



**Universidad de Valladolid**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES**

**Grado en Ingeniería Química**

**EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS  
COMBINADAS PARA LA PRODUCCIÓN  
SOSTENIBLE DE BIOCOMBUSTIBLES  
LÍQUIDOS**

**Autor:**

**Jiménez Arenas, Beatriz**

**Tutores:**

**Coca Sanz, Mónica  
García Cubero, María Teresa**

**Ingeniería Química y Tecnología del  
Medio Ambiente**

**Valladolid, Septiembre de 2015.**



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, principalmente a mi madre y a mi hermano, por su incondicional apoyo y porque gracias a ellos soy quien soy.

A Esteban, por sus ánimos, su cariño, sus consejos y porque siempre estás ahí.

A los compañeros del CTA, con los que he pasado muy buenos momentos y de los que he aprendido mucho, especialmente Jesús y Carolina.

A Maite, Gerardo y especialmente a Mónica por su dedicación y por haberme ensañado, aconsejado, ayudado en todo y por haber hecho posible este trabajo.



# INDICE

Resumen.....	7
Palabras clave.....	7
1 Introducción .....	9
1.1 Biocombustibles en el sector transporte .....	9
1.2 Biomasa lignocelulósica .....	11
1.2.1 Celulosa .....	13
1.2.2 Hemicelulosa .....	15
1.2.3 Lignina .....	17
1.3 Producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. ....	19
1.3.1 Preparación del material .....	19
1.3.2 Pretratamiento.....	20
1.3.2.1 Ozonólisis.....	22
1.3.2.2 Compuestos tóxicos generados durante el pretratamiento	24
1.3.3 Detoxificación .....	25
1.3.4 Hidrólisis enzimática.....	26
1.3.5 Fermentación.....	29
1.3.5.1 <i>P. stipitis</i> .....	30
1.3.5.2 <i>S. cerevisiae</i> .....	32
2 Objetivos.....	35
3 Materiales y métodos.....	37
3.1 Materia prima .....	37
3.2 Pretratamiento .....	38
3.3 Detoxificación .....	40
3.4 Hidrólisis enzimática .....	42
3.5 Fermentación .....	46
3.5.1 <i>P. stipitis</i> . Mantenimiento y preparación de inóculo .....	46
3.5.2 <i>S. cerevisiae</i> . Mantenimiento y preparación de inóculo .....	47
3.5.3 Fermentación de medios modelo.....	48
3.5.4 Fermentación de hidrolizados de paja de trigo.....	49

3.6	Métodos de análisis .....	51
3.6.1	Caracterización de la materia prima .....	51
3.6.2	Determinación de azúcares e inhibidores mediante HPLC.....	51
3.6.3	Compuestos fenólicos .....	51
3.6.4	Determinación de la concentración celular .....	52
4	Resultados y discusión .....	53
4.1	Fermentación con <i>P. stipitis</i> de medios modelo. Influencia de la presencia de inhibidores.....	53
4.2	Influencia del pretratamiento en la liberación de azúcares fermentables y producción de etanol. ....	57
4.3	Influencia de la carga de sólido en la liberación de azúcares fermentables y producción de etanol .....	61
4.4	Análisis de diferentes estrategias de lavado en la fermentación de paja de trigo pretratada .....	67
4.5	Fermentación de hidrolizados de paja de trigo en reactor con agitación mecánica.....	72
4.6	Fermentación de hidrolizados de paja de trigo con <i>S. cerevisiae</i> . ..	76
5	Conclusiones .....	81
6	Bibliografía .....	85
	Anexos.....	95
	ANEXO I: Caracterización de la materia prima.....	95
	Anexo II: Análisis de azúcares, alcoholes y productos inhibidores mediante HPLC. Preparación de muestras y patrones .....	96
	ANEXO III: Análisis de compuestos fenólicos mediante espectrofotometría	98
	ANEXO IV: Caracterización de aguas de lavado.....	101

## Resumen

El presente trabajo estudia la obtención de bioetanol a partir de paja de trigo. El proceso está formado por diferentes etapas: pretratamiento mediante extrusión-ozono, detoxificación, hidrólisis enzimática y fermentación con *Pichia stipitis*.

El pretratamiento de extrusión-ozonólisis mejora el rendimiento de la hidrólisis enzimática con respecto al material sin tratar de 8,4% a 30,0% para glucosa y de 3,7% a 29,0% para xilosa. Para mejorar la eficacia, se han estudiado varias estrategias de detoxificación, demostrándose que el lavado del material a pH 11 y 60°C es capaz de aumentar la recuperación de azúcares fermentables hasta el 91% para glucosa y 43% para xilosa.

Aunque el lavado reduce la concentración de compuestos tóxicos en el medio, el metabolismo de fermentación de xilosa con *P. stipitis* es inhibido cuando la concentración de ácido acético es superior a 0,3 g/L, lo que afecta negativamente a la fermentación con *P. stipitis* de hidrolizados de paja con una carga de sólido del 12% (w/w).

## Palabras clave

Biomasa lignocelulósica; Bioetanol 2G; Pretratamiento; Hidrólisis enzimática; Fermentación

## Abstract

The purpose of this research is to obtain bioethanol from wheat straw. The different stages, in which the process is divided, are: pretreatment by extrusion and ozone, detoxification, enzymatic hydrolysis and fermentation with *Pichia stipitis*.

The pretreatment by extrusion-ozonolysis improves the performance of the enzymatic hydrolysis, in comparison to the process using the material without pre-treatment, from 8,4% to 30% for glucose and from 3,7% to 29,0% for xylose. In order to increase the efficiency, several strategies of detoxification has been studied, proving that the material washing at a pH 11 and 60°C is able to increment the recovery of fermentable sugars up to 91% for glucose and 43% for xylose.

Despite the reduction of the toxic compounds concentration in the fermentation medium, the metabolism of xylose fermentation with *P. stipitis* is inhibited when the acetic acid concentration is higher than 0,3 g/L, this fact has a negative impact on the fermentation with *P. stipitis* of straw hydrolyses with a solid load of 12% (w/w).

## Key Words

Lignocellulosic biomass; 2G Bioethanol; Pretreatment; Enzymatic hydrolysis; Fermentation

# 1 Introducción

## 1.1 Biocombustibles en el sector transporte

El 60% del consumo de crudo está destinado a este sector [1], y aproximadamente el 98% de los combustibles para el transporte provienen del petróleo [2], lo que se traduce en una fuerte dependencia del mismo. Esto sumado a que en España se importa el 70% del petróleo que se consume [1], que el petróleo en el sector transporte es responsable del 19% de las emisiones totales de dióxido de carbono y el 70% monóxido de carbono [3], el crecimiento de la población, la disminución de las reservas de petróleo y el calentamiento global ha dado lugar a un planteamiento de cambio en el modelo energético.

La utilización de fuentes de energía renovables contribuye a disminuir la dependencia energética y ayuda a la diversificación de fuentes de energía. Las energías renovables no se agotan, no generan residuos de difícil tratamiento y reducen las emisiones de gases causantes del efecto invernadero. La biomasa, (toda materia orgánica originada de forma inmediata en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía [4]), constituye una alternativa para la sustitución de combustibles fósiles en el sector transporte a corto y medio plazo, favorece el mantenimiento y desarrollo del sector agrícola y forestal y genera beneficios adicionales en el caso de la valorización energética de residuos [4].

Los biocombustibles para el transporte tienen generalmente un balance energético positivo, ya que la energía contenida en el producto es superior a la requerida para su producción y distribución [5] y emiten en principio, menos dióxido de carbono porque están producidos por un ciclo de carbono a corto plazo y su combustión sólo devuelve a la atmósfera el dióxido de carbono que la planta ha fijado para su crecimiento [2].

Se pueden diferenciar dos tipos de biocombustibles, los líquidos (bioetanol, biodiesel, biometanol, biobutanol, aceites vegetales y biocombustibles líquidos obtenidos por el proceso de Fischer-Tropsch) y los gaseosos (biogás, gas de síntesis y biohidrógeno). Dentro de los biocombustibles líquidos se encuentran los biocarburantes, entre los que destacan principalmente el biodiesel y el bioetanol [1]. El biodiesel se obtiene a partir de aceites vegetales, grasas animales o grasas recicladas procedentes del sector hostelero, es muy similar al gasóleo obtenido del petróleo (también llamado petrodiesel) y puede usarse en motores de ciclo diésel mezclado con gasóleo, aunque si se usa en su forma más pura los motores requieren modificaciones

## 1. INTRODUCCIÓN

[6]. El bioetanol es un producto de la fermentación de azúcares simples que mezclado con la gasolina produce un biocombustible de alto poder energético con características muy similares a la gasolina y si se mezcla con la misma en proporciones relativamente bajas (5% y 10% de bioetanol) los motores actuales no requieran modificación alguna [7].

Se prevé que el bioetanol va a ser el combustible dominante a medio plazo, con una producción total de 1,81 millones de barriles en 2017, siendo EEUU y Brasil los mayores productores. Al día de hoy 85 países han implementado programas para el desarrollo de energías renovables y en 50 países existen plantas de producción de biocombustibles [8].

El cultivo azucarado más ampliamente empleado para la producción de bioetanol es la caña de azúcar, ya sea en forma de melaza o de zumo de caña. El bioetanol obtenido de productos amiláceos proviene en su mayor parte del maíz y en menor medida de trigo, tapioca, cebada, centeno o sorgo [9-15]. El etanol obtenido de estos cultivos se denomina etanol de primera generación (1G). Estos cultivos forman parte del sustento humano y animal lo que causa dos problemas, por un lado el debate moral que supone utilizar recursos alimentarios, que son limitados, con fines energéticos y por otro lado el elevado coste de esta materia prima lo que repercute en el precio final del producto.

Para lograr un precio competitivo se deben reducir los costes de las materias primas, ya que estos pueden llegar a suponer el 60-70% del coste final del producto. En este contexto aparecen los denominados biocombustibles de segunda generación (2G), producidos a partir de biomasa lignocelulósica, barata y abundante, cuyo coste es menor y no compite con el mercado alimentario [16, 17].

La paja de trigo es una abundante fuente de biomasa lignocelulósica, principalmente en Europa. Cada kilogramo de grano de trigo, produce 1,1 kilogramos de paja. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) estima que la Producción Mundial de Trigo 2015/2016 será de 722 millones de toneladas de trigo, lo que supone 794 millones de toneladas de paja de trigo disponibles. El 40% de esta producción será destinada a alimentación animal y mantenimiento de suelos mientras que el 60% restante podría destinarse a fines energéticos convirtiéndose en una de las fuentes de biomasa lignocelulósica más abundante. Asimismo, debido a su alto contenido en celulosa, la paja de trigo es una opción muy prometedora como materia prima en los procesos de producción de etanol [17-21].

### 1.2 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica puede clasificarse en seis grupos principales: i) residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar, bagazo de maíz, paja de trigo, paja de arroz, paja de cebada...), ii) maderas duras (madera de álamo, madera de chopo...), iii) maderas blandas (madera de pino, madera de píce...), iv) residuos celulósicos (papel de periódico, lodos de papel reciclado, residuos de papel de oficina...), v) biomasa herbácea (alfalfa, alpiste, limoncillo...) y vi) residuos sólidos urbanos (RSU) [22].

Los componentes de los materiales lignocelulósicos se clasifican en [23]:

- Componentes estructurales  
Los forman tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. Del total de los compuestos que forman parte de los materiales lignocelulósicos, la celulosa y la hemicelulosa, polisacáridos de alto peso molecular, constituyen el 60-80% del peso total, mientras que la lignina, polímero no polisacárido tridimensional formado por unidades de fenilpropano, representa el 20-35% del peso total de los materiales lignocelulósicos.
- Componentes secundarios  
Son componentes presentes en menor proporción, no forman parte de la pared celular y son de dos tipos, por un lado componentes de bajo peso molecular, hidrosolubles o extraíbles mediante disolventes orgánicos que se denominan extractos (terpenos, fenoles, grasas, proteínas, alcaloides, gomas, resinas...) y por otro lado materias minerales que en los análisis químicos se estiman como cenizas (son principalmente calcio, potasio y magnesio). Estos componentes secundarios representan entre el 4 y el 10% del peso seco del material.

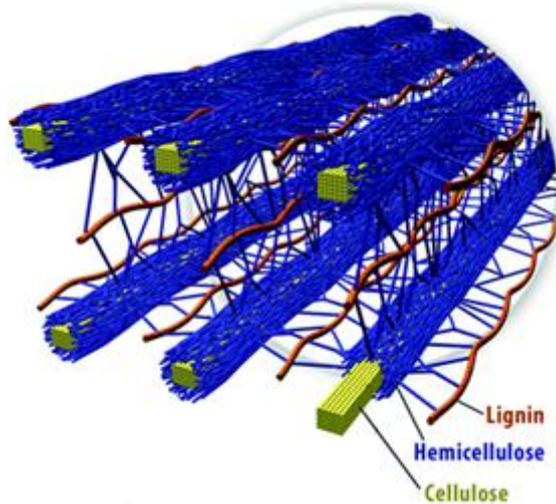
## 1. INTRODUCCIÓN

La proporción de los diferentes componentes de la biomasa lignocelulósica varía dependiendo del tipo de material, como puede observarse en la Tabla 1.1

Biomasa	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
<b>Maderas duras</b>			
Nogal	46,2	20,9	21,9
Arce	44,9	23,0	28,0
Chopo	43,5	21,8	26,2
Álamo	49,9	25,1	18,1
<b>Maderas blandas</b>			
Pino	46,4	20,6	29,4
Abeto	49,9	21,6	28,7
<b>Residuos Agrícolas</b>			
Paja de trigo	30,2	22,3	17,0
Paja de cebada	33,1	24,9	16,1
Residuos de maíz	36,8	30,6	23,1
<b>Biomasa herbácea</b>			
Pasto varilla	45,0	31,4	12,0
<b>Residuos celulósicos</b>			
Papel de periódico	40-55	25-40	18-30

*Tabla 1.1. Composición sobre peso seco de diferentes materiales lignocelulósicos. [24-27]*

La estructura y composición química de los materiales lignocelulósicos es un factor clave que afecta a la eficiencia de la producción de bioetanol. Los materiales lignocelulósicos presentan una estructura compleja en la que la celulosa y la hemicelulosa se encuentran fuertemente ligadas a la lignina, como se puede observar en la Figura 1.1, hecho que restringe de forma severa la accesibilidad enzimática y microbiana.

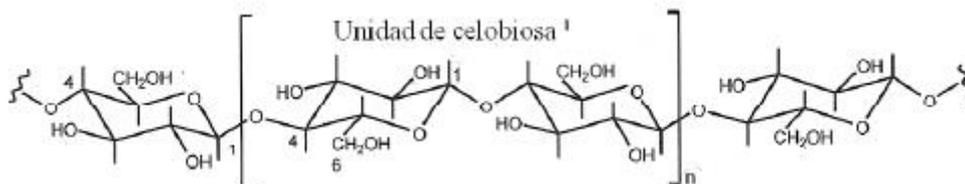


**Figura 1.1.** Estructura del material lignocelulósico. [28]

### 1.2.1 Celulosa

Es el componente principal de las paredes celulares de los vegetales y el polímero mayoritario del planeta.

La celulosa es un homopolímero lineal, cuya estructura se puede observar en la Figura 1.2, de elevado peso molecular y con un alto grado de polimerización de unidades de D-glucosa, entre 200 y 10.000, que se unen por enlaces glucosídico  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4).

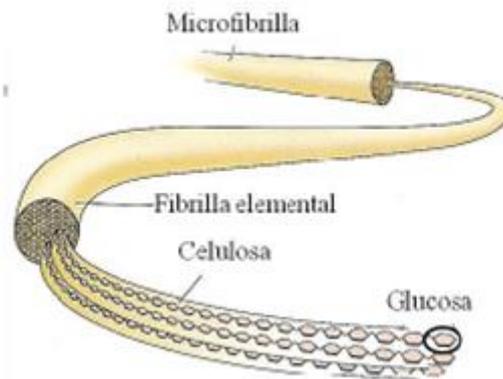


**Figura 1.2.** Estructura primaria de la celulosa. [23]

La celulosa se encuentra en la naturaleza como moléculas individuales de D-glucosa que se van ensamblando en el mismo lugar en el que se producen. Las moléculas de celulosa se unen formando moléculas más largas conocidas como protofibrillas o fibrillas elementales, que está formada por unas 40-100 cadenas de celulosa.

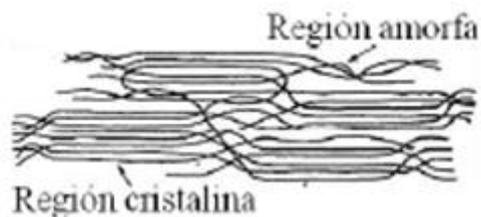
## 1. INTRODUCCIÓN

A su vez las protofibrillas se empaquetan en unidades mayores denominadas microfibrillas como se observa en la Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Estructura de una microfibrilla. [23]

Dentro de las fibrillas elementales se pueden encontrar zonas con una estructura altamente ordenada (zonas cristalinas) y regiones con una estructura menos ordenada (zonas amorfas) como se puede observar en la Figura 1.4. Las primeras aportan resistencia a la celulosa mientras que las segundas le otorgan elasticidad. La presencia de regiones amorfas en la fibrilla elemental facilita la penetración de disolventes químicos y enzimas celulolíticas. Sin embargo, cuanto más ordenada y cristalina es la celulosa es menos soluble y más difícil de degradar [23].



**Figura 1.4.** Fibrilla elemental o protofibrilla. [23]

La estructura molecular de la celulosa y las estructuras de las protofibrillas y las microfibrillas son aspectos muy importantes que condicionan la posterior hidrólisis de la celulosa. Las diferencias en el grado de polimerización y peso molecular también influyen en el comportamiento de la celulosa durante la hidrólisis, ya sea enzimática o química [1, 4, 23, 29].

### 1.2.2 Hemicelulosa

Junto con la celulosa, la hemicelulosa está también presente en la pared celular de las plantas. Su función principal es proporcionar la unión entre la celulosa y la lignina [30].

La hemicelulosa es un heteropolímero formado diferentes azúcares entre los que se encuentran tres hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) y dos pentosas (D-xilosa y L-arabinosa). También pueden aparecer ácidos urónicos (D-glucurónico, D-galacturónico, 4-O-metilglucurónico) [1].

Generalmente está constituida por una cadena principal que puede estar formada por una única unidad (homopolímero) o por dos o más unidades (heteropolímero), que a su vez pueden presentar un gran número de ramificaciones.

Existen diferencias en la composición y estructura de la hemicelulosa según el tipo de biomasa como se puede observar en la Tabla 1.2 que recoge los diferentes compuestos que forman la hemicelulosa en diferentes materiales lignocelulósicos en porcentaje respecto al peso total del material.

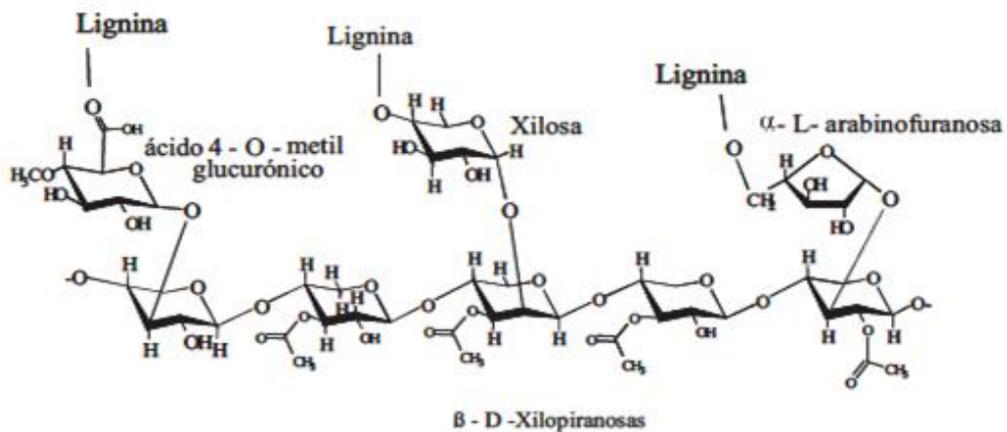
Material lignocelulósico	Xilosa (%)	Manosa (%)	Galactosa (%)	Arabinosa (%)	Grupos acetilo (%)	Ácidos urónicos (%)
<b>Maderas blandas</b>						
Pinus resinosa	7,9-9,3	7,4-10,7	1,8-2	2-2,4	1,2	6
Pinus sylvestris	7,6	10-12,4	1,9-3,1	1,5–1,6	1,3	5-5,6
<b>Maderas duras</b>						
Abedul	20-26	1,8-3,6	0,6-1,3	0,3-0,6	3,3-4,4	4,2-6,3
Álamo	15,2-21,2	2,1-3,5	0,8-2	0,4-0,9	3,2-3,9	3,1-5,2
Arce	15-19	2,3-3,3	0,6-1	0,5-1	2,9-3,8	3,5-4,4
<b>Residuos agrícolas</b>						
Bagazo de caña	21,5	0	0	2,7	-	-
Paja de cebada	15,0	1,3	1,7	4,0	-	-
Paja de trigo	16,9-18,5	0-0,7	0,7-2,2	1,6-2,1	2,4	2,2
Paja de sorgo	15,0	0,8	0,2	3,0	-	-
Cascarilla de arroz	12,3	2,7	0,1	2,6	-	-

*Tabla 1.2. Monosacáridos constituyentes de la hemicelulosa. [23]*

## 1. INTRODUCCIÓN

En las maderas duras, el xilano es el polímero más abundante, altamente sustituido por grupos acetilo, pudiendo representar hasta un 30% del peso total. Por el contrario, en las maderas blandas el polímero más abundante es el galactoglucomanano, presentando mayor proporción de unidades de manosa y galactosa que las maderas duras [31]. En los residuos agrícolas la composición de la hemicelulosa es similar a la de las maderas duras, pero presentan menor cantidad de grupos acetilo [32].

En el caso concreto de la paja de trigo, el xilano predomina en la estructura de la hemicelulosa [30]. El xilano contiene una cadena principal formada por residuos de D-xilopiranosos unidos por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Los xilanos más abundantes son los arabinoxilanos que presentan unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa distribuidas al azar, con enlaces O-glucosídico  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), a lo largo de la cadena de xilosa, pudiendo estar unidos por unidades de galactosa, ácido glucurónico o ácido 4-O-metil glucurónico [33, 34]. Es a través de estos intermediarios monoméricos de la hemicelulosa por donde se producen las uniones a la lignina. La estructura característica de la hemicelulosa de la paja de trigo se puede observar en Figura 1.5.

