.

Energía consumida (MJ/h)		Caso base	Caso 2	Caso 3	Caso 4
Pretratamiento	Calentamiento	15,65	15,65	15,65	15,65
	Refrigeración	160,82	160,82	160,82	160,82
	Energía mecánica	91,44	91,44	91,44	91,44
	Total etapa	268,11	268,11	268,11	268,11
LSFS	Reactor de licuefacción	73,64	73,64	67,10	67,10
	Reactor de SFS	68,57	82,96	43,19	34,47
	Total etapa	142,21	156,60	110,29	101,57
Separación	Columna 1	65,57	67,73	38,40	61,40
	Columna 2	69,16	82,31	41,36	60,27
	Refrigeración productos	82,56	79,95	44,19	105,40
	Total etapa	217,30	229,99	123,95	227,08
Total del proceso		627,62	654,70	502,35	596,76

Tal y como se observa en la tabla 4.6, los consumos energéticos totales varían desde 502 MJ/h hasta 654,70 MJ/h. El mayor consumo de energía corresponde al caso 2, con un aumento del 4,3% del gasto sobre el caso base. Este pequeño aumento se debe, por un lado, a los mayores requerimientos de agua de refrigeración en el reactor de SFS, debido a la mayor producción de etanol (proceso exotérmico), gracias a la co-fermentación de glucosa y xilosa. Por otro lado, esta mayor producción de etanol hace que el gasto energético en la columna 2 de destilación sea mayor, ya que el flujo a tratar es mayor que en el caso base. En el extremo contrario se situaría el caso 3, donde se produce un ahorro energético de un 20% respecto de la energía consumida en el caso base. El ahorro proviene de la mayor carga de sólidos del bioextrusado, lo que implica una menor cantidad de agua en la LSFS y la separación, y de una menor producción de etanol, lo que hace que la corriente de destilado 1 sea menor y con ella, el flujo energético necesario para la destilación.

Desglosando los resultados por etapas y equipos o cargas energéticas dentro de éstas, se comprueba que el pretratamiento es en todos los casos la etapa con un mayor consumo energético, 268 MJ/h. Este valor supone más del 40% del gasto energético total en todos los casos, llegando a corresponder hasta un 53% del gasto total en el caso 3. Dentro del pretratamiento, la refrigeración para el mantenimiento de la temperatura de operación es el concepto que más energía consume, seguido por la energía mecánica necesaria para accionar el motor. No obstante, el modelado del extrusor como reactores independientes con cambios de calor entre etapas no se ajusta por completo al sistema real de calentamiento y refrigeración, por lo que estos datos podrían estar sobreestimados.

En comparación con el pretratamiento por explosión de vapor con SO₂ que proponen Wingren *et al.* (2008), cuyo consumo energético es 7,2 MJ/L etanol, el gasto energético del pretratamiento es casi el doble en el presente caso (13,5 MJ/L etanol). Sin embargo, la contribución de esta etapa respecto del consumo total de energía es parecida en ambos casos, siendo superior al 40% en el caso base de esta tesis, comparado con el 38% que estiman Wingren *et al.* (2008). Por otro lado, Cardona y Sánchez (2006) atribuyen al pretratamiento de explosión de vapor ácida más la hidrólisis y fermentación de los azúcares un consumo de 4,2 MJ/L etanol, lo que supone aproximadamente un 10% del gasto total. A la vista de estos datos, el pretratamiento de extrusión tiene un consumo energético más elevado que los pretratamientos hidro-térmicos descritos en la bibliografía. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la energía mecánica es un dato experimental que cambiaría en función del tamaño del equipo y el flujo de biomasa empleado, por lo que el consumo energético podría reducirse sensiblemente dependiendo de las condiciones utilizadas.

La etapa de LSFS es la que tiene un menor gasto energético en todo el proceso. En los casos 3 y 4 el consumo de energía es menor que en el caso base debido a la mayor carga de sólidos empleada en las incubaciones, ya que al contener menos agua, los flujos de energía necesarios para mantener las temperaturas óptimas de operación son menores. Este efecto se extiende a la etapa de separación en el caso 3, cuyo gasto energético es mucho menor (un 43% menos) que el de el caso base. En cambio, en el caso 4 no hay un ahorro energético en esta etapa, al contrario, aumenta el consumo de energía casi un 5% respecto del caso base, debido a la mayor cantidad de agua que entra al proceso en el lavador de gases. La destilación consume alrededor de 6 – 6,5 MJ/L etanol en todos los casos, valor similar a los calculados por Wingren *et al.* (2008), 7,2 a 5,5 MJ/L etanol, y Humbrid *et al.* (2011), 6,05 MJ/L etanol. Cardona y Sánchez, en cambio, estimaron un consumo de energía de 27,4 MJ/L etanol sumando la energía de la destilación más la de una etapa de deshidratación.

Tal y como se hizo anteriormente para el caso base, se calcularon los consumos y producciones energéticas de todos los casos de estudio, referidos a la producción de etanol, así como el balance de energía respecto de la materia prima (Tabla 4.7).

Tabla 4.7- Balance energético de los diferentes casos de estudio, referido a la energía consumida (valores negativos) y producida (valores positivos) en el proceso, clasificada según su tipo. Valores de recuperación de energía considerando el aporte energético de la biomasa.

Tipo de energía	Caso base	Caso 2	Caso 3	Caso 4
Consumo de energía				
Energía mecánica (MJ/L etanol)	-4,6	-3,6	-7,1	-5,1
Calentamiento (MJ/L etanol)	-4,3	-3,6	-6,5	-4,7
Refrigeración (MJ/L etanol)	-28,6	-23,4	-35,1	-29,8
Recuperación de energía				
Combustión residuo sólido (MJ/L etanol)	48,1	37,2	96,4	70,7
Biogás (MJ/L etanol)	21,6	15,2	19,0	26,8
Total proceso (MJ/L etanol)	32,2	21,8	64,9	57,9
Recuperación energía sobre materia prima (eficiencia energética)	0,70	0,73	0,73	0,95

Si se analiza el saldo energético total del proceso, en todos los casos el valor es positivo, indicando que la producción de energía a partir de las corrientes residuales es capaz de compensar la energía gastada en el proceso y además generar un exceso de energía que estaría disponible para su venta. Respecto del valor de referencia del caso base, la energía total por litro de etanol generada en el proceso es menor en el caso 2 y mayor en los casos 3 y 4. Esto es debido a que en los casos 3 y 4 queda una mayor cantidad de carbohidratos (glucano y xilano) en el residuo sólido, lo que hace que esta corriente tenga no sólo un mayor flujo, sino también un mayor valor energético. En el caso 4 se consume una mayor cantidad de agua en el proceso, por lo que el flujo de agua residual es mayor, produciéndose una mayor cantidad de biogás.

Si se compara la energía recuperada en el proceso con la que contiene inicialmente la biomasa, todas las alternativas planteadas mejoran respecto del caso base. En el caso 2 se produce una ligera mejora desde 0,7 (caso base) hasta 0,73, lo que es debido a la mayor cantidad de etanol producido por cada kg de biomasa. En el caso 3 tiene lugar el mayor gasto energético, pero también es donde más energía se produce a partir de la combustión del residuo sólido, por lo que la recuperación final de energía es 0,73 sobre la energía de la paja de cebada. El caso que más se acerca a un proceso energéticamente eficiente es el caso 4, ya que se recupera el 95% de la

energía contenida en la paja de cebada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mejora en la eficiencia energética del proceso en los casos 3 y 4 no tiene su origen en una mayor producción de etanol, sino en la energía producida por la combustión del residuo sólido y por la digestión anaerobia del agua de desecho. Este hecho no sería asumible desde el punto de vista de una utilización eficiente de carbohidratos contenidos en la biomasa, que al no hidrolizarse correctamente forman parte del residuo sólido.

4. Conclusiones

En este capítulo se calcularon los balances de materia y energía del proceso de producción de bioetanol a partir de paja de cebada mediante bioextrusión y LSFS del bioextrusado, en un caso base y cuatro escenarios alternativos que implican diferentes modificaciones del caso base.

El caso base estudiado comprende un proceso de pretratamiento mediante extrusión alcalina más bioextrusión, seguida por una etapa de licuefacción al 20% (p/v) de carga de sólidos, tras la cual se inocula el medio con *S. cerevisiae* y se produce la fermentación de la glucosa. En la zona de separación y recuperación del bioetanol se recurre a un tren de destilación donde se llega a una concentración de etanol del 92% (p/p), seguido por una deshidratación del etanol mediante tamices moleculares, donde se llega a una pureza del 99,5% (p/p). Las corrientes de desecho producidas se separan en líquidos, que son tratados mediante digestión anaerobia y sólidos, que se queman en caldera para producir energía. En esta configuración se producen 199 L etanol/t biomasa y se consumen 7,2 t de agua/t biomasa. El consumo de energía fue de 37,5 MJ/L etanol, recuperándose 69,7 MJ/L etanol a partir de la combustión de lignina y biogás producido. En conjunto, la eficiencia energética del proceso es de 0,70. La producción de etanol está dentro del intervalo de valores encontrados en la literatura para procesos con fermentación exclusiva de la glucosa; sin embargo el consumo de agua es elevado y debería plantearse un sistema de recirculación y reducción del agua empleada en el proceso. El consumo de energía es mayor que el calculado en los estudios más recientes, por lo que sería necesario diseñar un sistema de integración energética que permitiese reducir este valor. La eficiencia energética del proceso es buena dentro de los valores encontrados dentro de la literatura; sin embargo, depende en gran medida de la cantidad de energía recuperada en las corrientes de desecho.

A continuación se evaluaron las alternativas al caso base en las que, en lugar de fermentar únicamente la glucosa, se consideró una co-fermentación de los C5 y C6 (caso 2), se aumentó la carga de sólidos en la incubación hasta un 37% p/v (caso 3), o se consideraron ambas alternativas a la vez (caso 4). Con estas modificaciones se consiguió, alternativamente, mejorar la producción de etanol, llegando hasta 257 L

etanol/t biomasa (caso 2), reducir el consumo de agua hasta 4,5 t agua /t biomasa (caso 3) o incrementar la eficiencia energética hasta 0,95 (caso 4). La producción máxima de etanol está dentro del rango de las descritas en la bibliografía en procesos de co-fermentación. No obstante, los aumentos en la eficiencia energética del proceso realizado al 37% p/v de carga de sólidos (casos 3 y 4), no resultan interesantes, ya que se producen a costa de una pérdida importante en el rendimiento global de producción de etanol, compensada por la energía producida a partir de la combustión y digestión anaerobia de los residuos.

En conclusión, parte de los resultados de la simulación del proceso de producción de etanol lignocelulósico estudiado son prometedores; sin embargo, al analizar el balance energético se hace evidente que es necesario implementar diferentes mejoras en el proceso y en la simulación para determinar su potencial real. En cuanto al proceso, uno de los cuellos de botella detectados es el bajo rendimiento de la hidrólisis enzimática, cuando se emplean altas cargas de sólidos. Como ya se comentó en el capítulo anterior, sería necesario el desarrollo de una mezcla enzimática específica que permitiese hidrolizar los oligómeros producidos, aumentando así la producción de azúcares monoméricos en esta etapa. Por otra parte, es evidente que para que el proceso sea viable es imprescindible incorporar una co-fermentación, que aproveche el potencial de producción de etanol a partir de las pentosas, descartando las alternativas que no la tengan en cuenta. Otro punto débil del proceso es su gran consumo de agua y de energía, sobre todo en el pretratamiento. Para mejorar estos aspectos habría que realizar más ensayos que optimizaran estos valores (experimentos a una mayor relación sólido-líquido en el extrusor).

Por otra parte, se hace necesario plantear nuevas configuraciones de proceso en las que se lleve a cabo una integración energética completa y diseñar un circuito de reciclaje del agua de proceso para minimizar su consumo. A nivel de simulación es importante intentar subsanar las limitaciones detectadas para aumentar la precisión del modelo. A este respecto, es importante recabar más datos experimentales para completar el BE, así como introducir los circuitos de servicios auxiliares en la simulación. Idealmente, además, se deberían desarrollar e implementar modelos propios de BM y BE para las etapas de pretratamiento y LSFS.

5. Bibliografía

Aden, A.; Ruth, M.; Ibsen, K.; Jechura, J.; Neeves, K.; Sheehan, J.; Wallace, B.; Slayton, A., y Lukas, J. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute-acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. *National Renewable Energy Laboratory: Golden (CO, USA)*. 2002. Technical report No. NREL/TP-510-32438.

Cardona, C. A., y Sánchez, O. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*. 2007, núm. 98, p. 2415-2457.

Galbe, M.; Sassner, P.; Wingren, A., y Zacchi, G. Process engineering economics of bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2007, núm. 108, p. 303-327.

Humbird, H.; Davis, R.; Tao, L.; Kinchin, C.; Hsu, D.; Aden, A.; Schoen, P.; Lukas, J.; Olthof, B.; Worley, M.; Sexton, D., y Dudgeon, D. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *National Renewable Energy Laboratory: Golden (CO, USA)*. 2011. Technical report No. NREL/TP-5100-47764.

Karuppuchamy, V., y Muthukumarappan, K. Extrusion pretreatment and enzymatic hydrolysis of soybean hulls. *ASABE: St. Joseph (MI, USA)* 2009. ASABE Paper No. BIO-097989.

Martínez, V. H.; Alonso, P. A.; López, J.; Salado, M., y Rocha, J.A. *Simulación de procesos en Ingeniería Química*. Primera Edición ed. México: 2000. ISBN 9688567558.

McAloon, A.; Taylor, F.; Yee, W, Ibsen, K., y Wooley. Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks. *National Renewable Energy Laboratory: Golden (CO, USA)*. 2000. Technical report No. NREL/TP-580-28893.

ProSim. *ProSimPlus application example: Bioethanol production plant*. 2009. [Consulta: 09/01/2015] Disponible on-line en: http://www.prosim.net/fr/ressources-prosimplus_25-30.php

Quintero, J.A., y Cardona, C.A. Process simulation of fuel ethanol production from lignocellulosics using Aspen Plus. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2011, núm. 50, p. 6205-6212.

Quintero, J.A.; Moncada, J., y Cardona, C.A. Techno-economic analysis of bioethanol production from lignocellulosic residues in Colombia: A process simulation approach. *Bioresource Technology*. 2013, núm. 137, p. 300-304.

Sánchez, O.J., y Cardona, C.A. Conceptual design of cost-effective and environmentally friendly configurations for fuel ethanol production from sugarcane by knowledge-based process synthesis. *Bioresource Technology*. 2012, núm. 104, p. 305-314.

Sommer, S.G.; Christensen, M.L.; Schimdt, T., y Jensen, L. S. (editors). *Animal Manure Recycling: Treatment and Management*. United Kingdom: John Wiley & Sons, 2013. ISBN 9781118488539.

Yoo, Juhyun. Technical and economical assessment of thermo-mechanical extrusion pretreatment for cellulosic ethanol production. Tesis doctoral. Universidad del Estado de Kansas, Departamento de Ciencias e Industria del Grano del Colegio de Agricultura. Manhattan, Kansas, 2011.

Wooley, R., y Putsche, V. Development of an ASPEN PLUS physical property database for biofuels components. *National Renewable Energy Laboratory*: Golden (CO, USA). 1996. Technical report No. NREL/TP-425-20865.

Wooley, R.; Ruth, M.; Seehan, J.; Ibsen, K.; Majdeski, H., Galvez, A. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current acid prehydrolysis and acid hydrolysis current and futuristic scenarios. *National Renewable Energy Laboratory*: Golden (CO, USA). 1999. Technical report No. NREL/TP-580-26157.

CONCLUSIONES

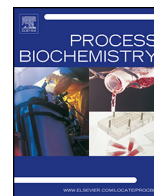
El estudio de un pretratamiento de la paja de cebada por extrusión alcalina combinada con bioextrusión planteado en el presente trabajo, permite extraer las siguientes conclusiones:

1. En general, el pretratamiento de extrusión alcalina es un método efectivo para alterar la estructura de la biomasa de paja de cebada y promover así la producción de azúcares fermentables en el material extrusado, mediante la utilización de enzimas comerciales.
2. La extrusión alcalina en condiciones moderadas de álcali y temperatura produce una desacetilación y solubilización parcial de las hemicelulosas, así como una cierta deslignificación de la paja de cebada. El pretratamiento permite alcanzar unas elevadas recuperaciones de sólidos y de azúcares en el extrusado, obteniéndose un material que contiene la mayor parte de los azúcares de la materia prima, tanto C6 como C5.
3. La configuración de extrusión alcalina con lavado fuera del extrusor (configuración básica) permite obtener un sustrato concentrado en carbohidratos, con una elevada digestibilidad enzimática. En esta configuración el parámetro R [en el intervalo 2,5 -7,5% (p/p)] afecta significativamente a la producción de azúcares, de manera que a mayor valor de R, la digestibilidad enzimática aumenta.
4. La integración de una etapa de neutralización dentro del extrusor permite obtener un material apto para su incubación con enzimas sin necesidad de acondicionamiento previo, evitando la etapa de lavado, disminuyendo las operaciones corrientes abajo, y avanzando en la integración del proceso. Esta configuración se ha demostrado escalable a nivel de planta piloto de capacidad máxima 100 kg/h, si bien se producen ciertos cambios en el balance de materia del proceso.
5. En la configuración con neutralización integrada, es necesaria la introducción de una etapa de filtración dentro del extrusor, que mejora significativamente la digestibilidad enzimática de los extrusados obtenidos, en comparación con la de los extrusados a los que no se ha aplicado filtración. En esta configuración el parámetro R no resultó significativo en el rango ensayado [6–10% (p/p)].
6. La extrusión con enzimas de la paja de cebada previamente sometida a extrusión alcalina (bioextrusión) es un proceso altamente integrado que produce un material con unas características propias y distintivas respecto de los extrusados alcalinos lavados o neutralizados.

7. A nivel físico, la bioextrusión produce una reducción del tamaño de partícula, así como el aumento de la fracción soluble, debido a la solubilización de parte del glucano y el xilano durante el tratamiento.
8. El pretratamiento de bioextrusión favorece la producción de oligómeros de glucosa y xilosa en todas las condiciones ensayadas, lo que resulta en una reducción del rendimiento en monómeros en los bioextrusados en comparación con el material extrusado alcalino. Para la hidrólisis de estos materiales sería necesario estudiar la utilización de mezclas enzimáticas específicamente diseñadas para los mismos, que permitan la hidrólisis de las formas oligoméricas, mejorando así la producción de azúcares monoméricos.
9. El bioextrusado es un sustrato adecuado para su utilización en un proceso de licuefacción y sacarificación y fermentación simultáneas (LSFS), si bien es necesario reducir la proporción de sólidos del mismo (23% p/p) para mejorar los rendimientos de producción de etanol. En ensayos realizados al 20% (p/v) de carga de sólidos, se alcanzan concentraciones de 30 g/L de etanol en el medio, siendo el rendimiento de LSFS un 75% del teórico.
10. Los estudios del balance de materia y energía llevados a cabo mediante *software* de simulación dieron como resultado una producción de etanol de 199 L/t biomasa y una eficiencia energética del 70%. Estos resultados permiten concluir que es imprescindible introducir una co-fermentación, que aproveche el potencial del material pretratado en cuanto a producción de pentosas, para mejorar tanto la producción de etanol, como la eficiencia energética del proceso.
11. Aunque desde el punto de vista de los balances másicos del proceso éste es equiparable a otros procesos descritos en la bibliografía, son necesarias mejoras en cuanto al consumo de agua y energía para mejorar su viabilidad energética y potencialidad de aplicación.

ANEXOS

ANEXO I



Optimization of integrated alkaline–extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis

A. Duque*, P. Manzanares, I. Ballesteros, M.J. Negro, J.M. Oliva, F. Saez, M. Ballesteros

Biofuels Unit, Energy Department-CIEMAT, Avda. Complutense, 22, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2012
 Received in revised form 4 March 2013
 Accepted 10 March 2013
 Available online 27 March 2013

Keywords:

Lignocellulose
 Experimental design
 Extrusion
 Enzymatic hydrolysis
 Alkaline treatment

ABSTRACT

In this work, an integrated one-step alkaline–extrusion process was tested as pretreatment for sugar production from barley straw (BS) biomass. The influence of extrusion temperature (T) and the ratio NaOH/BS dry matter (w/w) (R) into the extruder on pretreatment effectiveness was investigated in a twin-screw extruder at bench scale. A 2^3 factorial design of experiments was used to analyze the effect of process conditions [T : 50–100 °C; R : 2.5–7.5% (w/w)] on composition and enzymatic digestibility of pretreated substrate (extrudate). The optimum conditions for a maximum glucan to glucose conversion were determined to be $R=6\%$ and $T=68\text{ °C}$. At these conditions, glucan yield reached close to 90% of the theoretical, while xylan conversion was 71% of theoretical. These values are 5 and 9 times higher than that of the untreated material, which supports the great potential of this one-step combined pre-treatment technology for sugar production from lignocellulosic substrates. The absence of sugar degradation products is a relevant advantage over other traditional methods for a biomass to ethanol production process since inhibitory effect of such product on sugar fermentation would be prevented.

© 2013 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The increasing global energy demand, which relies mostly upon the dependence on fossil fuels and a raising concern about the greenhouse gases emissions have lead to a search for new and sustainable energy sources. In this context, biofuels represent a solid alternative to conventional fossil fuels. Within this field, ethanol produced from lignocellulosic biomass is considered a key element to boost implementation of bioethanol in the current fuel market since it avoids the most important drawback of the first generation bioethanol: its competition with food crops. However, since the structure of these materials makes them very recalcitrant to the enzymes accessibility [1], a pretreatment is needed to break down the lignin net and disrupt the crystalline structure of cellulose, increasing the surface area and porosity of the biomass fibres.

Among the several pretreatments that are being currently studied and further developed, extrusion stands out for its ability to provide high shear, rapid heat transfer, and effective and rapid mixing [2]. Other advantages of this method are the feasibility of continuous operation and its versatility to adopt different process configurations. In addition, extrusion can be run at moderate temperature, which is advantageous in comparison to other

hydrothermal pretreatments, since the formation of inhibitory byproducts as 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (hereinafter referred as furfural and HMF) can be prevented. Pretreatment of different biomasses by extrusion alone or in combination with different chemicals and additives for sugar production by enzymatic hydrolysis has been reported by several authors during the last years. The performance of extrusion and the influence of the operation parameters has been studied on switchgrass, prairie cord grass, corn stover and more recently on pine wood chips by Karunanithy and Muthukumarappan [2–6], while other researchers have focused extrusion pre-treatment on biomasses such as *Miscanthus* sp. [7], Douglas fir [8], soybean hulls [9], rice straw [10] and a combination of wheat bran and straw [11].

Lately, extrusion has been also pointed out as an interesting technique to be used together with other pretreatments, in a two-step process strategy. For example, Lee et al. [12] used extrusion as complementary step for Douglas fir after hot-compressed water treatment. Results showed sugar yields 5 times higher than without passing through the extruder and a fine fibrous morphology on a sub-micro/nanoscale. The combination of extrusion and diluted acid pretreatment has been tested on rice straw and proved to be an effective method to maximize hemicellulose hydrolysis and enhance glucan to glucose conversion by enzymes [10]. More recently, the conditions for sequential treatment of corn stover by extrusion and surfactant pretreatment has been optimized [13], aimed at increasing efficiency of hydrolysis for bioethanol production.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3466054.
 E-mail address: aleta.duque@ciemat.es (A. Duque).

On the other hand, mild alkaline pretreatment is a well-known method to enhance the enzymatic digestibility of the lignocellulosic biomass. It is generally more effective in the pretreatment of agricultural residues and herbaceous crops [14]. Biomass soaking in sodium hydroxide, potassium hydroxide, ammonia or lime, in a concentration below 2%, has been reported to cause delignification, xylan loss, decrease of cellulose crystallinity and swelling of biomass [14–16]. As a consequence, sugar production increases as reported by McIntosh and Vancov [17], who obtained 5.6-fold higher sugar yields by pretreating sorghum straw in 2% NaOH at 121 °C for 60 min.