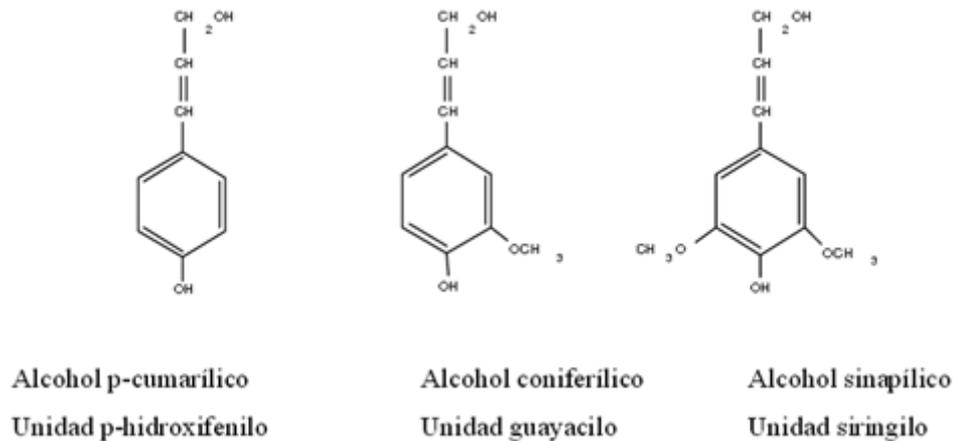


**Figura 1.5.** Arabinoxilano característico de la hemicelulosa de la paja de trigo.  
[4]

### 1.2.3 Lignina

La lignina es un polímero aromático de estructura tridimensional bastante compleja, muy ramificada y amorfa, formada por la condensación de distintos precursores fenólicos, llamados alcoholes cinamílicos. Su función es proteger la celulosa del ataque microbiano, conferir resistencia e impermeabilidad al material y mantener unidas las fibras celulósicas [23].

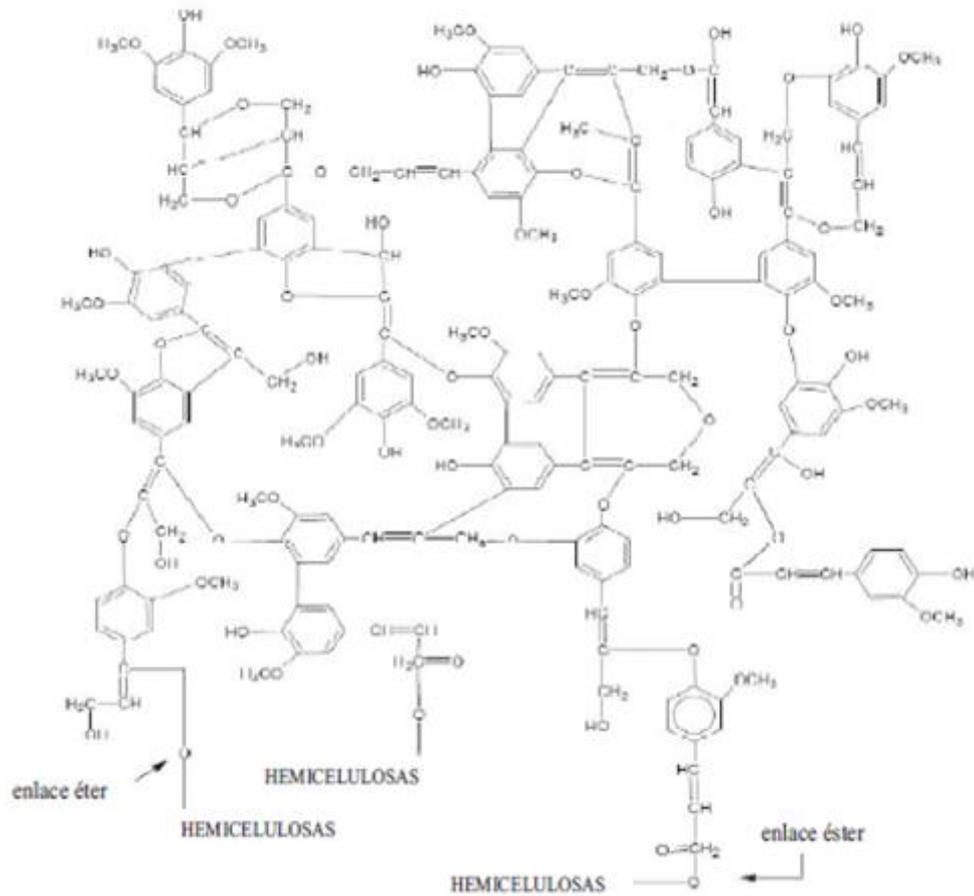
El contenido en lignina, al igual que en el caso de la hemicelulosa, puede variar en los distintos materiales lignocelulósicos, pero los monómeros básicos están formados siempre por tres alcoholes cinamílicos (Figura 1.6), el alcohol p-cumarílico que forma las unidades de hidroxifenilo o unidades H, el alcohol coniferílico, que forma unidades de guayacilo o unidades G y el alcohol sinapílico que forma las unidades de siringilo o unidades S [23].



**Figura 1.6.** Alcoholes cinamílicos precursores de la molécula de lignina. [23]

La lignina de las maderas blandas está formada principalmente por unidades G, mientras que la lignina de las maderas duras está formada por unidades S y G. Los materiales herbáceos, son ricos en unidades S, G y H. En el caso concreto de la paja de trigo, la lignina contiene unidades H, G y S en unas proporciones aproximadas de 5, 49 y 46% respectivamente [35]. Una aproximación de la estructura de la lignina para la paja de trigo puede ser la que se muestra en la Figura 1.7:

## 1. INTRODUCCIÓN



**Figura 1.7.** Estructura aproximada de la lignina en la paja de trigo. [4]

La lignina es altamente resistente a la degradación química y está fuertemente ligada a la hemicelulosa. Este hecho hace necesario un pretratamiento que solubilice o degrade este compuesto para que la estructura hemicelulósica sea accesible al ataque enzimático y microbiano [1, 36, 37].

### 1.3 Producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

La fermentación tradicional convierte la glucosa en etanol, pero en el caso de los materiales lignocelulósicos, la celulosa debe ser primero convertida en azúcares simples mediante hidrólisis enzimática y después fermentada para producir etanol. Por este motivo la materia prima lignocelulósica debe ser sometida a las etapas que se indican a continuación [38]:

1. Preparación del material lignocelulósico que incluye la reducción de tamaño (si es necesario).
2. Pretratamiento del material.
3. Purificación del hidrolizado o proceso de detoxificación (si es necesario).
4. Hidrólisis principal (fraccionamiento de la celulosa)
5. Fermentación.
6. Recuperación del bioetanol.

Todo este proceso se muestra de forma esquematizada en la Figura 1.8:



*Figura 1.8. Esquema general del proceso de producción de etanol vía enzimática.*

#### 1.3.1 Preparación del material

Los residuos lignocelulósicos, después de recogidos, deben ser procesados adecuadamente, mediante la reducción del tamaño mediante cortado y/o molienda (aunque esta etapa puede formar parte del pretratamiento del material) y posteriormente lavado, si fuera necesario y secado hasta que el material tenga la humedad que requiera el posterior pretratamiento [38].

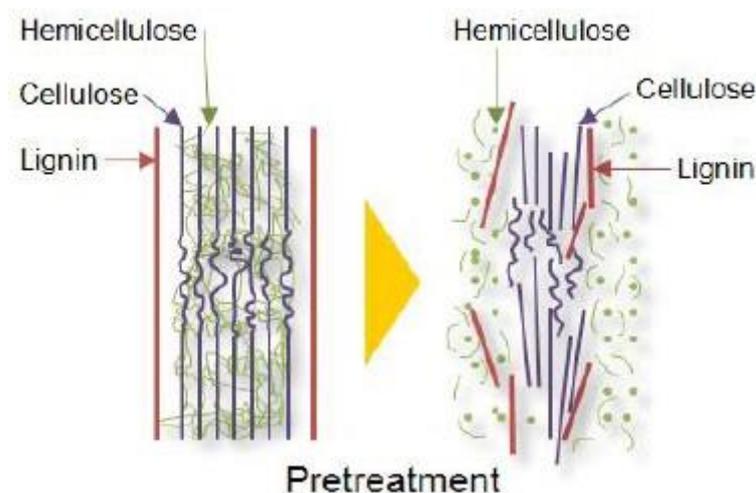
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.3.2 Pretratamiento

El pretratamiento de los materiales lignocelulósicos es una etapa crucial para mejorar la eficiencia del proceso de hidrólisis enzimática, debido a que estos materiales son poco susceptibles a ataques enzimáticos y microbianos por su composición y estructura físico-química. Si durante el proceso se prescinde de esta fase de pretratamiento, el rendimiento de la hidrólisis enzimática apenas alcanzaría el 20%. Esto se debe a la estrecha relación estructural que existe entre la celulosa, hemicelulosa y lignina que forman una estructura no accesible a las enzimas y a otros agentes químicos y a la cristalinidad de la celulosa. La fuerte asociación de la celulosa con la lignina constituye una verdadera barrera física a la penetración de las enzimas.

El objetivo del pretratamiento es modificar la estructura y cristalinidad del material para obtener un sustrato lignocelulósico reactivo que sea altamente accesible al ataque químico, microbiológico o enzimático [38, 39].

El efecto del pretratamiento sobre la estructura del material está representado en la Figura 1.9.



**Figura 1.9.** Efecto del pretratamiento sobre la estructura del material lignocelulósico. [40]

Para que un pretratamiento sea considerado efectivo debe cumplir los siguientes objetivos [25, 41, 42]:

- Provocar la solubilización y/o redistribución de la lignina.
- Disociar el revestimiento que la lignina y la hemicelulosa forman alrededor de la celulosa con el fin de aumentar la accesibilidad de las enzimas.
- Alterar las características estructurales de la celulosa, como la cristalinidad y el grado de polimerización.
- Ser efectivo para una gran variedad de materias primas.
- Asegurar la recuperación de los componentes de la biomasa lignocelulósica.
- Evitar la formación de productos de degradación y compuestos potencialmente inhibitorios de etapas posteriores.
- Evitar la degradación de azúcares
- Evitar la necesidad de pasos previos de preparación de la materia prima.
- Ser efectivo para grandes cargas de sólido
- Tener un coste moderado (se estima que los costes de esta etapa del proceso ascienden a un 33% del coste total).

Existen numerosos tipos de pretratamiento y el comportamiento de los diferentes tipos de biomasa frente a cada uno de ellos no es el mismo, por lo que es necesario encontrar para cada tipo de biomasa el pretratamiento más adecuado. Atendiendo a su naturaleza, los pretratamientos se pueden clasificar en físicos, químicos, físico-químicos y biológicos [25, 43, 44].

Dentro de los **pretratamientos físicos** se encuentran la molienda del material, que mediante fuerzas de impacto y cizalla reduce la cristalinidad de la celulosa y aumenta la superficie específica, facilitando la hidrólisis posterior. Los requerimientos energéticos de este tipo de pretratamiento dependen del tamaño final de partícula que se precise y de las características del material a pretratar, pero en cualquier caso es un pretratamiento costoso [22, 42, 45].

Un pretratamiento físico prometedor y novedoso es la extrusión, en la que los materiales se calientan, se mezclan y se hacen pasar por un extrusor, lo que resulta en modificaciones físicas y químicas del material como la desfibrilación de la estructura o el acortamiento de fibras, traducándose finalmente en un aumento de la accesibilidad del ataque enzimático a los hidratos de carbono. Los parámetros más importantes a tener en cuenta en este tratamiento son la temperatura y la velocidad del tornillo [42, 46].

En los **pretratamientos biológicos** se usan microorganismos, como los hongos de podredumbre blanca, parda o blanda. El principal problema de este

## 1. INTRODUCCIÓN

método es que dichos hongos además de degradar la lignina degradan también hemicelulosa, consumen celulosa y es un proceso lento [47].

Como **pretratamiento físico-químico** merece especial mención la explosión de vapor (EV), por ser el tratamiento más ampliamente estudiado y utilizado. Este tratamiento consiste en exponer a la materia prima a la acción de vapor saturado (190-210°C) durante un determinado tiempo (de 5 a 10 minutos) [1] [38], transcurrido el cual se produce una descompresión súbita que favorece el posterior ataque enzimático de la celulosa a costa de la destrucción de parte de la hemicelulosa [42]. Este proceso también ha sido estudiado catalizado con SO<sub>2</sub>. El efecto del pretratamiento sobre la biomasa es una combinación de alteraciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras) y químicas (despolimerización y ruptura de enlaces) [4]. Asimismo, cabe destacar la termohidrólisis (ACL), donde se trata la materia con agua caliente en fase líquida (aproximadamente 220°C) a presión [48, 49], y la explosión por vapor con amoníaco (AFEX), tratamiento similar al de la explosión por vapor en el que el material es impregnado con amoníaco líquido (1-2 kg amoníaco/kg biomasa seca) a una temperatura en torno a 90°C durante un tiempo de 30 minutos transcurrido el cual el material es sometido a una descompresión súbita [25]. A diferencia de la explosión por vapor este pretratamiento no solubiliza la hemicelulosa y no se producen inhibidores de la fermentación. El proceso AFEX sólo es efectivo cuando el contenido en lignina del material es inferior a un 15% [47].

Los **pretratamientos químicos** emplean diferentes agentes como ozono, ácidos (ácido sulfúrico, ácido clorhídrico), bases (hidróxidos de sodio, potasio o calcio), peróxido de hidrógeno y solventes orgánicos (metanol, etanol o acetona). La ozonólisis es el pretratamiento elegido para este presente trabajo, por lo que se le presta especial mención en el siguiente apartado.

### 1.3.2.1 Ozonólisis

La ozonólisis es un pretratamiento químico que consiste en la reacción del material lignocelulósico con ozono a presión y temperatura ambiente, lo que reduce costos de energía. El objetivo de este tratamiento es la degradación de la lignina mejorando de esta forma la digestibilidad de la celulosa en la etapa posterior de hidrólisis enzimática. [47]

El ozono es un oxidante muy potente y reactivo pero a su vez selectivo. Tiene gran afinidad hacia a los compuestos que incorporan dobles enlaces conjugados y grupos funcionales con alta densidad de electrones. Por lo tanto, la lignina es el componente estructural de los materiales lignocelulósicos con mayor probabilidad de ser oxidado durante la ozonización debido a su alto contenido en enlaces C = C [50]. La especificidad del ozono

hacia la lignina se ha convertido en una clara ventaja, en comparación con otros procesos de deslignificación, ya que produce menores pérdidas de peso durante el pretratamiento. Aunque la hemicelulosa se puede ver afectada, la celulosa apenas lo hace, con unas pérdidas aproximadamente del 5% cuando se trata la paja de centeno y prácticamente nulas para la paja de trigo [25, 50-52].

Otra de las ventajas de la utilización de ozono es que este compuesto puede generarse en el lugar, según sea necesario, evitando así problemas de abastecimiento, almacenaje, costos de transporte y problemas de seguridad asociados con el transporte y manejo. Además la generación de ozono no requiere una aplicación a gran escala para ser económicamente viable [25, 51, 52].

El impacto del proceso sobre el medioambiente es mínimo ya que el ozono residual puede ser descompuesto fácilmente a oxígeno utilizando un lecho catalítico. En cualquier caso el ozono residual debe ser mínimo para optimizar el proceso y no tener un consumo de ozono mayor que el requerido viable [25, 51, 52].

Hay que añadir que este método produce una menor cantidad de compuestos potencialmente tóxicos comparado con otros pretratamientos, como la EV. El ozono al reaccionar con la lignina libera compuestos de bajo peso molecular, principalmente ácido acético, fórmico u oxálico [50, 52]. Al no dejar residuos fuertemente ácidos, básicos o tóxicos los materiales lignocelulósicos ozonizados pueden ser utilizados como alimento animal.

Este método ha demostrado ser eficaz, mejorado el rendimiento de la hidrólisis enzimática en materiales como paja de trigo o de centeno [50, 53], bagazo de caña, pino, algodón y serrín de chopo [52].

Las variables a tener en cuenta durante el proceso son la humedad del material, el tamaño de partícula, el tipo de biomasa, el caudal aire/ozono y el flujo de ozono alimentado. [50]

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.3.2.2 Compuestos tóxicos generados durante el pretratamiento

Durante la etapa de pretratamiento se generan una serie de compuestos como consecuencia de la degradación de la lignina y de parte de los azúcares que pueden actuar como inhibidores de las etapas que siguen en el proceso, es decir, inhiben la acción enzimática durante la hidrólisis y la microbiana durante la fermentación haciendo que el rendimiento en la obtención de etanol pueda descender notablemente. La concentración y naturaleza de estos compuestos generados varían en función del pretratamiento utilizado, de la severidad de las condiciones utilizadas durante el mismo (presión, temperatura, tiempo), del tipo de materia prima (maderas duras, maderas blandas o residuos agrícolas) y de la presencia de catalizadores ácidos [54].

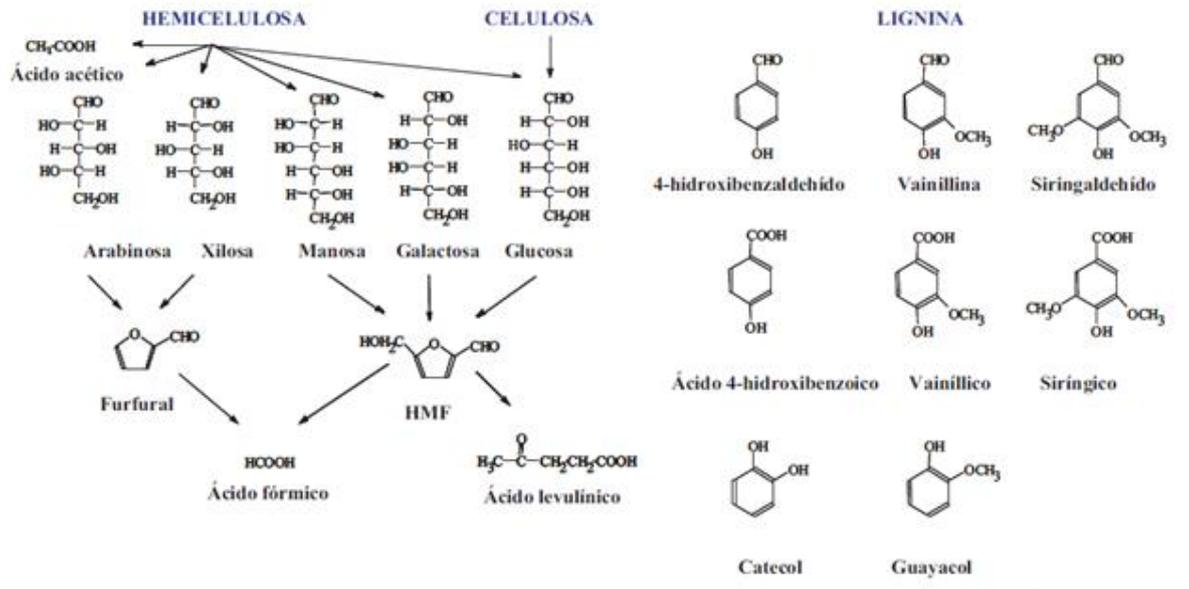
Atendiendo a su estructura química y origen, los compuestos de degradación pueden dividirse en tres grupos: 1) derivados del furano, 2) ácidos alifáticos de bajo peso molecular y 3) derivados fenólicos [55].

Como derivados del furano se encuentran dos compuestos, furfural, que proviene de la degradación de pentosas, y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), que proviene de la degradación de hexosas [4]. Si los furanos están presentes en alta concentración ejercen un efecto inhibitorio sobre el microorganismo fermentador provocando una prolongación de la fase de adaptación con la correspondiente disminución de la productividad [56].

Como principales ácidos alifáticos generados durante el pretratamiento se encuentran: el ácido acético, producido a partir de los grupos acetilo de las hemicelulosas y el ácido fórmico, procedente de la degradación del furfural e HMF. Una elevada concentración de estos compuestos ácidos puede llegar a provocar la muerte celular [57].

Como consecuencia de la solubilización de la lignina también se genera una serie de compuestos fenólicos, los más abundantes son hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, acetosiringona, ácido vainílico y ácido siríngico [58]. Los compuestos fenólicos causan una pérdida de integridad de la membrana nuclear, reduciendo de este modo tanto el crecimiento celular como el consumo de azúcares [59].

La Figura 1.10 resume de forma esquemática la procedencia de los distintos inhibidores de la fermentación que se pueden generar durante el pretratamiento del material lignocelulósico.



**Figura 1.10.** Principales inhibidores de la fermentación generados durante el pretratamiento de biomasa lignocelulósica. [4]

### 1.3.3 Detoxificación

Con objeto de aumentar la fermentabilidad de los hidrolizados obtenidos tras el pretratamiento puede ser necesario reducir la concentración o eliminar totalmente del medio, los compuestos tóxicos generados durante el pretratamiento.

Dependiendo de los mecanismos empleados para la eliminación de los inhibidores, estos métodos se pueden agrupar en biológicos, químicos y físicos [47].

Los métodos biológicos utilizan microorganismos capaces de metabolizar algunos inhibidores presentes en los hidrolizados. Un ejemplo es la utilización de micelios de *Trichoderma reesei* y de enzimas (lacasas y peroxidasas) para eliminar compuestos como el ácido acético, el furfural y el ácido benzoico [60].

Como método físico-químico se encuentra la evaporación a pH ácido, tratamiento que persigue la eliminación de compuestos volátiles como el furfural, el ácido acético o el fórmico [55]. Como métodos químicos, uno de los más utilizados es el tratamiento con diferentes hidróxidos (hidróxido de calcio, magnesio o sodio) [61]. El método consiste en añadir hidróxido hasta pH 10, lo que genera un precipitado de sales que arrastra compuestos tóxicos

## 1. INTRODUCCIÓN

como el furfural, HMF y ácido acético. El problema de este método es el incremento de los costes de operación al añadir nuevos reactivos que posteriormente necesitan ser eliminados [62].

También existen otros métodos como la utilización de zeolitas, carbón activo, carbón vegetal o resinas de intercambio iónico [63-66].

Como puede observarse, existen numerosos tratamientos referidos en la bibliografía para eliminar los inhibidores generados durante la etapa de pretratamiento. La elección del más adecuado dependerá de la composición y tipo de materia prima pretratada y del microorganismo utilizado durante la fermentación [47].

Un parámetro a tener en cuenta en la elección del método de detoxificación es el coste del proceso, por lo que en el presente estudio se ha optado por un lavado del material lignocelulósico con agua para eliminar o por lo menos reducir la concentración de estos compuestos inhibidores. Las ventajas de este tratamiento son su relativo bajo coste y, además de no presentar gran dificultad técnica ni equipos específicos o de alto costo.

### 1.3.4 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis llevada a cabo puede ser de dos tipos, ácida o enzimática. La hidrólisis ácida, bien se lleve a cabo con ácidos concentrados o diluidos, muestra múltiples inconvenientes como son la corrosión de equipos, las grandes cantidades de ácido empleadas, la necesidad de neutralización de los hidrolizados antes de la fermentación o la mayor degradación de azúcares hemicelulósicos, así como la necesidad de emplear altas temperaturas cuando se utilizan ácidos diluidos, lo que hace que la hidrólisis enzimática (HE) se presente como una opción prometedora en los procesos de obtención de etanol y por ello es la elegida en este estudio [1, 4].

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas y xilanasas cuya acción conjunta produce la rotura de las cadenas de celulosa y hemicelulosa en monómeros de glucosa y xilosa, respectivamente, en unas condiciones de temperatura y pH concretas, en torno a 40-50°C y pH 4-5 [1, 47].

Las plantas superiores, algunos invertebrados y principalmente microorganismos (hongos y bacterias) son productores de este tipo de enzimas. Las celulasas de origen fúngico más estudiadas son las pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium* por la capacidad de los microorganismos de producirlas de forma extracelular, lo que facilita su separación de medios de cultivo [47]. Existen también otras especies de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Shizophyllum* y bacterias

aerobias como *Cellulomonas* y *Streptomyces* capaces producir estas enzimas [4].

El complejo de celulasas proveniente de los hongos está formado por distintos componentes que actúan de forma sinérgica. El sistema enzimático tiene tres tipos diferentes de actividad: endo- $\beta$ -glucanasas (EGs), exo- $\beta$ -glucanasas y  $\beta$ -glucosidasas (BG) [67].

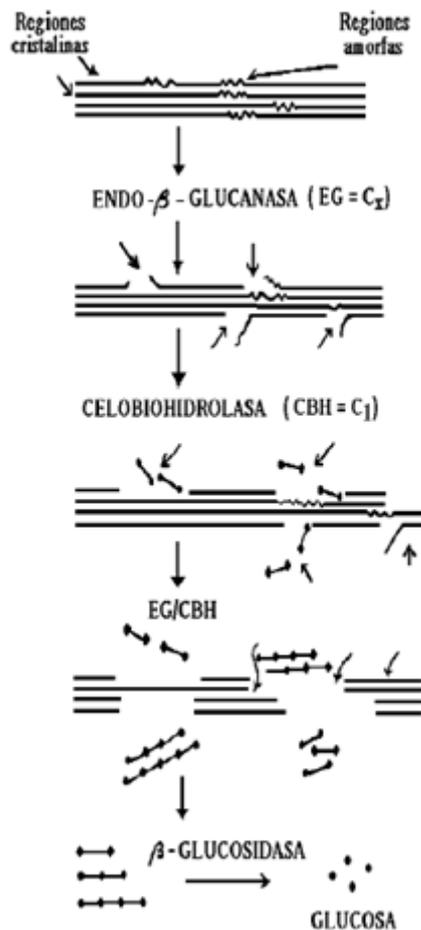
Las endo- $\beta$ -glucanasas actúan al azar en sobre las regiones amorfas del polímero, hidrolizando enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), generando oligosacáridos y causando extremos libres y acortamientos de la cadena de celulosa [4, 47].

Dentro de las exo- $\beta$ -glucanasas se pueden diferenciar dos tipos de actividad diferente: la celobiohidrolasas (CBHs) y la glucohidrolasa (GGH). Las celobiohidrolasas actúan sobre los extremos generados por las EGs liberando moléculas de celobiosa. Al contrario que la anterior, esta enzima tiene actividad sobre la celulosa tanto amorfa como cristalina. La-glucohidrolasa se encuentra en pequeña proporción y actúa también sobre los extremos de la cadena, pero en este caso liberando unidades de glucosa, y sólo tiene actividad sobre la parte amorfa [47].

Por último, la  $\beta$ -glucosidasa hidroliza celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño. Su acción es muy importante porque al consumir celobiosa evita la inhibición que este producto produciría sobre el resto de enzimas [68].

## 1. INTRODUCCIÓN

En la Figura 1.11 se muestra el mecanismo de hidrólisis de la celulosa mediante la acción combinada de las celulasas.



*Figura 1.11. Mecanismo de acción de las celulasas. [47]*

El uso de otras enzimas capaces de hidrolizar la hemicelulosa, denominadas de forma general hemicelulasas, puede ayudar a mejorar la eficiencia y la recuperación de azúcares monoméricos en la etapa de hidrólisis [69]. Las hemicelulasas incluyen un gran número de enzimas debido a la diversidad de estructuras de hemicelulosas existentes.

Dentro de las hemicelulasas, se encuentran las xilanasas, siendo las dos principales participantes las endo-(1→4)-xilanasas y las β-xilosidasas. Las primeras se encargan de la despolimerización principal de los xilanos y las segundas de su transformación en xilosa [70]. La HE de la hemicelulosa es complicada, no sólo por la compleja estructura de la hemicelulosa, sino también por las propiedades de las enzimas hemicelulósicas, que requieren la acción coordinada de diversas enzimas para su correcta actuación.

La velocidad y eficiencia de la reacción enzimática depende de varios factores como son el tamaño y porosidad de las partículas, la materia prima, la calidad y composición del complejo enzimático, el grado de polimerización y cristalinidad original del sustrato lignocelulósico, la adecuación del complejo enzimático a un material concreto y el grado de actividad enzimática, entre otros factores [42]. Ante todo se puede deducir que la hidrólisis enzimática es una etapa limitante del proceso, cuya eficiencia y costo depende en gran medida del pretratamiento previo, de forma que cuánto más adecuado sea el pretratamiento, menor será la dosis de enzimas utilizadas en esta etapa, mayor el rendimiento en la recuperación de azúcares y por lo tanto menores serán los costes de operación del proceso general [38].

### 1.3.5 Fermentación

La fermentación es una etapa en la cual los azúcares fermentables generados en la hidrólisis enzimática pasan a ser metabolizados por microorganismos con la consiguiente producción de etanol y CO<sub>2</sub> [1]. La conversión estequiométrica de glucosa y xilosa a etanol es de 0,51 (g etanol/g de azúcar). Es difícil obtener este rendimiento porque las levaduras derivan parte de la energía que consumen hacia el metabolismo celular y el crecimiento [4].

La fermentación se puede realizar de forma simultánea con la hidrólisis, formando una única etapa (SFS) o por separado, siendo dos etapas diferenciadas (HFS). En la SFS, las enzimas hidrolizan los azúcares y el microorganismo los convierte simultáneamente en etanol, mientras que en la HFS primero las enzimas hidrolizan las cadenas de celulosa y hemicelulosa en monómeros y en un paso posterior, estos monómeros son convertidos en etanol [47]. Cada uno de los dos métodos tiene una serie de ventajas e inconvenientes frente al otro. Por un lado la HFS al realizarse en dos etapas, permite que cada una se lleve en sus condiciones óptimas de pH y temperatura, mientras que en la SFS las condiciones de proceso deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas de la hidrólisis y la fermentación. Por otro lado, el proceso SFS consigue reducir los costes y el tiempo de operación, al reducir el número de pasos y además minimiza la inhibición por producto final [4]. Este trabajo se centra en la utilización del proceso de dos etapas.

El microorganismo más utilizado a nivel industrial para realizar la fermentación alcohólica es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque este microorganismo produce etanol con unos rendimientos cercanos al máximo teórico (0,51 g/g), presenta una gran limitación, ya que no es capaz de fermentar pentosas de forma natural, es decir, no fermenta azúcares hemicelulósicos como xilosa o arabinosa [4, 44].

## 1. INTRODUCCIÓN

Los materiales lignocelulósicos pueden contener entre un 15-30% de pentosas en su composición (la mayor parte xilosa), es por ello que la fermentación de la xilosa es esencial para hacer más eficiente y rentable el proceso de producción de etanol y con este objeto se han estudiado diferentes alternativas.

Una de las opciones que se estudia para mejorar la eficiencia del proceso es la co-fermentación, que consiste en la adición de dos especies al medio, cada una de las cuales se encarga de fermentar glucosa o xilosa. Ejemplo de esto es la utilización de *Saccharomyces cerevisiae* con *Pichia stipitis* [71, 72] o de *Saccharomices cerevisiae* con *Candida shehatae* [73], capaces de fermentar glucosa y xilosa, respectivamente.

En los últimos años, se están aplicando técnicas de ingeniería genética bien mediante la introducción de genes relacionados con la producción de etanol en bacterias como *E. coli* o por la introducción de los genes de la ruta de la fermentación de las pentosas de microorganismos como *P. stipitis* en otros como *S. cerevisiae* [74].

Otra opción es la utilización de un único microorganismo que sea capaz de metabolizar pentosas y hexosas. Con el fin de aumentar el rendimiento en la producción de etanol, al aprovechar también durante el proceso las moléculas de cinco carbonos, y por ser una alternativa sencilla, en comparación con la técnicas de modificación genética o el uso de co-cultivos, esta ha sido la opción elegida en el presente trabajo, usando como microorganismo la levadura *P. stipitis*, cuyas principales características se describen en el siguiente apartado.

### 1.3.5.1 *P. stipitis*

Como ya se ha mencionado anteriormente, *P. stipitis* ha sido el microorganismo utilizado en este estudio por ser capaz de metabolizar tanto glucosa como xilosa, aprovechando de este modo todos los azúcares fermentables presentes en el hidrolizado.

*P. stipitis* es una levadura perteneciente al reino de los hongos del género *Scheffersomyces*. Su forma habitual es esférica o elipsoidal como se puede observar en la Figura 1.12, con un diámetro de 3 a 5  $\mu\text{m}$  [1]. Se encuentra en el intestino de escarabajos de la familia *Passalidae* y su hábitat ideal incluye zonas ricas en materia orgánica, como zonas de madera dura o zonas con alto contenido en residuos agrícolas. El crecimiento se produce en un rango de temperaturas de 25 a 37<sup>0</sup>C y en un rango de pH entre 5-6. Su temperatura óptima es 30<sup>0</sup>C aproximadamente y no es capaz de sobrevivir en temperaturas superiores a 40<sup>0</sup>C [72, 75].

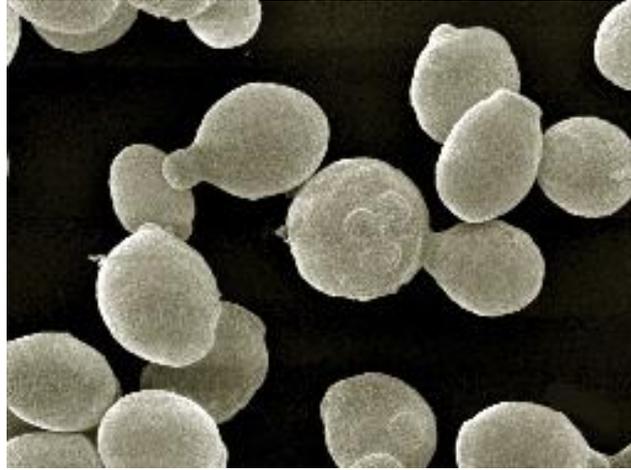


Figura 1.12. Morfología típica de la levadura *P.stipitis*. [76]

*P. stipitis* puede fermentar glucosa y xilosa tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Sin embargo, para estimular la producción de etanol a partir de xilosa es necesario establecer condiciones limitantes de oxígeno [77, 78]. La cantidad de oxígeno presente en el medio es un factor crucial en el proceso de fermentación alcohólica mediante *P. stipitis*, debido a que es la clave que determina el balance entre crecimiento y formación de productos [79]. En la Figura 1.13 se muestra la ruta metabólica típica de la levadura *P. stipitis* a partir de glucosa y xilosa para la obtención de etanol.

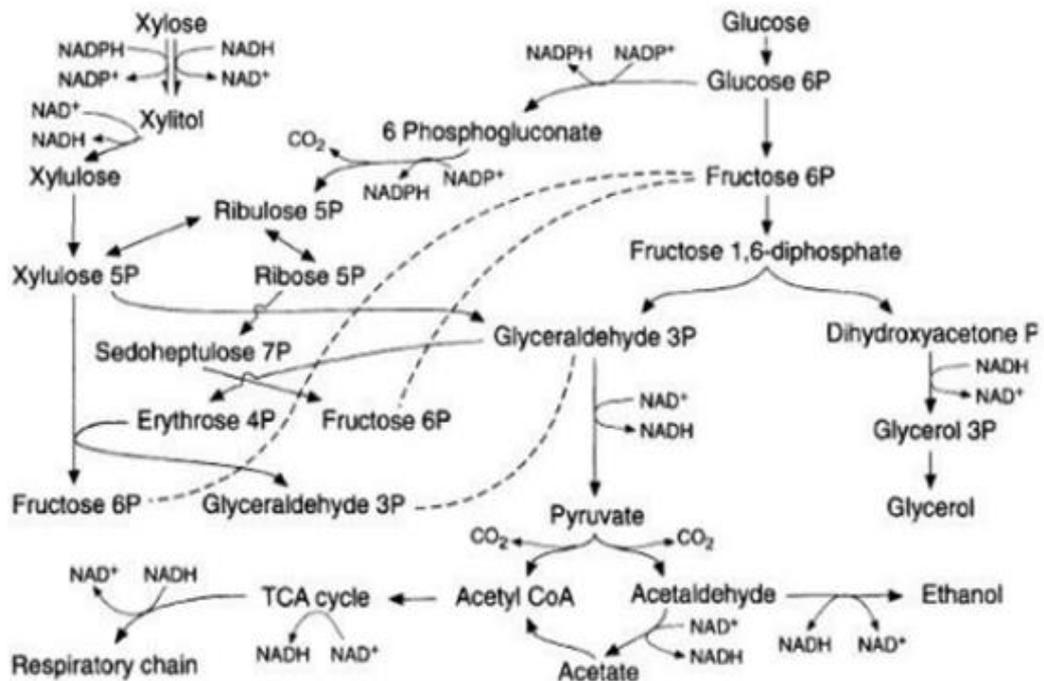


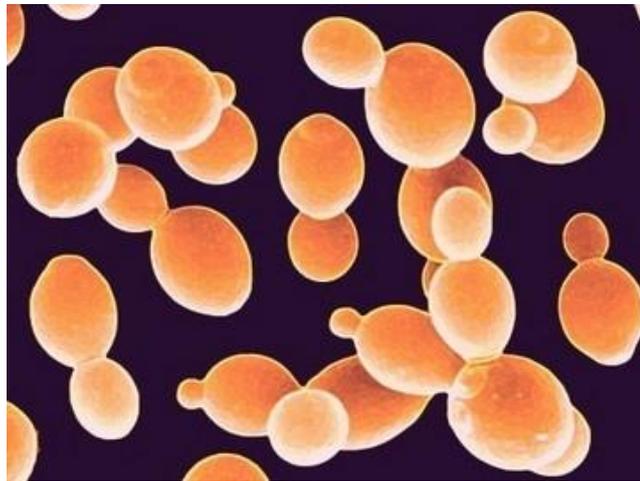
Figura 1.13. Ruta metabólica de *P. stipitis*. [80]

## 1. INTRODUCCIÓN

Dado el potencial de bioconversión de materiales lignocelulósicos en combustibles renovables, la fermentación con *P. stipitis* se ha estudiado ampliamente y se muestra como una alternativa en el sector industrial para la producción de etanol.

### 1.3.5.2 *S. cerevisiae*

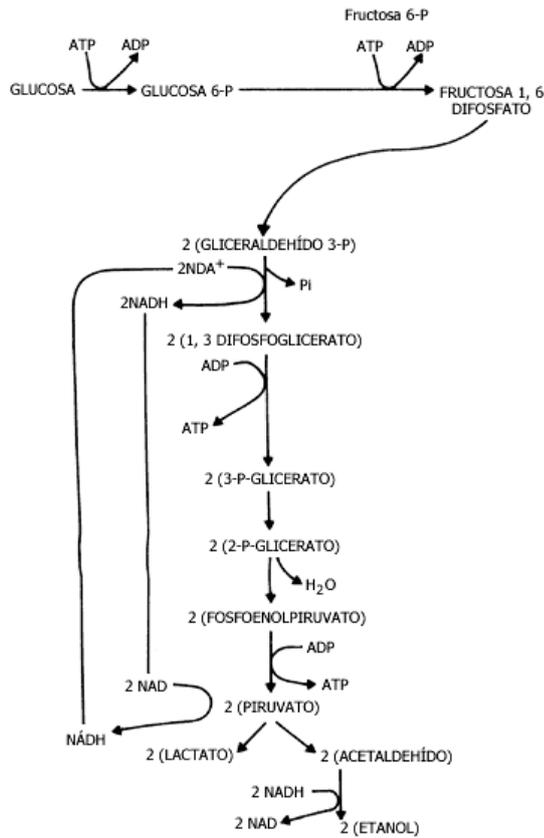
*S. cerevisiae* es una levadura, un hongo unicelular del grupo de los ascomicetos. Su morfología es más o menos redondeada (con un tamaño de partícula como el de la *P. Stipitis*, de 3 a 5  $\mu\text{m}$ ). En la naturaleza se encuentra sobre sustratos ricos en azúcares o en los exudados y savias dulces de algunas plantas [81].



**Figura 1.14.** Morfología típica del hongo *S. cerevisiae*. [82]

Es el microorganismo comúnmente empleado a nivel industrial en los procesos de fermentación alcohólica ya que puede usar todo tipo de hexosas con unos rendimientos cercanos al máximo teórico (0,51 g/g). Es utilizado a nivel industrial para la fabricación de pan, vino y cerveza [4].

En la Figura 1.15 se representa de forma esquemática las reacciones que se producen en la ruta metabólica de obtención de etanol.



**Figura 1.15.** Ruta metabólica de conversión de glucosa en etanol. [83]

La ventaja de esta levadura es la gran tolerancia que presenta a los productos tóxicos generados durante el pretratamiento, no obstante *S. cerevisiae* tiene una gran limitación cuando se quiere utilizar en la fermentación de los azúcares hemicelulósicos ya que no es capaz de fermentar pentosas, como la xilosa, presentes también en los materiales lignocelulósicos [4].

Se intenta solventar el problema de este hongo de falta de afinidad por la xilosa mediante manipulación genética introduciendo genes de levaduras fermentadoras de xilosa. Aun así las cepas de *S. cerevisiae* modificadas para la fermentación de pentosas presentan otra dificultad que es el transporte de éstos azúcares en el interior de la célula, puesto que *S. cerevisiae* no presenta transportadores de membrana específicos para la xilosa y los tiene que compartir con la glucosa, lo que hace que el transporte de esta molécula sea mucho menos eficiente [84, 85].

## 1. INTRODUCCIÓN

## 2 Objetivos

El objetivo general del presente trabajo consiste en analizar el efecto que produce el pretratamiento secuencial de extrusión y oxidación con ozono sobre la sacarificación y fermentación con *P. stipitis* de paja de trigo en la producción de bioetanol de segunda generación. Se estudiará el efecto que ejercen diferentes parámetros de operación sobre la eficacia del proceso.

Para alcanzar dicho objetivo global se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la influencia que tienen los inhibidores que puedan generarse durante el pretratamiento sobre los rendimientos de obtención de etanol en la etapa de fermentación.
2. Análisis de la etapa de hidrólisis enzimática estudiando la influencia que sobre ella producen distintos factores como la carga, la estrategia de lavado y la presencia de inhibidores.
3. Establecer una estrategia de detoxificación adecuada para disminuir la concentración de compuestos tóxicos y así aumentar la eficiencia del proceso.
4. Comparación del proceso de fermentación con *Pichia stipitis*, microorganismo capaz de fermentar hexosas y pentosas, con *Saccharomyces cerevisiae*, que sólo puede fermentar hexosas.

## 2. OBJETIVOS

### 3 Materiales y métodos

#### 3.1 Materia prima

El material lignocelulósico utilizado ha sido paja de trigo extrusada con un tamaño de partícula menor de 1 mm suministrada por el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Unidad de Biocarburantes (CIEMAT).

La paja de trigo es almacenada a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización, en el que se descongela hasta temperatura ambiente. La Figura 3.1 muestra una imagen de la paja de trigo extrusada preparada para ser pretratada.



*Figura 3.1. Aspecto de la paja de trigo extrusada.*

La materia prima tiene una humedad de  $8,8 \pm 1,6\%$  sobre el peso del material. La composición de la materia prima se recoge en la Tabla 3.1 (% sobre MS):

Compuesto	% sobre MS
Celulosa	$40,1 \pm 1,15$
Hemicelulosa	$21,8 \pm 1,0$
Lignina Ácida Insoluble (LAI)	$16,6 \pm 2,4$
Lignina Ácida Soluble (LAS)	$4,6 \pm 0,5$
Cenizas	$4,1 \pm 0,4$
Extractivos	$4,3 \pm 0,5$

*Tabla 3.1. Composición de la materia prima*

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2 Pretratamiento

Como se ha indicado anteriormente, el pretratamiento elegido fue un tratamiento combinado de extrusión seguido de oxidación química con ozono.

El tratamiento de extrusión de paja de trigo se llevó a cabo a 20°C y a una velocidad de tornillo de 120 rpm, alimentando el extrusor con 0.8 kg/h de biomasa molida previamente a 5 mm y 0,44 L/h de agua para obtener una humedad final de aproximadamente un 40% en la paja de trigo extrusada. Este pretratamiento fue llevado a cabo en las instalaciones de CIEMAT, que proporcionó la paja extrusada para los posteriores ensayos de oxidación química con ozono.

El dispositivo experimental cuenta con un ozonizador (SANDER 301), que genera ozono a partir de aire seco (60 L/h) a temperatura ambiente mediante descarga eléctrica. El ozonizador cuenta con un regulador de potencia para regular la cantidad de ozono producida, que se mantuvo en todo momento al 68%, lo que implica una dosis de 1.8 g de O<sub>3</sub>/h ó 30 mg de O<sub>3</sub>/L. Para que el proceso no se revierta y se descomponga la molécula de ozono, el equipo cuenta con refrigeración mediante agua.