The combination of both extrusion and alkaline pretreatment has been explored in some recent works by Lamsal et al. [18] and by Karunanithy and Muthukumarappan [4], with different results. Lamsal could not find any improvement in sugar yield by soaking wheat bran and soybean hull in a solution of sodium hydroxide, urea and thiourea (10%, w/w) and then introducing the mixture in a twin-screw extruder at 7 Hz and maximum barrel temperature of 150 °C, compared to a simple grinding of the biomass. However, the extensive washing of the pretreated substrate took away the solvents and enzymatic inhibitors, resulting in enhanced sugar yields of 60–73% and 25–36%, respectively, for wheat bran and soybean hull. On the other hand, Karunanithy and Muthukumarappan optimized the extrusion performance for prairie cord grass at 114 °C, 122 rpm, 1.70% NaOH concentration and 8 mm particle size, reaching a maximum glucose and xylose recovery of 86.8 and 84.5% respectively, after enzymatic hydrolysis. These authors claim that the low alkaline concentration used allow hydrolysing the extruded material without washing of the biomass.

In both works, the alkali soaking was a previous step to the extrusion and was done in a discontinuous way. The aim of this study is to integrate both processes in a single step to pretreat barley straw, enabling a continuous operation of the whole pretreatment, reducing the contact time between the NaOH and the substrate and possibly improving the effect of the alkali by a thoroughly mixing in the extruder. The final purpose of the present work is to optimize the operation conditions, namely the ratio NaOH/barley straw dry weight (w/w) (*R*) and extrusion temperature (*T*), in an integrated alkaline–extrusion pre-treatment by using a statistical experimental design, in order to enhance glucan and xylan digestibility by further enzymatic saccharification.

2. Materials and methods

2.1. Raw material

Barley straw (6% moisture content) was provided by Centre for the Development of Renewable Energy Sources (CEDER), (Soria, Spain). Biomass was coarsely crushed to about 5 mm particle size using a laboratory hammer mill (Retsch), homogenized and stored until used.

2.2. Extrusion pretreatment

Extrusion was performed in a twin-screw extruder (Cletral Processing Platform Evolum® 25 A110, Cletral, France), composed of 6 modules of 100 mm length each (Fig. 1). In module 5 a filtration step was set up in order to separate liquid from solid fraction (filtrate and extrudate respectively) after extrusion. The modules have a heating and cooling system that allows setting a temperature profile throughout extrusion process. The temperature set for the module is considered to be the extrusion temperature (*T*). The screws diameter is 25 mm and they were configured to produce transport, mixing and shearing effects along the process, as depicted in Fig. 1. Two metering pumps connected to the extruder are used to supply the catalyst (NaOH solution at 10%, w/v) and H₂O to the process. Biomass feeding was done through a volumetric feeder KMV KT20 (Ktron), which has a flow capacity up to 1.2 kg/h for 5 mm barley straw. The feeder screw speed rate was set to provide a continuous feed rate of 0.6 kg/h.

Operating conditions were set to achieve moderate values of *R*, between 2.5 and 7.5% (w/w), and temperature, between 50 and 100 °C. Based on preliminary experiments, a fixed motor speed of 150 rpm was used for all runs. At this condition, the residence time of the biomass inside the extruder is about 2 min.

Table 1

Experimental conditions according to 2³ factorial design used in the study of integrated alkaline–extrusion of barley straw.

Experimental design		
Run	Temperature (<i>T</i>) °C	NaOH/BS DM ratio (<i>R</i>) (% w/w)
1	50	2.5
2	50	5
3	50	7.5
4	75	2.5
5	75	5
6	75	7.5
7	100	2.5
8	100	5
9	100	7.5

After extrusion, solid extruded material was recovered and washed thoroughly with distillate water until neutral pH (hereinafter, extrudate). Filtrate was also collected and analyzed for sugar and degradation compounds, i.e. furfural and HMF.

A portion of extrudate was dried and analyzed for carbohydrates and lignin composition to evaluate changes in comparison to untreated BS. Samples were stored at 4 °C in hermetic plastic bags until use in enzymatic hydrolysis experiments.

2.3. Experimental design

In order to study the variation of extrudate composition and enzymatic digestibility against selected process variables and to determine the optimum extrusion conditions leading to a maximum enzymatic digestibility in extrudate, a 2³ factorial experimental design with two variables [ratio NaOH/barley straw dry weight (w/w), *R* and extrusion temperature, *T*] was employed. The design resulted in 9 runs (Table 1) and was developed with StatGraphics Plus 5.0 Enterprise Edition (Statistical Graphics Corporation, Princeton, NY). The order of experiments was randomized, as a way to avoid the effect of lurking variables. The levels of optimized variables were 2.5–5–7.5% for *R* and 50–75–100 °C for *T*. They were selected according to the criteria of using mild conditions and based on preliminary extrusion trials on BS.

2.4. Enzymatic hydrolysis

The extrudate was used as substrate for enzymatic hydrolysis (EH) in 0.05 M sodium citrate buffer (pH 4.8) at 50 °C and 5% (w/v) dry extrudate load. As a control, untreated barley straw was also subjected to enzymatic hydrolysis at the same conditions. Experiments were performed in 100 ml Erlenmeyer flasks on a rotary shaker (Certomat-R B-Braun, Germany) at 150 rpm. Enzymatic cocktail consisting of commercial cellulase boosted with commercial xylanase in a proportion 9:1 in protein content was added in a dosage of 10 mg protein (15 FPU of cellulase)/g dry extrudate. The supplementation with xylanase was aimed at promoting xylan hydrolysis, based on the significant xylan content of extrudates after extrusion (see below). The enzymes were kindly provided by Novozymes A/S (Denmark). After 72 h saccharification, glucose and xylose concentration in EH media was measured by HPLC as described below in analytical methods section.

The parameter used to evaluate the hydrolysis performance is the enzymatic hydrolysis yield (EHY), which is defined as the glucose/xylose released during EH divided by the potential glucose/xylose (calculated based on glucan/xylan content of the solid extrudate), and expressed as percentage.

2.5. Raw and extruded biomass characterization

National Renewable Energy Laboratory (NREL, CO) laboratory analytical procedures (LAP) for biomass analysis [19] were used to determine carbohydrates, acid-insoluble lignin, acid-soluble lignin, acetyl groups, extractives and ash content in raw material. Extrudates were analyzed for carbohydrates and acid-insoluble lignin by the same procedures.

2.6. Analytical methods

The filtrate was recovered after extrusion and analyzed for its content of monomeric and oligomeric sugars. The oligosaccharides ratio was determined as the difference in monomeric sugar concentration before and after mild acid hydrolysis (3%, v/v H₂SO₄, 120 °C and 30 min). Sugars were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in a Waters 2695 liquid chromatograph with refractive index detector, as described in Cara et al. [20]. Likewise, glucose and xylose concentration after completion of enzymatic hydrolysis tests was measured in EH media by HPLC using the same column. Furfural and HMF were analyzed by HPLC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA), using an Aminex ion exclusion HPX-87H cation-exchange column (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) at 65 °C. Mobile phase was 89% 5 mM H₂SO₄ and 11% acetonitrile at a flow rate of 0.7 mL/min. Column eluent was detected with a 1040A Photodiode-Array detector (Agilent, Waldbronn, Germany).

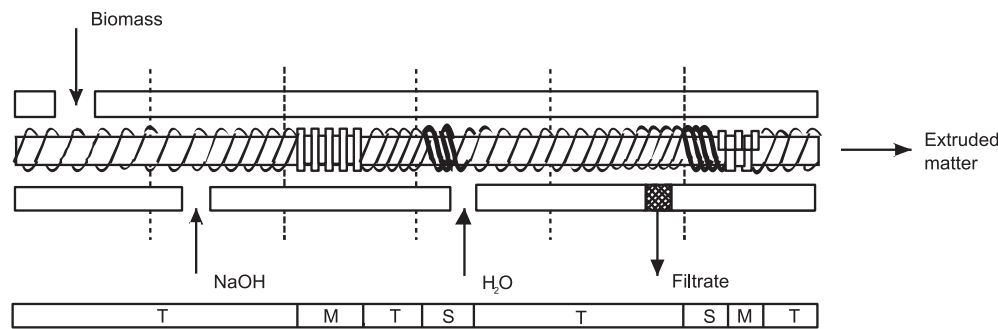


Fig. 1. Screw configuration used for barley straw extrusion in the 6-module twin-screw extruder with inlet/outlet positions. *T*: transport effect, *M*: mixing effect; *S*: shearing effect.

3. Results and discussion

3.1. Raw material composition

Table 2 presents the results of barley straw composition. The dry matter distribution shows an average value of 39.1% cellulose, 25.7% hemicellulose and 15.2% lignin, making it a very promising substrate for bioconversion to ethanol after a suitable pre-treatment based on high total carbohydrate content of 65% on dry weight basis (dwb). The degree of lignification of barley straw biomass is in the range of that reported for other agricultural residues such as wheat straw (17%) [21] or corn stover (17–19%) [22]. A significant fraction of the feedstock, about 10%, is made up of both water and ethanol soluble materials, included in the term extractives. Water extract was analyzed for sugar content and glucose was found in concentration about 2 g/l (equivalent to about 1 g/100 g dw biomass). Minor contents of other sugars were found. The high ash content of barley straw (6.8%) is consistent with the presence of silica as a major mineral component of cereal straws. In general, results are comparable to the ones reported by Linde et al. [23]; Persson et al. [24]; García-Aparicio et al. [25] and Li et al. [26] for raw barley straw.

3.2. Extrusion pretreatment

3.2.1. Effect of extrusion conditions in extrudate and filtrate composition

In order to evaluate the efficiency of extrusion as a pretreatment to fractionate barley straw biomass and so affect the enzymatic digestibility of the extruded material, changes in the composition of extrudates with respect to the raw material were measured at the different extrusion conditions. Moreover, filtrate fraction was analyzed for sugar composition and the presence of furfural and HMF. Results are shown in Table 3.

Regarding the results of biomass composition variation because of extrusion (Table 3), in general alkali concentration seems to exert

a greater effect than temperature, in the range of conditions tested. To evaluate changes in comparison to raw BS, it has been considered that extractives and ash are solubilized into the filtrate during extrusion (these components are not found in extrudate composition analysis) and that so, cellulose, hemicellulose and lignin remaining in the extrudate would be concentrated at least by a factor corresponding to the sum of extractives and ash content, which accounts for 17% of BS dry weight. So, to refer composition values shown in Table 1 to an “extractives and ash free” basis BS, they can be multiplied by a factor of 1.2 [$100/(100-17)$]. Taking into account these considerations, it can be seen that at *R* of 2.5%, extrudate composition at the three temperatures tested is similar to that expected if raw BS composition data are multiplied by the concentration factor above, i.e., 47% cellulose, 25.4% xylan and 18.2% lignin, indicating very slight or no destructure of major components in BS at these conditions.

Particularly for hemicellulose fractionation, the one-step alkaline–extrusion process, in the conditions tested in the present work, does not exert an impact in hemicellulose breakdown at *R* of 2.5 and 5% and only at 7.5% for all temperature conditions (runs 3, 6 and 9), xylan content values are below than expected if the concentration factor is considered (25.4%), indicating hemicellulose solubilization. Even when xylan solubilization occurs at the highest alkali ratio, a significant part of the xylan in raw material is remaining in extrudate after extrusion, which could be hydrolyzed in the subsequent enzymatic hydrolysis step by specific enzymes.

Sugar analysis of the prehydrolysate (Table 3) shows negligible concentrations of glucose (data not shown) and varying amounts of hemicellulose-derived sugars, mostly xylose and arabinose and in minor concentration galactose and mannose (data not shown). Increasing hemicellulose-derived sugar content is found as *R* raises, reaching concentrations up to 18 g/l at 75 °C and 7.5% *R* (Table 3). It was found that sugars measured in filtrate were mostly in oligomeric form in all *R* conditions, regardless the extrusion temperature. It is important to highlight that neither furfural nor hydroxymethyl furfural (HMF) was detected in the filtrates.

The effect of exposure to alkaline substances during the pretreatment process on hemicellulose loss is well supported in the literature in experiments at different operation conditions for alkali treatment. McIntosh and Vancov [17] obtained 18.5% of hemicellulose solubilization for sorghum straw when biomass was treated for 60 min in an autoclave at 121 °C and 0.75% NaOH. Other studies have shown the effectiveness of pretreating lignocellulosic materials with dilute alkali for xylan removal by soaking soybean or wheat straw biomass at room temperature [27,28]. However, these results are difficult to compare with the present work due to very different process conditions for alkali treatment. In the integrated one step process of the present work, the action of alkali is combined with the mixing and shearing effects of extrusion during the 2 min the residence time of the material inside the extruder at selected

Table 2

Raw barley straw composition. Mean values and standard deviation of three replicates.

Component	(% dwb)
Extractives	10.2 ± 0.9
Cellulose	39.1 ± 0.7
Hemicellulose	25.7 ± 0.3
Xylose	23.8 ± 0.2
Arabinose	3.7 ± 0.05
Galactose	1.5 ± 0.02
Acetyl groups	1.8 ± 0.01
Acid-insoluble lignin (AIL)	15.2 ± 0.01
Ash	6.8 ± 0.2

Table 3
Extrudate solid content and composition (% dry matter), EH yield based on glucose and xylose release and concentration of hemicellulosic sugars in filtrate, at different temperature and NaOH/BS (% w/w) ratios, according to design of experiments shown in Table 1 Mean values of triplicates.

Experiment	Extrudate solid content (g solid/100 g extrudate)	Extrudate composition (% w/w)			Hemicellulose sugars** in filtrate (g/l)	Enzymatic hydrolysis yield (EHY) (% of theoretical)	
		Cellulose	Xylan	ALL*		Glucose	Xylose
1	22.45	43.7 ± 0.2	26.8 ± 0.1	19.1 ± 0.1	1.4	31.2 ± 0.003	18.8 ± 0.02
2	18.80	46.5 ± 0.5	25.7 ± 0.4	15.0 ± 0.1	5.4	83.8 ± 0.4	68.8 ± 0.2
3	19.79	64.5 ± 0.1	14.5 ± 0.1	13.7 ± 0.4	8.6	82.2 ± 0.7	74.8 ± 1.8
4	26.43	52.3 ± 1.7	26.8 ± 0.7	18.2 ± 0.3	1.9	50.3 ± 0.2	45.5 ± 0.02
5	19.0	53.4 ± 1.0	26.3 ± 0.9	14.3 ± 0.2	7.4	81.7 ± 0.6	68.4 ± 0.2
6	13.85	58.3 ± 0.2	20.8 ± 0.2	12.4 ± 0.2	18.0	74.7 ± 1.7	88.2 ± 0.6
7	30.90	45.6 ± 1.5	26.1 ± 1.1	19.5 ± 0.3	0.8	35.8 ± 0.4	34.6 ± 0.2
8	15.58	51.4 ± 1.9	25.1 ± 1.0	13.2 ± 0.1	7.2	90.3 ± 0.8	64.8 ± 0.4
9	18.43	61.0 ± 0.3	15.6 ± 1.6	12.1 ± 0.3	11.7	71.0 ± 1.4	88.3 ± 0.1

* Acid-insoluble lignin.

** Sum of xylose, arabinose, galactose and mannose.

screw speed. Also working on extrusion, Jacquemin et al. [29] have reported effective hemicellulose extraction by a combined twin-screw alkali-extrusion in a mixture of wheat bran and straw, but in this work much higher values of *R* [close to 50% (w/w)] are employed.

According to our results, *R* value $\geq 5\%$ during extrusion is needed to provoke significant hemicellulose solubilization, regardless extrusion temperature. On the other hand, when the results of lignin content variation during extrusion are analyzed, ALL content is below that “concentrated” value (18.2%) at *R* of 5 and 7.5% at all temperatures tested, while only at the lower value of 2.5%, no lignin was removed. This means that mildest conditions are required to attain some lignin solubilization compared to hemicellulose, suggesting greater effectiveness of alkaline extrusion treatment on lignin component, in the conditions tested in the present work. A positive effect of alkali treatment on lignin hydrolysis and swelling of wheat straw biomass has been reported in relation to an improvement in the enzymatic digestibility of the substrate [30]. In fact, it is generally recognized that lignin is one of the main hindrances that difficult the enzyme access to the cellulose [31] and for this reason, delignification is often used as an indicator of the pretreatment effectiveness in alkaline pretreatments.

As a consequence of hemicellulose and lignin solubilization as *R* increases from 2.5% on, cellulose is concentrated in the extrudate, reaching maximum content close to 65%, w/w, which is obtained at 50 °C and *R* of 7.5%. The increase of the cellulose content in extrudate at this condition compared to untreated BS (39.1% dwb) is an important advantage of biomass pretreatment for ethanol production, since the material that is introduced in the following step of hydrolysis is cellulose-enriched in relation to the untreated material.

In order to assess the importance of the effect of *T* and *R* on the variation of extrudate composition, a response surface analysis was performed with the experimental data shown in Table 3. The graphs reveal a marked effect of *R* and, in a much lesser extent, of *T*, on cellulose, hemicellulose and lignin content, as it is shown in Figs. 2–4 (panel A), respectively. There is a clear tendency towards increasing cellulose content and decreasing hemicellulose and lignin content in extrudate, as the value of *R* levels up from 5 to 7.5%. In fact, when the significance of each effect on the global behaviour of the variable is analyzed by the Pareto charts (panel B of Figs. 2–4); only the effect of *R* is significant, at a 95.0% confidence level. The effect of temperature is not statistically significant for any of the considered responses. It means that in the range of variation of temperature tested no significant influence on extrudate composition exists, given the effect of NaOH/BS DM ratio.

Table 3 also includes values of solid content of extrudates at different conditions, which varies between about 14 and 30% dwb.

In the integrated extrusion process of this work, it depends mainly on the different inlet flows and the extrusion configuration, since no treatment is given to the raw material before. This implies that the consistency (solid content) of the extrudate at the output can be adjusted according to the process needs by varying the flows and the screw profile, always considering the effect on solids losses, which can be attributed to any carbohydrate solubilization.

3.3. Enzymatic hydrolysis

From glucan and xylan enzymatic hydrolysis yields values on extrudates produced at different extrusion conditions shown in Table 3, it can be concluded that integrated NaOH-extrusion improved enzymatic digestibility, in comparison to untreated BS (17 and 10% of theoretical for glucan and xylan, respectively, data not shown). The hydrolysis yield refers to the efficiency of enzymes to reach and hydrolyze the carbohydrates in the extrudate and is often referred as “saccharification efficiency”. It levels up as *R* increases to maximum values of 90% and 88% of theoretical for glucan and xylan conversion, respectively. This means that the enzymatic digestibility of glucan and xylan in BS can be increased in 5 and 9 times, respectively, in relation to untreated BS by the moderate integrated alkaline-extrusion process of the present work.

The increase of *R* causes a marked effect on enzymatic digestibility, regardless the temperature tested. At the lowest *R* value of 2.5%, where no significant changes in extrudate composition in relation to raw BS were found, the rise in EHY compared to untreated BS is significantly lower than obtained when *R* increases to 5% on, as a result of a higher destructure of the material at a more severe extrusion conditions. When BS is extruded at 5% *R*, a marked increase in EH yield is found at all temperatures, attaining the maximum value of 90% in the experiments at 100 °C. At this alkaline condition, lignin solubilization was found (see discussion above), which can be considered an indicator of a break of the strong cellulose-hemicellulose-lignin association resulting in enhanced enzyme accessibility. However, in experiments at 7.5% *R*, the increase of *T* to 75 and 100 °C, results in a decrease in enzymatic digestibility. The combination of more severe alkali and temperature conditions may be leading to condensation and/or repolymerization reactions in the cellulose-hemicellulose matrix, resulting in lower enzymatic hydrolysis efficiency.

On the other hand, xylan conversion yield increases in all temperatures tested as alkaline conditions become more severe, attaining values of 88% of theoretical in extrudates at 75 and 100 °C and 7.5% *R*. It means that the digestibility of xylan is greatly improved by the one-step alkaline extrusion process, which shows the positive effect of this pre-treatment to deconstruct

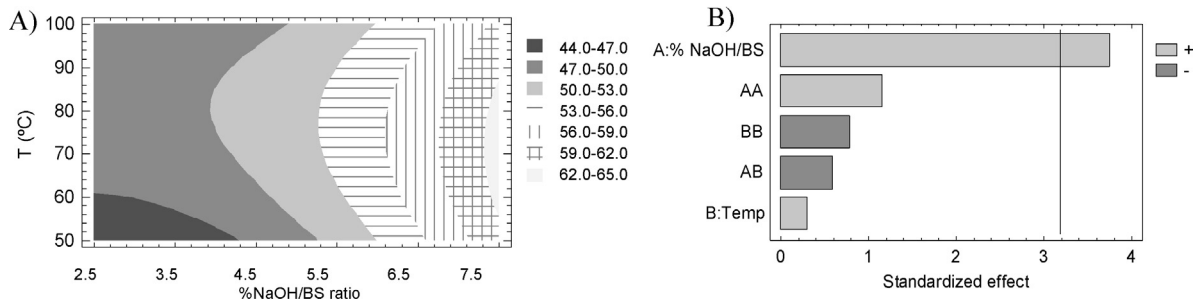


Fig. 2. Response surface graph and Pareto chart of the effect of *T* and NaOH/BS ratio on cellulose content in extrudate.

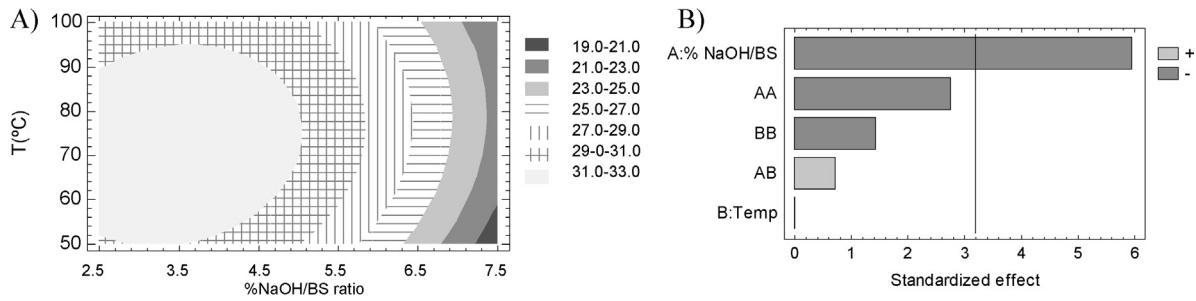


Fig. 3. Response surface graph and Pareto chart of the effect of *T* and NaOH/BS ratio on hemicellulose content in extrudate.

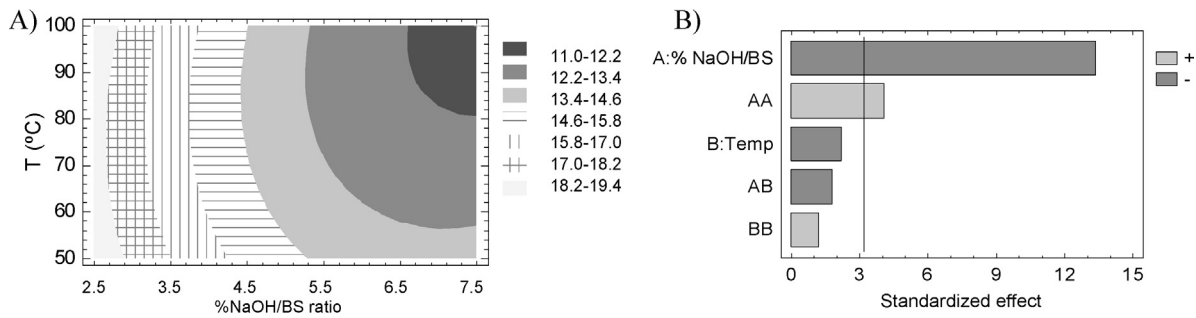


Fig. 4. Response surface graph and Pareto chart of the effect of *T* and NaOH/BS ratio on acid-insoluble lignin content in extrudate.

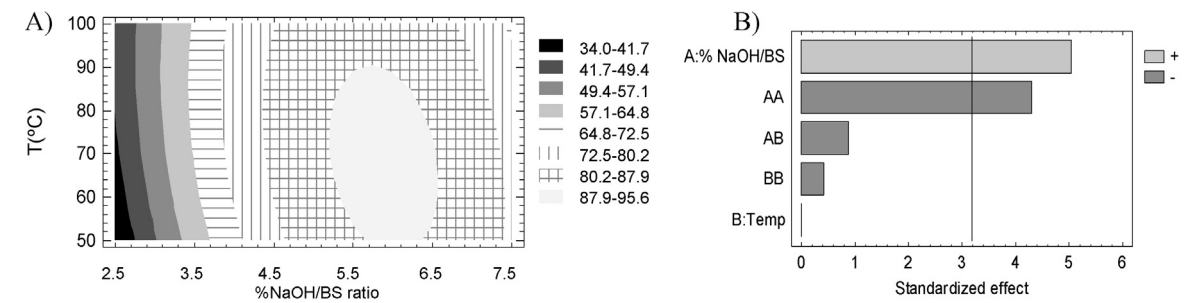


Fig. 5. Response surface graph and Pareto chart of the effect of *T* and NaOH/BS ratio on enzymatic hydrolysis yield for glucan.