A la salida del generador de ozono hay columna de vidrio con unas dimensiones de 20 mm de diámetro y 300 mm de largo, que se llenó con aproximadamente 18 g de paja de trigo extrusada con un 40% de humedad formando un lecho fijo. El tiempo de reacción se fijó en 30 min. El consumo de ozono relativo al material seco (MS) fue de 0,08 g O<sub>3</sub>/g MS.

Las condiciones de operación (flujo de aire, concentración de ozono, humedad, tiempo de reacción...) fueron seleccionadas a partir de anteriores estudios del *GIR Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos* de la Universidad de Valladolid.

La entrada a esta columna es la corriente de aire que contiene ozono procedente del ozonizador y la salida es un borboteador con una solución de KI (2% w/w), para destruir el ozono que no ha reaccionado y cuantificar el ozono consumido. El gas resultante, se emite directamente a la atmósfera.

A la salida del equipo de generación de ozono también se sitúa un borboteador con una disolución de KI (2% w/w), que se conecta cuando se estabiliza el equipo y para cuantificar el ozono producido.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 3.2 se muestra el dispositivo experimental utilizado.



**Figura 3.2.** Equipo de ozono del laboratorio.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción fijado, la paja ozonizada (Figura 3.3) se lleva a una estufa de secado a 60°C durante 24h para ser utilizada en la siguiente etapa del proceso (hidrólisis enzimática). Durante el proceso de secado (Figura 3.4) dos parámetros son importantes a tener en cuenta, el tiempo de permanencia en la estufa y la temperatura de la misma, estas condiciones no deben ser muy severas porque ocasionarían el cierre de los poros del material dificultando el ataque enzimático y microbiano y disminuyendo el rendimiento del proceso.



**Figura 3.3.** Paja de trigo ozonizada.



**Figura 3.4.** Secado en estufa tras ozonólisis.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3 Detoxificación

En esta parte del proceso el objetivo es intentar eliminar o por lo menos reducir, la concentración de los compuestos tóxicos o inhibidores que puedan generarse durante el pretratamiento, ya que pueden afectar de forma sustancial a la fermentación.

Se han analizado diferentes estrategias de lavado con agua, analizando diferentes variables del proceso como pueden ser la temperatura, el pH, el número de lavados, la proporción entre el agua utilizada y la cantidad del material (L agua/kg MS) o el tiempo de lavado, todo ello con el objetivo de optimizar y mejorar el rendimiento en la etapa de fermentación.

Para lavar la paja se utilizaron botellas de vidrio ISO de 2 L de capacidad en las que se añadió paja seca y la cantidad de agua correspondiente. Se mantuvo en agitación durante el tiempo fijado y posteriormente se filtró a vacío, con filtros para análisis cualitativo de 80 g/m<sup>2</sup> de 0,185 mm de espesor y de 43-48 µm de tamaño de poro. La paja se llevó a estufa a 60°C aproximadamente, por lo menos durante 24 h para eliminar su humedad, y fue almacenada en estufa a 35°C hasta su utilización en la hidrólisis enzimática. La Figura 3.5, la Figura 3.6 y la Figura 3.7 muestran las etapas del proceso de detoxificación.



**Figura 3.5.** Proceso de lavado de la paja de trigo pretratada



**Figura 3.6.** Filtrado de paja de trigo posterior al lavado.



**Figura 3.7.** Secado de paja de trigo tras la etapa de detoxificación.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Del agua de lavado se tomó una muestra para su caracterización (azúcares, inhibidores) mediante cromatografía líquida (HPLC) detallado en ANEXO III: Caracterización de aguas de lavado.

En la Tabla 3.2 se exponen todas las estrategias de lavado utilizadas y en el apartado de resultados se hará referencia a ellas con sus abreviaturas, los ensayos en los que se utilice paja no lavada se nombrará como NL:

Ensayos de lavado	Cantidad de agua (mL/g MS)	T <sup>a</sup> agua (°C)	pH final agua lavado	Tiempo de lavado (min)	Nº de lavados
D1	100	20	≈2,60	15	1
D2	100	20	≈2,60	15	5
D3	50	20	≈2,60	15	2
D4	50	30	≈2,60	15	2
D5	40	20	≈2,60	15	3
D6	40	30	≈2,60	15	3
D7	100	60	≈2,60	15	1
D8	100	60	11,64	15	1

*Tabla 3.2. Estrategias de lavado seguidas durante el proceso de detoxificación.*

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.4 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática llevó a cabo en dos sistemas diferentes: en matraces de 100 mL en incubador orbital y en reactores de 250 mL con agitación mecánica. La paja utilizada para esta parte del proceso es paja que después ser pretratada se mantuvo en estufa a 35°C por lo menos 24 horas. Para que el pH del hidrolizado se mantenga en valores óptimos para la reacción, la paja se mezcló con buffer de citrato (50 mM), que consiste en una dilución de 50 mL/1L de un buffer citrato concentrado 1M. El buffer citrato concentrado 1 M se prepara disolviendo 210 g de ácido cítrico monohidratado en 750 mL de agua destilada y añadiendo NaOH (50-60 g) hasta pH=4,3. A continuación se enrasa hasta 1L y se añade más NaOH si es necesario, hasta pH=4,5.

Para el desarrollo de esta etapa se han utilizado complejos comerciales de enzimas de Novozyme compuestos por celulasas y  $\beta$ -glucosidasas, en concreto Celluclast 1.5L (celulasa, para hidrolizar celulosa) y Novozyme 188 (preparado comercial de  $\beta$ -1,4-glucosidasa que hidroliza celobiosa a glucosa). La dosis de enzima añadida se mantuvo constante durante todos los ensayos: 0,36 g Celluclast/g MS (20 FPU/g MS) y 0,1 g Novozyme188/g MS (40 CBU/g MS).

La hidrólisis se llevó a cabo a las condiciones de operación óptimas para estas enzimas que son 50°C y pH 4,8 (aproximadamente), durante 48 horas a 175 rpm.

El procedimiento a seguir de modo general ha sido siempre el mismo pero se va a describir para los dos sistemas de hidrólisis:

- Hidrólisis en matraces

Se utilizaron matraces de 100 mL con tapón de silicona provisto de una aguja para facilitar la eliminación del CO<sub>2</sub> generado en la etapa fermentación; la cantidad total añadida en ellos fue de 30 g. Se realizaron ensayos por triplicado variando el porcentaje de materia seca entre el 5 y el 14% w/w para posteriores fermentaciones con *P. stipitis* y ensayos del 12% w/w para fermentaciones con *S. cerevisiae*, tal y como se resume en la Tabla 3.3.

	5 %	10%	12%	14%
<b>g paja</b>	1.5	3	3.6	4.2
<b>g buffer</b>	28.5	27	26.4	25.8
<b>g Celluclast</b>	0.525	1.1	1.3	1.5
<b>g Novozyme188</b>	0.15	0.3	0.36	0.42

**Tabla 3.3.** Resumen de las cantidades añadidas en los diferentes ensayos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tras pesar la paja y el buffer se ajusta el pH a 4.8, si es necesario, con NaOH o HCl 3M. A continuación, se colocan los matraces en el agitador orbital (OPTIC IVYMEN SYSTEM) para que se atemperen a la temperatura óptima de las enzimas, es decir, 50°C. Transcurrida media hora, se añaden las enzimas, y se vuelven a colocar los matraces en el incubador para que se produzca la reacción enzimática durante un tiempo de 48h. A las 24 horas de hidrólisis enzimática se mide el pH y se ajusta de nuevo a 4.8 si es necesario.

Para tener en cuenta la concentración de azúcares que puedan aportar las enzimas, se prepara un ensayo de control, de la misma forma que el resto, pero sin añadir paja. La concentración de azúcares obtenidos tras la hidrólisis en el ensayo de control es restada a las concentraciones obtenidas en los hidrolizados de paja de trigo.

La Figura 3.8 y la Figura 3.9 muestran imágenes de los matraces antes y durante el proceso de hidrólisis enzimática.



**Figura 3.8.** Matraces preparados para comenzar HE.

**Figura 3.9.** Matraces durante la HE en incubador orbital.

Cuando se han cumplido las 48 h de reacción, se toma muestra del hidrolizado y se mide el pH final. La muestra se congela hasta su posterior análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (WATERS HPLC) para determinar la concentración de azúcares fermentables (glucosa y xilosa) y compuestos inhibidores (ácidos acético, oxálico y fórmico, furfural, HMF). La concentración de compuestos fenólicos es analizó mediante espectrofotometría. La concentración de compuestos inhibidores permite tener una idea de cómo va a resultar la siguiente etapa de fermentación y de cómo de efectiva ha sido la etapa de detoxificación. La concentración de azúcares simples permite determinar el rendimiento y eficiencia del proceso. Para ello se hace referencia al rendimiento global de recuperación de azúcares que se ha definido de la siguiente manera:

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

$$RG = \frac{\text{glucosa liberada (g/100 g MS)}}{\text{glucosa en paja de trigo (g/100 g MS)}} \cdot 100 \quad (\text{ec. 3.1})$$

$$RX = \frac{\text{xilosa liberada (g/100 g MS)}}{\text{xilosa en paja de trigo (g/100 g MS)}} \cdot 100 \quad (\text{ec. 3.2})$$

Siendo RG y RX recuperación de glucosa y recuperación de xilosa, respectivamente, expresados en tanto por ciento.

- Hidrólisis en reactores

Los ensayos que dieron lugar a los mejores resultados operando con matraces, se llevaron también a cabo en reactor con agitación mecánica con el fin de mejorar la transferencia de materia y la liberación de azúcares fermentables. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

El dispositivo experimental consta de dos reactores encamisados de vidrio de 250 mL (AFORA). Por la camisa de cada reactor circula agua procedente de un baño termostático (J.P. SELECTA, ULTRATERM). La tapa del reactor tiene diferentes entradas que permiten la toma de muestras y la inserción de sondas de medida del pH (CRISON Basic 20) y de temperatura. La agitación consiste en una varilla de palas conectada a un agitador mecánico (HEIDOLPH, RZR 2020). El agitador de palas se introduce a través de un cierre de agitación. La Figura 3.10 muestra la instalación de hidrólisis enzimática en reactores encamisados.



*Figura 3.10. Equipo de hidrólisis enzimática en reactores encamisados con agitación mecánica*

La masa total (paja seca y buffer) en el reactor, fue de 200 g. Se realizaron ensayos con un contenido en materia seca del 10% y 12% w/w. La Tabla 3.4 resume las cantidades de materia seca, buffer, y enzima añadidos en cada ensayo.

	% en peso de M.S.	
	10%	12%
<b>g paja</b>	20	24
<b>g buffer</b>	180	176
<b>g Celluclast</b>	7.2	8.64
<b>g Novozyme188</b>	2	2.4

*Tabla 3.4. Resumen de las cantidades añadidas a los reactores para el proceso de HE.*

De la misma forma que en los matraces, se mide el pH inicial de la suspensión y se ajusta a 4.8 con NaOH 3M. Después se atempera el contenido del reactor a 50°C y se añaden las enzimas disueltas en unos 10 mL de buffer. El tiempo de reacción enzimática se estableció en 48 horas. A las 24 horas se mide el pH y se ajusta a 4,8 en caso de ser necesario. Una vez ha finalizada la hidrólisis, se toma muestra del hidrolizado para su análisis mediante HPLC para cuantificar la recuperación de azúcares y la presencia de inhibidores.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.5 Fermentación

### 3.5.1 *P. stipitis*. Mantenimiento y preparación de inóculo

El mantenimiento del microorganismo *P. stipitis* a corto plazo se realizó en placas Petri a una temperatura de 4°C con el siguiente medio de mantenimiento: 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona de soja, 20 g/L de xilosa y 20 g/L de agar. Para preparar las placas, se prepara el medio de mantenimiento y se autoclava (20 min 121°C), exceptuando la xilosa que se puede caramelizar y que se añade posteriormente, utilizando filtros estériles de 0,20 µm en la cámara de flujo laminar. El medio se añade a las placas cuando todavía está caliente y se deja enfriar en la cámara de flujo laminar.



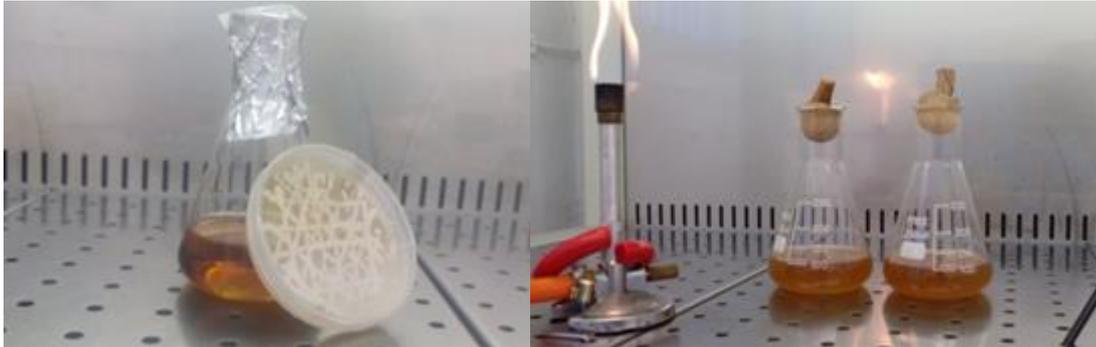
**Figura 3.11.** Proceso de preparación de placas de mantenimiento en cámara de flujo laminar

Una vez preparada la placa, se trasvasa el microorganismo utilizando un asa de siembra, de un medio de crecimiento, en el que el inóculo ha pasado 24 h, a la placa. La placa se incuba en estufa a 30°C durante 48 h y una vez haya crecido se conserva en el frigorífico a una temperatura de 4°C.

El medio de cultivo para la preparación de inóculo se compone de 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de peptona de soja esterilizados en autoclave durante 20 min a 121°C, mientras que la xilosa (20 g/L), como en el caso anterior, se añade posteriormente en la cámara de flujo laminar utilizando filtros estériles de 0,20 µm. En concreto se prepara 150 ml de medio de crecimiento, por duplicado, El microorganismo se transfiere desde la placa Petri al medio de cultivo y se incuba aeróbicamente durante 24 h a 175 rpm y 30°C en erlenmeyer de 250 mL con tapón de algodón. Las operaciones de trasvase de microorganismos se realizan en la cámara de flujo laminar para

mantener condiciones estériles. La concentración celular después de 24 h de crecimiento fue de  $3,6\pm 0,4$  g/L.

En la Figura 3.12 y la Figura 3.13 se puede observar el crecimiento de *Pichia stipitis*, con una imagen tomada a las 0 horas y otra tomada a las 24 horas de crecimiento del microorganismo, además de una placa de mantenimiento del microorganismo.



**Figura 3.12.** Placa de mantenimiento con *P. stipitis* y medio de cultivo a las cero horas de crecimiento.

**Figura 3.13.** Imagen de inóculos tras 24 horas de crecimiento.

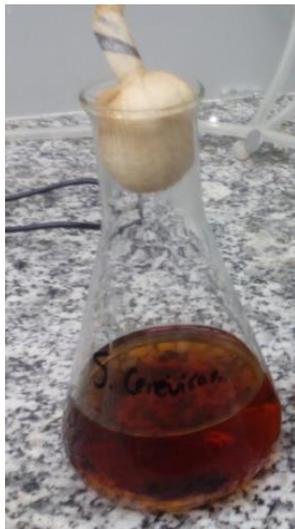
#### 3.5.2 *S. cerevisiae*. Mantenimiento y preparación de inóculo

Al igual que en el caso de *P. stipitis* el mantenimiento de *S. cerevisiae* a corto plazo se realiza en placas Petri con un medio con la siguiente composición: 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona de soja, 20 g/L de glucosa y 20 g/L de agar. El microorganismo se trasvasa desde el medio de crecimiento a la placa preparada con el medio de mantenimiento con ayuda de un asa de siembra en condiciones estériles. La placa se incuba en estufa a 30°C durante 48 h y se conserva en el frigorífico a una temperatura de 4°C.

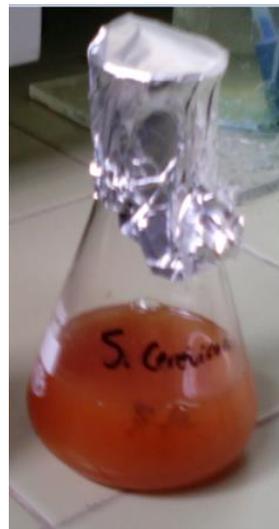
El medio de cultivo para la preparación de inóculo se compone de 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de glucosa y 20 g/L de peptona de soja esterilizados en autoclave durante 20 min a 121°C. El microorganismo se transfiere en condiciones de esterilidad desde la placa Petri al medio de cultivo, preparado por duplicado, y se incuba aeróbicamente durante 24 h a 175 rpm y 30°C en erlenmeyer de 250 mL con tapón de algodón.

La Figura 3.14 y la Figura 3.15 muestran el crecimiento de la levadura. La primera foto está realizada a las 0 horas del crecimiento, mientras que la segunda, en la que el medio presenta un aspecto más turbio, está tomada tras 24 h en un incubador orbital a 30°C.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 3.14.** Medio de cultivo con *S. cerevisiae* a las 0 h de crecimiento.



**Figura 3.15.** Medio de cultivo con *S. cerevisiae* a las 24 h de crecimiento.

#### 3.5.3 Fermentación de medios modelo

Se han realizado ensayos de fermentación con *P. stipitis* en medios modelos, para estudiar la influencia posibles inhibidores del proceso presentes en los hidrolizados de paja de trigo tratada con ozono.

Los medios de fermentación están compuestos por: 20 g/L de glucosa, 10 g/L de xilosa, 20 g/L de peptona de soja, 10 g/L de extracto de levadura, 0,47 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 12,8 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,51 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,47 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y compuestos tóxicos, concretamente ácido acético y ácido gálico, en un rango de 0,0-0,5 g/L y 0,0-1,2 g/L, respectivamente. Se han elegido estos compuestos porque están presentes de forma habitual en estas concentraciones en los hidrolizados de paja de trigo ozonizada y se sospecha que pueden tener un efecto perjudicial sobre la etapa de fermentación con *P. stipitis*.

Los ensayos se han realizado en frascos de vidrio encapsulados de 125 ml (penicilin flasks) provistos de aguja para la eliminación del dióxido de carbono generado durante la fermentación. El pH de los medios se ajusta a 5 y posteriormente se autoclava ( $120^\circ$  y 20 min), a excepción de la xilosa y los inhibidores, que son añadidos posteriormente a cada frasco mediante filtros de aguja estériles de 0,20  $\mu\text{m}$ . Los frascos de vidrio contienen un volumen total de 50 ml y se inocularon al 10% (v/v) con *P. stipitis*. La fermentación se llevó a cabo en incubador orbital a  $30^\circ\text{C}$  y 175 rpm durante 168 h.

#### 3.5.4 Fermentación de hidrolizados de paja de trigo

Al igual que la hidrólisis enzimática, esta etapa se ha llevado a cabo en matraces de 100 mL y reactores agitados de 250 mL.

La fermentación tiene lugar al pH óptimo de crecimiento del microorganismo, que está en torno a 5, por lo que el primer paso es ajustar el pH tanto de los matraces como de los reactores con una disolución de NaOH 3M.

Para llevar a cabo la fermentación en condiciones estériles, se pasteuriza el contenido de matraces y reactores. En el caso de los matraces, se mantienen en un baño termostático durante 30 minutos a 80°C. Para los reactores se aumenta hasta 85°C la temperatura del baño dejándolo a esta temperatura durante algo más de media hora. Una vez han pasado los 30 minutos, se deja enfriar hasta la temperatura óptima de crecimiento de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*, esto es 30°C.

A continuación, se inocula el microorganismo *P. stipitis* al 10% (v/v), lo que significa que en los matraces se añadieron 3 ml de inóculo y en los reactores 20 mL de inóculo. Este procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, por lo que se realiza en cámara de flujo laminar en el caso de los matraces y cerca de llama en el caso de los reactores. Se tomó muestra inicial del medio de fermentación para determinar la concentración inicial de azúcares simples y etanol mediante HPLC.

La fermentación con *P. stipitis* tuvo lugar durante 7 días a 30°C y 175 rpm. En el caso de los reactores, se tomó muestra diariamente. Para los matraces sólo se tomó muestra al inicio y al final de la fermentación.

La fermentación con *S. cerevisiae* se realizó en matraces agitados a 30°C y pH 5, prolongándose durante 48 h, con una dosis de inóculo 3,3% (v/v).

La inoculación de *S. cerevisiae* se realizó al 3% (v/v). La fermentación se llevó a cabo en un incubador orbital a 30°C y 175 rpm, estudiándose para dos tiempos de proceso 24 h y 48 h.

A partir de la concentración de azúcares y etanol se puede evaluar la conversión de etanol durante el proceso, el rendimiento total del mismo, la productividad de etanol. Para ello se definen los siguientes parámetros [1]:

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Rendimiento de etanol sobre el teórico (RTE): tanto por ciento de etanol producido con respecto a la cantidad total de etanol que podría producirse a partir de los azúcares fermentables presentes inicialmente en el medio de fermentación.

$$RTE = \frac{\text{g etanol}}{0,51 \cdot (\text{g glucosa} + \text{g xilosa})} \cdot 100 \quad (\text{ec. 3.3})$$

Rendimiento global de etanol (RGE): tanto por ciento de etanol producido con respecto al máximo teórico que podría haberse producido teniendo en cuenta los azúcares presentes en la materia prima.

$$RGE = \frac{\text{etanol (g/100 gMS)}}{0,51 \cdot (\text{g glucosa} + \text{g xilosa}) \text{ en paja trig. (g/100 gMS)}} \cdot 100 \quad (\text{ec. 3.4})$$

Coefficiente de rendimiento de etanol ( $Y_{p/s}$ ): gramos de etanol producidos por cada gramo de xilosa y glucosa consumido.

$$Y_{p/s} = \frac{\text{etanol producido (g/L)}}{\text{azúcares consumidos (g/L)}} \quad (\text{ec. 3.5})$$

## 3.6 Métodos de análisis

### 3.6.1 Caracterización de la materia prima

Para la caracterización de la paja de trigo se siguen los métodos del National Renewable Energy Laboratory [86] para la determinación de sólidos totales, extractivos, carbohidratos estructurales, lignina y cenizas en la biomasa lignocelulósica. En el

ANEXO I: Caracterización de la materia prima se representa un esquema del proceso.

### 3.6.2 Determinación de azúcares e inhibidores mediante HPLC.

Mediante HPLC o cromatografía líquida de alta resolución son determinados diferentes compuestos: azúcares fermentables (glucosa, xilosa y arabinosa), posibles compuestos inhibidores de la fermentación (ácidos oxálico, acético, láctico y fórmico) y etanol como producto final del proceso de fermentación.

El cromatógrafo usado (WATERS HPLC) está dotado de un detector con medida del índice de refracción (Waters 2414 Refractive Index Detector) y una columna Aminex 87-H de Biorad. Se utilizó como fase móvil  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5  $\mu\text{M}$  con un flujo de 0.6 mL/min, temperatura 60 °C y un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ .

Las muestras de hidrólisis y fermentación contenidas en tubos eppendorf se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos (EPPENDORF, MiniSpin). Se realizó una dilución 1:5 con agua Milli-Q del sobrenadante. Esta dilución se filtró por medio de filtros de jeringa de 0.22  $\mu\text{m}$  y se almacenó en viales de HPLC hasta su análisis.

La preparación de muestras y patrones se desarrolla con más detalle en el Anexo II: Análisis de azúcares, alcoholes y productos inhibidores mediante HPLC. Preparación de muestras y patrones.

### 3.6.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos que pueden formarse en el pretratamiento y estar presentes en los hidrolizados de trigo se analizaron mediante espectrofotometría a 765 nm. La absorbancia de cada muestra medida con el espectrofotómetro se relacionó con la concentración de fenólicos mediante una recta de calibrado previamente preparada con patrones de concentración conocida de ácido gálico. El proceso de determinación de compuestos fenólicos está más ampliamente desarrollado en el ANEXO III: Análisis de compuestos fenólicos mediante espectrofotometría.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.6.4 Determinación de la concentración celular

La concentración de células se determina filtrando un volumen de muestra determinado (alrededor de 40 ml) a través de filtros de fibra de vidrio de 0,45  $\mu\text{m}$ . El filtro se seca en estufa a 105°C hasta pesada constante. La diferencia entre la pesada inicial y final es la cantidad de biomasa presente en el volumen filtrado.

## 4 Resultados y discusión

### 4.1 Fermentación con *P. stipitis* de medios modelo. Influencia de la presencia de inhibidores.

Para estudiar la influencia de los compuestos presentes en los hidrolizados de paja de trigo tratada con ozono que pudieran inhibir la fermentación del microorganismo *P. stipitis*, que es el elegido para llevar a cabo la fermentación de los hidrolizados de paja de trigo debido a su capacidad de fermentar pentosas y hexosas, se han realizado ensayos de fermentación en matraces agitados con medios modelos a los que se han añadido diferentes concentraciones de inhibidores que se encuentran de forma habitual en los hidrolizados de paja de trigo pretratada con ozono, concretamente ácido acético, procedente de la degradación de los carbohidratos y ácido gálico, que se utiliza para simular la presencia de compuestos fenólicos, procedentes de la degradación de la lignina.

Otros autores han realizado estudios de la influencia que tiene el ácido acético sobre la etapa de fermentación en concentraciones comprendidas entre 0,5-2,5 g/L [1, 87], por ello el rango elegido fue inferior 0,1-0,5 g/L. Por otro lado se ha decidido estudiar la inhibición que producen los compuestos fenólicos sobre *P. stipitis* debido a la ausencia de estudios previos sobre el tema. El rango de concentraciones elegido en este caso ha sido 1,0-1,2, por ser el habitual en los hidrolizados de paja de trigo ozonizada.

Se han planteado dos tipos de ensayos. Por un lado se ha estudiado el efecto que producen los compuestos fenólicos de forma aislada y para ello se han realizado ensayos con diferentes concentraciones de los mismos: 1,0 g/L (F-1) y 1,2 g/L (F-2). Por otro lado se ha estudiado el efecto sinérgico que producen los compuestos fenólicos con el ácido acético. Para ello se ha mantenido constante en 1,0 g/L la concentración de compuestos fenólicos y se ha ido aumentando la concentración de ácido acético: 0,1 g/L (FA-1), 0,3 g/L (FA-2) y 0,5 g/L (FA-3). El ensayo de control se corresponde con un medio modelo libre de inhibidores.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 4.1 se muestra la composición del medio modelo al inicio y al final de la fermentación relativa a azúcares fermentables (glucosa y xilosa), inhibidores (ácido acético y compuestos fenólicos) y etanol.

	Concentración inicio de fermentación (g/L)				Concentración final fermentación (g/L)		
	Azúcares		Inhibidores		Azúcares		Producto
	Glucosa	Xilosa	Comp.fenólicos	Ác. acético	Glucosa	Xilosa	Etanol
F-1	14,8±0,2	11,1±0,1	1,0±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	1,2±0,1	10,6±0,6
F-2	14,2±0,2	10,9±0,0	1,2±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,1	9,6±0,5
FA-1	14,3±0,1	10,9±0,1	1,0±0,1	0,1±0,0	0,0±0,0	4,5±0,1	9,6±0,4
FA-2	14,3±0,1	10,9±0,1	1,0±0,1	0,3±0,0	1,8±0,1	10,2±0,1	6,7±0,5
FA-3	13,9±0,1	10,1±0,2	1,0±0,1	0,5±0,1	2,7±0,2	9,6±0,1	6,1±0,6
Control	14,0±0,1	10,3±0,1	0,0±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,9±0,1	11,0±0,6

**Tabla 4.1.** Concentración inicial y final de azúcares, inhibidores y etanol en la fermentación de medios modelo.

La concentración inicial de sustrato en los ensayos, 14 g/L de glucosa y 11 g/L de xilosa, corresponde con las concentraciones de azúcares que podrían alcanzarse teóricamente en hidrolizados de paja de trigo con una carga del 5% de materia seca (MS).

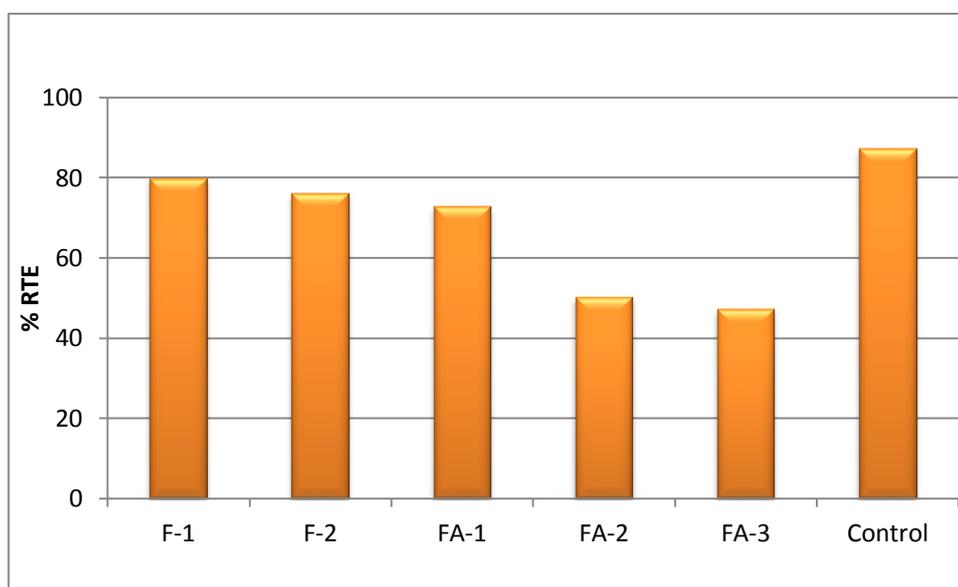
A partir de los datos de la Tabla 4.1 se puede observar que el efecto individual de los compuestos fenólicos sobre el proceso de fermentación no es muy significativo. En el caso del control la producción de etanol alcanza 11,0 g/L. Este valor desciende ligeramente hasta 10,6 g/L y 9,6 g/L para concentraciones de 1,0 g/L (F-1) y 1,2 g/L (F-2) de compuestos fenólicos, respectivamente.

Al añadir ácido acético al medio, la inhibición se hace más evidente. En FA-1 se alcanza una concentración de etanol de 9,6 g/L, en FA-2 6,7 g/L y en FA-3 6,1 g/L. Como puede observarse, a partir de una concentración de ácido acético de 0,3 g/L y compuestos fenólicos de 1 g/L, la xilosa permanece en el medio sin fermentar y la glucosa no se consume completamente.

En la Tabla 4.2 y en la Figura 4.1 se representan los rendimientos de obtención de etanol obtenidos en la fermentación de los medios modelo con *P. stipitis*.

	RTE (%)	Y p/s
F-1	79,8	0,45
F-2	76,1	0,46
FA-1	72,9	0,45
FA-2	50,1	0,49
FA-3	47,3	0,50
Control	87,3	0,46

**Tabla 4.2.** Rendimientos de obtención de etanol en los medios modelo.



**Figura 4.1.** Rendimientos de obtención de etanol.

El descenso en el rendimiento teórico de obtención de etanol al aumentar la concentración de compuestos fenólicos no es muy pronunciado. El RTE para el control alcanza un 87,3%, disminuyendo hasta valores de 79,8% para F-1 y 76,1% para F-2. Por otra parte el coeficiente de rendimiento de etanol no se ve afectado por la presencia de compuestos fenólicos teniendo un valor de 0,45-0,46 en todos los casos.

Sin embargo, el rendimiento en la obtención de etanol se ve seriamente afectado por la presencia de ácido acético en el medio, disminuyendo notablemente a medida que aumenta la concentración del tóxico. Respecto al rendimiento teórico de obtención de etanol se observa un descenso muy

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

importante desde 87,3% obtenido en el control hasta 47,3% correspondiente al ensayo FA-3 (1 g/L de compuestos fenólicos y 0,5 g/L de ácido acético).

A la vista de estos datos se puede afirmar que el ácido acético es un inhibidor potencial y junto con los compuestos fenólicos producen un efecto sinérgico negativo sobre la etapa de fermentación con *P. stipitis* que comienza a ser a ser notable con concentraciones de 0,3 g/L y 1,0 g/L de ácido acético y compuestos fenólicos, respectivamente. Para una concentración de 3,5-3,9 g/L de ácido acético en el medio, la producción de etanol es inhibida completamente [1, 87].

El efecto que produce el ácido acético sobre el proceso de fermentación con *P. stipitis* consiste en impedir el consumo de los azúcares del medio. Con concentraciones de 0,3 g/L de ácido acético el metabolismo de la xilosa queda inhibido, como se puede observar en la Tabla 4.1, lo que impide el crecimiento de la biomasa y un descenso en la producción de etanol.

Este comportamiento ha sido observado previamente por otros autores que vieron disminuidos los rendimientos de producción de etanol al aumentar la concentración de ácido acético en fermentaciones con *P. stipitis* CECT 1992 en medio modelo (20 g/L glucosa y 15 g/L xilosa) añadiendo 3 g/L y 6g/L de ácido acético [88] y con *P. stipitis* DSM 3651 en medio modelo (35 g/L glucosa y 20g/L xilosa) añadiendo 0,5, 1,5 g/L y 2,5 g/L de ácido acético donde se observó inhibición parcial del metabolismo de xilosa con 0,5 g/L y total con 1,5 g/L, mientras que la velocidad de consumo de glucosa disminuye para 1,5 g/L de ácido acético y su metabolismo queda inhibido parcialmente para 2,5 g/L [1, 89].

El efecto que producen otros compuestos como el ácido oxálico sobre el proceso de fermentación también han sido estudiado por otros autores concluyendo que este tóxico provoca un retardo en el consumo de xilosa, disminuyendo el coeficiente de rendimiento de etanol, pero de una forma menos notable que el ácido acético ya que se requiere una concentración considerablemente mayor (6,5 g/L de ácido oxálico), que no se alcanza en los hidrolizados de paja de trigo pretratada con ozono. Cuando el ácido acético y el ácido oxálico se encuentran simultáneamente en el medio en concentraciones elevadas (1,5 g/L y 6,5 g/L, respectivamente) se produce un efecto sinérgico negativo sobre el proceso de fermentación. [1]

## 4.2 Influencia del pretratamiento en la liberación de azúcares fermentables y producción de etanol.

Con el objetivo de aumentar la eficiencia en la producción de etanol, la biomasa lignocelulósica se somete a un pretratamiento físico de extrusión y químico de ozonización. Para analizar la eficacia del pretratamiento, se determinó la composición del material pretratado y el rendimiento de liberación de azúcares fermentables durante la etapa de hidrólisis enzimática y la producción de etanol mediante fermentación con *P. stipitis*.

La Tabla 4.3 muestra la composición, en porcentaje sobre el peso seco del material, para paja de trigo extrusada y extrusada-ozonizada. La humedad del material fue  $43,4 \pm 5,8$  % para la paja extrusada y  $42,1 \pm 0,6$  % para paja extrusada y ozonizada (% base húmeda).

Compuesto	Paja extrusada	Paja extrusada y ozonizada
Celulosa	$39,4 \pm 1,7$	$39,1 \pm 0,2$
Hemicelulosa	$21,7 \pm 0,9$	$20,5 \pm 0,1$
Lignina Ácida Insoluble (LAI)	$14,8 \pm 2,1$	$9,70 \pm 0,1$
Lignina Ácida Soluble (LAS)	$4,2 \pm 0,3$	$6,31 \pm 0,3$
Cenizas	$4,0 \pm 0,3$	$4,4 \pm 0,0$

*Tabla 4.3. Composición de la materia prima pretratada.*

Como puede observarse en la Tabla 4.3 el pretratamiento consigue una alteración de la estructura del material. La extrusión produce una pequeña reducción en el porcentaje de lignina ácida insoluble con respecto al material sin tratar (de 16,6% a 14,8% sobre MS). El resto de compuestos de la estructura de la paja se mantienen en un porcentaje más o menos constante. Durante la ozonólisis se produce una degradación y/o solubilización parcial de la lignina con respecto a la materia prima sin tratar, de forma que el porcentaje de lignina ácida soluble aumenta y por el contrario el porcentaje de lignina ácida insoluble disminuye, lo que provoca que el porcentaje de lignina ácida total disminuya ligeramente (suponiendo un 19% para la paja extrusada y un 16% para la paja extrusada-ozonizada). El contenido en celulosa no se ve afectado por el pretratamiento y la disminución en el contenido de hemicelulosa es poco significativo.

Para analizar la eficacia en cuanto a liberación de azúcares y producción de etanol, se realizaron ensayos en matraces agitados con una concentración de materia seca del 10% (w/w) con paja de trigo no pretratada (ensayo 10-U), paja de trigo extrusada (ensayo 10-E) y paja de trigo extrusada y

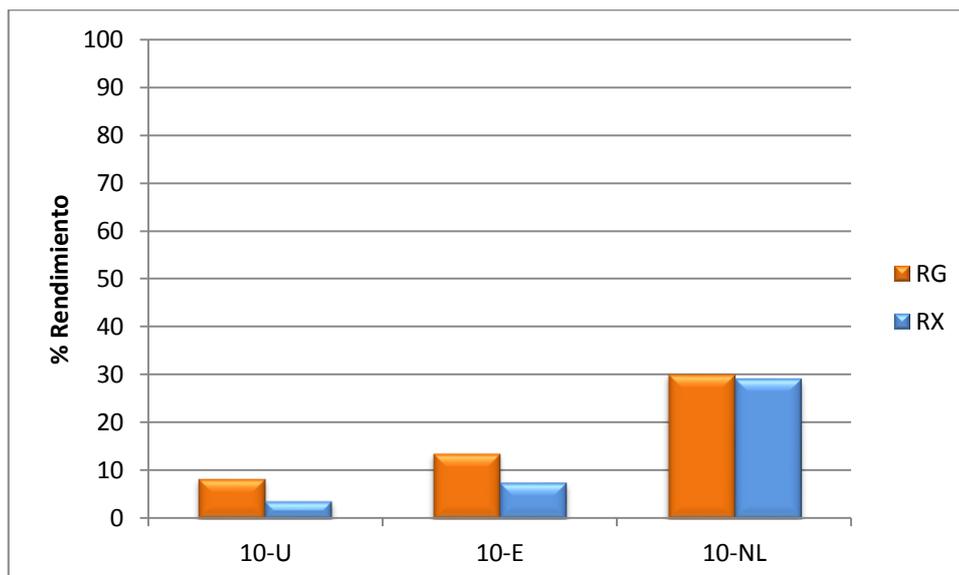
#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

posteriormente ozonizada (ensayo 10-NL). En la Tabla 4.4 se muestra las concentraciones de azúcares obtenidas tras la hidrólisis enzimática, así como las concentraciones de compuestos tóxicos presentes en el medio. Los rendimientos de recuperación de azúcares son representados en la Figura 4.2.

Ensayo	Concentraciones obtenidas tras HE (g/L)			
	Azúcares		Inhibidores	
	Glucosa	Xilosa	Comp. fenólicos	Ác. acético
10-U	3,5±0,0	0,9±0,0	0,6±0,0	0,4±0,0
10-E	5,8±0,2	1,7±0,1	0,9±0,0	0,6±0,0
10-NL	12,6±0,3	6,6±0,1	0,9±0,0	0,9±0,0

**Tabla 4.4.** Comparación de la composición media de azúcares e inhibidores en hidrolizados de paja de trigo con distintos pretratamientos.

El pretratamiento del material incrementa los rendimientos de la hidrólisis en comparación con el material sin tratar. El pretratamiento de extrusión combinado con ozono altera la estructura y cristalinidad de la biomasa lignocelulósica favoreciendo su digestibilidad enzimática. Se puede apreciar el aumento considerable de la concentración de glucosa que toma valores de 3,5 g/L para la paja sin tratar, 5,8 g/L para la paja extrusada y 12,6 g/L para la paja extrusada y ozonizada. Lo mismo ocurre con la concentración de xilosa que aumenta desde 0,9 g/L para la paja no tratada hasta 1,7 g/L para la paja extrusada y 6,6 g/L para la paja extrusada y ozonizada.



**Figura 4.2.** Rendimientos globales de recuperación de azúcares simples tras hidrólisis enzimática de paja de trigo con distintos pretratamientos.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

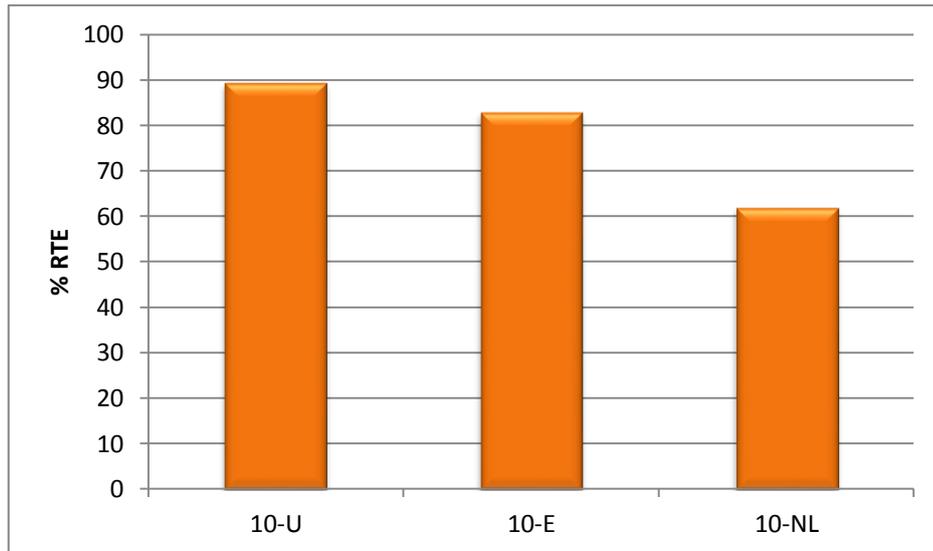
Los rendimientos globales de recuperación de azúcares mejoran a la vez que se incrementa el grado de tratamiento del material, pasando de un 8,4% y 3,7% para el material sin tratar a 13,6% y 7,5% para la paja extrusada y 30,0% y 29,0% para la paja extrusada-ozonizada en cuanto a recuperación de glucosa y xilosa, respectivamente. Así también lo confirman datos de la bibliografía, en los que los rendimientos de la hidrólisis pasan del 29% para paja de cereal sin pretratar a un 53-88, 6% para paja ozonizada [50].

Aunque el pretratamiento favorece la digestibilidad enzimática y aumenta el rendimiento de la sacarificación, también se pueden generar compuestos procedentes de la degradación de carbohidratos (ácido acético) y de la lignina (compuestos fenólicos) que son potencialmente tóxicos para el microorganismo en la etapa de fermentación. La Tabla 4.4 recoge la concentración de estos compuestos inhibidores mientras que la Tabla 4.5 y la Figura 4.3 recogen los resultados de la fermentación con *P. stipitis* de los hidrolizados procedentes de los diferentes pretratamientos.

Ensayo	Concentraciones al inicio de la fermentación (g/L)			Concentraciones al final de la fermentación (g/L)			Rendimiento
	Azúcares		Producto	Azúcares		Producto	
	Glucosa	Xilosa	Etanol	Glucosa	Xilosa	Etanol	Y p/s
<b>10-U</b>	2,6±0,1	0,7±0,0	0,2±0,0	0,0±0,0	0,3±0,0	1,7±0,1	0,50
<b>10-E</b>	4,5±0,2	0,9±0,1	0,1±0,0	0,0±0,0	0,5±0,0	2,4±1,4	0,47
<b>10-NL</b>	11,5±0,3	6,2±0,2	0,1±0,1	0,0±0,0	5,2±1,1	5,7±0,3	0,45

**Tabla 4.5.** Concentraciones medias de azúcares y etanol al inicio y final de la fermentación de paja de trigo para diferentes pretratamientos.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 4.3.** Rendimientos medios de obtención de etanol para diferentes pretratamientos

Los valores del RTE con respecto al material sin tratar disminuyen, muy levemente para la paja extrusada y más notablemente para la paja extrusada y ozonizada, desde un 89% correspondiente a la paja sin pretratar hasta un 83% y un 62%, respectivamente. Lo mismo ocurre con los factores de conversión de etanol que varían desde 0,50 en el ensayo 10-U a 0,47 y 0,45 en 10-E y 10-NL, respectivamente. Con el material pretratado ya sea extrusado o extrusado-ozonizado la concentración final de etanol obtenido aumenta, porque lo hace la concentración de azúcares iniciales, pero por el contrario los rendimientos disminuyen, lo que significa que los azúcares del medio no se están aprovechando de manera eficiente. Como se ha explicado en el apartado 4.1 la presencia de ácido acético aun en baja concentración, puede actuar como inhibidor de la fermentación con *P. stipitis*; además la presencia de compuestos fenólicos de forma simultánea puede incrementar el efecto negativo de este tóxico. El ácido acético forma parte de la estructura del propio material lignocelulósico pero además puede formarse como consecuencia del pretratamiento de ozonización debido a las reacciones de oxidación de lignina.