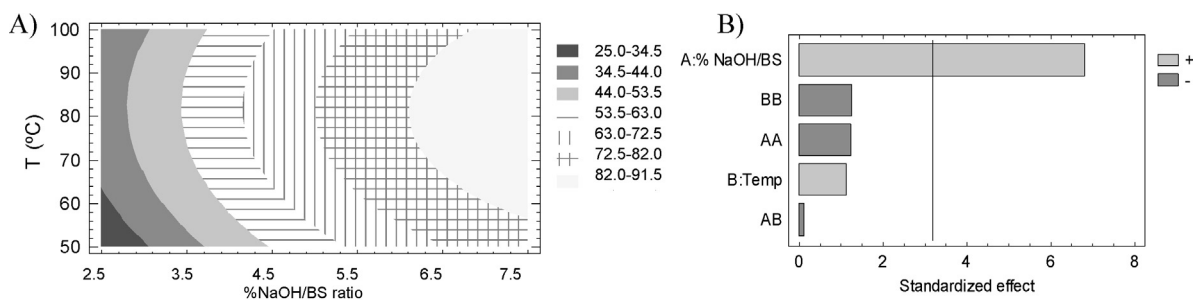


Fig. 6. Response surface graph and Pareto chart of the effect of *T* and NaOH/BS ratio on enzymatic hydrolysis yield for xylan.

lignocellulose matrix and facilitate the action of hemicellulolytic enzymes. As in glucan hydrolysis, the improvement with T is statistically significant, which is well supported by the response surface graphs shown in Figs. 5 and 6 that show the marked effect of alkali ratio in both responses EH of glucan and xylan. The Pareto charts confirm that only the effect of R is significant at a 95.0% confidence level (Figs. 5 and 6).

A positive effect of extrusion in enzymatic digestibility of lignocellulosic substrates has also been demonstrated in other lignocellulosic substrates. De Vrije et al. [7] studied a combination of mechanical and chemical pre-treatment methods for the production of fermentable sugars from *Miscanthus* and concluded that a combination of extrusion and sodium hydroxide is more favourable based on higher cellulose conversion yields and good performance of the pre-treatment. More recently, Yoo et al. [9] have reported on the increase of glucan to glucose conversion yield of soybean hulls from 40.8% of untreated biomass to 94.8% after extrusion at 80 °C and 350 rpm in a twin-screw extruder, without any catalyst addition. However, in the comparison with our results it is necessary to consider that soybean hull has much lower lignin content (2.3%) than barley straw, which makes the digestibility of this feedstock quite high even when untreated. Other authors report on sugar recovery yields after enzymatic hydrolysis (sugar released during saccharification related to sugar in raw material) being positively affected by an extrusion process alone [2,5,6], in combination with chemicals [4,12,18,32,33] or with other pretreatment techniques, such as liquid hot water [10]. Alkali impregnation and subsequent extrusion of prairie cord grass was studied by Karunanithy and Muthukumarappan [4] in the optimum conditions of 114 °C extrusion temperature, 122 rpm screw speed, 1.70% alkali concentration, and 8 mm particle size. They obtained a maximum glucose, xylose and combined sugar recoveries of 86.8, 84.5, and 82%, respectively, by enzymatic hydrolysis.

Regarding the mechanism underlying the positive effect of extrusion in enzymatic hydrolysis efficiency, it is not completely elucidated, although several hypotheses have been formulated. According to Yoo et al. [9], extrusion causes disruption of cell wall structure due to the combination of thermal and mechanical energy. This combined effect would lead to exposure of greater surface area and also to deconstruction of hemicellulose chains, which interfere in enzymes accessibility [18]. In the integrated alkaline-extrusion process of the present work, the extrusion effect would be enhanced by the action of the alkaline agent, which promotes glucan conversion by degradation of ester bonds and cleavage of glycosidic linkages in the cell wall matrix leading to the reduction of the lignin-hemicellulose complex and swelling of cellulose [13]. Our results support the fact that there is a positive effect of combining extrusion and alkali treatment (in the interval of T : 50–75 °C and R : 5–7.5%) on enzymatic digestibility of extruded BS. It occurs at the same time that a part of hemicellulose and/or lignin solubilizes, indicating substrate deconstruction. However, when T is increased to 100 °C, enzymatic digestibility decreases.

Other approaches using a combination of techniques that includes alkali have also been shown to be effective to enhance enzymatic digestibility of barley straw. Persson et al. [24] pre-treated barley straw by impregnation with different amounts of NaOH, followed by steam explosion at 190 °C and varying times. They found glucose conversions after 72 h between 80 and 90% and xylose yields ranging from 83 to 95%, which are in the range of those obtained in the present work: However, the integrated alkaline-extrusion poses the advantage of an one-step integrated process at lower temperature and lack of sugar degradation compounds. As in the present work, the authors observed a tendency towards higher glucan conversion with higher NaOH concentration in the impregnation step.

3.4. Optimization of extrusion conditions for enzymatic hydrolysis of glucan and validation of the model

Experimental data of enzymatic hydrolysis of glucan were processed using Statgraphics in order to infer a mathematical model which would describe the system and be able to predict its behaviour, being the final objective to maximize the conversion of glucan to glucose. This analysis was characterized by regression parameter $R^2 = 0.937$, which indicates that the model as fitted explains 93.7% of variability for glucan hydrolysis yield. The adjusted R^2 statistic was 0.833. The programme gave the following equation: $X = -107.406 + 55.723 R + 0.96727 T - 4.3597 R^2 - 0.06332 RT - 0.00434133 T^2$ for EH yield of glucan (X), as a function of NaOH/DM ratio (R) and temperature (T). The contour plot depicted in Fig. 5 shows how the design leads us towards an optimal experimental condition within the experimental range studied, which was found to be 89.9% of theoretical, at $R = 6\%$ and $T = 68$ °C.

To test the model validity, a new experiment was carried out, setting the process variables to the optimum ones given above. EH yield for glucan at optimum conditions was 88.9% of theoretical, which is in agreement with the predicted value (89.9% according to the above formula) and confirms the validity of the model. At the optimum conditions, the composition of extrudate gave the following composition: cellulose, 54.9%, hemicellulose, 28.9% and lignin, 14.7% (dry weight basis). The hydrolysis yield for xylan resulted in 71% of theoretical and the amount of hemicellulose-derived sugars reached 10.3 g/l. The absence of furfural and HMF in filtrate was confirmed in this validation experiment.

4. Conclusions

The results obtained in this work prove the effectiveness of the integrated one-step alkaline extrusion technique to enhance enzymatic digestibility of barley straw biomass for sugar production. Values of saccharification efficiency of glucan and xylan in extruded BS can be increased in 5 and 9 times, respectively, in relation to untreated material in EH experiments on washed extrudate at 5% (w/w) solids load. These results confirm the effectiveness of the integrated pretreatment to cause deconstruction of lignocellulose structure, so promoting the accessibility of enzymes to the carbohydrates during hydrolysis step.

The study of the influence of process variables, such as temperature (T) and NaOH/barley straw DM ratio (w/w) (R) showed that only R has a significant effect on enzymatic hydrolysis yield and extrudate composition variation, in the interval studied of 2.5–7.5% (w/w) and 50–100 °C. The optimization of process variables for a maximum glucan to glucose conversion by enzymatic hydrolysis led to optimal conditions of $R = 6\%$ and $T = 68$ °C. At these conditions, glucan yield reached 89.9% of theoretical, while xylan conversion was 71%. These results support the great potential of this one-step combined pre-treatment technology for sugar production from lignocellulosic substrates. The absence of sugar degradation products is a relevant advantage over other traditional methods for a biomass to ethanol production process since inhibitory effect of such products on sugar fermentation is prevented. Further efforts will be devoted to continue studying the process conditions that result in a more integrated and effective process and to test its feasibility at a larger scale.

Acknowledgements

This work has been partially funded by the Regional Government of Madrid under the R&D Technology Programme/2009 (Project RESTOENE Ref. n° P2009/ENE-1743) and the European

Community Seventh Framework Programme under Grant agreement reference n° 227498 (BABETHANOL PROJECT).

References

- [1] Himmel MED, Ding S-Y, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, et al. Biomass recalcitrance. *Engineering plants and enzymes for biofuels production*. Science 2007;315:804–7.
- [2] Karunanithy C, Muthukumarappan K. Effect of extruder parameters and moisture content of switchgrass, prairie cord grass on sugar recovery from enzymatic hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:1785–803.
- [3] Karunanithy C, Muthukumarappan K. Influence of extruder temperature and screw speed on pretreatment of corn stover while varying enzymes and their ratios. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:264–79.
- [4] Karunanithy C, Muthukumarappan K. Optimization of alkali soaking and extrusion pretreatment of prairie cord grass for maximum sugar recovery by enzymatic hydrolysis. *Biochem Eng J* 2011;54:71–82.
- [5] Karunanithy C, Muthukumarappan K. Optimization of switchgrass and extruder parameters for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Ind Crops Prod* 2011;33:188–99.
- [6] Karunanithy C, Muthukumarappan K, Gibbons WR. Extrusion pretreatment of pine wood chips. *Appl Biochem Biotechnol* 2012;167:81–99.
- [7] De Vrije T, De Haas GG, Tan GB, Keijsers ERP, Claassen PAM. Pretreatment of *Miscanthus* for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1381–90.
- [8] Lee SH, Teramoto Y, Endo T. Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process I – effect of additives with cellulose affinity. *Bioresour Technol* 2009;100:275–9.
- [9] Yoo J, Alavi S, Vadlani P, Amanor-Boadu V. Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. *Bioresour Technol* 2011;102:7583–90.
- [10] Chen W-H, Xu Y-Y, Hwang W-S, Wang J-B. Pretreatment of rice straw using an extrusion/extraction process at bench-scale for producing cellulosic ethanol. *Bioresour Technol* 2011;102:10451–60.
- [11] Zeitoun R, Pontalier PY, Marechal P, Rigal L. Twin-screw extrusion for hemicellulose recovery: influence on extract purity and purification performance. *Bioresour Technol* 2010;101:9348–54.
- [12] Lee SH, Inoue S, Teramoto Y, Endo T. Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process II: effect of hot-compressed water treatment. *Bioresour Technol* 2010;101:9645–9.
- [13] Eckard AD, Muthukumarappan K, Gibbons W. Pretreatment of extruded corn stover with polyethylene glycol to enhance enzymatic hydrolysis: optimization, kinetics and mechanism of action. *BioEnergy Res* 2011;5:424–38.
- [14] Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, et al. Features of promising technologies for pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 2005;96:673–86.
- [15] Balat M, Balat H. Progress in bioethanol processing. *Prog Energy Combust Sci* 2008;34:551–73.
- [16] Zhao X, Zhang L, Liu D. Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. *Bioresour Technol* 2008;99:3729–36.
- [17] McIntosh S, Vancov T. Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresour Technol* 2010;101:6718–27.
- [18] Lamsal B, Yoo J, Brijwani K, Alavi S. Extrusion as a thermo-mechanical pretreatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass Bioenergy* 2010;34:1703–10.
- [19] NREL. Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory; 2007.
- [20] Cara C, Moya M, Ballesteros I, Negro MJ, González A, Ruiz E. Influence of solid loading on liquid hot water pre-treatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *J Chem Technol Biotechnol* 2007;82:929–38.
- [21] Pérez JA, González A, Oliva JM, Ballesteros I, Manzanares P. Effect of process variables on liquid hot water pre-treatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor. *J Chem Technol Biotechnol* 2007;82:929–38.
- [22] Kim S, Holtzapple MT. Lime pre-treatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour Technol* 2005;96:1994–2006.
- [23] Linde M, Galbe M, Zacchi G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme Microb Technol* 2007;40:1100–7.
- [24] Persson T, Ren JL, Joëlsson E, Jönsson A-S. Fractionation of wheat and barley straw to access high-molecular-mass hemicelluloses prior to ethanol production. *Bioresour Technol* 2009;100:3906–13.
- [25] García-Aparicio MP, Oliva JM, Manzanares P, Ballesteros M, Ballesteros I, González A, et al. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel* 2010;90:1624–30.
- [26] Li Z, Liu Y, Liao W, Chen S, Zemetra RS. Bioethanol production using genetically modified and mutant wheat and barley straws. *Biomass Bioenergy* 2011;35:542–8.
- [27] Wan C, Zhou Y, Li Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. *Bioresour Technol* 2011;102:6254–9.
- [28] McIntosh S, Vancov T. Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. *Biomass Bioenergy* 2011;35:3094–103.
- [29] Jacquemin L, Zeitoun R, Sablayrolles C, Yves Pontalier P, Rigal L. Evaluation of the technical and environmental performances of extraction and purification processes of arabinoxylans from wheat straw and bran. *Process Biochem* 2012;47:373–80.
- [30] Carrillo F, Lis MJ, Colom X, Lopez-Mesas M, Valldeperas J. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: kinetic study. *Process Biochem* 2005;40:3360–4.
- [31] Chang VS, Holtzapple MT. Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol* 2000;84–86:5–37.
- [32] Zhang S, Keshwani DR, Xu Y, Hanna MA. Alkali combined extrusion pretreatment of corn stover to enhance enzyme saccharification. *Ind Crops Prod* 2012;37:352–7.
- [33] Dale BE, Weaver J, Byers FM. Extrusion processing for ammonia fiber explosion (AFEX). *Appl Biochem Biotechnol* 1999;77:35–45.



Study of process configuration and catalyst concentration in integrated alkaline extrusion of barley straw for bioethanol production



A. Duque*, P. Manzanares, I. Ballesteros, M.J. Negro, J.M. Oliva, F. Saez, M. Ballesteros

Biofuels Unit, Energy Department-CIEMAT, Avda. Complutense, 40, 28040 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- Barley straw was alkali-pretreated and neutralized in a single extrusion process.
- Alkali level and two process configurations (filtration, yes or not) were tested.
- Filtration allows to obtain better enzymatic digestibility of extrudates.
- Good ethanol production by liquefaction plus SSF of pretreated materials.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2014

Received in revised form 27 May 2014

Accepted 28 May 2014

Available online 13 June 2014

Keywords:

Lignocellulose

Extrusion

Alkaline treatment

Enzymatic hydrolysis

Ethanol production

ABSTRACT

Barley straw was pretreated with alkali (NaOH) at increasing NaOH/DM ratios (6–10%) and neutralized in a twin-screw extruder, obtaining a substrate ready for the incubation with enzymes. Two process configurations were evaluated: with and without filtration inside the extruder. The enzymatic digestibility of the pretreated substrates was evaluated and filtration was proved to be beneficial for the enzymatic hydrolysis. A maximum enzymatic hydrolysis yield of 71% was attained for the barley straw pretreated with 8 g NaOH/100 g dry barley straw and filtration inside the extruder. The ethanol production was evaluated on this substrate for increasing solid loadings, 2.5, 15 and 20% (w/v). A global process yield based on ethanol production, including hydrolysis and fermentation, was calculated over the pretreated material in experiments at 20% (w/v) solids, reaching 53% of the maximum theoretical. The concentration of ethanol reached up to 29 g/l in these conditions.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lignocellulosic biomass is increasingly being recognized as an important feedstock for the production of biofuels and chemicals by contributing to environmental sustainability and not competing with food production [1]. Particularly, bioethanol produced from lignocellulose by biochemical pathway (*cellulosic ethanol*) is foreseen to become one of the most credible alternatives to meet bioethanol supply targets in the next years in a sustainable way [2]. A great effort has been devoted in the past decades to overcome the technological and process-based barriers present in the different stages of the cellulosic ethanol value chain, i.e., pretreatment, hydrolysis, fermentation and distillation. However, the highly-structured and recalcitrant nature of lignocellulose remains as an important bottleneck in the conversion process and thus any advances in the pretreatment step will undoubtedly contribute to optimize hydrolysis and further processing downstream opera-

tions [3]. Several pretreatment approaches based on elevated temperatures and/or high concentration of chemicals such as solvents, acids, etc. have been proven to effectively fractionate lignocellulosic biomass and extensive literature has been published on this subject in past years [4–8]. Recently, thermo-mechanical extrusion process has been claimed as an interesting and alternative method for fractionation of lignocellulosic biomass based on it can be applied at relatively mild process conditions and operates in continuous way [9]. It provides high shear, rapid heat transfer, effective and rapid mixing, and a continuous throughput and adaptability for many different process configurations [10–12]. One consequence of its versatility is that extrusion can be used alone or combined with other pretreatments or chemicals (reactive extrusion) to enhance its performance.

Concerning reactive extrusion with alkali, two different forms of combining alkaline pretreatment with extrusion have been described in the literature on different biomasses. One is the impregnation of the raw biomass in an alkali solution for a determined period of time, followed by the introduction of this wet biomass into the extruder [10,13–16]. Another way is the addition of

* Corresponding author. Tel.: +34 91 346 6054.

E-mail address: aleta.duque@ciemat.es (A. Duque).

the alkaline solution directly into the extruder [17–20], which allows one-step process operation. The second alternative is more advantageous, considering the reduction in the process time and the higher integration level of this strategy. Particularly for barley straw biomass, the authors proved in a previous work [17] that twin-screw extrusion in combination with alkali directly fed into the extruder effectively fractionates barley straw (BS) biomass into its constituents. Mild temperature and chemicals conditions were used, preventing the formation of inhibitory byproducts coming from the degradation of hemicellulose/lignin. However, it was also shown that the so produced materials (hereinafter, extrudates) need a washing or pH-adjusting step before they can be submitted to enzymatic hydrolysis (EH). Therefore, downstream operations become complicated, meaning a significant drawback from an industrial point of view.

The process strategy followed in the present work is the alkaline extrusion of barley straw by performing continuous alkaline-extrusion at reasonably low NaOH/DM (w/w) ratios (R) ranging from 6% to 10% (w/w), with neutralization inside the extruder. These R values were selected considering the effective results obtained in the former work of alkaline extrusion of BS [17].

The fact that neutralization is performed during extrusion run increases the integration of the pretreatment and allows generating a substrate ready for the enzymatic hydrolysis [21]. However, in this integrated concept the addition of both alkali and acid inside the extruder implies the formation of inorganic salts that remain in the substrate for its subsequent hydrolysis and/or fermentation. Thus, in this work the inclusion of a filtration step inside the extruder was studied aimed at evaluating if a partial removal of such soluble solids affects the yield of carbohydrate hydrolysis upon further incubation of the extrudate with cellulolytic enzymes. The strategy including filtration is compared to one without filtration. The effect of increasing NaOH/DM ratio in the integrated alkaline pretreatment of BS and the inclusion of the filtration step in the performance of enzymatic hydrolysis of extrudate was evaluated in laboratory tests using commercial enzymes.

Moreover, this paper deals with one of the less studied areas in the assessment of the extrusion pretreatment: the evaluation of the ethanol production potential from alkaline extrudates [9]. For this purpose, simultaneous saccharification and fermentation (SSF) experiments at increasing solids loading levels, including a 24 h liquefaction step, were carried out on extrudates generated on the best process conditions. The production of ethanol was measured and the yield of the fermentation process calculated.

2. Materials and methods

2.1. Raw material

Barley straw biomass (6% moisture content), was provided by Centre for the Development of Renewable Energy Sources (CEDER), (Soria, Spain). Biomass was coarsely-crushed to 5 mm particle size using a laboratory hammer mill (Retsch), homogenized and stored until used.

2.2. Alkaline extrusion pretreatment

Extrusion experiments were carried out in a twin-screw extruder (Cletral Processing Platform Evolum[®] 25 A110, Cletral, France) described elsewhere [17]. The extruder was continuously fed with 0.6 kg/h of BS. A solution of NaOH (10% w/v) was pumped into the extruder at variable feeding flows, in order to achieve alkaline ratios of 6, 8 and 10 g NaOH/100 g BS. After alkaline treatment and in the same extrusion run, a solution of H₃PO₄ (0.1 M) was

introduced for neutralization purposes, in a proportion enough to obtain a pH about 5 at the output, which is an adequate value for the hydrolytic enzymes action in the subsequent step comprised in this work. Temperature was set at 68 °C along the extruder and the speed of the screw was 150 rpm, as in the previous work [17], which means a residence time inside the extruder of about 2 min.

Two process configurations were considered in order to carry out the alkaline pretreatment and neutralization of the biomass: the complete configuration (C) (Fig. 1), in which alkali and acid are sequentially added to the extruder and then extrudate comes out, and the filtered configuration (F) (Fig. 2), which includes a filtration step previous to the output of the extrudate. The position of the inputs and barrels, as well as the screw profile, were adapted and optimized to each of the configurations. In C, alkali is introduced in barrel 1 and acid in barrel 5, while in F alkali is also introduced in barrel 1, but acid is added in barrel 4 and barrel #5 is replaced by a filtering module. Transport screws, bi-lobal paddles and reverse screws were used in order to provide transport, mixing and shearing effects along the extrusion.

An important factor, influencing the effectiveness of the pretreatment is the liquid to solid ratio inside the extruder (L/S) [9]. This parameter is calculated as the sum of the liquid flows (NaOH solution for the reaction zone, soda plus acid solution flow in the neutralization zone) entering the extruder, plus the moisture of the raw material, divided by the amount of dry weight barley straw fed to the equipment. It is especially important in the reaction zone (barrels 1–4 in C and 1–3 in F). The values for the L/S in the reaction and in the neutralization zone for the three soda levels are shown in Table 1.

To stabilize operation conditions, the extruder was operated for 30 min before any sampling was taken. After this time, the extrudates in configuration C and F and the filtrate from configuration F, were collected for at least 30 min to avoid variation in output flow rates. Extrudates were kept in sealed plastic bags and stored at 4 °C until use. A portion of extrudates and filtrates were analyzed for main components and the content in monomeric and oligomeric sugars and potential inhibitors (furfural, hydroxymethyl furfural – HMF, and phenols), respectively, as described below.

2.3. Raw and pretreated material characterization

The composition in carbohydrates, acid-insoluble lignin and ash content was determined in raw material and extrudates, according to the laboratory analytical procedures (LAP) for biomass analysis [22] of the National Renewable Energy Laboratory (NREL, CO).

2.4. Enzymatic hydrolysis tests

Extrudates from both configurations (C and F) were submitted to enzymatic hydrolysis in 0.05 M sodium citrate buffer (pH 4.8) at 50 °C and 2.5% (w/v) dry extrudate load. Experiments were performed in 100 ml Erlenmeyer flasks on a rotary shaker (Certomat-R B-Braun, Germany) at 150 rpm. Enzymatic cocktail consisting of commercial cellulase boosted with commercial xylanase in a proportion 9:1 (protein content basis) was added in a dosage of 20 mg protein (8 FPU of cellulase)/g dry extrudate. The enzymes were kindly provided by Novozymes A/S (Denmark). Samples were taken at 0 h and then at 24 h and 48 h, when the hydrolysis of the extrudates is completed. After withdrawal, samples were boiled for 10 min to deactivate enzymes before chromatographic analysis. The sample at 0 h is used to determine the amount of sugars coming from the solubilization during extrusion and from the enzymatic preparation. These sugars do not result from the hydrolytic action of enzymes during incubation and therefore, they are sub-

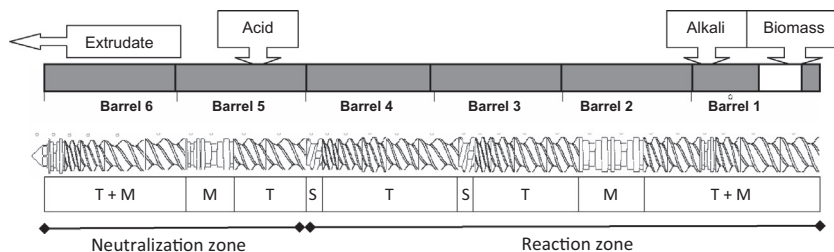


Fig. 1. Complete configuration (C) for the extrusion of barley straw in the twin-screw extruder. Inputs, outputs, screw profile and reaction and neutralization zones are shown. T: transport effect; M: mixing effect; and S: shearing effect.