### 4.3 Influencia de la carga de sólido en la liberación de azúcares fermentables y producción de etanol

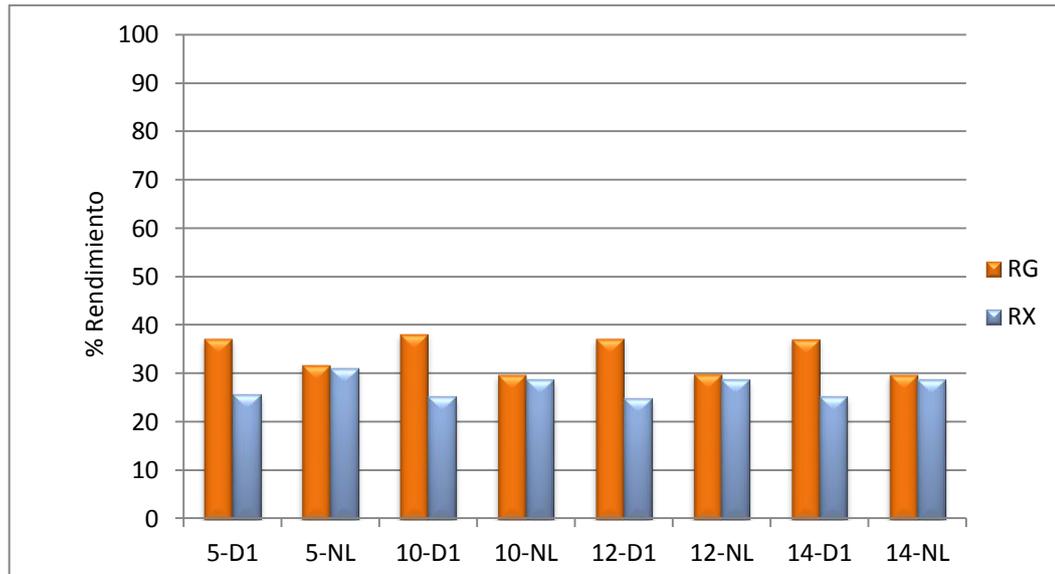
Para estudiar cómo afecta el porcentaje de materia seca al proceso de sacarificación y obtención de etanol se han realizado ensayos en matraces agitados con cargas de sólido del 5%, 10%, 12% y 14% (w/w). La paja fue previamente pretratada (extrusada y ozonizada). Para analizar la influencia de la presencia de inhibidores en las etapas de hidrólisis y fermentación, se realizaron ensayos con paja pretratada lavada y sin lavar. Las condiciones de lavado corresponden al ensayo D1 referido en la Tabla 3.2 (un único lavado durante 15 min y una relación de 100 mL agua/g MS a temperatura ambiente).

En la Tabla 4.6 y en la Figura 4.4 se muestran los resultados obtenidos tras los ensayos de hidrólisis enzimática para las diferentes cargas de material. Los ensayos han sido nombrados como: carga de sólido y lavado o no del material (D1: lavado; NL: paja sin lavar).

Ensayo	Concentraciones obtenidas tras HE (g/L)			
	Azúcares		Inhibidores	
	Glucosa	Xilosa	Comp. Fenólicos	Ác. acético
5-D1	7,6±0,2	2,9±0,1	0,5±0,0	0,3±0,0
5-NL	6,5±0,1	3,5±0,0	0,6±0,0	0,4±0,0
10-D1	16,1±0,2	5,8±0,1	0,8±0,0	0,8±0,0
10-NL	12,6±0,3	6,6±0,1	0,9±0,0	0,9±0,0
12-D1	19,1±0,6	7,0±0,2	0,8±0,0	0,9±0,0
12-NL	15,4±0,2	8,0±0,1	1,0±0,0	1,1±0,0
14-D1	22,5±0,5	8,3±0,2	0,9±0,0	1,2±0,0
14-NL	17,9±0,4	9,4±0,1	1,1±0,0	1,4±0,0

**Tabla 4.6.** Composición media de azúcares e inhibidores en hidrolizados de paja de trigo.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 4.4.** Rendimientos globales de recuperación de azúcares simples tras hidrólisis enzimática de paja de trigo.

Al comparar la concentración de azúcares simples liberados en los hidrolizados de paja de trigo se observa que la concentración de glucosa y xilosa en el medio aumenta a medida que lo hace la carga inicial, desde 7,6 g/L de glucosa y 2,9 g/L de xilosa para una carga del 5% de paja lavada hasta 22,5 g/L de glucosa y 8,3 g/L de xilosa para una carga del 14% (paja lavada). En cualquier caso, los rendimientos de recuperación de azúcares para el 5% y el 14% de MS son similares, 37% la recuperación de glucosa y 25% de recuperación de xilosa con paja lavada porque aunque la concentración de azúcares presentes en el medio sea mayor, también es mayor la concentración de azúcares disponibles (es mayor la carga de sólidos), es decir, el ratio entre azúcares liberados y azúcares presentes en la paja de trigo se mantiene.

La etapa de detoxificación por un lado favorece la recuperación de glucosa, pero por otro lado reduce la concentración de xilosa en el medio. Por ejemplo para un 10% (w/w) la recuperación de glucosa para la paja lavada alcanza un 38% disminuyendo hasta un 30% para la paja sin lavar, mientras que la recuperación de xilosa alcanza un valor de 25% para la paja lavada que asciende hasta un 29% para la paja sin lavar. Este hecho puede ser debido a la solubilización de azúcares en el agua de lavado que afecta principalmente a la fracción hemicelulósica [90]. Sin embargo, la recuperación de glucosa mejora debido probablemente a la eliminación de inhibidores de la hidrólisis enzimática durante el lavado.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

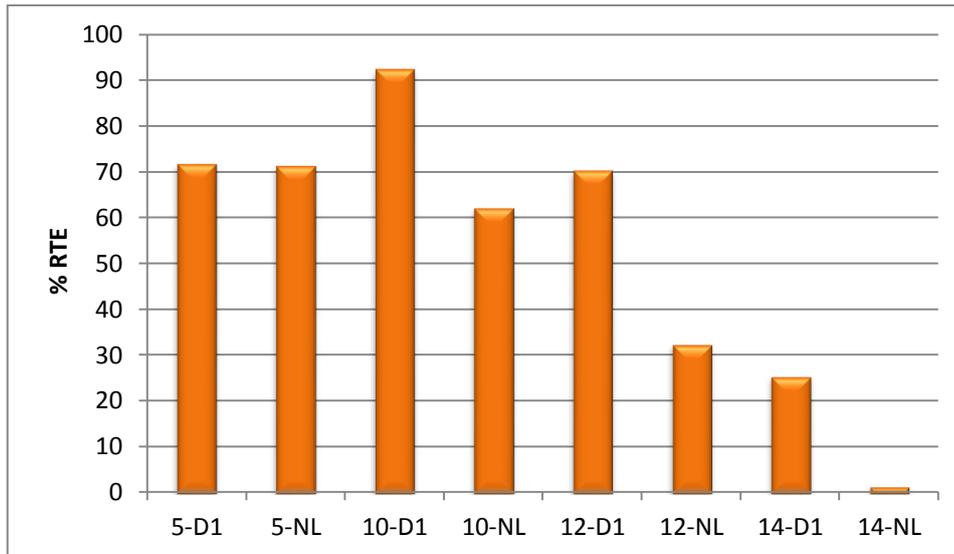
En resumen, los rendimientos de recuperación de glucosa se encuentran en torno al 37% para la paja lavada y 30% para la paja sin lavar y los rendimientos de xilosa toman valores aproximadamente de 25% y 29% para paja lavada y sin lavar, respectivamente. Estos valores son más bajos que otros datos encontrados en bibliografía donde la recuperación de glucosa fue del 56% para paja lavada y del 62% para paja sin lavar mientras que la recuperación de xilosa tomó valores de 38% y 52% para paja lavada y sin lavar, respectivamente [1].

En la Tabla 4.7 se presentan las concentraciones de glucosa, xilosa y etanol del medio al inicio y al final de la fermentación con *P. stipitis* de hidrolizados de paja de trigo. Los rendimientos de obtención sobre el teórico se representan en la Figura 4.5.

Ensayo	Concentraciones al inicio de la fermentación (g/L)			Concentraciones al final de la fermentación (g/L)			Rendimiento
	Azúcares		Producto	Azúcares		Producto	
	Glucosa	Xilosa	Etanol	Glucosa	Xilosa	Etanol	Y p/s
5-D1	7,1±0,3	2,7±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	3,6±0,0	0,37
5-NL	5,9±0,2	3,1±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	3,3±0,2	0,38
10-D1	13,4±1,5	5,6±0,3	0,1±0,0	0,0±0,0	0,9±0,7	9,0±0,2	0,49
10-NL	11,5±0,3	6,2±0,2	0,1±0,1	0,0±0,0	5,2±1,1	5,7±0,3	0,45
12-D1	14,1±1,8	5,9±1,1	0,1±0,1	1,2±1,7	4,7±3,0	7,3±1,1	0,51
12-NL	13,6±0,3	7,2±0,1	0,1±0,0	4,6±0,5	7,1±0,3	3,6±0,1	0,38
14-D1	20,0±1,0	7,6±0,4	0,1±0,0	9,3±2,5	7,4±0,2	3,7±0,5	0,33
14-NL	15,5±0,2	8,3±0,2	0,1±0,0	14,2±2,0	8,1±0,3	0,3±0,8	0,12

**Tabla 4.7.** Concentraciones de azúcares y etanol al inicio y final de la fermentación.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 4.5.** Rendimientos medios de obtención de etanol.

La presencia de ácido acético combinada con la de compuestos fenólicos, inhibe parcialmente el consumo de glucosa (con concentraciones de 1,1 g/L de ácido acético y 1,0 g/L de compuestos fenólicos como se observa en la Tabla 4.6 y la Tabla 4.7) y totalmente el de xilosa (con concentraciones de 0,3 g/L de ácido acético y 1,0 g/L de compuestos fenólicos como se muestra en la Tabla 4.1, correspondiente a ensayos en medios modelo). Al aumentar la concentración de paja en el medio, aumenta la concentración de azúcares fermentables, pero también la concentración de inhibidores, lo que reduce considerablemente el rendimiento de obtención de etanol. El lavado se convierte entonces en una etapa muy importante para aumentar la eficiencia del proceso. La concentración de etanol en el medio aumenta en 3,5 g/L, aproximadamente, de la paja lavada a la paja sin lavar.

Con un 5% y un 10% de carga, los azúcares son consumidos totalmente (a excepción de la xilosa en el ensayo 10-NL). A medida que aumenta la carga aumenta la concentración de inhibidores en el medio que provocan un descenso en la producción de etanol desde un 9,0 g/L para una carga del 10% de paja lavada (ensayo 10-D1), donde las concentraciones de ácido acético y compuestos fenólicos son 0,8 g/L, hasta 3,7 g/L de etanol para una carga del 14% de paja lavada (ensayo 14-D1) y unas concentraciones de inhibidores de 1,2 g/L de ácido acético y 0,9 g/L de compuestos fenólicos. El aumento de la carga de sólido también puede influir en la etapa de fermentación, de forma que un aumento del porcentaje de material dificulte la transferencia de materia y por lo tanto, la producción de etanol.

*P. stipitis* presenta un comportamiento diaúxico a la hora de consumir los azúcares del medio, es decir, consume los azúcares de seis y cinco carbonos de forma secuencial, mostrando preferencia por las hexosas. Si existe una

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

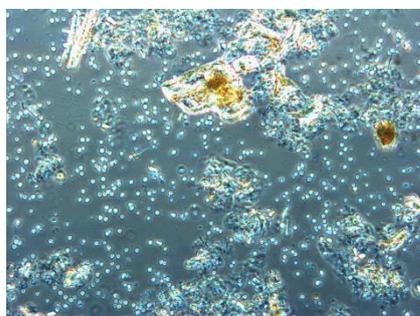
alta concentración de compuestos tóxicos la velocidad de consumo de glucosa se ve ralentizada, impidiendo que se consuma en su totalidad durante el proceso y a su vez esta glucosa inhibirá el consumo de xilosa. A partir del 12% (w/w) se puede observar claramente este efecto. La concentración de inhibidores aumenta, la glucosa deja de ser consumida en su totalidad mientras que la xilosa permanece intacta en el medio de fermentación.

Los mayores rendimientos correspondieron a una carga de sólido del 10% (w/w) y paja lavada alcanzando 9,2 g etanol/100 g MS, lo que supone un 92% con respecto al teórico de etanol, 29% con respecto al global y un ratio de conversión etanol/azúcares consumidos de 0,49. Los resultados obtenidos son ligeramente superiores a los encontrados en la bibliografía para fermentaciones con *P. stipitis* de paja de trigo ozonizada al 10 % (w/v) que alcanzaron 9,6 g etanol/100 g MP de etanol, 70,2% con respecto al teórico y 0,38 de ratio de conversión [1]. Si el porcentaje de materia seca añadido supera el 10% los rendimientos disminuyen, debido a que la agitación del incubador orbital no es suficiente para asegurar un buen contacto entre del material con las enzimas y el microorganismo.

Las diferencias en el crecimiento de la biomasa para los distintos ensayos se pueden observar en las siguientes imágenes tomadas en el microscopio (LEICA DM 400B) al final del proceso de fermentación.



**Figura 4.6.** Fermentación de paja de trigo 5-NL



**Figura 4.7** Fermentación de paja de trigo 10-NL

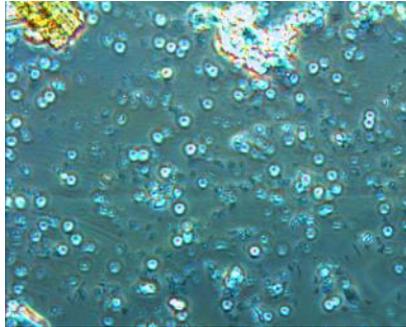


**Figura 4.8** Fermentación de paja de trigo 14-NL

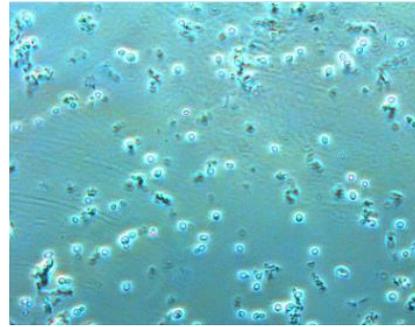
La Figura 4.6, la Figura 4.7 y la Figura 4.8 muestran el crecimiento del microorganismo *P. stipitis* tras 168 horas de fermentación. El porcentaje de materia seca añadido al medio produce efectos contrarios, por un lado al pasar del 5% al 10% MS la concentración de biomasa aumenta y al haber más materia prima el microorganismo dispone de una concentración de azúcares en el medio mayor. En cambio al pasar del 10% al 14% de MS se produce una disminución muy considerable en la concentración de biomasa que puede ser debida a un aumento en la concentración de compuestos

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

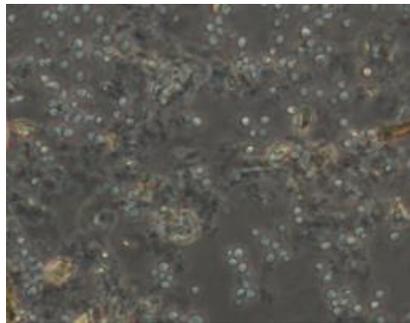
inhibidores como el ácido acético que ralentizan el crecimiento de este microorganismo.



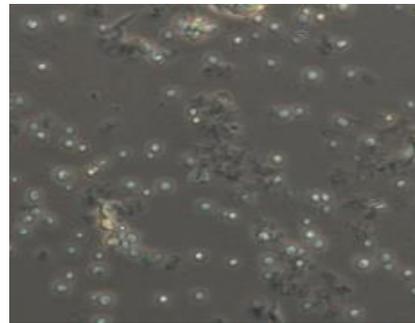
**Figura 4.9** Fermentación de paja de trigo 5-D1



**Figura 4.10** Fermentación de paja de trigo 5-NL



**Figura 4.11** Fermentación de paja de trigo 10-D1



**Figura 4.12** Fermentación de paja de trigo 10-NL

La etapa de detoxificación es crucial en el proceso de obtención de etanol ya que reduce la concentración de compuestos inhibidores del crecimiento de *P. stipitis*. Este efecto puede ser observado en la Figura 4.9, Figura 4.10, Figura 4.11 y Figura 4.12 donde se puede observar el incremento en la concentración de biomasa al realizar el lavado de la paja de trigo pretratada.

#### 4.4 Análisis de diferentes estrategias de lavado en la fermentación de paja de trigo pretratada

Debido a la fuerte inhibición en la fermentación con *P. stipitis* observada en los anteriores ensayos con porcentajes de materia seca superiores al 10%, se ha planteado el análisis de diferentes estrategias de lavado para ver cómo afectan a las etapas posteriores de hidrólisis enzimática y fermentación con *P. stipitis* para cargas de sólido del 12% MS.

Las estrategias de lavado llevadas a cabo son las recogidas en la Tabla 3.2 y que se indican a continuación:

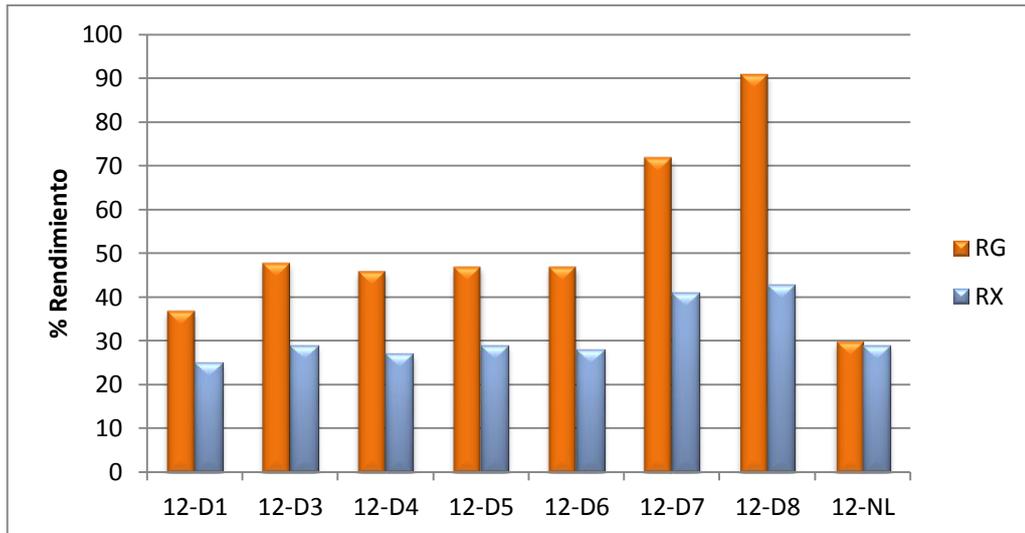
- D1: 1 lavado, 100 ml/g MS, 15 min, 20°C
- D3: 2 lavados, 50 ml/g MS, 15 min, 20°C
- D4: 2 lavados, 50 ml/g MS, 15 min, 30°C
- D5: 3 lavados, 40 ml/g MS, 15 min, 20°C
- D6: 3 lavados, 40 ml/g MS, 15 min, 30°C
- D7: 1 lavado, 100 ml/g MS, 15 min, 60°C
- D8: 1 lavado, 100 ml/g MS, 15 min, 60°C, pH11
- NL: no lavada

Los ensayos se llevaron a cabo en matraces agitados. En la Tabla 4.8 y en la Figura 4.13 se muestran las concentraciones de azúcares e inhibidores presentes en los hidrolizados y los rendimientos de recuperación de azúcares simples obtenidos tras la hidrólisis enzimática, respectivamente.

Ensayo	Concentraciones obtenidas tras HE (g/L)			
	Azúcares		Inhibidores	
	Glucosa	Xilosa	Comp. fenólicos	Ác. acético
12-D1	19,1±0,6	7,0±0,2	0,8±0,0	0,9±0,0
12-D3	24,1±0,6	8,0±0,2	0,7±0,0	1,0±0,0
12-D4	23,1±0,5	7,5±0,2	0,9±0,1	1,0±0,0
12-D5	23,6±0,4	8,0±,1	0,8±0,1	1,1±0,0
12-D6	23,9±0,3	7,8±0,1	0,7±0,0	1,0±0,0
12-D7	36,6±1,7	11,2±0,6	0,7±0,1	1,3±0,2
12-D8	46,2±1,1	12,0±0,3	0,6±0,0	0,4±0,0
12-NL	15,4±0,2	8,0±0,1	1,0±0,0	1,1±0,0

**Tabla 4.8.** Composición media de azúcares e inhibidores en hidrolizados de paja de trigo.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 4.13.** Rendimientos globales de recuperación de azúcares simples tras hidrólisis enzimática de paja de trigo.

El mejor resultado tras la hidrólisis enzimática se obtiene para el ensayo 12-D8, que corresponde a un lavado con agua a pH 11 y 60°C con una relación de 100 mL/g MS. En estas condiciones se ha conseguido alcanzar un rendimiento del 91% en recuperación de glucosa y un 43% en recuperación de xilosa. Las concentraciones de estos azúcares en el medio son 46,2 g/L glucosa y 12,0 g/L xilosa. Además, se muestra como una estrategia de lavado prometedora para la etapa de fermentación puesto que las concentraciones de inhibidores en el hidrolizado son 0,4 g/L y 0,6 g/L de ácido acético y compuestos fenólicos, respectivamente.

El ensayo 12-D7, que corresponde a un lavado a pH 2,6 y 60°C da lugar a resultados ligeramente inferiores en cuanto a recuperación de azúcares 36,6 g/L de glucosa y 11,2 g/L de xilosa, lo que resulta en un 72% en recuperación de glucosa y un 41% en recuperación de xilosa.

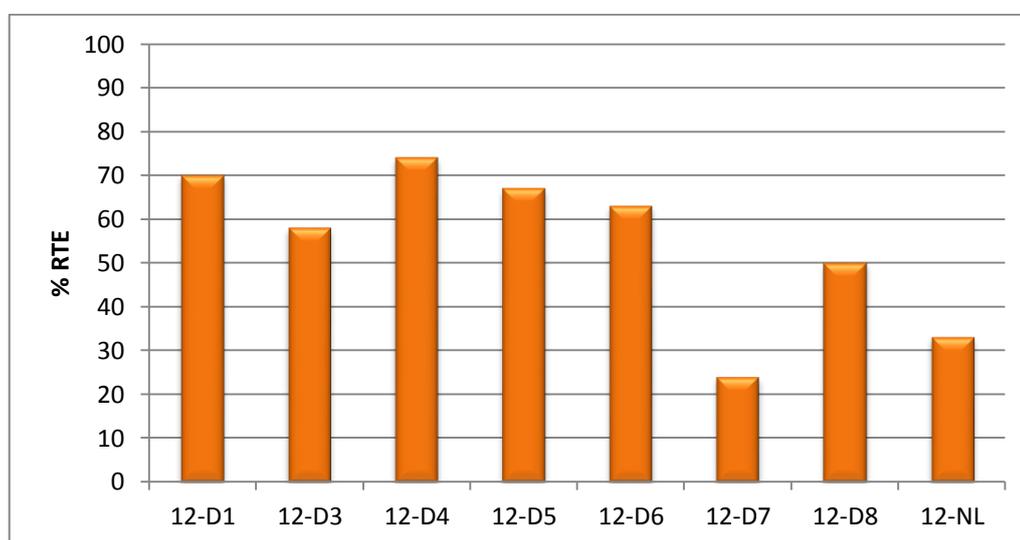
Las estrategias de lavado D3, D4, D5 y D6 mejoran ligeramente los resultados obtenidos con el método de lavado D1, pasando de un 38% en recuperación de glucosa a un 47% y de un 25% a un 28% en la recuperación de xilosa. Sin embargo no se aprecia ninguna reducción en la concentración de ácido acético en los hidrolizados que siguen tomando valores de 1 g/L aproximadamente. Las estrategias D3 y D6 consiguen disminuir levemente la concentración de compuestos fenólicos con respecto a D1 (de 0,8 g/L a 0,7 g/L).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 4.9 se recogen las concentraciones de azúcares y etanol obtenidas al inicio y final de la fermentación y en la Figura 4.14 se representan los rendimientos de obtención de etanol para los diferentes ensayos de detoxificación.

Ensayo	Concentraciones al inicio de la fermentación (g/L)			Concentraciones al final de la fermentación (g/L)			Rendimiento
	Azúcares		Producto	Azúcares		Producto	
	Glucosa	Xilosa	Etanol	Glucosa	Xilosa	Etanol	Y p/s
12-D1	14,1±1,8	6,0±1,1	0,1±0,1	1,2±1,7	4,7±3,0	7,3±1,1	0,51
12-D3	20,7±0,5	7,1±0,1	0,3±0,0	0,0±0,0	7,1±0,4	8,6±1,7	0,40
12-D4	19,7±1,1	6,8±0,3	0,4±0,1	0,6±0,4	5,7±3,3	10,3±1,2	0,49
12-D5	19,7±0,4	7,2±0,2	0,4±0,1	0,0±0,0	6,8±1,6	9,6±0,9	0,46
12-D6	20,8±0,3	7,0±0,1	0,3±0,0	1,7±1,3	7,0±1,2	9,2±0,6	0,46
12-D7	27,3±1,2	10,0±0,3	0,2±0,1	16,5±3,7	9,9±0,5	4,7±1,6	0,42
12-D8	35,9±2,6	10,9±0,8	0,1±0,0	4,7±2,8	10,0±0,4	12,0±0,8	0,37
12-NL	13,6±0,3	7,2±0,1	0,1±0,0	4,6±0,5	7,1±0,3	3,6±0,1	0,38

**Tabla 4.9.** Concentraciones de azúcares y etanol al inicio y final de fermentación para diferentes estrategias de lavado.



**Figura 4.14.** Rendimientos medios de obtención de etanol.

Tras la hidrólisis enzimática la estrategia de lavado D8 parecía la más prometedora debido a la alta concentración de azúcares fermentables y baja concentración de ácido acético y compuestos fenólicos. Sin embargo, al finalizar el proceso de fermentación del ensayo 12-D8 los resultados no son

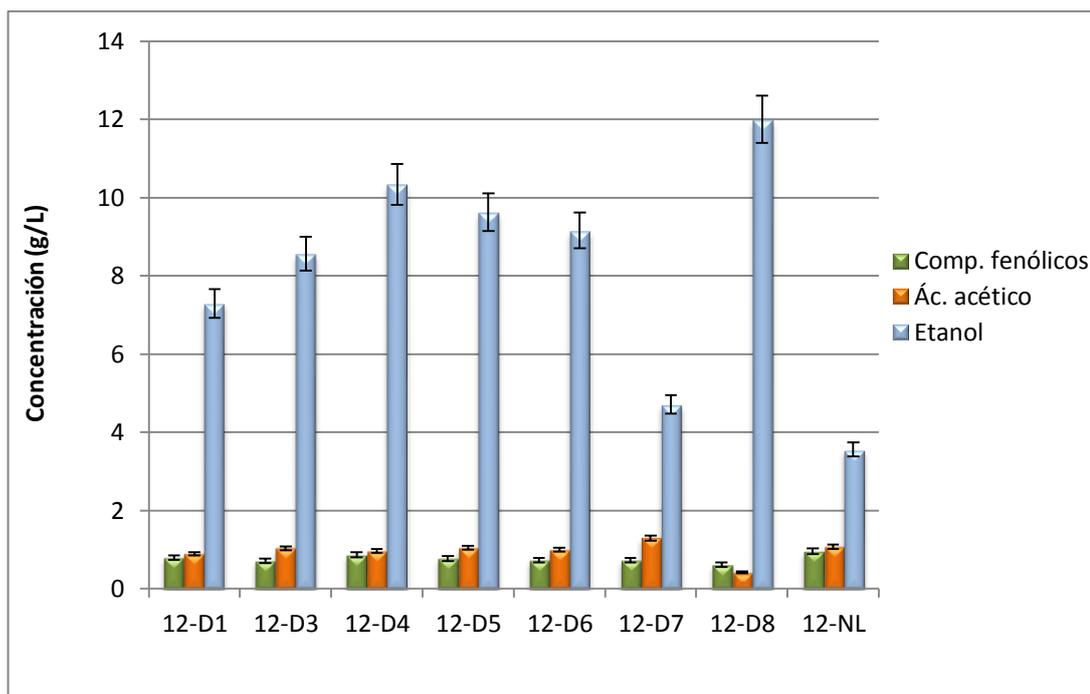
#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los esperados. Por un lado la concentración de etanol producida es más alta que la conseguida con otros lavados, alcanzando 12 g/L, pero por otro lado los rendimientos de obtención de etanol no son muy altos, 50% sobre el teórico (RTE), 33% de conversión global (RGE) y 0,37 de ratio de conversión etanol/azúcares consumidos. Los azúcares fermentables no se consumen completamente y quedan en el medio sin fermentar, especialmente la xilosa, que inicia el proceso con una concentración de 10,9 g/L y lo finaliza con 10,0 g/L, quedando prácticamente intacta; lo que hace sospechar que existe otro motivo que perjudica la eficiencia del proceso, además de la presencia de ácido acético y compuestos fenólicos.

También se obtuvieron buenos resultados en los ensayos 12-D4 y 12-D5, con una concentración de etanol en el medio de 10,3 g/L y 9,6 g/L, un rendimiento de producción de etanol del 74% y 67% sobre el teórico, 28% y 26% de rendimiento global y 0,49 y 0,46 de ratio de conversión etanol/azúcares consumidos, respectivamente. Estos resultados son ligeramente superiores a los encontrados en bibliografía para fermentaciones de hidrolizados de paja de trigo ozonizada al 10% (w/w) y lavada (100 mL agua/g MS), donde se ha obtenido una concentración máxima de etanol de 8,7 g/L lo que supone un coeficiente de rendimiento de etanol de 0,42 y un 69% sobre el teórico [1].

Cabe destacar como una estrategia de lavado muy poco adecuada el ensayo 12-D7, en la que la concentración de etanol apenas alcanza 4,7 g/L, a pesar de los elevados resultados de recuperación de azúcares alcanzados en la hidrólisis enzimática. Los rendimientos fueron del 24% sobre el teórico (RTE) y 13% sobre el global de azúcares (RGE).

La Figura 4.15 muestra la concentración de inhibidores presentes en los hidrolizados de paja de trigo utilizando diferentes estrategias de lavado y la concentración de etanol producido tras la fermentación. Como puede observarse, la concentración de etanol más alta corresponde a la más baja en compuestos fenólicos y ácido acético (12-D8)



**Figura 4.15.** Concentración de inhibidores y etanol presentes en el medio.

Como se puede observar en la Tabla 4.1, para concentraciones de 0,3 g/L de ácido acético y 1,0 g/L de compuestos fenólicos en medio modelo, el consumo de xilosa queda inhibido completamente. Esta puede ser la causa de que prácticamente en todos los ensayos de fermentación de hidrolizados de paja de trigo con un 12% w/w de material, la xilosa quede intacta en el medio. En ninguna de las estrategias ensayadas (excepto en D8) se ha conseguido reducir la concentración de ácido acético, principal inhibidor, por debajo de 0,9 g/L, y lo mismo ocurre con los compuestos fenólicos que en todos los casos han estado presentes con concentraciones superiores a 0,7 g/L. Si se lograra que el consumo de xilosa no fuera inhibido, la concentración final de etanol aumentaría y por lo tanto, los rendimientos obtenidos durante los ensayos.

Asimismo con concentraciones en el medio de 0,7 g/L de compuestos fenólicos y 1,3 g/L de ácido acético (ensayo D7) se observa una inhibición considerable en el metabolismo de glucosa.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.5 Fermentación de hidrolizados de paja de trigo en reactor con agitación mecánica.

Con el objetivo de mejorar la transferencia de materia y el contacto entre paja y enzimas, además de simular el comportamiento en reactores, se ha realizado la hidrólisis y fermentación con *P. stipitis* de la paja de trigo pretratada en reactores de 250 ml (AFORA) con cargas de un 10% y un 12% (w/w).

El ensayo del 10% (w/w) se realizó con paja de trigo lavada según la estrategia D1, un lavado con agua a 20°C y pH 2,60, ya que se observó en los ensayos con matraces agitados, que con esta estrategia de detoxificación para un 10% (w/w) de carga de sólido es suficiente para no apreciar inhibición.

Para el 12% (w/w) de materia prima, se realizaron dos experimentos, por un lado se utilizó paja lavada según el método D1, para poder hacer una comparativa con el ensayo 10-D1. Sin embargo, para un 12% (w/w) esta estrategia no es suficiente para reducir la concentración de tóxicos y obtener buenos rendimientos de obtención de etanol. Por ello con el objetivo de mejorar la eficiencia del proceso, se realizó un ensayo utilizando la estrategia de lavado D2, que consiste en 5 lavados con agua a 20°C y pH 2,60.

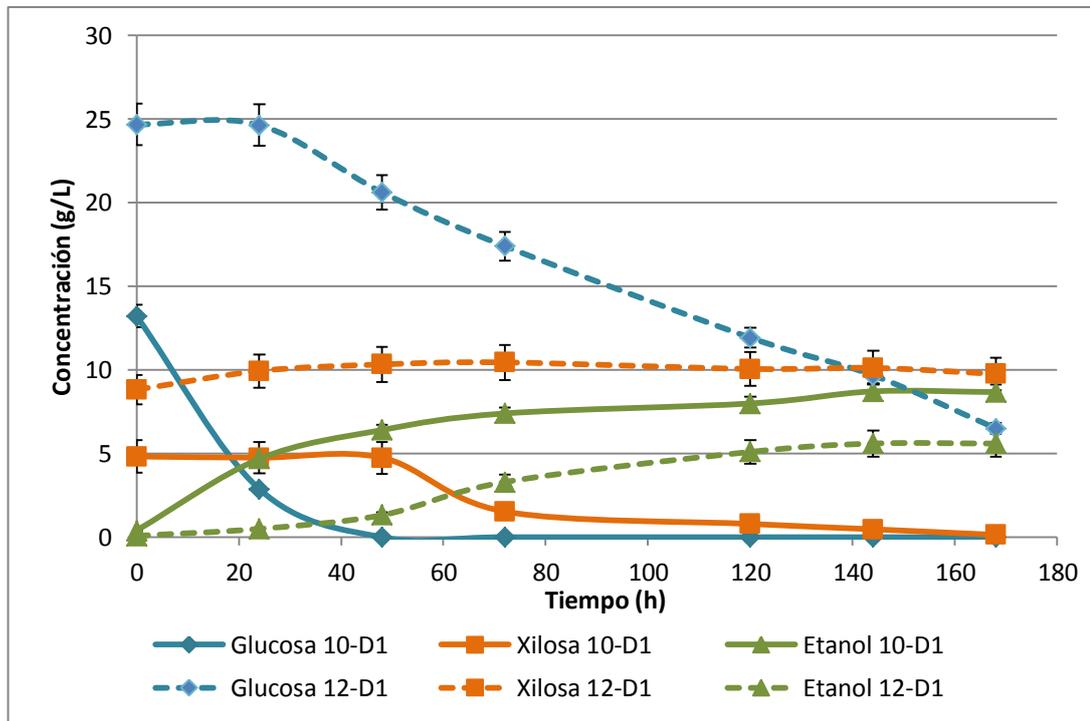
En la Tabla 4.10 se muestran las concentraciones de azúcares y compuestos tóxicos obtenidos tras finalizar la hidrólisis enzimática.

Ensayo	Concentraciones obtenidas tras HE (g/L)			
	Azúcares		Inhibidores	
	Glucosa	Xilosa	Comp. fenólicos	Ác. acético
10-D1	14,8±0,5	5,2±0,2	0,4±0,0	0,7±0,0
12-D1	26,8±0,7	9,4±2,1	0,8±0,0	1,2±0,0
12-D2	20,8±3,5	6,5±0,7	0,5±0,0	0,6±0,0

**Tabla 4.10.** Concentración media de azúcares e inhibidores obtenidos tras la hidrólisis enzimática.

Como se puede observar en la Tabla 4.10 la concentración de glucosa y xilosa se ve afectada al realizar más lavados a la paja de trigo, pasando de 26,8 g/L a 20,8 g/L de glucosa y de 9,4 g/L a 6,5 g/L de xilosa con un 12% (w/w) para uno y cinco lavados, respectivamente. Este descenso en la concentración puede ser debido a la solubilización de azúcares en las aguas de lavado.

La Figura 4.16 compara los perfiles de concentración de glucosa, xilosa y etanol para diferentes cargas de paja lavada siguiendo la estrategia D1.



**Figura 4.16.** Comparación de la fermentación para una carga del 10% (w/v) y del 12% (w/v)

En los perfiles de concentración de azúcares del ensayo 10-D1, se puede observar el comportamiento diaúxico que tiene *P. stipitis*, aunque es capaz de fermentar hexosas y pentosas; presenta una clara preferencia por las primeras, de tal forma la xilosa del medio no comienza a consumirse hasta las 48 h de fermentación, momento en el cual la glucosa del medio es agotada. A las 168 h de fermentación, la xilosa también es consumida totalmente y se alcanza la máxima concentración de etanol, 8,7 g/L, lo que supone un coeficiente de conversión de etanol de 0,48 y 9,0 g de etanol/100 g MS. Los resultados obtenidos en este ensayo se encuentran dentro del rango indicado en la bibliografía que para un 10% de materia seca y el mismo método de lavado, informa de una concentración final de etanol de 9 g/L aproximadamente para paja pretratada usando sólo ozono [1].

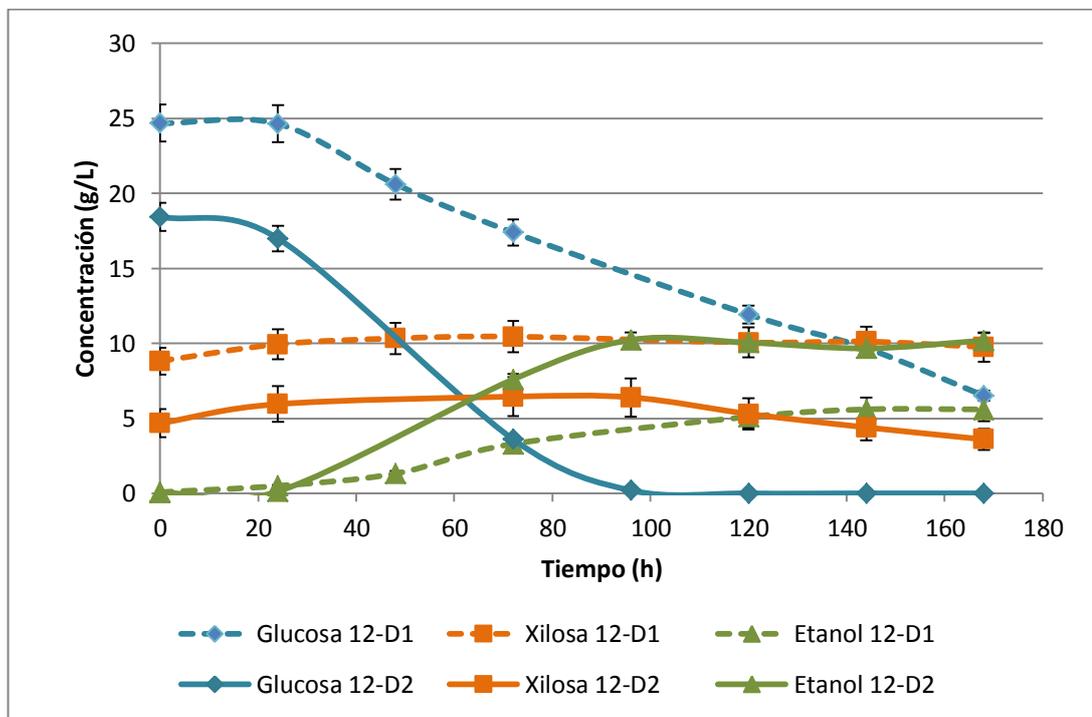
Al fermentar hidrolizados con un 12% (w/w) de sólidos de carga inicial la concentración azúcares fermentables en el medio aumenta, en comparación con el 10%(w/w), pero estos no son aprovechados de forma eficiente por *P. stipitis*, lo que provoca una disminución en la concentración final de etanol.

Al analizar el perfil de concentración de azúcares para el ensayo 12-D1 se observa que se produce una notable disminución en la velocidad de consumo

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de glucosa con respecto al ensayo 10-D1. Finalizado el tiempo de fermentación sigue habiendo glucosa en el medio en una concentración de 5,6 g/L, posiblemente provocado por la alta concentración de ácido acético en el medio (1,2 g/L) y el efecto sinérgico negativo que produce el mismo con los compuestos fenólicos cuya concentración alcanza 0,8 g/L. En este contexto el metabolismo de xilosa es inhibido totalmente, permaneciendo constante su concentración durante todo el proceso. La producción de etanol experimenta un retardo de 20 h aproximadamente. La concentración máxima de etanol es 5,6 g/L, y se alcanza después de 120 h de reacción, lo que supone un rendimiento sobre el teórico del 31%

En la Figura 4.17 se representan los perfiles de glucosa, xilosa y etanol obtenidos después de lavar la paja 5 veces (ensayo D2) para un 12% (w/w) comparándolos con los obtenidos para el método de detoxificación D1 y la misma carga de sólidos.



**Figura 4.17.** Perfil de concentraciones durante la fermentación para paja lavada una vez y paja lavada cinco veces.

Con la estrategia de lavado D2, la concentración de tóxicos disminuye desde 1,2 g/L hasta 0,6 g/L para el ácido acético y desde 0,8 g/L hasta 0,5 g/L para los compuestos fenólicos, lo que provoca un aumento en la velocidad de consumo de glucosa con respecto al ensayo D1, siendo agotada totalmente a las 100 h de fermentación. En este momento se empieza a consumir xilosa aunque con una velocidad muy lenta. La inhibición sigue siendo importante, por lo que no se aprecia aumento considerable en la concentración final de

etanol, que a partir de las 100 h se mantiene constante en torno a 10 g/L. En cualquier caso, con el lavado D2 se obtienen mejores rendimientos que para el lavado D1 para un 12% (w/w) ya que se aprovechan mejor los azúcares presentes en el medio obteniendo una concentración de etanol más alta, 5,6 g/L para D1 y 10,2 g/L para D2. El coeficiente etanol producido/azúcares consumidos aumenta de 0,30 a 0,51.

En resumen, el rendimiento más alto (94% sobre el teórico) se consigue con paja lavada (D1) al 10% (w/w) con una producción de 9,0 g etanol/100 g MS. Al aumentar la carga, el lavado se convierte en una etapa muy importante para aumentar la eficiencia en la obtención de etanol. Realizando cinco lavados a la materia prima conseguimos un rendimiento del 86% sobre el teórico y 8,7 g etanol/100 g MS.

No obstante, existe la sospecha de que no sólo la concentración de tóxicos y la sinergia que se produce entre ellos afecta de forma negativa al proceso, porque las concentraciones de ácido acético y compuestos fenólicos al inicio de la fermentación para los ensayos 10-D1 y 12-D2 son similares, sin embargo la xilosa sólo es consumida totalmente cuando con un 10% (w/w) de carga inicial (para un 12% (w/w) sólo se consume el 23% de xilosa presente en el medio). El aumento de la carga de sólido inicial puede dificultar la transferencia de materia, lo que se traduce en un menor rendimiento en la producción de etanol

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.6 Fermentación de hidrolizados de paja de trigo con *S. cerevisiae*.

*S. cerevisiae* es el microorganismo más comúnmente empleado a nivel industrial para llevar a cabo la fermentación alcohólica, aunque sólo puede fermentar hexosas [4]. En este contexto se plantea la realización de diferentes ensayos con dicha levadura, para comparar su comportamiento con *P. stipitis*.

Para mejorar la liberación de azúcares fermentables, la paja fue lavada siguiendo las estrategias D7, un lavado de paja con agua a 60°C y pH 2,60, y D8, un lavado con agua a 60°C y pH 11, puesto que son las estrategias de lavado que conducen a los mejores resultados de recuperación de azúcares en matraces agitados (apartado 4.4).

La fermentación con *S. cerevisiae* se prolongó durante un período de 48 h. No obstante, se tomó muestra y se analizaron los resultados a las 24 h de proceso. Los resultados de fermentación después de 24 h se muestran en la Tabla 4.11, mientras que los resultados correspondientes a las 48 h, se recogen en la Tabla 4.12. En la Figura 4.19 se muestran los rendimientos de obtención de etanol para los dos tiempos de fermentación.