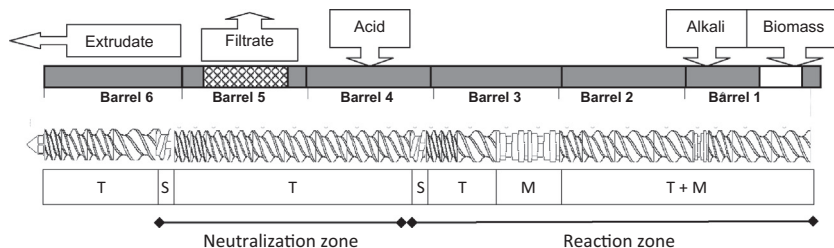


Fig. 2. Filtered configuration (F) for the extrusion of barley straw in the twin-screw extruder. Inputs, outputs, screw profile and reaction and neutralization zones are shown. T: transport effect; M: mixing effect; and S: shearing effect.

Table 1

Liquid to solid ratios (L/S) in the reaction and neutralization zones for extrusion at 6%, 8% and 10% R (g NaOH/g dry barley straw).

R (%)	L/S in reaction zone	L/S in neutralization zone
6	0.8	4.2
8	1	7.7
10	2	14.3

tracted from the final amount of sugars when calculating the actual yield of the hydrolysis in the course of incubation.

The parameter used to assess differences in the enzymatic hydrolysis performance by incubation of the extrudates produced in the two process configurations and increasing R values is the enzymatic hydrolysis yield (EHY). This parameter is calculated as the glucose/xylose released during EH divided by the potential glucose/xylose (calculated based on glucan/xylan content of the solid extrudate), and expressed as percentage of theoretical. As it was previously explained, the sugars solubilized at $t = 0$ h are subtracted in this calculation. In addition, the overall production yield in the extrudate was also calculated, taking into account sugars produced during both the extrusion step and the additional incubation. So the amount of sugars at the beginning of the hydrolysis is summed up to that resulting from incubation to calculate this yield, which is expressed as g of sugar (glucose and xylose) produced per g of dry extrudate. In all calculation, the amount of glucose coming from the enzyme preparation was subtracted.

2.5. Ethanol production from extrudates

Extrudates were submitted to simultaneous saccharification and fermentation (SSF) tests with a previous 24 h step of liquefaction (L) at 50 °C (hereinafter, LSSF). Experiments were carried out at 2.5%, 5%, 10%, 15% and 20% (w/v) solids loading in Erlenmeyer flasks incubated in rotary shakers at 150 rpm as explained in Section 2.4.

To start the experiment, 20 mg protein/g of extrudate of the above mentioned enzymatic cocktail (see Section 2.4) were supplied to each flask and they were incubated for 24 h at 50 °C.

After that, hydrolyzates had liquefied and the flasks were inoculated with 1 g/l of pre-grown *Saccharomyces cerevisiae* (see below) and further incubated at 35 °C for another 72 h. Samples were withdrawn every 24 h. Glucose and ethanol concentration were measured as described below in Section 2.6.

S. cerevisiae (Ethanol Red from Fermentis, France) was prepared for inoculation by growing 0.5 g of the dehydrated microorganism on a rotary shaker at 150 rpm and 35 °C for 16 h, in growth medium composed by: 30 g/l of glucose, 4 g/l of yeast extract, 2 g/l of $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 1 g/l of KH_2PO_4 and 0.3 g/l of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The preculture was centrifuged at 9000 rpm for 10 min at 4 °C and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in citrate buffer (0.05 mM) in a volume calculated to achieve inoculum load of 1 g/l.

To evaluate ethanol production on extrudates, LSSF yield was calculated considering both steps, liquefaction and subsequent SSF. Thus, the yield was calculated as the amount of ethanol produced during SSF, divided by the potential production of ethanol in hydrolyzates and expressed in %. Potential ethanol was determined as the maximum ethanol that could be produced from the glucose in extrudates, considering 100% hydrolysis yield and the theoretical conversion factor 0.51 g ethanol/g glucose.

2.6. Analytical methods

Sugars content in the filtrate and in EH media after completion of enzymatic hydrolysis tests was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) in a Waters 2695 liquid chromatography with refractive index detector, as described in Cara et al. [23]. The oligosaccharides ratio in the filtrate was determined as the difference in monomeric sugar concentration before and after mild acid hydrolysis (3% v/v H_2SO_4 , 121 °C and 30 min).

Furfural and HMF and phenolics (i.e., hydroxy-benzoic acid, hydroxy-benzaldehyde, vanillic acid, vanillin and cumaric and ferulic acids), were analyzed by HPLC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA), using an Aminex ion exclusion HPX-87H cation-exchange column (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) at 65 °C. Mobile phase was 89% 5 mM H_2SO_4 and 11% acetonitrile at a flow rate of 0.7 mL min^{-1} . Column eluent was detected with a 1040A Photodiode-Array detector (Agilent, Waldbronn, Germany).

Ethanol concentration was measured by gas chromatography using an Agilent technology 7890A GC System equipped with an Agilent 7683B Series injector, a flame ionization detector (both maintained at 150 °C) and a column of Carbowax 20 M at 85 °C.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of raw material, extrudates and filtrates

Six pretreated extrudates were obtained from extrusion experiments, corresponding to the three levels of alkali (6%, 8% and 10% g NaOH/g BS) in both configurations, C and F. The composition of the raw BS and extrudates is shown in Table 2.

It can be seen that complete extrudates (CE) have a similar, or even a bit lower, content of hydrocarbons compared to the untreated BS (36% vs. 39% of cellulose, 24% vs. close to 26% hemicellulose). This is due to the fact that the extrudate is not filtered and, therefore, all the components remain in the substrate for analysis. It must be noticed, however, that there is a small dilution factor resulting from the addition of chemicals (alkali and acid) during the pretreatment, which sums up an additional weight in the complete extrudate and could be accounted for the slight differences found between CE and raw BS composition. The higher amount of ash in the complete extrudates (from 12.8% ash at 6% *R* to 14% ash at 10% *R*) in comparison to raw BS supports this fact.

On the other hand, filtered extrudates (FE) show a higher proportion of cellulose and hemicellulose than in untreated BS, about 41–45% and up to 28.5%, vs. 39.1% and 25.7%, respectively. In this configuration, part of the inorganic salts and other non-structural compounds is removed by filtration, which results in concentration of major components to a certain extent. The analysis of the filtrate (Table 3) shows minor concentration of sugars (expressed as simple glucose and xylose after mild acid hydrolysis) coming from carbohydrate solubilization. The amount of solubilized glucose is small, ranging from 1 to 2 g/l. Considering the volume of filtrate recovered during filtration, which is different in each trial, these concentration values are equivalent to 1.9–2.8% of the glucose in the BS, with no significant variation among *R* values. These small amounts of glucose solubilized could be attributed to the presence of some starch in the raw material, coming from grain contamination. However, the solubilization of xylose is more significant, up to 5 g/l; and increases significantly with *R* between 6–8% *R* and 10% *R*. These differences account for 6.5–17.3% of the xylose in the raw BS, again depending on the volume of filtrate. It is important to note that more than 96% of the solubilized xylose was originally found in oligomeric form in the filtrate, whereas oligomers of glucose were about 64%. The solubilization of combined C6 and C5 sugars related to their content in raw BS varies between 4% and 8.5%. In spite of solubilizing this small amount of sugars, filtration concentrates the carbohydrates in FE to some extent (as it was mentioned above) due to extensive solubilization of minor components such as extractives and ash.

Regarding inhibitory compounds (Table 3), neither furfural nor HMF were found in the filtrates. This is an expected result found

Table 3

Concentration (g/l) of sugars (glucose and xylose), acetic acid and phenolics in the filtrate (F) for the different additions of NaOH (g NaOH/100 g dry barley straw).

g/l	F-6	F-8	F-10
Glucose	2.1	1.5	1.1
Xylose	3.9	3.4	4.9
Acetic acid	3.8	3.3	4.0
Phenols	0.08	0.17	0.19

in extrusion experiments at low temperatures and one of the main advantages of this pretreatment over other thermo-chemical methods that are carried out at higher temperature conditions. Phenols were found in negligible concentrations (<0.1 g/l, which means less than 0.01% of dry BS), while acetic acid was the main compound detected with a concentration about 4 g/l. This value, referred to the volume of filtrate and to BS dry matter, means that 95% of the acetyl groups in the raw BS (about 1.8% dwb, data not shown) have been removed from the hemicellulose by alkaline extrusion. This deacetylation effect is in agreement with the results described in the literature and it is thought to occur by saponification of acetyl ester bonds [24,25]. The amount of acetic acid that is removed with the filtrate is, however, still present in CE, which could interfere with the enzymatic activity. However, the extent of this effect is highly related to the concentration value, as it was proved in a study by Hodge et al. [26], who demonstrated inhibition effect but at much higher acetic acid concentrations of 15 g/l.

3.2. Enzymatic hydrolysis efficiency

The values of EH yields at 24 and 48 h, depicted in Fig. 3A and B (for cellulose and xylan, respectively), show that glucose and xylose are mostly released within the first 24 h of hydrolysis, which is consistent with low solids loading (2.5% w/v) and the enzyme dose used in the experiments.

The results from the statistical analysis show that there are not significant differences between the enzymatic hydrolysis yields of glucan of complete extrudates produced at different *R* levels ($p = 0.05$), either in filtered ones. In spite of the NaOH level not being significant, the FE at 8% was the substrate which gave a slightly better glucan yield, i.e. 71% of theoretical. This means an improvement 4 times over the EH yield of glucan of untreated barley straw (17% of theoretical, data not shown). The yields from the hydrolysis of xylan were lower, varying in the range of 52–60% of the theoretical, which is a xylan EH yield up to 5.8 times higher compared to the untreated biomass (10% of theoretical, data not shown). In the case of xylan, there are statistically significant differences between CE and FE at 6% and 8% *R*, while this difference is not found at 10% *R*. The fact that the extrudate contains virtually all xylan from raw material and that it is hydrolyzed during incubation with a reasonably good efficiency results in a significant amount of xylose being released to the media. Xylose would be available for conversion to valuable products in a further step, increasing the amount of total sugars produced in a single step of enzymatic hydrolysis.

Table 2

Raw barley straw and extrudates composition (% dry weight basis) according to the process configuration and addition of NaOH per dry matter.

% Dry weight basis	BS	CE-6	FE-6	CE-8	FE-8	CE-10	FE-10
Cellulose	39.1 ± 0.7	36.2 ± 0.6	41.3 ± 0.6	36.6 ± 0.4	45.6 ± 0.7	36.6 ± 0.4	45.5 ± 0.5
Glucose	43.0 ± 0.7	39.8 ± 0.6	45.6 ± 0.7	40.3 ± 0.5	50.2 ± 0.8	40.3 ± 0.5	50.1 ± 0.5
Hemicellulose	25.7 ± 0.7	23.8 ± 0.4	25.4 ± 0.2	24.6 ± 0.5	28.6 ± 0.4	24.2 ± 0.1	29.4 ± 0.9
Xylose	23.8 ± 0.6	22.3 ± 0.2	24.7 ± 0.2	23.0 ± 0.4	27.8 ± 0.3	24.3 ± 0.2	28.8 ± 0.1
Lignin	15.2 ± 0.8	13.9 ± 0.5	15.7 ± 0.1	14.6 ± 0.1	17.0 ± 0.1	16.1 ± 0.2	17.6 ± 0.1
Ash	6.8 ± 0.4	12.8 ± 0.5	4.3 ± 0.3	13.2 ± 0.1	4.5 ± 0.1	14.3 ± 0.1	4.5 ± 0.6

BS – barley straw; CE – complete extrudate; FE – filtered extrudate; 6, 8 and 10 – g NaOH/100 g dry BS.

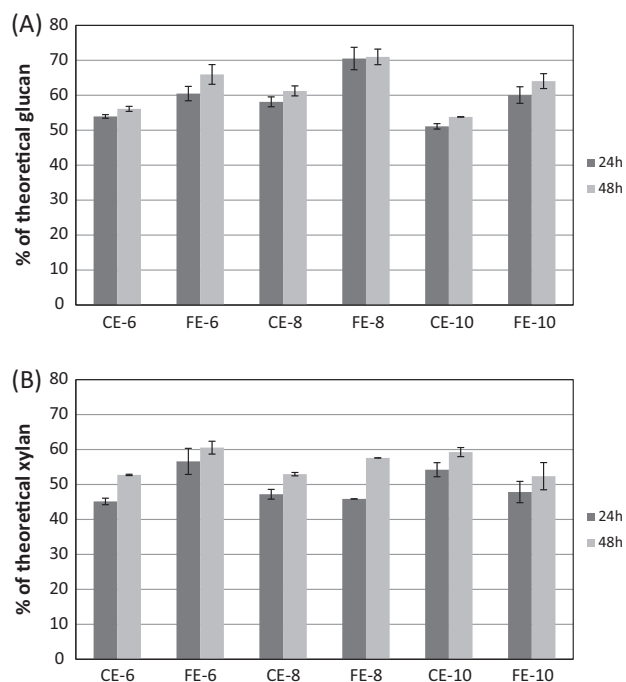


Fig. 3. Enzymatic hydrolysis yields in % of theoretical glucan (A) and xylan (B) at 24 and 48 h on BS extrudates produced in different configurations and *R* levels. C = complete extrudates; F = filtered extrudates; 6, 8 and 10 – g NaOH/100 g dry BS.

The values obtained in the present study are somehow lower than those attained in a previous work from the authors [17] on alkaline-extrusion of barley straw. The extrudates produced were washed and submitted to enzymatic hydrolysis, resulting in a highest glucan yield close to 90% at 68 °C, 150 rpm and 6% *R*. The decrease found in the present work can be attributed on the one hand to changes in the configuration of extrusion profile, since the introduction of neutralization inside the extruder implies a shortening of alkaline treatment. On the other hand, it is significant that the extrudates are not washed after extrusion.

Um et al. [18] proved the greater effectiveness of NaOH-extrusion vs. extrusion with hot water to pretreat rape straw, and achieved a maximum enzymatic digestibility value of 60% in the case of alkaline extrusion. This result was obtained at 1.5% *R*, 19 rpm and 170 °C, which means a lower catalyst consumption compared to the present study, but also the use of much more thermal energy due to the high temperatures used. Liu et al. [27] also employed a twin-screw extruder and NaOH loadings between 4% and 10% to pretreat corn stover, followed by a thermal preservation step. They found glucan and xylan conversions up to 83% for glucan and 89% for xylan. The fact that they use a high extrusion temperature (100 °C), a harsher screw profile and that they wash extrudates before EH, differentiates this study from the present work. The results Liu et al. [27] obtained were more similar to the ones in Duque et al. [21]. The fact of integrating a neutralization step in the extruder seems to shield the effect of the alkali concentration in the extrudates. The yields obtained in the present work are, nevertheless, quite acceptable and integrated neutralization bring other advantages from the operational and industrial point of view, which makes these configurations an interesting subject of study.

Lamsal et al. [15] washed extensively alkali-extruded wheat bran and soybean hulls previous to enzymatic saccharification, obtaining remarkable improvements in sugar recovery. The authors hypothesized that the washing step removed chemical treatment residues, as well as enzyme inhibitors from the

extrudates. Moreover, Zhang et al. [16] compared the glucose yields of washed and not washed extrudates pretreated with different alkali concentrations and came to a similar conclusion: washing of extrudates is beneficial at high alkali concentrations, although at lower concentrations the effect is the opposite.

The combination of alkaline treatment and extrusion inside the extruder has also been addressed by Kang et al. [19] on *Miscanthus* biomass and Han et al. [20] on barley straw. Both authors based the analysis of the effectiveness of the pretreatment on the biomass to ethanol ratio (BTER, a measure of the ethanol produced referred to glucose in raw biomass) and their results will be discussed later on in Section 3.3.

Regarding the two different configurations, there are significant differences for a confidence level of 5%. In general, enzymatic digestibility of FE is higher than that of CE, proving a positive effect of soluble compounds removal on enzymatic hydrolysis performance. Thus, the hydrolysis of complete substrates would be somehow affected by some compounds present in CE, which are removed by filtration. The analysis of filtrates (Table 3) can shed light on the possible causes of the inhibition. Hodge et al. [26] stated that the inhibition of enzymatic hydrolysis at low solids concentrations is completely due to the soluble compounds. The sugars and acetic acid removed with the filtrates are still present at the beginning of EH in CE. As it was previously commented, most of the sugars were found in oligomeric form, mainly xylooligomers, and according Qing et al. [28] these oligomers have a remarkable inhibitory effect on cellulases. It is possible also, that a combined effect of soluble sugars and acetic acid is hindering the hydrolysis efficiency [26].

Another parameter to evaluate the effectiveness of the pretreatment is the sugar production, which will eventually determine the potential for the production of bioethanol in relation to the weight of extruded material. This parameter, expressed as g of sugar (glucose or xylose) per g of dry extrudate, sums up the sugars produced by alkaline extrusion (i.e. the sugars measured at the beginning of the EH experiments) to the ones produced during the incubation with enzymes and refers them to the weight of the extrudate. Glucose and xylose production of CE was about 23 and 13 g/100 g dry extrudate, respectively. The EH essays of FE resulted in higher sugar productions, especially at 8% *R*, where the productions were 34 g of glucose and 16 g of xylose per 100 g of dry extrudate, equivalent to 71% of the glucan yield and 58% of xylan yield.

To advance with the study of ethanol production, the best extrudate was selected according to the results discussed above, and this is FE at 8% *R*.

3.3. Ethanol production and LSSF yield

Ethanol production tests were carried out on extrudate at best condition (FE, 8% *R*) at 2.5%, 5%, 10%, 15% and 20% w/v solid loadings. The assays were first incubated 24 h at 50 °C with the cellulytic cocktail and then inoculated and incubated for additional 72 h at 35 °C (Liquefaction plus SSF, LSSF).

The results shown in Fig. 4 indicate that LSSF yields increase progressively with the incubation time, reaching values up to 73% of theoretical and 53% of theoretical at 72 h of incubation at 2.5% and 20% solids loading, respectively. The observed decrease of the yield with the increasing solids content is influenced by the progress of the EH at high solids loading, as it could be observed that liquefaction was hindered in the flasks at 15% and, mainly, 20% solids loading. This effect on the EH at high solids loadings is well documented in the literature [29,30]. It has been reported that increasing the solids loading presents some difficulties such as high viscosity, end product inhibition of enzymes by glucose and cellobiose and mass transfer limitations, especially at laboratory flask scale. However, due to the higher concentration

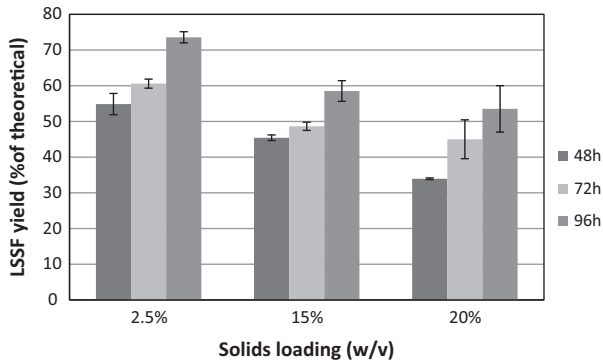


Fig. 4. Ethanol yield (in % of theoretical) at 48, 72 and 96 h of incubation, on filtered extrudate at 8% *R*, submitted to LSSF at 2.5%, 15% and 20% (w/v) solids loading.

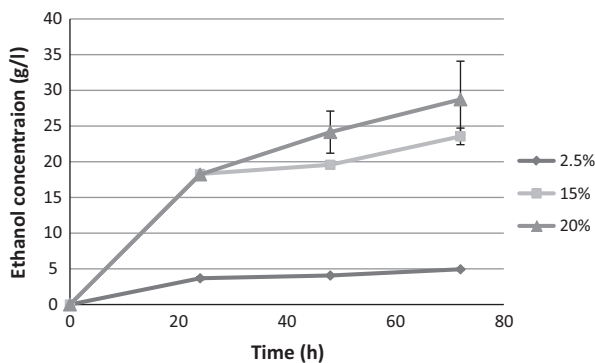


Fig. 5. Ethanol production (in g/l) at 48, 72 and 96 h of incubation of filtered extrudate at 8% *R*, submitted to LSSF at 2.5%, 15% and 20% (w/v) solids loading.

of potential cellulose at high loadings, the ethanol concentration in the media increases from 5 g/l at low solids loading up to close to 30 g/l at 20% (Fig. 5).

To date, there are not many studies on the fermentability of extrudates in the literature. One work that addresses this issue is the paper from Yoo et al. [31]. They extruded soybean hulls at different in-barrel moisture contents and screw speeds and carried out separated hydrolysis and fermentation tests, obtaining a maximum ethanol production of 15.4 g/l (at initial hydrolysis consistency of 10% w/w). The temperature was kept under 100 °C and no significant concentrations of furfural or HMF were detected, similar to what happens in the present study. Our results compare very favorably with this work, since about twofold ethanol concentration (28.7 g/l) is obtained at double solid level (20%). The authors also discuss on the effect of acetic acid released to the hydrolyzate by extrusion and EH, which can inhibit ethanol

production, depending on concentration and pH. One of the advantages of the FC presented in the present paper is the possibility to avoid this potential problem in the hydrolysis and fermentation steps, by removing the acetic acid with the filtrate.

Kim et al. [32] studied the potential for ethanol production by SSF of poplar sawdust extruded with sulphuric acid. Cellulase load was 30 FPU/g cellulose. The authors report a decrease of the ethanol yield at solid loadings over 6% (w/v) and used a fed-batch strategy to overcome this problem, reaching a final concentration of 11% solids and 40 g/l ethanol without losing efficiency (77.3% yield calculated over the raw material). In our case, we also observe a decrease of the LSSF yield at 15% and 20% solids (w/v); therefore, the fed-batch strategy could be a good solution to be explored in future works.

Kang et al. [19] also dealt with fermentation of extrudates, in this case, from alkali-extruded *Miscanthus* at 200 °C and 12.8% *R*. They carried out SSF experiments at 25% substrate load, that resulted in 67 g/l of ethanol (26.8 g/100 g extrudate) and ethanol conversion, BTER, of 88%. These values are higher than the obtained in the present work; however it must be noticed that Kang et al. [19] performed a more severe pretreatment, washed the substrates after alkaline-extrusion and added a higher enzyme dosage (30 FPU/g cellulose). They also proved that an increase of the enzyme dose increases the amount of ethanol produced. This strategy could be applied in future studies to achieve higher LSSF yields from alkali-extruded BS.

Specifically working with alkali-extruded BS (16% *R*), Han et al. [20] obtained 46 g/l of ethanol after SSF with 30 FPU/g cellulose of enzyme at 20% substrate load, equivalent to 23 g/100 g extrudate. The BTER at this consistency was 77%. Han et al. also observed that higher enzyme load led to higher ethanol yields and that this ethanol yield decreased at solid loadings over 20% (w/v), which is consistent with the conclusions of the previous works [19,32].

In comparison to the reported values, the ethanol concentration and LSSF yield obtained in this work at 20% solids (28.7 g/l and 53.5% of theoretical, respectively) are good given the present operational conditions (mild temperature, no washing of extrudates, 20 FPU/g cellulose). Nevertheless, the authors consider the experiments done are a preliminary assessment of the hydrolyzability and fermentability of extrudates and these steps require further optimization to achieve ethanol concentrations in the fermentation media enough to make the whole process profitable at industrial level.

4. Conclusions

A neutralization step was successfully integrated with alkaline extrusion of barley straw, producing a pretreated material suitable for direct incubation with enzymes. Two extrusion configurations were compared and the advantages of the inclusion of a filtration

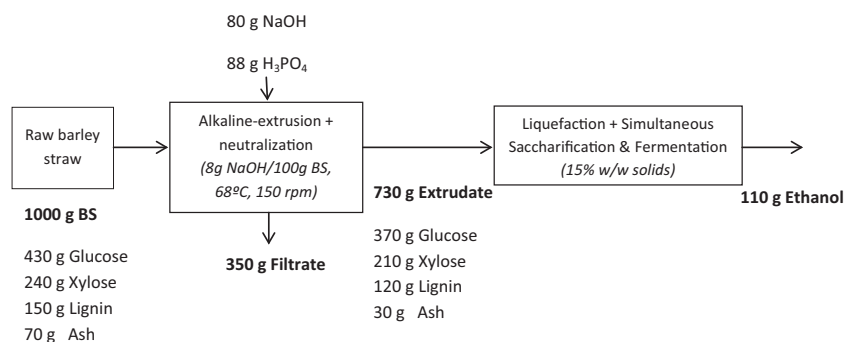


Fig. 6. Mass balance of 1 kg of barley straw (BS) pretreated by alkaline extrusion plus neutralization and subsequent LSSF to ethanol.

step inside the extruder were demonstrated. However, the effect of increasing R values in the alkaline treatment was not significant at the levels tested. Extrudates gave good hydrolysis yields, being the best around 70% of theoretical at low solid concentration. The capacity for ethanol production from the best extrudates (FE, 8% R) was tested through LSSF experiments and 19.7 g/100 g extrudate ethanol were obtained after 72 h incubation at 2.5% solid concentration. Fig. 6 shows the material balance of barley straw to ethanol at the optimal conditions of extrusion shown in this work, calculated based on results obtained at 15% w/w solids, a more relevant process condition. Under these conditions it is possible to obtain 110 g ethanol from 1 kg barley straw.

References

- [1] Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Convers Manage* 2011;52:858–75.
- [2] Technology roadmap: biofuels for transport. IEA Report 2011.
- [3] Limayema A, Ricke SC. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog Energy Combust* 2012;38:449–67.
- [4] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour Technol* 2010;10:4851–61.
- [5] Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol Adv* 2011;29:675–85.
- [6] Zhao X, Zhang L, Liu D. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuel Bioprod Bioresour* 2012;6:561–79.
- [7] Sathitsuksanoh N, George A, Zhang YHP. New lignocellulose pretreatments using cellulose solvents: a review. *J Chem Technol Biotechnol* 2013;88:169–80.
- [8] Cardona E, Rios J, Peña J, Rios L. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. *Fuel* 2014;118:41–7.
- [9] Karunanithy C, Muthukumarappan K. Thermo-mechanical pretreatment of feedstocks. In: Gu T, editor. *Green biomass pretreatment for biofuels production*. Netherlands: Springer; 2013. p. 31–65.
- [10] Dale BE, Weaver J, Byers FM. Extrusion processing for ammonia fiber explosion (AFEX). *Appl Biochem Biotechnol* 1999;77:35–45.
- [11] Lee SH, Teramoto Y, Endo T. Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process I – Effect of additives with cellulose affinity. *Bioresour Technol* 2009;100:275–9.
- [12] Karunanithy C, Muthukumarappan K. Influence of extruder and feedstocks variables on torque requirements during pretreatment of different types of biomass – a response surface analysis. *Biosyst Eng* 2011;109:37–51.
- [13] Karunanithy C, Muthukumarappan K. Optimization of alkali soaking and extrusion pretreatment of prairie cord grass for maximum sugar recovery by enzymatic hydrolysis. *Biochem Eng J* 2011;54:71–82.
- [14] Karunanithy C, Muthukumarappan K. Optimization of alkali, switchgrass and extruder parameters for maximum sugar recovery. *Chem Eng Technol* 2011;34:1413–26.
- [15] Lamsal B, Yoo J, Brijwani K, Alavi S. Extrusion as a thermo-mechanical pretreatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass Bioenergy* 2010;34:1703–10.
- [16] Zhang S, Keshwani DR, Xu Y, Hanna MA. Alkali combined extrusion pretreatment of corn stover to enhance enzyme saccharification. *Ind Crops Prod* 2012;37:352–7.
- [17] Duque A, Manzanares P, Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Sáez F, et al. Optimization of integrated alkaline-extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem* 2013;48:775–81.
- [18] Um BH, Choi CH, Oh KK. Chemicals effect on the enzymatic digestibility of rape straw over the thermo-mechanical pretreatment using a continuous twin screw-driven reactor (CTSR). *Bioresour Technol* 2013;130:38–44.
- [19] Kang KE, Han M, Moon SK, Kang HW, Kim Y, Cha YL, et al. Optimization of alkali-extrusion pretreatment with twin-screw for bioethanol production from *Miscanthus*. *Fuel* 2013;109:520–6.
- [20] Han M, Kang KE, Kim Y, Choi GW. High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor. *Process Biochem* 2013;48:488–95.
- [21] Duque A, Manzanares P, Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, González A, et al. Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. *Bioresour Technol* 2014;158:262–8.
- [22] NREL. Chemical analysis and testing laboratory analytical procedures. Golden CO: National Renewable Energy Laboratory; 2007.
- [23] Díaz MJ, Cara C, Ruiz E, Pérez-Bonilla M, Castro E. Hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Fuel* 2011;90:3225–9.
- [24] Kong F, Engler RC, Soltes EJ. Effects of cell-wall acetate, xylan backbone, and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood. *Appl Biochem Biotechnol* 1992;34–35:23–35.
- [25] Chang VS, Holtzapple MT. Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol* 2000;84–86:5–37.
- [26] Hodge DB, Karim MN, Schell DJ, McMillan JD. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresour Technol* 2008;99:8940–8.
- [27] Liu C, Van der Heide E, Wang H, Li B, Yu G, Mu X. Alkaline twin-screw extrusion pretreatment for fermentable sugar production. *Biotechnol Biofuels* 2013;6:97.
- [28] Qing Q, Yang B, Wyman CE. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour Technol* 2010;101:9624–30.
- [29] Jørgensen H, Vibe-Pedersen J, Larsen J, Felby C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnol Bioeng* 2007;96:862–70.
- [30] Modenbach AA, Nokes SE. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment – a review. *Biotechnol Bioeng* 2012;109:1430–42.
- [31] Yoo J, Alavi S, Vadlani P, Behnke KC. Soybean hulls pretreated using thermo-mechanical extrusion – hydrolysis efficiency, fermentation inhibitors and ethanol yield. *Appl Biochem Biotechnol* 2012;166:576–89.
- [32] Kim TH, Choi CH, Oh KK. Bioconversion of sawdust into ethanol using dilute sulfuric acid-assisted continuous twin-screw-driven reactor pretreatment and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresour Technol* 2013;130:306–13.



Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion



A. Duque*, P. Manzanares, I. Ballesteros, M.J. Negro, J.M. Oliva, A. González, M. Ballesteros

Biofuels Unit, Energy Department-CIEMAT, Avda. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- A novel pretreatment for the production of sugars from barley straw is presented.
- Chemicals and enzymes are combined with extrusion in two consecutive runs.
- Carbohydrate breakdown starts during extrusion with enzymes (bioextrusion).
- High sugar production by enzymatic hydrolysis of pretreated material (bioextrudate).

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2013

Received in revised form 10 February 2014

Accepted 11 February 2014

Available online 20 February 2014

Keywords:

Lignocellulose

Biomass

Extrusion

Enzymatic hydrolysis

Alkaline treatment

ABSTRACT

A pretreatment that combines a thermo-mechanical process (extrusion) with chemical and biological catalysts to produce fermentable sugars from barley straw (BS) biomass was investigated. BS was firstly extruded with alkali and then, the pretreated material (extrudate) was submitted to extrusion with hydrolytic enzymes (bioextrusion). The bioextrudate was found to have 35% (w/w dwb) of total solids in soluble form, partly coming from carbohydrate hydrolysis during bioextrusion. About 48% of soluble solids dry weight is comprised by sugars, mostly glucose and xylose. Further enzymatic hydrolysis of bioextrudate could be successfully carried out at high solid loading level of 30% (w/v), with sugar production yield of 32 g glucose and 18 g xylose/100 g bioextrudate at 72 h incubation (equivalent to 96 and 52 g/l concentration, respectively). These results, together with the high level of integration of the process, indicate a great potential of this pretreatment technology for sugar production from lignocellulosic substrates.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lignocellulosic biomass is the most promising feedstock to be used in biorefineries, as source for the production of biofuels, chemicals and other biomass-derived products (Uihlein and Schebek, 2009). This type of biomass has a heterogeneous composition, which includes cellulose, hemicellulose, starch, lignin, oils and proteins. Specific technologies need to be developed to achieve a complete fractionation of the material and the conversion of each fraction to high-value products (Menon and Rao, 2012).

Lignocellulosic biomass pretreatment technologies have been widely investigated over the last years as a first and crucial stage to breakdown fibre structure and make carbohydrates accessible to hydrolytic chemical or biological catalysts. Various biological, chemical, and physical pretreatment approaches have been proven

to open the recalcitrant structure of lignocellulosic biomass and increase the susceptibility of cellulose to enzymatic attack. (Mosier et al., 2005; Tomás-Pejó et al., 2011). However, most of these pretreatments achieve these goals by solubilizing hemicelluloses and/or lignin that in turn can be degraded to compounds that can exert inhibitory effect on enzymes and microorganisms in the subsequent steps, due to the use of elevated temperatures and/or high concentration of chemicals such as solvents, acids, etc. On the contrary, twin-screw extrusion stands out as a technology that can effectively open the recalcitrant structure of lignocellulosic biomass into its constituents at mild temperature and chemicals conditions, preventing the formation of such inhibitory by-products (Duque et al., 2013). Other advantages are that it can be operated in continuous way and that produces little effluent, disposal and solid losses.

Extrusion process is based on the effect exerted by the tight rotation of a single or a twin-screw inside a stationary barrel equipped with temperature control. The most common equipment

* Corresponding author. Tel.: +34 00 34 91 346 6054.

E-mail address: aleta.duque@ciemat.es (A. Duque).

for the extrusion of biomass is the fully intermeshing co-rotating twin-screw extruder, whose configuration can be varied by the combination of different types of screw elements, which produce different effects, such as transport, mixing and shearing, along the extrusion process (Senturk-Ozer et al., 2011).

The application of extrusion in biomass pretreatment has been lately investigated as individual technique (Karunanithy and Muthukumarappan, 2010a,b, 2011a,c; Karunanithy et al., 2012; Yoo et al., 2011; Zhang et al., 2012), or in combination with chemicals, such as alkali, ammonia or ethylene glycol, in the so called “reactive extrusion” (Dale et al., 1999; Karunanithy and Muthukumarappan, 2011b,d, 2013; Lamsal et al., 2010; Eckard et al., 2011; Lee et al., 2010). Although the process has been successfully demonstrated without catalyst on a variety of substrates such as switch grass, prairie cord grass and corn stover (Karunanithy and Muthukumarappan, 2010a,b, 2011a), the integration of extrusion and chemical agents may result in more efficient biomass component fractionation. In the particular case of alkaline-extrusion, several approaches have been carried out by soaking the biomass with an alkaline solution prior to its introduction in the extruder. For instance, Karunanithy and Muthukumarappan (2011d) optimized the reactive extrusion conditions for switchgrass reaching a maximum sugar recovery after enzymatic hydrolysis of 86.8 for glucose and 84.5% for xylose, after soaking biomass for 30 min in 2% (w/v) alkali solution prior to extrusion. Zhang et al. (2012) also demonstrated the effectiveness of this sequential alkali-soaking/extrusion pretreatment in enhancing sugar release by subsequent enzymatic hydrolysis in corn stover.

Significantly, a step towards the integration of the alkali and extrusion pretreatment was taken in a previous work carried out by the authors (Duque et al., 2013), by introducing the alkaline solution directly into the extruder and running the whole process in a continuous way. In that work, NaOH and water were fed into the extruder and after extrusion, extrudate was collected, washed and used as substrate in enzymatic hydrolysis tests. The yields of enzymatic hydrolysis of the washed extruded material in the best conditions (6% NaOH/DM ratio and 68 °C) were 88.9% for glucose and 71.3% for xylose (values in % of the maximum theoretically achievable if all glucan and xylan contained in extrudate were transformed to sugars), in experiments at 5% solids and 27 FPU/g glucan enzyme load. However, it was necessary to extensively wash the extruded material before the subsequent step of enzymatic hydrolysis to remove catalyst and neutralize for enzymatic hydrolysis that implied high water consumption. Recently, Um et al. (2013) have also reported on the effect of chemicals, such as alkali, in the extrusion of rapeseed straw in a continuous twin-screw reactor, by feeding directly the catalyst into the extruder at a similar NaOH/DM ratio, but at higher temperature of 170 °C. The positive effect of alkali addition is shown by a 2.4-fold increase in enzymatic digestibility in comparison to untreated material, reaching a maximum of 60% in experiments at 2% solids loading. The authors claim an important role of particle size reduction during extrusion in the effectiveness of the process, based on significant improvement of enzymatic digestibility also in experiments conducted by feeding hot water instead of alkali.

The first objective of the present work is to develop an advanced integrated alkaline extrusion process that includes a neutralization step into the extruder. This advanced process configuration allows avoiding the washing step of extrudate and thus, the water consumption at this stage. Moreover, this integrated process allows generating a pretreated material at high solid loading level, which can be used directly in a subsequent step for sugar production. The alkaline-extrusion process of the present work aims at enhancing the action of the alkaline agent, which promotes glucan conversion by cleavage of H₂ bonds of cellulosic structure and as a consequence, swelling of cellulose (Carrillo et al., 2005). Moreover, the

work addresses an additional goal by performing a second extrusion run on the alkaline extruded biomass with hydrolytic enzymes to provide a good interaction enzyme-substrate at the high solids conditions in which process is carried out. Thus, a “bio-extrudate” is produced, which can be directly incubated for sugar release from carbohydrates by enzyme action, without any additional downstream operation. The composition and characteristics of extruded materials and the sugar production of bioextrudate in subsequent enzymatic hydrolysis incubation at high solid loading is investigated.

2. Methods

2.1. Raw material

Barley straw (BS) (6% moisture content) was provided by Centre for the Development of Renewable Energy Sources (CEDER), (Soria, Spain). Biomass was coarsely crushed to about 5 mm particle size using a laboratory hammer mill (Retsch), homogenised and stored until used.

2.2. Twin-screw extrusion pretreatment

2.2.1. Twin-screw extruder

Extrusion experiments were carried out in a twin-screw extruder (Clextal Processing Platform Evolum[®] 25 A110, Clextal, France), composed of 6 modular barrels of 100 mm length. In each barrel, different screws of 25 mm diameter are fitted to provide transport, mixing and shearing effects. A computer into the extruder controls the extruder barrel temperature and the screw speed. A volumetric feeder KMV KT20 (Ktron) connected to the extruder is used to provide continuous biomass feeding.

2.2.2. Alkaline pretreatment

The operational parameters for alkaline extrusion of BS were selected based on results from a previous optimization study described elsewhere (Duque et al., 2013). Accordingly, extrusion of BS was carried out at an even temperature of 68 °C and at a ratio of NaOH/BS dry weight (w/w) of 7.5%. The screw profile used in this step is shown in Fig. 1A. Alkaline pretreatment was run by continuously feeding BS biomass through the feeder at a feeding rate of 0.6 kg/h fresh weight and a NaOH solution (10% w/v) through a metering pump connected to the extruder in module #2. The present work integrates a neutralization step by feeding a solution of diluted phosphoric acid (1% w/v) in module #4. The aim is to get the extrudate at the output with a pH value from 5 to 5.5. Both NaOH and phosphoric acid solution flows were adjusted to provide a liquid flow to solid input ratio (L/S) inside the extruder of 12/1. This value had been previously shown to provide a proper operation during this stage.

Regarding screw profile (Fig. 1A), in the first two barrels conveying elements were installed to transport the biomass forward, while in the third barrel a mixing section was included to achieve a good mixture between the biomass and the catalyst. Two reverse screws, one in module #4 and the other immediately after module #5, were set to increment the pressure and shearing effect in the extruder. A filtration unit was set up in module #5 to separate a liquid fraction or filtrate before extruded material output. The residence time of the biomass in contact with the soda can be estimated in less than 1 min, considering the total time of the extrusion run (about 2 min) and the sequence of the different steps (material feeding, alkaline treatment, neutralization and filtration) during the run.

After extrusion, a portion of the extrudate was dried, milled and analysed for major components as described below. Likewise, the

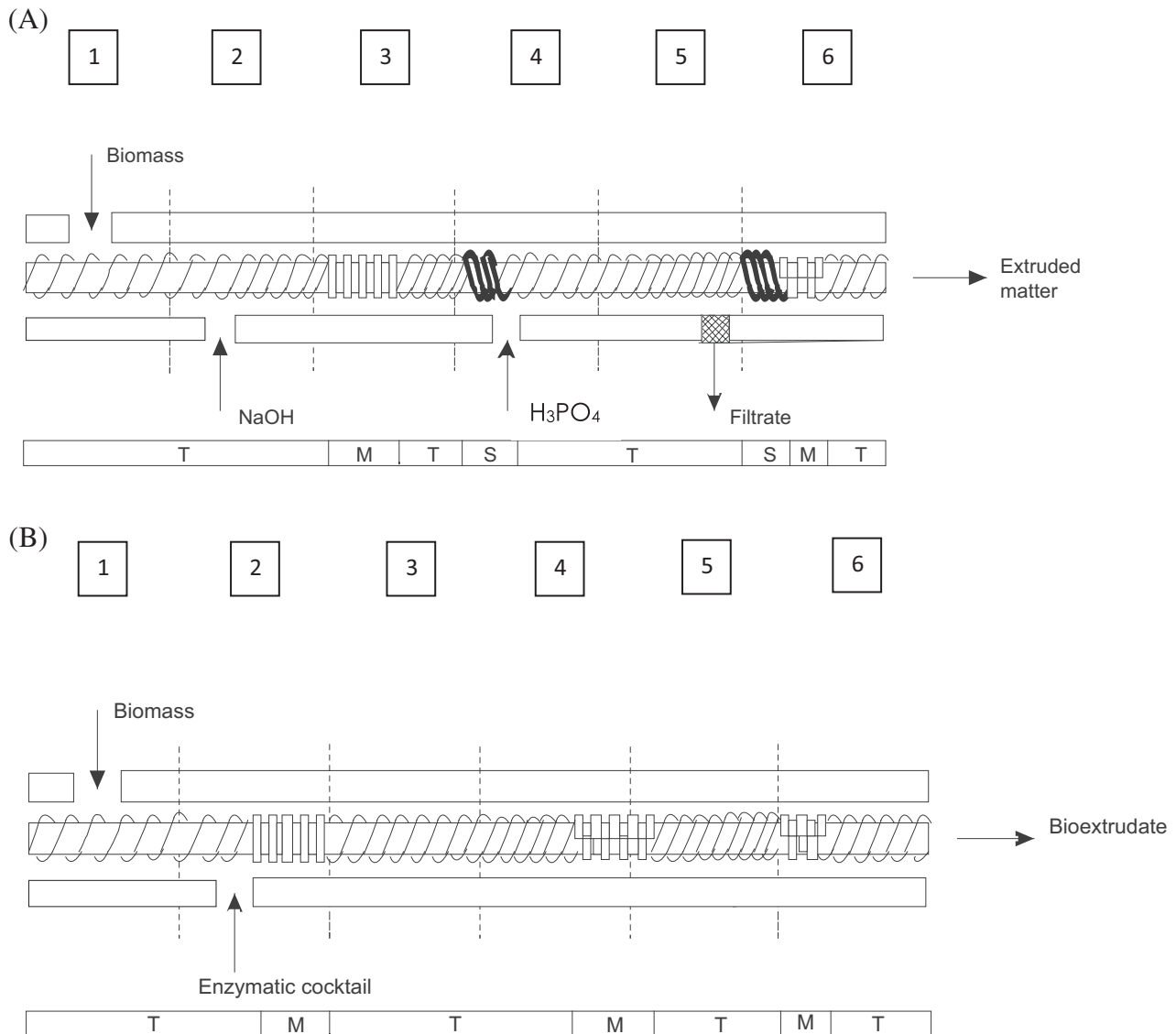


Fig. 1. Screw profile used for (A) the alkaline pretreatment of barley straw with inlet and outlet positions; (B) the biological extrusion of alkali-extruded barley straw with inlet and outlet positions. T, transport effect; M, mixing effect; S, shearing effect.

filtrate was collected and analysed for sugars and degradation compounds, i.e. furfural and HMF, following the methodology shown below.

2.2.3. Extrusion with enzymes (bioextrusion)

The extrudate produced in the alkaline extrusion was used as feedstock in a second run for extrusion with hydrolytic enzymes (bioextrusion). Extrudate, with moisture content around 63%, was continuously fed into the extruder through the feeder at a flow of 0.62 kg/h fresh weight. The screw configuration in this step is shown in Fig. 1B, aimed at providing transport and mixing effects with no shearing effect of reverse screws. Extrusion run was performed at an even temperature of 50 °C and no filtration was applied in this step.

Some exploratory trials at different L/S ratios using water instead of enzymatic solution carried out to optimize this value indicated that L/S ratio close to 4/1 could provide a proper operation within the extruder. The amount of enzyme added into the extruder was 25 mg protein/g dry extrudate, which can be considered in the range of those used in other research works by the authors

about enzymatic hydrolysis of steam explosion-pretreated BS (García-Aparicio et al., 2011). The enzyme solution fed into the extruder was prepared by mixing cellulase and hemicellulase preparations, in a ratio 9:1 in protein content, in citrate buffer 200 mM, pH 4.8. Novozymes A/S (Denmark) kindly provided the enzymes. The dilution of enzymatic preparation and its flow-feeding rate into the extruder was calculated considering the ratio enzyme/dry matter into the extruder of 25 mg protein/g dry extrudate and the selected L/S ratio of 4/1.

After bioextrusion experiments, a portion of the bioextrudate was dried at 40 °C, milled and analysed for major components as described below for raw and extruded biomass characterization. Moreover, a fraction was submitted to a characterization process as follows.

2.2.4. Characterization of bioextrudate

To examine if hydrolysis of carbohydrates occurs during bioextrusion due to enzyme action, a portion of bioextrudate was filtered and divided into two fractions: insoluble (IF) and soluble (SF). IF was washed and dried at 40 °C to determine main components

content following the procedures shown below for raw and extruded biomass. The liquid resulting from washing the bioextrudate was analysed for simple sugars by HPLC and the amount of sugars measured considered being a part of the SF.

The volume of SF was recorded and a portion centrifuged at 9000 rpm. An aliquot of the supernatant was analysed by HPLC as described below for sugar content. In parallel, an aliquot was submitted to mild acid hydrolysis (4% (v/v) H₂SO₄, 120 °C and 30 min) and analysed again for total sugar content. By difference between the former (monomeric sugars) and second (monomeric plus oligomeric sugars) values, the amount of oligomeric sugars was calculated. The rest of the supernatant was dried until constant weight to determine total dissolved solids (TDS) content.

2.3. Sugar production of bioextrudate upon incubation at high solid loading level

To evaluate the sugar production efficiency of extruded material after bioextrusion, the bioextrudate was incubated in a Terrafors-IS bioreactor 15 l capacity (Infors HT, Switzerland) for 72 h. Solid content of bioextrudate was 23% w/w, which is equivalent to a 30% solids level (w/v) in the incubation media. To follow-up sugar release during incubation, samples were withdrawn at 0, 3, 6, 8, 20, 24, 48 and 72 h, boiled to inactive enzymes and measured for glucose and xylose concentration by HPLC as described below in Analytical methods Section.

To determine if any sugar is found in the media sample in oligomeric form, in parallel an aliquot of the sample was submitted to mild acid hydrolysis as described above (see point 2.2.4), and the amount of glucose and xylose oligomers calculated.

The efficiency of whole sugar production by enzymatic hydrolysis taking into account the bioextrusion and further incubation of the bioextrudate (hereinafter sugar production yield) was calculated. Glucose and xylose (as monomers and oligomers) were measured in the incubation media and divided by the potential glucose/xylose that could be found based on glucan/xytan content in the bioextrudate (dwb). Results are expressed in percentage. For this calculation, the values of glucose and xylose found in the media at 0 time were considered since these sugars were produced during bioextrusion prior to incubation.

2.4. Raw and extruded biomass chemical composition analysis

National Renewable Energy Laboratory (NREL, CO) laboratory analytical procedures (LAP) for biomass analysis (NREL, 2007) were used to determine carbohydrates, acid-insoluble lignin and ash content in raw and extruded materials (extrudate and bioextrudate).

Granulometric analysis was carried out on untreated BS and extruded biomass samples according to European Standard Method [European Standard Norm, 2010]. The aim is to analyse differences in particle size distribution before and after alkaline and enzymatic extrusion.

2.5. Analytical methods

The filtrate recovered after alkaline extrusion and the soluble fraction of the bioextrudate were analysed for their content in monomeric and oligomeric sugars (glucose, xylose, arabinose and galactose). The oligosaccharides ratio was determined as the difference in monomeric sugar concentration before and after mild acid hydrolysis. Simple sugars were analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in a Waters 2695 liquid chromatograph with refractive index detector, as described in Cara et al. (2007). Likewise, sugars concentration after completion of enzymatic hydrolysis tests were measured in EH media by HPLC

as described above. Furfural and HMF were analysed by HPLC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA), using an Aminex ion exclusion HPX-87H cation-exchange column (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) at 65 °C. Mobile phase was 89% 5 mM H₂SO₄ and 11% acetonitrile at a flow rate of 0.7 ml/min. Column eluent was detected with a 1040A Photodiode-Array detector (Agilent, Waldbronn, Germany).

3. Results and discussion

3.1. Raw material and extrudate characterization

The significance of dry matter composition in barley straw (Table 1, first column) has already been discussed in a previous work by the authors (Duque et al., 2013). Based on its high total carbohydrate content of 65% (dwb) (39.1% cellulose and 25.7% hemicellulose), this feedstock has been proposed as a very promising substrate for sugar production and conversion to high added-value products such as bioethanol.

Regarding extrudate composition (Table 1, second column), the material is somehow enriched in cellulose, xylan, and acid-insoluble lignin in relation to untreated BS due to the solubilisation into the filtrate of easily removable biomass components such as extractives, soluble ash (Duque et al., 2013) and a minor part of glucose and hemicellulosic-derived sugars, mostly xylose (see below, liquid fraction analysis). The amount of solids in the extrudate, (37%) are 95% insoluble solids and 5% soluble since the material is not washed after extrusion and a minor fraction of soluble solids remain in the extrudate after the filtration step carried out into the extruder. These soluble solids contain negligible amounts of monomeric sugars as glucose and xylose.

Extrudate is made up of 73% of carbohydrates, 17% lignin and 4.5% ash. The fact that the extruded material contains virtually all glucan and xylan from raw material, at the conditions tested in this work, stands out for a clear difference with other pretreatment techniques using water or chemicals that cause extensive solubilisation of easily removable carbohydrates (Alvira et al., 2010; Ballesteros et al., 2011; Mosier et al., 2005). It may represent an advantage from the point of view of increased potential sugars to be released by enzymatic hydrolysis, if the material becomes accessible to enzymatic attack. To demonstrate this point is one of the objectives of this work.

Extrusion has been reported to cause physical disruption of cell wall assembly due to the combination of thermal and mechanical energy (shearing forces), leading to a certain deconstruction of biomass structure (Yoo et al., 2011). Moreover, the addition of alkali during extrusion may cause hemicellulose and lignin extraction as well as cellulose crystallinity decrease, depending on operating conditions. As a result, non-structural components are easily released, the lignin-hemicellulose complex is somehow affected and swelling of cellulose occurs (Eckard et al., 2011). This swelling effect can be observed in the extrudate generated in this work in

Table 1
Moisture content and main components in raw barley straw and extrudate generated in the alkaline extrusion run. Values in % dry weight basis.

	Raw material	Extrudate
Moisture content (%)	6	63
<i>Composition (% dwb)</i>		
Cellulose	39.1 ± 0.6	44.6 ± 1.5
Hemicellulose	25.7 ± 0.3	28.2 ± 0.8
Xylan	21.1 ± 0.2	23.6 ± 0.8
Arabinan	3.3 ± 0.05	3.5 ± 0.08
Galactan	1.3 ± 0.03	1.1 ± 0.03
Lignin	16.4 ± 0.07	17.2 ± 1.3
Ash	6.8 ± 0.2	4.5 ± 0.2

comparison to untreated BS. The extrudate appearance is remarkably different from untreated BS by presenting a more soft and porous aspect. In addition, granulometric analysis shows changes in particle size distribution between both materials (Fig. 2). About 63% of the particles in the raw barley straw are over 3.15 mm, while this percentage decreases to 44% in the extrudate. Instead, the fraction between 3.15 and 0.52 mm particle size increases in the extrudate and sums up to 53.7%. These data are in agreement with the observations of Um et al. (2013) about the reduction of particle size due to the friction and shearing forces inside the extruder.

3.2. Filtrate composition

The characterization of liquid fraction or filtrate from alkaline extrusion is shown in Table 2. The pH value close to 5 indicates successful neutralization in the extruder, which is important to facilitate its use directly in the second extrusion run with enzymes. Regarding sugars content, the values found are low, in all cases <2 g/l. Data represent sugars in both monomeric and oligomeric form; in the case of glucose, around 40% is found as monomer, while for xylose this figure is only 3%. Concentration values are highly dependant on the total liquid flow and so, values in relation to the amount of BS loaded have been calculated. The value of glucose concentration found in the filtrate is equivalent to 2.4% of the

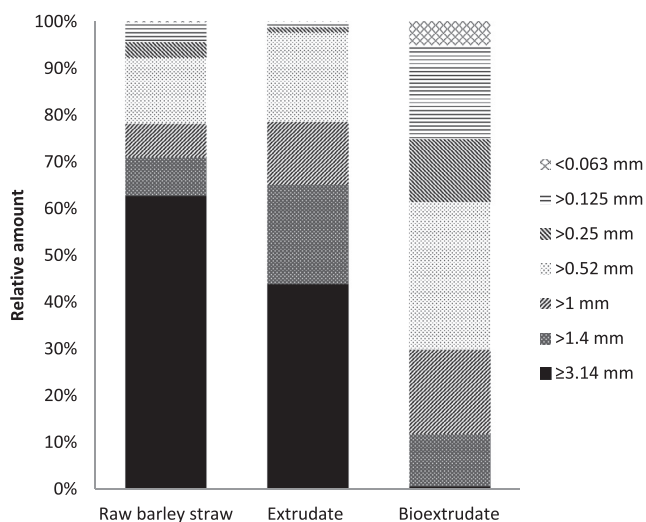


Fig. 2. Particle size distribution (% relative amount) of raw barley straw, extrudate and bioextrudate materials.

Table 2

Dissolved solids content, sugar concentration and recovery of sugars in filtrate generated in alkaline extrusion of barley straw.

Liquid fraction	
pH	4.8
Dissolved solids (% w/w)	2.6
Sugar concentration ^a (g/l)	
Glucose	1.8
Xylose	1.2
Arabinose	0.6
Galactose	0.4
Sugar recovery ^a (g/100g DM BS)	
Glucose	2.4
Xylose	1.5
Arabinose	0.8
Galactose	0.6

^a In both monomeric and oligomeric form.

glucose contained in raw material, which is solubilized during extrusion. The amount of xylose solubilized (1.5% of BS DM) represents close to 6% of the content in raw material.

Alkaline treatments have been shown to remove hemicellulose and lignin from lignocellulosic biomass, but its effectiveness is closely related to the concentration and conditions of alkali treatment. The relative mild alkaline conditions tested in the present work do not result in significant hemicellulose removal, although the enzymatic accessibility of the extruded material is significantly increased in comparison to raw BS (Duque et al., 2013), due to a swelling effect of alkali on the cellulosic fibres. On the contrary, Jacquemin et al. (2012) have reported effective hemicellulose extraction by a combined twin-screw alkali-extrusion in a mixture of wheat bran and straw, but employing much higher values of NaOH/DM [close to 50% (w/w)].

It is important to highlight that neither furfural nor hydroxymethyl furfural (HMF) were detected in the filtrate, which is a clear clue of no sugar degradation during this step of the pretreatment process.

3.3. Bioextrudate characterization

The analysis of bioextrudate composition shown in Table 3 allows estimating the mass balance of solids between the two fractions: soluble and insoluble. Whole bioextrudate solid recovery (108%) is over 100% due to enzymes and buffer that are added during bioextrusion, representing a factor of 1.08 in relation to solids extrudate dry weight. Therefore, carbohydrates and lignin content of bioextrudate (in percentage dwb of bioextrudate) is slightly lower than in extrudate (Table 1), due the above “dilution” factor.

Total solids of the bioextrudate are composed of 35% soluble and 65% insoluble solids. Almost a half of the soluble solids (48%) are comprised by sugars, mostly glucose and xylose, but also minor amounts of galactose and arabinose. A great part of the xylose found in SF is in form of oligomers (60%), while glucose oligomers only represent a 12% of the total glucose in soluble form. The fraction of glucose in SF (8.7% of whole bioextrudate dwb) accounts for 18% of total glucose content of whole bioextrudate (47.4% dwb). Likewise, xylose in SF (6.8% of whole bioextrudate dwb) represents a value close to a 28% of total xylose (24.5% dwb). Thus, it is demonstrated that by the addition of enzymes into the extruder in the second run, the feedstock for this stage (extrudate) is transformed into a bioextrudate that contains a part of the carbohydrates already in soluble form. This is the key difference with extrudate and the evidence that enzymes are acting during bioextrusion.

It is relevant to highlight that while during bioextrusion some carbohydrate breakdown occurs, no carbohydrate losses take place and the rest of the carbohydrates are available for further hydrolysis upon further incubation of the material.

Regarding differences in appearance between bioextrudate and extrudate, the former presents dark brownish colour, is sticky, and tend to lump, which may be related to changes in lignin chemistry and solubilisation of carbohydrates. Results of particle size distribution by granulometric analysis in both materials (Fig. 2) show that particle size is reduced in bioextrudate. There is a negligible amount of particles over 3.14 mm, while the fraction of particles between 3.14 and 0.52 mm reaches 60% of the total. Particles under 0.52 mm account for 39%, compared to just 2.3% of the particles under that size in extrudate. These results prove that bioextrusion results in a material with distinctive physical characteristics in relation to the extrudate.

3.4. Sugar production yield on bioextrudate

Bioextrudate was incubated in the 15 l bioreactor at 50 °C during 72 h to determine sugar production yield. Values of production

Table 3
Solids content and chemical composition of bioextrudate (values given in % of whole bioextrudate dwb).

Bioextrudate as a whole	% Solid recovery (g/100g DM extrudate)	Bioextrudate solid content (% dwb)	Composition (% dwb of whole bioextrudate)					
			Glucose	Xylose	Galactose	Arabinose	Lignin	Ash
	108	23	47.4 ± 1.6	24.5 ± 0.8	1.3 ± 0.03	3.1 ± 0.1	17.6 ± 1.3	4.9 ± 0.1
Insoluble fraction (IF) ^a		(% dwb of bioextrudate DM) 65	(% dwb of whole bioextrudate)					
			38.0	17.6	0.7	2.0	25.4	
Soluble fraction (SF) ^a		(% dwb of bioextrudate DM) 35	(% dwb of whole bioextrudate)					
			8.7	6.8	0.5	1.0	–	

^a IF and SF are produced by filtration to characterize the bioextrudate (see point 2.2.4.).

yield at 0, 3, 6, 8, 20, 24, 48 and 72 h, as well as concentration in g/l (both monomers and oligomers) are shown in Fig. 3, for glucose and xylose (panels A and B, respectively).

As commented in point 3.3., the enzymes action produce a certain carbohydrate hydrolysis during the second run in the extruder, which confirms that saccharification is taking place to a certain extent during bioextrusion. As a result, there is an initial amount of sugars in the media at 0 h, that accounts for 7.5% of the potential glucose and 18% of the potential xylose. These values are a bit lower than the amount of soluble sugars found when characterising the bioextrudate due to the different methodologies used for their quantification (see Methods). During the first 20–24 h of incubation, the hydrolysis of glucan and xylan is slow and the values are low, but then, within the next 48 h, it accelerates until reaching production yields of 73% and 72% of theoretical for glucose and xylose, respectively. Glucose (monomers and oligomers)

concentration in EH media at this condition after 72 h incubation reached 96 g/l.

The delay for the hydrolysis to take off can be due to the high solids content at which the experiment is carried out, 30% w/v. It is indeed well known that increasing the solids loading presents some difficulties such as mass transfer limitations and end product inhibition of enzymes by glucose and cellobiose, which may affect the final efficiency of hydrolysis (Wang et al., 2011; Lu et al., 2010). However, the fact that in the present work the enzymes are thoroughly mixed during the bioextrusion and that some sugars are released by the enzymatic action during this step, seems to provide an advantage when the material is further incubated at extended time, resulting in reasonably good yields at 30% w/v solids. Moreover, the use of advanced enzymatic cocktails consisting in cellulase boosted with xylanase is with certainty influencing this positive result. Supporting this idea, Manzanares et al. (2012) have reported a positive effect of xylanase addition on SSF of steam-exploded forage sorghum that allows increasing solid concentration up to 18% (w/w) with good SSF performance and high final ethanol content in SSF broth.

The event of xylan hydrolysis during incubation with a reasonably good efficiency, results in a significant amount of xylose being released to the media, which would be available for conversion to valuable products in a further step. At 30% solid loading level, the final concentration of xylose is 52 g/l (considering monomers and oligomers). A certain amount of other free sugars, mostly arabinose (up to 6 g/l) and galactose (3 g/l) are also found by HPLC (data not shown), resulting in a total concentration of fermentable C5 and C6 sugars about 155 g/l, from which 71 g/l are monomeric glucose and 31 g/l correspond to monomeric xylose.

The values of sugar production referred to dry matter of extrudate reach values about 32 g glucose/100 g dry extrudate and 18 g xylose/100 g extrudate. Considering the production of glucose and xylose in relation to both glucan and xylan in the extrudate, a combined sugar production yield of 73% can be calculated. These results are somewhat lower than those obtained in other lignocellulosic biomasses submitted to alkaline extrusion, such as prairie cord grass (Karunanithy and Muthukumarappan, 2011b) or switch grass (Karunanithy and Muthukumarappan, 2011d). For the first one, the optimal extrusion conditions of 114 °C, 122 rpm and soaking in 1.7% alkali, yielded a maximum combined sugar recovery of 82%. In the work on switch grass biomass, maximum combined sugar recovery of 88% was recorded after extrusion of the material at 180 °C and 118 rpm screw speed, previously soaked for 30 min in an alkali solution of 2% (w/v) concentration. However, it is important to highlight that these experiments were obtained in enzymatic hydrolysis experiments at low solid loading level at less than 5% solids, so resulting in low sugar concentrations in the media. The fact that the combined extrusion process of the present work results in reasonably high yields at high consistencies up to

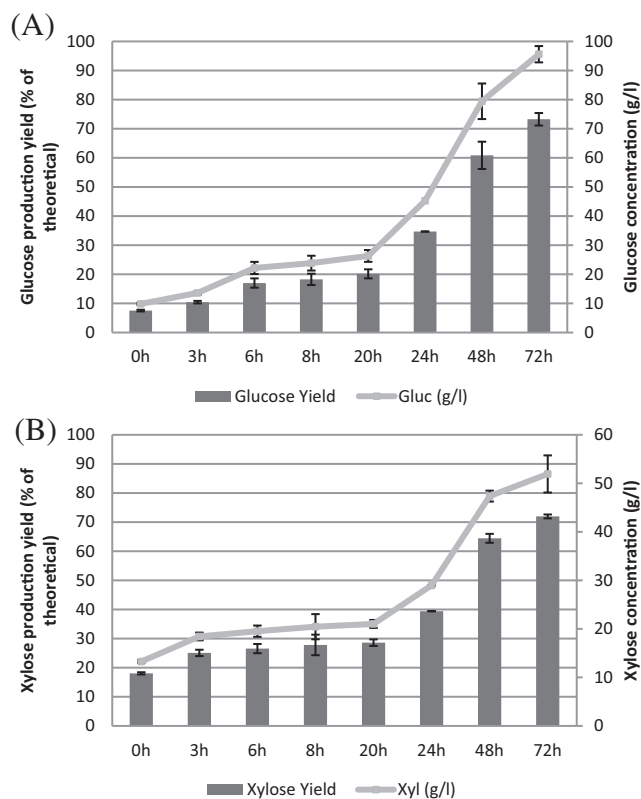


Fig. 3. Sugar production yields (in % of theoretical) and concentrations (in g/l) of glucose (A) and xylose (B) at 0, 3, 6, 8, 20, 24, 48 and 72 h of incubation at 50 °C of barley straw bioextrudate.

30% (w/v), stands up for a clear advantage in terms of sugar concentration in hydrolysis media. Moreover, the high level of integration of the steps in the whole process represents an important gain over other technologies that require separate processing steps.

In brief, the process described in the present work denotes several important benefits over other extrusion processes and pretreatment techniques described in the literature for biomass fractionation and enzyme accessibility improvement. On the one hand, the steps of alkaline treatment and neutralization are integrated in a single run, which provides the possibility to use directly the material in the second run without downstream operations. On the other hand, the solid loading level of the pretreated extrudate can be adjusted, so that a high solids material can be produced, which is a clear advantage against other pretreatment processes that use steam or other catalysts. Finally, the introduction of the enzymes in a second extrusion run provides an enhanced enzyme-substrate mixture, which results in a pretreated material with a fraction of carbohydrates already solubilized due to enzyme action, without carbohydrates losses. As a result, enzymatic hydrolysis at high solid loading level can be successfully performed, resulting in EH media containing high total sugar concentration up to 155 g/l available for fermentation to ethanol or other uses.

4. Conclusions

The results show the feasibility and effectiveness of the integrated combined alkali and enzymatic extrusion process to pretreat barley straw biomass for sugar production. After two sequential runs of alkaline plus enzymatic extrusion (bioextrusion), saccharification has already started in the produced bioextrudate. The bioextrudate can be incubated at high solid loading for sugar release, giving reasonably high sugar productions yields and concentration in EH media. These results support the great potential of this integrated process as pretreatment technology. Further studies should be carried out to test new enzymatic mixtures and evaluate its feasibility at a larger scale.

Acknowledgements

This work has been partially funded by the European Community Seventh Framework Programme under Grant agreement reference no. 227498 (BABETHANOL PROJECT). The authors want to thank the staff from Laboratoire de Chimie Agro-industrielle of INPT/ENSACIET (Toulouse, France) who contributed to the definition of screw profiles used in the extrusion runs.

References

- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861.
- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cara, C., Sáez, F., Castro, E., Manzanares, P., Negro, M.J., Oliva, J.M., 2011. Effect of water extraction on sugars recovery from steam exploded olive tree pruning. *Bioresour. Technol.* 102, 6611–6616.
- Cara, C., Moya, M., Ballesteros, I., Negro, M.J., González, A., Ruiz, E., 2007. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochem.* 42, 1003–1009.
- Carrillo, F., Lis, M.J., Colom, X., Lopez-Mesas, M., Valldeperas, J., 2005. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: kinetic study. *Process Biochem.* 40, 3360–3364.
- Dale, B.E., Weaver, J., Byers, F.M., 1999. Extrusion processing for ammonia fiber explosion (AFEX). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77, 35–45.
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M., 2013. Optimization of integrated alkaline-extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.* 48, 775–781.
- Eckard, A.D., Muthukumarappan, K., Gibbons, W., 2011. Pretreatment of extruded corn stover with polyethylene glycol to enhance enzymatic hydrolysis: optimization, kinetics and mechanism of action. *Bioenergy Resour.* 5, 424–438.
- European Standard Norm 15149, 2010. Solid Biofuels – Determination of Particle Size Distribution. European Committee for Standardization, Brussels.
- García-Aparicio, M.P., Oliva, J.M., Manzanares, P., Ballesteros, M., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J., 2011. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel* 90, 1624–1630.
- Jacquemin, L., Zeitoun, R., Sablayrolles, C., Yves-Pontalier, P., Rigal, L., 2012. Evaluation of the technical and environmental performances of extraction and purification processes of arabinoxylans from wheat straw and bran. *Process Biochem.* 47, 373–380.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., 2010a. Effect of extruder parameters and moisture content of switchgrass, prairie cord grass on sugar recovery from enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 1785–1803.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., 2010b. Influence of extruder temperature and screw speed on pretreatment of corn stover while varying enzymes and their ratios. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 264–279.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., 2011a. Optimization of switchgrass and extruder parameters for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Ind. Crops Prod.* 33, 188–199.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., 2011b. Optimization of alkali soaking and extrusion pretreatment of prairie cord grass for maximum sugar recovery by enzymatic hydrolysis. *Biochem. Eng. J.* 54, 71–82.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., 2011c. Influence of extruder and feedstock variables on torque requirement during pretreatment of different types of biomass: a response surface analysis. *Biosyst. Eng.* 109, 37–51.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., 2011d. Optimization of alkali, switchgrass and extruder parameters for maximum sugar recovery. *Chem. Eng. Technol.* 34, 1413–1426.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., Gibbons, W.R., 2012. Extrusion pretreatment of pine wood chips. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 81–99.
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., 2013. Thermo-mechanical pretreatment of feedstocks. In: Gu, T. (Ed.), *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*. Springer, Netherlands, pp. 31–65.
- Lamsal, B., Yoo, J., Brijwani, K., Alavi, S., 2010. Extrusion as a thermo-mechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass Bioenergy* 34, 1703–1710.
- Lee, S.H., Inoue, S., Teramoto, Y., Endo, T., 2010. Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process II: effect of hot-compressed water treatment. *Bioresour. Technol.* 101, 9645–9649.
- Lu, Y., Wang, Y., Xu, G., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, S., 2010. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 360–369.
- Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., González, A., Ballesteros, M., 2012. Biological conversion of forage sorghum biomass to ethanol by steam explosion pretreatment and simultaneous hydrolysis and fermentation at high solid content. *Biomass Conv. Bioref.* 2, 123–132.
- Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 522–550.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapfel, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96, 673–686.
- NREL, 2007. *Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures*. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO.
- Senturk-Ozer, S., Gecgilili, H., Kalyon, D.M., 2011. Biomass pretreatment strategies via control of rheological behavior of biomass suspensions and reactive twin screw extrusion processing. *Bioresour. Technol.* 102, 9068–9075.
- Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2011. Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. In: Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S.C., Dussap, C.-G., Gnansounou, E. (Eds.), *Biofuels*. Academic Press, Burlington, pp. 149–176.
- Uihlein, A., Schebek, L., 2009. Environmental impacts of a lignocellulose feedstock biorefinery system: an assessment. *Biomass Bioenergy* 33, 793–802.
- Um, B.-H., Choi, C.H., Oh, K.K., 2013. Chemicals effect on the enzymatic digestibility of rape straw over the thermo-mechanical pretreatment using a continuous twin screw-driven reactor (CTSR). *Bioresour. Technol.* 130, 38–44.
- Wang, W., Kang, L., Wei, H., Arora, R., Lee, Y.Y., 2011. Study on the decreased sugar yield in enzymatic hydrolysis of cellulose substrate at high solid loading. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 1139–1149.
- Yoo, J., Alavi, S., Vadlani, P., Amanor-Boadu, V., 2011. Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. *Bioresour. Technol.* 102, 7583–7590.
- Zhang, S., Keshwani, D.R., Xu, Y., Hanna, M.A., 2012. Alkali combined extrusion pretreatment of corn stover to enhance enzyme saccharification. *Ind. Crops Prod.* 37, 352–357.

ANEXO II

Protocolos de análisis de materiales del NREL

(Laboratory Analysis Procedure, LAP)

1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN (NREL/TP-510-42620)

Introducción

- Este procedimiento describe un método reproducible de convertir una variedad de muestras en un material uniforme adecuado para el análisis de composición. Todos los procedimientos LAP del NREL asumen que las muestras se han preparado cumpliendo estas especificaciones.
- Este procedimiento se aplicará siempre que el contenido en cenizas de la muestra a analizar sea superior a 5%.
- Este procedimiento describe métodos para el secado, reducción de tamaño, obtención de muestras con un tamaño de partícula uniforme y muestreo representativo de muestras de biomasa.

Ámbito

- Este método es adecuado para la preparación de la mayoría de los tipos de biomasa y sólidos derivados de biomasa para análisis de composición.
- Este procedimiento no está destinado a materiales que ya han pasado a través de un tamiz de número de malla 20 (850 µm).
- Este procedimiento no está destinado a materiales que no se pueden secar por los métodos descritos, hasta un contenido en sólidos totales de más de 85%.

Interferencias

- Este procedimiento produce muestras de biomasa con un intervalo de tamaño de partícula. Los procedimientos del NREL se ha optimizado para muestras con estos tamaños de partícula. Una desviación hacia un tamaño menor puede dar por resultado una desviación a la baja en el contenido en carbohidratos (y la consiguiente desviación al alta de la lignina) debido a una excesiva degradación de carbohidratos. Por el contrario, la utilización de un tamaño mayor puede dar también por resultado una desviación a la baja del contenido en carbohidratos (y la consiguiente desviación al alta de la lignina) debido a una hidrólisis incompleta de los polímeros.
- Este procedimiento produce muestras de biomasa con contenidos en humedad por debajo del 10%. Los procedimientos del NREL se ha optimizado para muestras con bajo contenido en humedad. Un elevado contenido en humedad de las muestras alterará la concentración efectiva de ácido en la etapa de hidrólisis con ácido concentrado. Esto a su vez dará lugar a una desviación a la baja del contenido en carbohidratos (y la consiguiente desviación al alta de la lignina) debido a una hidrólisis incompleta de los polímeros. Esta hidrólisis incompleta deja muchos azúcares oligoméricos que no son solubles en ácido al 4% y que se contabilizan incorrectamente como residuo insoluble en ácido, desviando el contenido en lignina hacia valores altos.
- Este procedimiento asume que no ocurre fraccionamiento químico durante las etapas de cribado y que la composición química de los finos separados de la muestra es similar a la composición de la muestra total.

Procedimiento

Preparar la muestra de biomasa utilizando uno de los siguientes métodos:

A) Método de preparación de secado al aire: Este método es adecuado para la preparación de grandes cantidades (>20 g) de muestra recogida en campo en una forma adecuada para el análisis. Este método es adecuado para secar materiales donde la humedad ambiental permite secar la muestra hasta un contenido en humedad por debajo del 10%.

1. Las muestras de biomasa deben contener piezas de dimensiones menores de 5x5x0,6 cm. Los tallos y ramas pequeñas no deben tener un diámetro superior a 0,6 cm. Los residuos como la paja y el papel para reciclado no deben sobrepasar los 20 cm de longitud para facilitar la molienda.
2. El material se debe extender en una superficie adecuada y dejar secar al aire antes del análisis. No amontonar el material a más profundidad de 15 cm. Voltear el material al menos una vez al día para asegurar un secado uniforme.
3. El material se considera que está seco cuando el contenido en humedad es menor de 10% y el cambio de peso es menor de 1% en 24 horas.
4. Moler la muestra secada al aire en un molino de cuchillas haciéndola pasar por un tamiz de tamaño 2 mm (nº de malla 10), procurando que no se calienten ni el molino ni la muestra.
5. Apilar los tamices en el siguiente orden, empezando por el fondo: nº de malla 80 (0,18-0,2 mm), nº de malla 20 (0,85- 1mm).
6. Colocar la biomasa molida en el tamiz de nº de malla 20. No colocar más de 7 cm de espesor. La muestra molida se puede procesar por tandas si fuera necesario.
7. Colocar la cubierta del tamiz superior y asegurar éste en el tamizador.
8. Tamizar en el tamizador durante 15 minutos.
9. La fracción retenida en el tamiz de nº de malla 20 (fracción + 20) debe ser reprocesada hasta que no quede biomasa en el tamiz de nº de malla 20.
10. La fracción retenida en el tamiz de nº de malla 80 (fracción -20/+80) se debe conservar para análisis composicional.
11. El material del recipiente del fondo constituye la fracción de finos (-80). Conservar este material para análisis de cenizas.
12. Combinar todas las fracciones de finos (-80) y homogeneizar. Este es el P₈₀.
13. Combinar todas las fracciones -20/+80, homogeneizar y pesar. Este es el peso P_{20/80}.
14. Determinar el contenido en sólidos totales de las dos fracciones , -20/+80 y la fracción de finos. Anotar como TS_{20/80} y TS₈₀.
15. Determinar el contenido en cenizas de cada fracción y anotar como Cenizas_{20/80} y Cenizas₈₀.
16. Utilizando las ecuaciones en el apartado de Cálculos, calcular el porcentaje de cada fracción en la muestra de biomasa original. El porcentaje de peso de cada fracción se utiliza para reconstruir la composición de la muestra de biomasa original. En la mayoría de los casos, la composición de la parte de biomasa que no son cenizas en la fracción de los finos, se puede asumir que es la misma que la composición de la parte de biomasa que no son cenizas en la fracción de -20/+80.
17. Si la muestra preparada no se analiza inmediatamente después de este procedimiento, la muestra se debe conservar en un recipiente herméticamente cerrado o en una bolsa de polietileno sellable y guardar a -20°C hasta su utilización.

B) Método de preparación de secado en estufa: Una alternativa aceptable al método de secado al aire es secar la biomasa en una estufa a temperaturas no superiores a 45°C. Este método es adecuado para una muestra muy húmeda que tiene riesgo de crecimiento microbiano durante el secado, muestras pretratadas húmedas, muestras que no serían estables durante una exposición prolongada a condiciones ambientales o para el secado de materiales cuando la humedad ambiental no permite alcanzar el contenido por debajo del 10% de humedad. Este método es adecuado para la preparación de pequeñas cantidades (<20 g) de muestra.

1. Seleccionar un recipiente adecuado para secado en estufa y poner a secar en a 45°C durante un mínimo de tres horas.
2. Poner el recipiente en un desecador, dejar enfriar a temperatura ambiente y pesar.
3. Poner la biomasa a secar en una capa no superior a 1 cm y pesar junto con el recipiente.
4. Secar el material en la estufa durante 24 a 48 horas. Enfriar y pesar.
5. Volver a poner a secar durante una hora, enfriar y pesar y así hasta que el peso varíe menos de un 1%.
6. Moler la muestra utilizando uno de los siguientes métodos:
 - Para muestras pequeñas (<20g), que no pasarían a través de un tamiz de número de malla de 20, reducir el tamaño de partícula mediante una molienda de cuchillo de toda la muestra con un tamiz de 1 mm. Si el tamaño de la muestra es suficiente, proceder a moler y a tamizar según el método A).
 - Para muestras grandes (>20 g), moler y tamizar según el método A).

C) Método de preparación de la muestra por liofilización (ver original)

Cálculos

- i. Para calcular el porcentaje de la fracción -20/+80, utilizar la siguiente ecuación:

$$\text{Fracción}_{20/80} \% = \frac{P_{20/80}}{P_{20/80} + P_{80}} \times 100$$

- ii. Para calcular el porcentaje de la fracción -80, utilizar la siguiente ecuación:

$$\text{Fracción}_{80} \% = \frac{P_{80}}{P_{20/80} + P_{80}} \times 100$$

Donde:

$P_{20/80}$ = peso de la fracción de gruesos, -20/80 (g)

P_{80} = peso de la fracción de finos, -80 (g)

- iii. Calcular el porcentaje de sólidos de la muestra mediante secado a 45°C, con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sólidos a } 45^{\circ}\text{C} = \frac{P_{\text{final, tara+muestra}} - P_{\text{tara}}}{P_{\text{inicial, tara+muestra}} - P_{\text{tara}}}$$

- iv. Para calcular la composición de un constituyente X en la muestra de biomasa original, utilizar la siguiente ecuación:

$$\% X_{\text{original}} = \% X_{-20/80} \times \% \text{ Fracción}_{-20/80} + [\% X_{-20/80} \times \frac{(100 - \% \text{ Cenizas}_{80} - \% \text{ Cenizas}_{-20/80})}{\% \text{ Fracción}_{80}}] \times$$

100

2. MÉTODO ESTANDAR PARA LA DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES EN LA BIOMASA

Las muestras de biomasa pueden contener grandes cantidades variables de humedad, que pueden cambiar rápidamente cuando se exponen al aire. Para que los resultados del análisis químico de este tipo de muestras sean significativos, éstos 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 a 105°C.

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 la muestra a 105°C hasta peso constante. Inversamente, el **contenido en humedad** de la muestra es la medida de la cantidad de agua (y otros componentes volatilizados a 105°C) presentes en la misma. Igualmente, por **peso seco en estufa (oven dry weight, ODW)** se entiende el peso de la biomasa corregido matemáticamente para la cantidad de humedad presente en la muestra en el momento de la pesada.

Interferencias

Este procedimiento no es adecuado para muestras de biomasa que cambian químicamente cuando se calientan, tales como muestras de biomasa ácidas o alcalinas.

Equipos

Estufa de secado por convección, con control de temperatura de 105 ±3°C

Balanza de precisión (0,1 mg)

Desecador con desecante

Platillo de aluminio

Analizador de humedad por infrarrojos (opcional, solo es necesario si se utiliza el procedimiento alternativo 2 de determinación de humedad con analizador de humedad por infrarrojos).

Muestras de ensayo

- Las muestras de biomasa adecuadas para análisis por este procedimiento son muestras sin preparamiento previo (según se reciben en el laboratorio), secadas al aire, molidas, muestras a las que se han extraído los extractivos, y la fracción sólida de muestras generadas durante el pretratamiento, fraccionamiento o fermentación de biomasa.
- La muestra de ensayo consistirá aproximadamente en 0.5 a 2 g de muestra, obtenida de manera tal que asegure que es representativa del lote completo de material a analizar.

Procedimiento 1

- Presecar los platillos de aluminio a 105°C durante un mínimo de cuatro horas. Enfriar los platillos en un desecador. Utilizar guantes o pinzas para manejar los platillos y pesarlos con precisión de 0,1 mg. Apuntar el peso.
- Mezclar bien la muestra y pesar en el platillo entre 0,5 a 2 g ($\pm 0,1$ mg) de muestra. Apuntar el peso de la muestra más el platillo. Se necesita como mínimo un duplicado.
- Poner un blanco. Un platillo sin muestra y seguir todos los pasos. La diferencia en peso debe ser menor a un 0,5% de error.
- *Opcional: Poner una muestra estándar por duplicado. Utilizar tartrato sódico y hacerlo por duplicado. La pérdida de peso del tartrato sódico debe ser 15,62% (83,38% de sólidos totales)*
- Poner la muestra en el horno a 105°C ± 3 °C durante un mínimo de cuatro horas. Sacar la muestra de la estufa y enfriarla en un desecador a temperatura ambiente. Pesar el platillo y la muestra y anotar el peso. Volver a introducir la muestra y el platillo en la estufa hasta que se alcance el peso constante. Se define peso constante como $\pm 0,1\%$ de cambio en el porcentaje de sólidos totales después de una hora de recalentamiento. Normalmente se requiere una noche para muestras húmedas.
- Sacar la muestra de la estufa y enfriarla en un desecador a temperatura ambiente.
- Pesar el platillo que contiene la muestra y anotar el peso.

Procedimiento 2

- Programar el analizador automático de humedad para una temperatura "standby" de 70°C, un análisis de temperatura de 105°C, y un punto final de menos de 0,05% de cambio en sólidos en un minuto.
- Encender los elementos del calentamiento por infrarrojos y dejarlos calentar durante aproximadamente 20 minutos. Operar el equipo una vez con una muestra que no importe y que se pueda desechar, para que los elementos cojan la temperatura.
- Presecar los platillos de aluminio a 105°C durante un mínimo de cuatro horas o desecarlos una vez sin muestra en el equipo de infrarrojos. Si los platillos se secan

en la estufa, enfriarlos en un desecador. Utilizar guantes o pinzas, colocar un platillo de aluminio en el platillo de la balanza y tarar la balanza.

- Rápida mente transferir de 1 a 2 gramos de la muestra al platillo de pesada. Extender la muestra igualmente sobre la superficie del disco de pesada. Analizar cada muestra por duplicado, como mínimo.
- Tan pronto como la balanza se estabilice, cerrar la tapa del equipo y seguir adelante con el análisis, siguiendo las instrucciones del manual del equipo.
- Una vez que la muestra se ha secado hasta peso constante, anotar el porcentaje de sólidos de la misma.

Cálculos (solo para el procedimiento 1)

- % Sólidos totales = [Peso de la muestra seca más el plato - peso del plato/Peso de muestra antes del secado] x 100
- Si se desea, se puede calcular también el % de humedad:

% Humedad = 100- % sólidos totales

- Para calcular la diferencia de porcentaje relativa (RPD) entre dos muestras, utilizar el siguiente cálculo

$$RPD = \frac{x_1 - x_2}{x_{media}} \times 100$$

Donde:

x_1 y x_2 son los valores medidos

x_{media} es la media de x_1 y x_2

- Para calcular la desviación cuadrática media, error cuadrático medio (desviación RMS) o desviación estándar de las muestras, utilizar los siguientes cálculos:

Primero calcular la media cuadrática o valor cuadrático medio:

$$RMS = x_m = media = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n}}$$

A continuación calcular la desviación cuadrática media, error cuadrático medio (desviación RMS) o desviación estándar, utilizando:

$$\text{Desviación RMS} = \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Donde :

x_m es el valor cuadrático medio de todos los valores x del grupo de muestras

n es el número de muestras en el grupo

x_i es un valor medido del grupo de muestras

3. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES Y LIGNINA EN BIOMASA (NREL/TP-510-42618)

Introducción

- Los carbohidratos y la lignina constituyen la mayor parte de las muestras de biomasa. Los carbohidratos pueden ser estructurales o no estructurales; los estructurales están unidos en la matriz de la biomasa, mientras que los no estructurales se pueden separar utilizando etapas de extracción o lavado. La lignina es un polímero fenólico complejo.
- Este procedimiento es adecuado para muestras que no contienen extractivos. Este procedimiento utiliza una hidrólisis ácida en dos etapas para fraccionar la biomasa en formas que son más fácilmente cuantificables. La lignina se fracciona en material insoluble en ácido y material soluble en ácido. El material insoluble en ácido puede incluir también cenizas y proteínas, que deben ser tenidos en cuenta durante el análisis gravimétrico. La lignina soluble en ácido se mide por espectroscopía UV-VIS. Durante la hidrólisis, los carbohidratos poliméricos se hidrolizan en sus formas monoméricas, que son solubles en el líquido de hidrólisis. A continuación se miden por HPLC. Las proteínas también pueden separar en la fracción líquida. Es necesario realizar una medida del contenido en grupos acetilo para las muestras de biomasa que contienen hemicelulosas con un esqueleto de xilanos, pero no en las biomásas que contienen esqueletos de mananos. El acético se mide por HPLC.

Ámbito del procedimiento

- Este procedimiento es adecuado para muestras libres de extractivos, que incluyen biomásas que se han extraído utilizando el procedimiento LAP correspondiente, así como sólidos del proceso que no contienen extractivos. Los resultados se dan sobre la base del peso seco en estufa. Los resultados se pueden dar sobre la base de la muestra según se recibió en el laboratorio, o en una base libre de extractivos, dependiendo del tipo de biomasa utilizada. Antes de utilizar este procedimiento, se debe preparar la biomasa según el método “Preparación de muestras para el análisis de composición de la biomasa”.
- Este procedimiento es adecuado para biomásas que contienen los componentes enumerados durante todo el procedimiento. Cualquier biomasa que contenga otros componentes no enumerados que puedan interferir, debe ser investigada adicionalmente.

Terminología

- *Peso seco en estufa* - El peso de la biomasa corregido matemáticamente para la cantidad de humedad en la muestra en el momento de la pesada.
- *Biomasa preparada* - Biomasa preparada según el LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis”.
- *Biomasa libre de extractivos* - Biomasa después de una extracción exhaustiva con agua y etanol (ver el correspondiente LAP para extractivos)
- *Lignina insoluble en ácido*- El residuo que queda en un crisol de filtración de porosidad media después de dos etapas de hidrólisis, con corrección para las cenizas insolubles en ácido y las proteínas insolubles en ácido.
- *Carbohidratos estructurales*- Carbohidratos poliméricos, es decir, celulosa y hemicelulosa.
- *Componentes no estructurales*- Componentes de la biomasa que no están unidos químicamente, que incluyen, pero no están limitados a sacarosa, nitratos/nitritos, proteínas, cenizas, clorofilas y ceras.

Interferencias

- Este procedimiento ha sido optimizado para el tamaño de partícula especificado en el LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis”. Una desviación a un tamaño de partícula menor puede dar como resultado una desviación a la baja del contenido en carbohidratos (y una consiguiente desviación al alta del contenido en lignina), debido a una excesiva degradación de carbohidratos. Una desviación a un tamaño de partícula mayor puede dar como resultado una desviación a la baja del contenido en carbohidratos (y una consiguiente desviación al alta del contenido en lignina), debido a una incompleta hidrólisis de los azúcares poliméricos a azúcares monoméricos.
- Las muestras que contienen extractivos no son adecuadas para este procedimiento. Los extractivos se separarán de forma irreproducible, dando como resultado una desviación de lignina al alta.
- Este procedimiento no es adecuado para las muestras que contienen ácido, base o catalizador.

Las muestras que contienen un contenido en humedad de 10% o superior pueden no ser adecuadas para este método, puesto que el exceso de humedad interferirá con las

concentraciones adecuadas de ácido. Las muestras se deben secar (al aire o en una estufa a menos de 40°C), antes de este procedimiento. Las muestras secadas a 45°C o temperaturas superiores no son adecuadas para este procedimiento.

- Las muestras con un contenido en cenizas superior al 10% no son adecuadas para este procedimiento, ya que la muestra puede contener restos de suelo u otros minerales que interferirán con las concentraciones de ácido adecuadas y pueden catalizar reacciones secundarias.
- Las muestras que contienen proteínas desviarán el contenido en lignina al alta, a menos que se justifiquen en la determinación gravimétrica del material insoluble en ácido. Se requiere un análisis independiente de nitrógeno para estimar el contenido en proteínas del residuo. A continuación las proteínas estimadas se sustraen de la medida del residuo insoluble en ácido. La separación física de la proteína insoluble en ácido de la lignina insoluble en ácido está fuera del ámbito del objetivo de este procedimiento.

Preparación de la muestra

- Antes de este análisis se debe llevar a cabo el procedimiento “Preparación de muestras de análisis composicional de biomasa”. Las muestras deben tener un mínimo de 85% de contenido en sólidos totales.

Procedimiento

A) Preparación de la muestra para el análisis e hidrólisis

1. Pesar $0,3 \pm 0,01$ g de la muestra libre de extractivos y poner en un “tubo de presión” (tubos especiales de cristal y tapa de teflón, Ref. Z566268) Al mismo tiempo se debe llevar a cabo la determinación de sólidos totales, para medir con precisión el porcentaje de sólidos para corrección. Hacerlo por duplicado como mínimo.
2. Añadir $3,00 \pm 0,01$ mL ($4,92 \pm 0,01$ g) de H_2SO_4 al 72%, y agitarlo con una varilla de agitación de teflón durante 1 min hasta que esté completamente impregnado.
3. Poner el “tubo de presión” en un baño a $30 \pm 1^\circ C$ y mantenerlo 60 minutos \pm 5 minutos.
4. Agitar la muestra cada 5-10 min con la varilla de agitación, sin sacar el “tubo de presión” del baño, para asegurar una mezcla completa.
5. Una vez transcurridas la hora de hidrólisis, sacar los “tubos de presión” del baño. Diluir a 4% la concentración de ácido añadiendo $84,00 \pm 0,04$ mL de agua desionizada, utilizando una bureta automática. También se puede realizar la dilución añadiendo $84 \pm 0,04$ g de agua purificada, utilizando una balanza de precisión de 0,01 g. El peso total añadido al “tubo de presión tarado” es 89,22 g (0,3 de muestra, 4,92 g de H_2SO_4 al 72%, y 84,00 g de agua desionizada). Puesto que la densidad de la solución de 4% de ácido es 1,0250g/mL, el volumen total de la solución (V_f) es 87,0 mL.
6. Preparar una serie de estándares de recuperación de azúcares (SRS), que se manejarán durante el resto de la hidrólisis y se utilizarán para corregir las pérdidas debidas a la destrucción de azúcares durante la hidrólisis con ácido diluido. SRS deben incluir glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa. Las concentraciones de azúcares se deben elegir lo más parecidas posibles a la concentración de azúcares en la muestra. Pesar la cantidad requerida de cada azúcar, con una precisión de 0,1 mg y añadir 10 mL de agua desionizada. Añadir 348,5 μ l de ácido sulfúrico al 72%. Transferir al tubo y cerrar fuertemente.
7. No se requiere un SRS recién preparado para cada análisis. Se puede producir una gran cantidad de SRS, filtrar a través de filtros de 0,2 μ m, repartir en alícuotas de 10 mL en

recipientes sellados y etiquetar. Se pueden conservar en un congelador y sacar cuando se necesiten. Descongelar y agitar antes de utilizar. Si se utilizan SRS congelados, se debe añadir la correspondiente cantidad de ácido a la muestra descongelada y agitar antes de añadir al tubo

8. Cerrar cada una de los “tubos de presión” e introducirlas en el autoclave.
9. Meter en autoclave las muestras (cerrar los tubos de presión) durante 1 h. a $121^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$.
10. Después de que acaba el autoclave dejar enfriar los “tubos de presión” 20 min a temperatura ambiente antes de abrirlas.

B) Análisis de la muestra para lignina ácido insoluble

1. Preparar una serie de crisoles de fondo poroso (15 micras) y calentar a 575°C durante un mínimo de cuatro horas. Sacar los crisoles de la mufla a un desecador y dejar enfriar durante un mínimo de una hora. Pesar y anotar la pesada. Repetir el calentamiento hasta conseguir un peso constante después de enfriar. Se define el peso constante como un cambio de $\pm 0,3$ mg en el peso después de una hora de recalentar el crisol.
2. Filtrar las muestras utilizando los crisoles de porcelana con fondo poroso de filtración de “porosidad media”. Recoger el filtrado en un matraz.
3. Transferir una alícuota de aproximadamente 50 mL a una botella para conservación de la muestra. Esta muestra se utilizará para determinar la lignina soluble en ácido, así como los carbohidratos y el ácido acético si es necesario. La lignina soluble en ácido se debe hacer en un periodo de seis horas desde la hidrólisis. Si el líquido de hidrólisis se debe conservar, este se debe guardar en una nevera durante un máximo de dos semanas.
4. Utilizar agua desionizada para transferir todos los sólidos del “tubo de presión” al dispositivo de filtración. Lavar los sólidos en el filtro con un mínimo de 50 mL de agua desionizada, si se quiere caliente (para disminuir el tiempo de filtración).
5. Introducir crisoles de porcelana de fondo poroso (crisol) previamente tarado. Secar el crisol de filtración y su contenido a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas, o hasta peso constante.
6. Enfriar en desecador y anotar el peso, del crisol, lignina ácido insoluble, y cenizas ácido insolubles, con una precisión de 0,1 mg.
7. Poner el crisol y su contenido en una mufla y calentar a $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$ durante un mínimo de 3 horas, o hasta que se ha eliminado el carbono. Calentar lentamente ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$), para evitar la aparición de llamas.
8. Secar en desecador y anotar el peso del crisol y las cenizas ácido insolubles, con precisión de 0,1 mg.

C) Análisis de la muestra para lignina ácido soluble

1. En un espectrofotómetro UV-VIS hacer un fondo con agua desionizada o ácido sulfúrico al 4%.
2. Utilizando el líquido de hidrólisis obtenido en la etapa anterior medir la absorbancia de la muestra a en el espectrofotómetro a la longitud de onda adecuada (ver Tabla más abajo, en cálculos) Diluir la muestra para llevar la absorbancia en el intervalo de 0,7-1,0, anotando la dilución. Se debe utilizar agua desionizada o ácido sulfúrico para diluir la muestra, pero el blanco se debe diluir de la misma forma. Analizar cada muestra por duplicado, como mínimo (Este análisis se debe realizar en seis horas desde la generación del hidrolizado).
3. Calcular el porcentaje en lignina soluble en ácido siguiendo los cálculos descritos en el punto 2 del Apartado Cálculos.

D) Análisis de la muestra para carbohidratos estructurales

1. Preparar una serie de estándares de calibración para una curva de calibrado en el HPLC siguiendo el punto 6 del apartado A). Se sugiere un intervalo de calibración de 0.1-4 mg/mL.
2. Preparar un estándar de verificación de calibración (CVS) independiente para cada grupo de estándares de calibración. Utilizar reactivos de una fuente distinta de la utilizada en la preparación de los estándares de calibración. Preparar el CVS en una concentración que se encuentre en la mitad del intervalo validado de la curva de calibración (se sugiere 2,5 mg/mL). Los CVS se deben analizar en el HPLC después de cada grupo de calibración y a intervalos regulares a lo largo de la secuencia de muestras. Los CVS se utilizan para verificar la calidad y estabilidad de las curvas de calibración a lo largo del ensayo.
3. No se necesita una tanda de estándares recién preparados para cada análisis. Se puede preparar una gran serie de estándares, filtrar a través de filtros de 0,2 µm en viales, sellar y etiquetar. Los estándares y el CVS se pueden guardar en un congelador y utilizar según se necesiten. Descongelar cada vez y agitar antes de su utilización. Observar los estándares y CVS en cuanto a una concentración inusual.
4. Transferir aproximadamente 20 mL de cada filtrado del apartado 2B) a un matraz de 50 mL.
5. Neutralizar con carbonato cálcico hasta llegar a un pH de 5-6. No sobreneutralizar. Añadir la base despacio y agitando frecuentemente para evitar problemas con la formación de espuma. Ir controlando el pH con papel pH para evitar la sobreneutralización (>6). Después de alcanzar un pH de 5-6, detener la adición de carbonato, dejar que se estabilice la muestra y retirar el sobrenadante por decantación. El pH del líquido debe ser entonces de aproximadamente 7. (Nunca se debe exceder un pH de 9).
6. Filtrar el hidrolizado neutralizado utilizando una jeringa con un filtro de 0,2 µm en un vial. Cerrar y etiquetar. Preparar cada muestra por duplicado, reservando uno de los duplicados para analizar más tarde si es necesario. Si se necesita, las muestras neutralizadas se deben guardar en la nevera durante tres o cuatro días. Después de conservar en frío, comprobar que no haya precipitados en la muestra. Si es así, se deben volver a filtrar, mientras están frías, a través de filtros de 0,2 µm.
7. Analizar en el HPLC los estándares de calibración, las muestras y los CVS, utilizando una columna CARBOsep CHO-682 LEAD (Transgenomic, Omaha, NE), operando a 80 °C, con agua Milli-Q water (Millipore) como fase móvil (0,5 mL /min).
8. Comprobar los cromatogramas de la muestra para la presencia de celobiosa y oligosacáridos. Los niveles de celobiosa mayores de 3 mg/mL indican una hidrólisis completa.
9. Comprobar los cromatogramas en cuanto a la presencia de picos que eluyen antes de la celobiosa. Estos picos pueden indicar altos niveles de productos de degradación, lo cual es indicativo de autohidrólisis.

E) Análisis de las muestras para contenido en acetilo, si es necesario

Ver más adelante en punto 6.

Cálculos

Calcular el peso de residuo insoluble en ácido (RIA) y lignina insoluble en ácido (LIA) de la siguiente manera:

$$\% \text{RIA} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{el residuo a } 105^{\circ}\text{C} - \text{peso crisol}}{\text{Peso de la muestra referida a Ps a } 105^{\circ}\text{C}} \times 100$$

Peso de la muestra referida a Ps a 105°C

$$\% \text{LAI} = \frac{[(\text{Peso del crisol} + \text{el residuo a } 105^{\circ}\text{C}) - \text{peso crisol}] - [(\text{peso crisol} + \text{cenizas}) - \text{peso crisol}] - \text{peso proteínas}}{\text{Peso de la muestra referida a Ps a } 105^{\circ}\text{C}} \times 100$$

Donde:

- % LAI es el residuo ácido insoluble, corregido con las cenizas [(peso crisol+cenizas)-peso crisol] y el peso de las proteínas, donde:
- Peso proteínas es la cantidad de proteínas en el residuo insoluble en ácido, determinado según el LAP: Determinación de proteínas en biomasa. Esta medida solo es necesaria cuando las muestras tengan un elevado contenido en proteínas.

Calcular la cantidad de lignina soluble en ácido (LAS) según la fórmula:

$$\% \text{LAS} = \frac{A \times \text{Volumen del filtrado} \times \text{Dilución}}{\epsilon \times \text{Peso seco muestra referido a Ps a } 105^{\circ}\text{C}} \times 100$$

Donde:

A= Absorbancia de la muestra a la correspondiente longitud de onda

Df = factor de dilución

ϵ = coeficiente de absorptividad de la biomasa a longitud de onda específica (ver Tabla a continuación)

Tipo de biomasa	Longitud de onda recomendada (nm)	Coficiente de absorptividad a la longitud de onda recomendada
Corn stover	320	30
Chopo	240	25
Bagazo	240	25
Pino	240	12

Calcular la cantidad total de lignina como la suma de la lignina ácido insoluble y la ácido soluble.

Crear una curva de calibración mediante análisis correlación lineal para cada azúcar a cuantificar. A partir de estas curvas, determinar la concentración en mg/mL de los azúcares presentes en cada solución analizada por HPLC.

Calcular la cantidad de azúcar recuperado de cada estándar de recuperación de azúcares (ver punto A.6 del procedimiento) a lo largo de la etapa de hidrólisis con ácido diluido. Este valor será una estimación de la cantidad de cada azúcar individual destruido durante el procedimiento de hidrólisis:

$$\% R = \frac{C_2}{C_1} \times 100\%$$

Donde:

% R = % de recuperación del estándar de recuperación de azúcares.

C_1 = concentración conocida del estándar de recuperación de azúcares antes de la hidrólisis, en mg/mL.

C_2 = concentración del estándar de recuperación de azúcares detectada por HPLC después de la hidrólisis, en mg/mL.

Corregir los valores de concentración de azúcares (en mg/mL) obtenidos por HPLC para cada azúcar, determinados en la muestra hidrolizada:

$$C_{\text{corr.}} = \frac{C_{\text{HPLC}}}{\% R} \times 100$$

Donde:

C_{corr} = concentración de azúcar corregida con los estándares de recuperación de azúcares en la muestra hidrolizada.

C_{HPLC} = concentración de azúcar por HPLC

% R determinado en el punto 2.

7. Calcular la concentración de azúcares poliméricos a partir de la concentración de monómeros corregida (punto 6 anterior), utilizando una corrección de 0,90 (162/180) por la pérdida de una molécula de agua para azúcares C-6 (glucosa, galactosa y manosa) y de 0,88 para C-5 (xilosa, arabinosa)

$$C_{\text{azúcar polímero}} = C_{\text{corr}} \times \text{factor corrección}$$

8. Para una muestra liofilizada, secada al aire, en estufa, o muestras que no requieran preparación, calcular el % de cada azúcar en base al peso seco de la muestra inicial de la siguiente manera:

$$\% \text{ azúcar} = \frac{C_{\text{azúcar polímero}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times V_F}{\text{Peso seco muestra referido a Ps } 105^{\circ}\text{C}} \times 100\%$$

Donde:

V_F = Volumen de filtrado, 87,0 mL

Corregir el % de componente en base libre de extractivos, calculado antes, a una base de peso seco inicial (sin extracción) a 105°C:

% de azúcar, lignina, acetilos...

en muestra inicial = % determinado en libre de extractivos $\times \frac{100 - \% \text{ de extractivos}}{100\%}$

Estadísticos del análisis

- Para calcular la diferencia de porcentaje relativa (RPD) entre dos muestras, utilizar el siguiente cálculo

$$\text{RPD} = \frac{x_1 - x_2}{x_{\text{media}}} \times 100$$

Donde:

x_1 y x_2 son los valores medidos

x_{media} es la media de x_1 y x_2

- Para calcular la desviación cuadrática media, error cuadrático medio (desviación RMS) o desviación estándar de las muestras, utilizar los siguientes cálculos:

Primero calcular la media cuadrática o valor cuadrático medio:

$$\text{RMS} = x_m = \text{media} = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n} \right)}$$

A continuación calcular la desviación cuadrática media, error cuadrático medio (desviación RMS) o desviación estándar, utilizando:

$$\text{Desviación RMS} = \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Donde:

x_m es el valor cuadrático medio de todos los valores x del grupo de muestras

n es el número de muestras en el grupo

x_i es un valor medido del grupo de muestras

4. DETERMINACION DE CENIZAS EN BIOMASA (NREL/TP-510-42622)

- La cantidad de material inorgánico en la biomasa, bien sea estructural o extraíble, debería medirse como un aparte de la composición total. Las cenizas estructurales es el material inorgánico que está unido en la estructura física de la biomasa, mientras que las cenizas extraíbles son el material inorgánico que se puede extraer lavando o extrayendo el material.
- 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.
- Antes de este análisis se debe llevar a cabo el procedimiento "Preparación de muestras de análisis composicional de biomasa".
- Las muestras se deben haber secado a 105°C según el LAP 001, antes del ensayo de cenizas. También se puede utilizar material secado al aire, pero en este caso se debe corregir su contenido en humedad antes de calcular el contenido en cenizas.

Procedimiento

1. Utilizar crisoles de porcelana., marcados con algún tipo de identificador. Determinar la tara del crisol, introduciendo el crisol vacío en la mufla a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ hasta peso constante (mínimo 4 horas). Enfriar el crisol a temperatura ambiente en un desecador y pesar con precisión de 0,1 mg. Si se utiliza un crisol de porcelana es recomendable calentar el crisol durante al menos cuatro horas, enfriar, pesar y volver a calentar durante otra hora más, o hasta que el peso de la tara varíe menos de 0,3 mg.
2. Pesar de 0,5 a 2,0 g y anotar el peso descontando la tara del crisol (P_1). Introducir el crisol en la mufla a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ durante 6 horas. Calentar lentamente y evitar sobrepasar la temperatura. Si la muestra tiende a encenderse, cubrir parcialmente el crisol. Este procedimiento se ha comprobado que da resultados similares a la utilización de una mufla con rampa de calentamiento
3. Enfriar el crisol a temperatura ambiente en un desecador y pesar con precisión de 0,1 mg. Descontar el peso del crisol y apuntar como P_2 .

Cálculos

1. Para muestra secadas a 105°C:
 $\% \text{ cenizas} = (P_2/P_1) \times 100$
2. Para muestras secadas al aire:
 $\% \text{ de cenizas} = [P_2/(P_1 \times T/100)] \times 100$

Donde: T = % de sólidos de la muestra, en base al peso seco a 105°C (LAP-001).

5. DETERMINACION DE EXTRACTIVOS EN BIOMASA (NREL/TP-510-42619)

Introducción

Es necesario separar el material no estructural de la biomasa antes del análisis para prevenir interferencias con las posteriores etapas del análisis. Este procedimiento utiliza una extracción en dos etapas para extraer el material soluble en agua y etanol. El material soluble en agua puede incluir material inorgánico, azúcares no estructurales y material nitrogenado, entre otros. El material inorgánico en el material soluble en agua puede venir tanto de la biomasa como de cualquier material soluble asociado con la biomasa, tal como suelo o fertilizante. El material soluble en etanol incluye clorofila, ceras, u otros componentes minoritarios. Algunas biomasa pueden requerir ambas etapas de extracción, mientras que otras biomasa quizás solo requieran una extracción exhaustiva con etanol. La decisión de utilizar una o dos etapas en la extracción se debe hacer en base al tipo de biomasa.

La extracción en dos etapas se utiliza para cuantificar extractivos en muestras de biomasa que contienen una cantidad significativa de material soluble en agua, o un material que contiene componentes solubles en agua de interés. El residuo del procesado del maíz es un ejemplo de biomasa que se debe someter a un proceso de extracción en dos etapas, ya que la parte soluble de la biomasa es significativa y el material soluble en agua incluye carbohidratos cuantificables. En general, si se trata de biomasa herbáceas, se realizarán las dos etapas de extractivos: agua y etanol; si son maderas, solo se realizará la extracción con etanol.

Las extracciones solo con etanol se deben utilizar para muestras que no tienen, o tienen poco, material extraíble en agua o cuando no se necesita cuantificar los componentes solubles en agua. Ejemplos incluyen a las maderas duras y las maderas blandas. Estas muestras se deben someter solo a una extracción con etanol.

Este procedimiento no se debe aplicar a otros tipos de biomasa sin las oportunas investigaciones respecto a la aplicabilidad del método, incluyendo muestras con grasas parcialmente solubles en etanol.

Terminología

Extractivos. – El material en una muestra de biomasa que es soluble o bien en agua o en etanol durante una extracción exhaustiva. Los extractivos incluyen los componentes no estructurales de una muestra de biomasa que pueden potencialmente interferir con el posterior análisis.

Biomasa libre de extractivos. – Biomasa después de una extracción exhaustiva en agua y etanol.

Componentes no estructurales. – Componentes de la biomasa unidos no químicamente que incluyen, pero no están limitados a sacarosa, nitratos/nitritos, proteínas, cenizas, clorofila y ceras

Extracción exhaustiva. – Para extracción Soxhlet en agua, 6-24 horas; para extracción con etanol, 24 h.

Interferencias

- Las muestras con moho o envejecidas pueden contener materiales estructurales que han sido modificados y que ahora son solubles en agua o etanol
- Un fallo en la retirada de los materiales extraíbles puede dar como resultado un error en los valores de azúcares estructurales. Los extractivos hidrófobos inhiben la penetración del ácido sulfúrico en la muestra dando por resultado una hidrólisis incompleta.

- Un fallo en la retirada del material extraíble puede dar lugar a valores de lignina falsamente elevados cuando los carbohidratos no hidrolizados se condensan con la lignina insoluble en ácido.

Procedimiento-Método Soxhlet

Muestra

La muestra debe ser de 2 a 10 gramos de muestra molida. La cantidad de muestra necesaria dependerá de la densidad de la biomasa.

1. Secar el dedal de extracción del Soxhlet y el matraz de fondo redondo a 105°C hasta peso constante. Secar a temperatura ambiente en un desecador y añadir perlas de ebullición al matraz, etiquetar y pesar con precisión de 0,1 mg.
2. Pesar el matraz o recipiente de recogida de muestra, con una precisión de 0,1 mg.
3. Añadir cuidadosamente la muestra al dedal (2-10 g), procurando no llenar el dedal hasta el borde (dejar aproximadamente 1 cm). La cantidad de muestra necesaria dependerá de la densidad de la biomasa. La altura de la biomasa en el dedal no debe exceder la altura del tubo sifón del Soxhlet. Si la altura de la biomasa excede la altura del sifón, tendrá lugar una extracción incompleta. Si se produce mucha espuma durante la extracción, añadir una trampa "bump" de 250 mL entre el matraz y el tubo Soxhlet.

EXTRACTIVOS EN AGUA

4. Montar el aparato Soxhlet utilizando 190 ± 5 mL de agua grado HPLC. Insertar el dedal y calentar a reflujo durante 6-24 horas. Periódicamente chequear la velocidad de reflujo y ajustar la velocidad de calentamiento para se produzcan de 4 a 5 cambios de disolvente por hora. En biomosas como el residuo del maíz el tiempo de reflujo es de aproximadamente 8 horas, y cualquier material residual soluble en agua se extraerá durante la extracción con etanol.
5. Una vez completado el tiempo de extracción, desconectar la manta calefactora y dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Si se va a realizar una posterior extracción con etanol, dejar el dedal en el extractor Soxhlet, extrayendo tanta agua residual como sea posible. Si no se necesita una extracción con etanol, retirar el dedal y transferir los sólidos extraídos, tan cuantitativamente como sea posible, en un papel de filtro de celulosa. Lavar los sólidos con aproximadamente 100 mL de agua HPLC. Dejar secar los sólidos utilizando filtración a vacío o secado al aire.
7. Transferir el agua a un matraz volumétrico de 200 mL. Enrasar y mezclar bien. Tomar una alícuota de 10 mL y analizar para el contenido en sacarosa y azúcares. Devolver los 190 mL de agua al matraz de fondo redondo.

EXTRACTIVOS EN ETANOL

8. Añadir 190 ± 5 mL de alcohol en un matraz de fondo redondo previamente tarado y colocar en la manta calefactora, teniendo en cuenta que se deben producir 6-10 cambios de alcohol a la hora.
9. Someter a reflujo entre 16 y 24 horas. El tiempo del reflujo dependerá de la velocidad de solubilización de los componentes de interés, la temperatura de los condensadores y la velocidad de recambio del solvente.
10. Cuando se complete el tiempo de reflujo, desconectar la calefacción de la manta y dejar enfriar a temperatura ambiente.

11. Retirar el dedal y lavar con aproximadamente 100 mL de alcohol. Dejar secar los sólidos utilizando filtración a vacío o al aire.

Procedimiento-Método extracción automática

1. Secar los tubos de recogida, pero no las tapas de plástico o septos, a 105°C durante un mínimo de 12 horas. Sacar y dejar enfriar a temperatura ambiente en un desecador. Pesar los tubos.
2. Colocar dos filtros de vidrio de tamaño adecuado en el fondo de una célula de extracción. Por otra parte, se puede introducir en el fondo de la célula de extracción un filtro individual de polipropileno de tamaño adecuado. Se puede utilizar un filtro de polipropileno para cortar los filtros (Sigma-Aldrich, catálogo #Z557722, W102 cm factor de actividad de permeabilidad 60 cfm. No se deben utilizar filtros de polipropileno para disolventes incompatibles, tales como hexano.
3. Añadir 1-10 g de muestra a la célula de extracción tarada. Anotar el peso. La cantidad de muestra dependerá de la densidad de la biomasa. No empaquetar la biomasa fuertemente, ni emplear rellenos inertes para rellenar el volumen muerto si se requiere un posterior análisis. Atornillar fuertemente los extremos de la célula. Colocar la célula en el extractor automático, asegurándose de que el extremo de los filtros está en el fondo.
4. Analizar la muestra para extractivos en agua y etanol, como sigue:
 - Crear un método en el software del extractor automático. Utilizando el sistema ASE del Dionex, programar los siguientes parámetros:
 - Presión: 1500 Psi
 - Temperatura: 100°C
 - Tiempo de precalentamiento: 0
 - Tiempo de calentamiento: 5 minutos
 - Tiempo estático: 7 minutos
 - Volumen "flush": 150%
 - Ciclos estáticos: 3 (Nota: si se utilizan células de 33 mL, un volumen "flush" de 150% y tres ciclos estáticos pueden desbordar el vial de recogida. Programar un ciclo estático por vial de recogida, si fuese necesario.
 - Archivar un programa para 100% agua, si se quiere, y otro para etanol.
 - Analizar cada muestra con el método deseado. Para evitar rellenarlos viales de recogida para purga cuando se está haciendo extracciones secuenciales en agua y etanol en un gran número de muestras, extraer todas las muestras con agua y a continuación extraer todas las muestras con alcohol.
 - Dejar que la célula de extracción se enfríe a temperatura ambiente. Retirar la muestra de la célula y dejar secar los sólidos al aire.
 - Una vez que el tubo se ha enfriado, transferir el agua a un matraz de 50 mL. Enrasar y mezclar bien. Tomar una alícuota de 5 mL y analizar en HPLC. Devolver los restantes 45 mL en el tubo de extracción. Este volumen retirado se debe compensar durante los cálculos.

Evaporación del disolvente de los extractivos (aplicable a los dos métodos)

1. Combinar los disolventes de las extracciones Soxhlet en el matraz de fondo redondo. En la extracción automática, sacar los viales del equipo.
2. El disolvente se puede separar del extracto utilizando cualquier dispositivo adecuado para evaporar agua y etanol, como por ejemplo, un rotavapor equipado con un baño a 40°C y una fuente de vacío. Una vez evaporado todo el disolvente, poner el matraz en

una estufa a 40°C durante 24 horas. Enfriar a temperatura ambiente en un desecador y pesar.

Cálculos

1. Calcular el peso seco de la muestra, utilizando el dato del contenido en sólidos:

$$\text{Peso seco (PS)} = \frac{(\text{Peso dedal y muestra} - \text{peso dedal}) \times \% \text{ de sólidos totales}}{100}$$

$$\% \text{ de extractivos} = \frac{\text{Peso matraz de recogida más residuo} - \text{peso del matraz}}{\text{PS}} \times 100$$

Si se ha tomado muestra para medir el contenido en sacarosa, utilizar esta fórmula que incluye una corrección para el volumen de muestra retirado:

$$\% \text{ de extractivos} = \frac{\text{Peso matraz de recogida más residuo} - \text{peso del matraz}}{\text{PS}} \times \frac{200 \text{ mL}}{190 \text{ mL}} \times 100$$

Estadísticos del análisis

- Para calcular la diferencia de porcentaje relativa (RPD) entre dos muestras, utilizar el cálculo descrito en los métodos anteriores.
- Para calcular la desviación cuadrática media, error cuadrático medio (desviación RMS) o desviación estándar de las muestras, utilizar los cálculos descritos en los métodos anteriores.

6. DETERMINACION DE GRUPOS O-ACILO EN BIOMASA MEDIANTE HPLC

Introducción

Los grupos alifáticos presentes en maderas y materiales herbáceos son grupos acetilo y formilo que se pueden combinar como grupos O-acilo con la parte polisacáridica. Este método emplea una hidrólisis ácida diluida para separar los grupos O-acilo de los polisacáridos. A continuación se cuantifican los ácidos acético y fórmico mediante HPLC.

El protocolo de este método utiliza el hidrolizado generado en el método LAP-002. Se debe tener especial cuidado en las etapas posteriores al autoclave en el LAP-002, para asegurar que no se pierden componentes volátiles. Todos los resultados se expresan relativos al peso seco a 105°C de la muestra; si son materiales donde se ha hecho una extracción, los resultados se pueden dar también en base al peso libre de extractivos.

Procedimiento

1. Una vez sacadas las muestras hidrolizadas del autoclave (como parte del procedimiento de determinación de carbohidratos), dejar enfriar los contenidos de los “tubos de presión” durante 20 minutos a temperatura ambiente. Agitar vigorosamente el contenido de los “tubos de presión” y dejar enfriar más, hasta que el contenido esté a temperatura ambiente y los sólidos depositados en el fondo.
2. Abrir los “tubos de presión” y con una jeringa desechable, tomar inmediatamente 1,5 mL de muestra, teniendo cuidado nuevamente de no remover los sólidos depositados en el fondo. Filtrar esta muestra rápidamente a través de un filtro de 0,2 µm en un vial y cerrar inmediatamente.
3. Prepara una serie de estándares de calibración con agua desionizada para hacer una curva de calibración de cada compuesto de interés. Un esquema sugerido para una columna HPX-87H es preparar una serie de estándares multi-componentes que contengan ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico, en el intervalo de 0,02 a 0,5 mg/mL.
4. Preparar un estándar de verificación de la calibración (CVS) independiente, utilizando productos químicos de diferente procedencia que los utilizados en los estándares de calibración. Este estándar debe contener cantidades precisas de cada componente contenido en los estándares de calibración, en una concentración intermedia del rango validado de la curva de calibración. Se debe medir después de cada curva de calibración y a intervalos regulares en la secuencia de HPLC. Este estándar se utiliza para verificar la calidad de la curva de calibración a lo largo del experimento de HPLC.
5. Analizar las muestras utilizando una columna HPX-87H de BioRad y las siguientes condiciones instrumentales:
Volumen de muestra:
Eluyente: ácido sulfúrico 0,01 N filtrado por un filtro de 0,2 µm
Velocidad de flujo: 0,6 mL/min
Tª de la columna: 55°C
Detector: Índice de refracción
Tiempo de ensayo: 20 minutos.

Nota: Tener en cuenta que puede haber pequeñas cantidades de furfural e hidroximetil furfural y estos picos pueden interferir en los cromatogramas.

Cálculos

1. Crear una curva de calibración mediante análisis de regresión lineal para cada componente a cuantificar. A partir de estas curvas, determinar la

concentración en mg/mL de los ácidos orgánicos presentes en cada solución analizada por HPLC.

2. Para muestras liofilizadas, secadas al aire, o muestras secadas en estufa, o para muestras que no requieren preparación, calcular el porcentaje de cada ácido orgánico presente en la muestra en base al peso inicial a 105°C:

$$\% \text{ acetato} = \frac{C \times \underline{1 \text{ g}} \times V_f \times F_c}{P_1 \times \frac{\% T_{\text{sin prep}}}{\% T_{\text{prep}}}} \times 100$$

C = concentración del componente en la muestra hidrolizada en mg/mL. Si la muestra no necesita preparación, % T_{prep} = 100 y % T_{final} = %T_{sin prep}.

V_f = volumen final. 87 mL

F_c = 0,683, el factor de conversión de ácido acético en acetato

ANEXO III

Técnicas analíticas cromatográficas

- Determinación de azúcares simples

La determinación se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en un equipo cromatográfico "Waters" 2695 con detector de índice de refracción. Se utilizó una columna de análisis de carbohidratos "Transgenomic CarboSep" CHO-682 a una temperatura de 80 °C con agua desionizada como fase móvil y un flujo de 0,5 mL/min.

- Determinación de ácido acético

El ácido acético se determinó mediante HPLC con un cromatógrafo de líquidos "Waters" equipado con un detector de índice de refracción 2414. El compuesto se cuantificó con una columna de exclusión iónica "Aminex" HPX-87H (BioRad Labs, Hercules, EEUU) a una temperatura de 65 °C con ácido sulfúrico 0,05 M como fase móvil y un flujo de 0,6 mL/min.

- Determinación de fenoles, furfural e hidroximetilfurfural

Para su determinación se empleó igualmente la técnica HPLC, con un equipo "Hewlett Packard" (Palo Alto, CA), usando una columna "Aminex" de intercambio de cationes y exclusión de iones HPX-87H (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) a 65 °C. La fase móvil empleada fue 89% 5 mM H₂SO₄ y 11% acetonitrilo con una velocidad de flujo de 0,7 mL min⁻¹. El detector empleado fue un detector de fotodiodo de 1040A, "Photodiode-Array" (Agilent, Waldbronn, Alemania).

- Determinación de etanol

La determinación de etanol se llevó a cabo mediante cromatografía de gases usando un equipo "Agilent technology 7890A GC System" (Agilent, Waldbronn, Alemania), equipado con un inyector Agilent 7683B Series, un detector de ionización de llama (ambos se mantienen a 150°C) y una columna "Carbowax" 20 M, cuya temperatura de operación se fija a 85°C.