Ensayo	Concentraciones al inicio de la fermentación (g/L)			Concentraciones tras 24h de fermentación (g/L)			Rendimiento Y p/s
	Azúcares		Producto	Azúcares		Producto	
	Glucosa	Xilosa	Etanol	Glucosa	Xilosa	Etanol	
12-D7	29,5±1,2	9,4±0,4	0,3±0,1	9,1±2,1	9,4±0,5	7,1±0,4	0,33
12-D8	33,5±3,8	8,9±0,8	0,2±0,1	2,8±2,2	8,9±0,5	12,1±0,0	0,39

**Tabla 4.11.** Concentraciones de azúcares y etanol obtenidas con *S. cerevisiae* tras 24 h de fermentación.

Ensayo	Concentraciones al inicio de la fermentación (g/L)			Concentraciones tras 48 h de fermentación (g/L)			Rendimiento Y p/s
	Azúcares		Producto	Azúcares		Producto	
	Glucosa	Xilosa	Etanol	Glucosa	Xilosa	Etanol	
12-D7	29,5±1,2	9,4±0,4	0,3±0,1	0,7±0,1	9,2±0,2	8,3±0,4	0,28
12-D8	33,5±3,8	8,9±0,8	0,2±0,1	0,8±0,2	8,8±0,4	10,5±0,9	0,32

**Tabla 4.12.** Concentraciones de azúcares y etanol obtenidas con *S. cerevisiae* tras 48 h de fermentación.

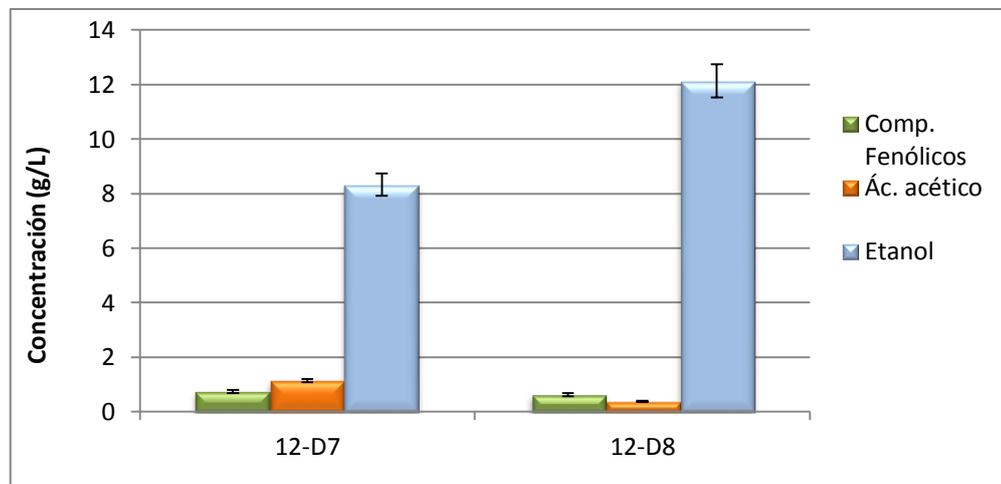
Para el ensayo 12-D7 la concentración de etanol en el medio aumenta con el tiempo, mientras que para 12-D8 disminuye. Esto puede ser debido a que en el primer caso se produce un retardo en el consumo de azúcares y transcurridas 24 h aún queda bastante glucosa en el medio para ser

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

consumida por el microorganismo, mientras que en el ensayo 12-D8, la concentración de glucosa en el medio es escasa pasadas las 24 h. En ambos casos el coeficiente de rendimiento de obtención de etanol disminuye al aumentar el tiempo de fermentación. Aunque la concentración de etanol aumente en el ensayo 10-D7, se produce una disminución en este coeficiente, debida a la baja eficiencia del proceso durante las últimas horas, en las que se produce un consumo de azúcares de 8,4 g/L y se genera únicamente 1,30 g/L de etanol

Como cabe esperar la concentración de xilosa permanece constante en el medio puesto que la gran limitación del microorganismo *S. cerevisiae* es que no es capaz de fermentar pentosas.

Una ventaja de este microorganismo es que muestra mayor tolerancia a los tóxicos producidos durante el pretratamiento. Aunque la máxima concentración de etanol, 12,1 g/L, coincide con la mínima de ácido acético, 0,4 g/L, la producción de etanol se mantiene en unos 8 g/L cuando la concentración de este tóxico en el medio supera 1 g/L. La Figura 4.18 muestra las concentraciones de compuestos tóxicos presentes en los hidrolizados y las máximas concentraciones de etanol obtenidas tras la fermentación.

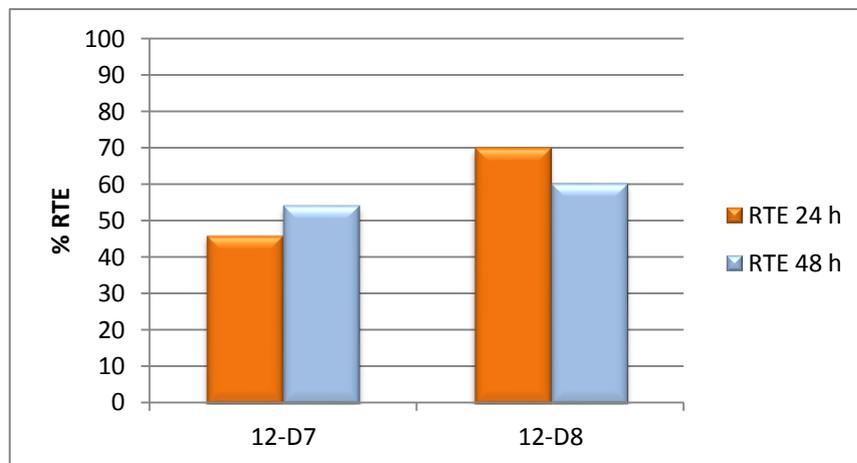


**Figura 4.18.** Concentración de inhibidores y etanol presentes en el medio.

El mejor resultado se corresponde con la estrategia de lavado D8 para un tiempo de fermentación de 24 h. La concentración de etanol alcanzada fue 12,1 g/L, el ratio de conversión etanol/azúcares consumidos fue 0,39, mientras que el rendimiento sobre el teórico fue del 70% y sobre el global 14% (ver Figura 4.19). Estudios anteriores de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) con *S. cerevisiae* Red Star al 10% (m/v) de paja de trigo pretratada con explosión de vapor condujeron a una concentración máxima de etanol de 11,2 g/L a las 30-40 h del proceso SFS lo que supone un

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

rendimiento del 40% sobre el teórico y un 0,22 de coeficiente de obtención de etanol [4].



**Figura 4.19.** Rendimientos medios de obtención de etanol para fermentación de 24 h y 48 h.

En la Tabla 4.13 se comparan las concentraciones máximas de etanol obtenidas tras el proceso de fermentación con los dos microorganismos utilizados así como los rendimientos obtenidos en cada caso. Los ensayos han sido nombrados con la inicial del microorganismos, S para *S. cerevisiae* y P para *P. stipitis*, seguido de la carga empleada, 12 %(w/w), y de la estrategia de lavado seguida.

Ensayo	Conc. inicio ferment. (g/L)		Conc. final ferment (g/L)	Rendimiento	
	Glucosa	Xilosa	Etanol	Y p/s	RTE (%)
S-12-D7	29,5±1,2	9,4±0,4	8,3±0,4	0,28	54
S-12-D8	33,5±3,8	8,9±0,8	12,1±0,0	0,39	70
P-12-D7	27,3±1,2	10,0±0,3	4,7±1,6	0,42	24
P-12-D8	35,9±2,6	10,9±0,8	12,0±0,8	0,37	50

**Tabla 4.13.** Comparación de concentraciones de glucosa, xilosa y etanol y rendimientos de obtención de etanol entre *S. cerevisiae* y *P. stipitis*.

Aunque *P. stipitis*, al contrario que *S. cerevisiae* sea capaz de fermentar pentosas y hexosas, aprovechando todos los azúcares del medio, en presencia ácido acético el consumo de glucosa se inhibe parcialmente y el de xilosa de forma total, afectando considerablemente a la eficiencia de la fermentación (la inhibición se puede apreciar con una concentración de 0,3 g/L y se ve incrementada a medida que aumenta la concentración del tóxico en el medio). Sin embargo, la presencia de ácido acético no afecta de forma

tan evidente a *S. cerevisiae* que es capaz de consumir toda la glucosa del medio.

Por este motivo la concentración de etanol obtenida con *P. stipitis* (4,7 g/L) es mucho menor que la obtenida en la fermentación con *S. cerevisiae* (8,3 g/L) para hidrolizados de trigo tratados con el método de detoxificación D7, en los que la concentración de acético alcanza 1,1-1,3 g/L.

En los hidrolizados de paja de trigo lavada con el método de detoxificación D8, la concentración de ácido acético se reduce hasta 0,4 g/L, consiguiendo que la concentración de etanol obtenida con *P. stipitis*, similar a la obtenida con *S. cerevisiae* (12 g/L con ambos microorganismos). Sin embargo, la productividad del proceso en estas condiciones, es mayor con *S. cerevisiae* porque consigue la misma concentración de etanol que *P. stipitis* en menos tiempo (la fermentación de *S. cerevisiae* dura 24 h mientras que la de *P. stipitis* necesita 168 h) y obtiene un rendimiento sobre el teórico mayor, ya que *P. stipitis*, no es capaz de fermentar la xilosa del medio.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5 Conclusiones

Se ha llevado un estudio de mejora en la eficiencia del proceso de obtención de bioetanol de segunda generación a partir de paja de trigo. Las etapas que componen el proceso son: pretratamiento, detoxificación, hidrólisis enzimática y fermentación. En el presente capítulo se exponen las principales conclusiones relativas a cada etapa:

### Pretratamiento

1. Durante el pretratamiento mediante extrusión-ozono, se produce una degradación y/o solubilización parcial de la lignina del material, de manera que el porcentaje de lignina ácida soluble aumenta, mientras que el de lignina ácida insoluble disminuye, provocando que la lignina total del material lignocelulósico disminuya. El contenido en celulosa no se ve afectado por el pretratamiento y la disminución en el contenido de hemicelulosa es mínimo.
2. En la etapa de pretratamiento se han utilizado extrusión y ozonólisis del material, como métodos efectivos para alterar la estructura de la biomasa lignocelulósica y facilitar su digestibilidad durante la hidrólisis enzimática, de forma que los porcentajes de recuperación de azúcares aumentan del 8,4% para paja sin tratar a 13,6% para paja extrusada y 30,0% para paja extrusada-ozonizada, en lo relativo a glucosa, y de 3,7% para paja sin tratar a 7,5% para paja extrusada y 29,0% para paja extrusada-ozonizada, en lo relativo a xilosa.

### Detoxificación

3. La etapa de detoxificación no consigue eliminar completamente los compuestos inhibidores, pero sí reducir su concentración en el medio significativamente. El método de detoxificación D8, que se corresponde con un lavado con agua (100 mL/ g MS) a 60°C y pH 11, ha resultado ser la estrategia de lavado más efectiva, consiguiendo reducir la concentración de ácido acético de 1,1 g/L para el material sin tratar a 0,4 g/L para el material tratado y de compuestos fenólicos de 1,0 g/L a 0,6 g/L.
4. Para todos los métodos de lavado, se observa un aumento considerable en las concentraciones de glucosa en los hidrolizados con respecto al material sin lavar. La mayor concentración de glucosa se obtuvo con paja de trigo lavada, una vez con agua a 60°C y pH 11 (D8), alcanzando 46,2 g/L, muy superior a los 15,4 g/L obtenidos con la paja sin lavar.

## 5. CONCLUSIONES

5. Como consecuencia del lavado, se observa un descenso en la concentración de xilosa en los hidrolizados, debido a la solubilización de la fracción hemicelulósica. La mayor pérdida de xilosa se produce con la estrategia D2, que se corresponde con 5 lavados con agua a 20°C y pH 2,6, donde la xilosa disminuye desde 8,0 g/L para la paja sin lavar a 4,7 g/L para la paja lavada.

### Hidrólisis enzimática

6. Un aumento en la carga de sólidos del proceso del 5 al 14% (w/w) no produce un efecto notable en los rendimientos de recuperación de azúcares de la hidrólisis que se mantienen en 37% para glucosa y 25% para xilosa, con paja lavada una vez, con agua (100 mL/ g MS) a 20°C y pH 2,60.
7. La presencia de compuestos inhibidores afecta considerablemente a la hidrólisis enzimática, de forma que los mejores resultados de recuperación de azúcares fermentables se obtuvieron cuando la paja fue lavada una vez con agua en una dosis de 100 mL/ g MS, a 60°C y pH 11 (91% de recuperación de glucosa y 43% de recuperación de xilosa).

### Fermentación

8. En medios modelos sin inhibidores, *P. stipitis* presenta un comportamiento diaúxico en presencia de sustrato mixto, consumiendo de forma preferencial glucosa y posteriormente xilosa.
9. La presencia en el medio de ácido acético y compuestos fenólicos produce un posible efecto sinérgico negativo sobre *P. stipitis* que perjudica notablemente los rendimientos de obtención de etanol. El metabolismo de la xilosa es inhibido totalmente con 0,3 g/L de ácido acético y 1,0 g/L de compuestos fenólicos en los ensayos con medios modelo. La velocidad de consumo de glucosa disminuye en los hidrolizados de paja de trigo con concentraciones en el medio de 1,1 g/L de ácido acético y 1,0 g/L de compuestos fenólicos.
10. Si la carga inicial de materia prima supera el 10% (w/w), las concentraciones de inhibidores (ácido acético y compuestos fenólicos) aumentan y los rendimientos de obtención de etanol se ven seriamente afectados, haciendo imprescindible una etapa de detoxificación.
11. El lavado que conduce a mayores rendimientos de producción de etanol fue D2 (5 lavados con agua, en una dosis de 100 mL/g MS, a 20°C y pH 2,60) que consigue un 86% sobre el teórico de etanol y 0,51 de coeficiente de obtención de etanol.

## 5. CONCLUSIONES

12. Los compuestos tóxicos del pretratamiento afectan al crecimiento de *P. stipitis* mientras que no tienen un efecto tan negativo sobre *S. cerevisiae* lo que le permite conseguir mejores rendimientos con este microorganismo.
13. Con ambos microorganismos la concentración máxima de etanol obtenida ha sido similar (12 g/L ó 10,5 g etanol/100 g MS), puesto que en las condiciones experimentales *P. stipitis* no ha sido capaz de fermentar xilosa.

## 5. CONCLUSIONES

## 6 Bibliografía

- [1] C. Bellido Díez, «Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*,» Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid, España, (2013).
- [2] L. Gómez, C. Steele-King y S. Mc Queen-Mason, «Sustainable liquid biofuels from biomass: The writing's on the walls,» *New Phytologist* 178, 473-485, (2008).
- [3] M. Balat, «Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review,» *Energy Conversion and Management* 52, 858-875, (2011).
- [4] E. Tomás-Pejó, «Bioetanol de paja de trigo: Estrategias de integración de las etapas del proceso,» Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España, (2009).
- [5] Y. Lechón, H. Cabal, C. Lago, C. De la Rúa, R. Sáez y M. Fernández, «Ánalysis de Ciclo de Vida de Combustibles alternativos para el transporte. Fase I. Ánalysis del Ciclo de Vida Comparativo de Etanol de Cereales y de la Gasolina. Energía y Cambio Climático,» Ministerio de Educación y Ciencia. Ministerio de Medio Ambiente. ISBN.84-8320-312-X, (2005).
- [6] «<http://www.biodieselpain.com/que-es-el-biodiesel>,» (2015). [En línea].
- [7] «<http://www.miliarium.com/Bibliografia/Monografias/Biocombustibles/Bioetanol.asp>,» (2015). [En línea].
- [8] «<http://petroquimex.com/240412/articulos/3.pdf>,» (2015). [En línea].
- [9] S. Limtong, C. Sringiew y W. Yongmanitchai, «Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *kluveromyces marxianus*,» *Bioresource Technology* 98, 3367-3374, (2007).
- [10] R. Bothast y M. Schlicher, «Biotechnological process for conversion of corn into ethanol,» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 67, 19-25, (2005).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [11] S. Wang, W. Ingledew, K. Thomas, K. Sosulski y F. Solsulski, «Optimization of fermentation temperature and mash specific gravity for fuel alcohol production,» *Cereal Chemistry* 76,82-86, (1999a).
- [12] N. Aggarwal, P. Nigam, D. Singh y B. Yadav, «Process optimization for the production of sugar for the bioethanol industry from Tapioca, a non-conventional source os starch,» *World Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 17, 783-787, (2001).
- [13] S. Wang, K. Thomas, K. Sosulski, W. Ingledew y F. Sosulski, «Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale,» *Process Biochemistry* 34,421-428, (1999b).
- [14] M. Blanco y D. Azqueta, «Can the environmental benefits of biomass support agriculture. The case of cereals for electricity and bioethanol production in Northern Spain,» *Energy Policy* 36, 357-366, (2008).
- [15] L. Laopaiboon, P. Thanonkeo, P. Jaisil y P. Laopaiboon, «Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*,» *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23,1497-1501, (2007).
- [16] C. Wyman, «Biomass ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges,» *Annual Review of Energy and Environment* 24, 189-226, (1999).
- [17] S. Kim y B. Dale, «Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues,» *Biomass and Bioenergy* 26, 361-375, (2004).
- [18] O. Bamaga, M. Thakur y M. Verma, «Assessment of cereal straw availability in combine harvested fields and its recovery by baling,» *Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America* 34, 53-58, (2003).
- [19] «<https://www.produccionmundialtrigo.com/>,» (2015). [En línea].
- [20] A. Alfani, F. Gallifuoco, A. Saporosi, A. Spera y M. Cantarella, «Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw,» *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25, 184-192, (2000).

- [21] L. Olsson, H. Sorensen, B. Dam, H. Christensen, K. Krogh y A. Meyer, «Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation wheat hemicellulose with recombinant xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae*,» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129-132, 117-129, (2006).
- [22] O. Sánchez y C. Cardona, «Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks,» *Bioresource Technology* 99, 5270-5295, (2008).
- [23] M. Barroso Casillas, «Pretatamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería,» Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, España, (2010).
- [24] C. Wyman, «Handbook on Bioethanol: Production and Utilization,» Taylor & Francis, Washington, (1996).
- [25] Y. Sun y J. Cheng, «Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review,» *Bioresource Technology* 83, 1-11, (2002).
- [26] M. Negro, P. Manzanares, I. Ballesteros, J. Oliva, A. Cabañas y M. Ballesteros, «Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass,» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105, 87-100, (2003).
- [27] I. Ballesteros, M. Negro, J. Oliva, A. Cabañas, P. Manzanares y M. Ballesteros, «Ethanol production from steam-explosion pretreatment wheat straw,» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 6, 129-132, (2006).
- [28] A. Brandt, J. Gräsvik, J. Hallet y T. Welton, «Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids,» *Green Chemistry* 15, 550-583, (2013).
- [29] H. Zhang y L. Lynd, «Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems,» *Biotechnology and Bioengineering* 88, 797-779, (2004).
- [30] R. Sun, J. Fang, P. Rowlands y J. Bolton, «Physicochemical and thermal characterization of wheat straw hemicelluloses and cellulose,» *Journal of Wood Chemistry and Technology* 46, 2804-2809, (1998).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [31] O. Dahlman, A. Jacobs y J. Sjoberg, «Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps,» *Cellulose* 10, 325-334, (2003).
- [32] D. Fengel y G. Wegener, «Wood, Chemistry, Ultrastructure and Reactions,» Berlin-New York: Walter de Gruyter, (1989).
- [33] R. Sun, J. Tomkinson, Y. Wang y B. Xiao, «Physico-chemical and structural characterization os hemicelluloses from wwheat straw by alkaline peroxide extraction,» *Polymer* 41, 2647-2656, (2000).
- [34] R. Sun y J. Tomkinson, «Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pretreated wheat straw,» *European Polymer Journal* 39, 751-759, (2003).
- [35] A. Buranov y G. Mazza, «Lignin in straw of herbaceous crops,» *Industrial Crops and Products* 28, 237-259, (2008).
- [36] R. Howard, E. Abotsi, J. Rensburg y S. Howard, «Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production,» *African Journal of biotechnology* 2, 602-619, (2003).
- [37] A. Berlin, N. Gilkes, D. Kilburn, V. Maximenko, R. Bura, A. Markov, A. Sinitsyn, O. Okunev, I. Solovieva y J. Saddler, «Evaluation of cellulase preparations for hydrolisis of hardwood substrate,» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129-132, 528-545, (2006).
- [38] M. Viñals-Verde, A. Bell-García, G. Michelena-Álvarez y M. Ramil-Mesa, «Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica,» *Intituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar* 46, 0138-6204, (2012).
- [39] L. Lynd, P. Weimer, W. Van Zyl y I. Pretorius, «Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology,» *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 506-577, (2002).
- [40] innoversia, «<http://www.innoversia.net/rfp/investigacion-880-1.html>,» (2012). [En línea].
- [41] L. Lynd, «overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy,» *Annual Review of Energy and the Environment* 21, 506-577, (1996).

- [42] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros y M. Negro, «Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on an enzymatic hydrolysis: A review,» *Bioresource Technology* 101, 4851-4861, (2010).
- [43] A. Hendriks y G. Zeeman, «Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass,» *Bioresource Technology* 100, 10-18, (2009).
- [44] P. Karagöz, I. Rocha, M. Özkan y I. Angelidaki, «Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation,» *Bioresource Technology* 104, 349-357, (2012).
- [45] L. Cuervo, J. Folch y R. Quiroz, «Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol,» *Biotechnología* 13:3, (2009).
- [46] C. Karunanithy, K. Muthukumarappan y J. Julson, «Influence of high shear bioreactor parameters on carbohydrate release from different biomasses,» *American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2008*. ASABE 084114 ASABE, St Joseph, Mich, (2008).
- [47] J. Oliva Domínguez, «Efecto de los productos de degradación originados en la explosión de vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*,» Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España, (2003).
- [48] G. Van Walsun, S. Allen, M. Spenser, M. Laser, M. Antal y L. Lynd, «Conversion of lignocellulosic pretreated with liquid hot water to ethanol,» *Applied Biochemical and Biotechnology* 57/58, 157-170, (1996).
- [49] J. Pérez, A. González, J. Oliva, I. Ballesteros y P. Manzanares, «Effect of process variables on liquid hot water pretreatment of wheat straw for bioconversion to fuel-ethanol in a batch reactor,» *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82, 929-938, (2007).
- [50] M. García-Cubero, G. González-Benito, I. Indacochea, M. Coca y S. Bolado, «Effect of ozonolysis pretreatment of enzymatic digestibility of wheat and rye straw,» *Bioresource Technology* 100,1608-1613, (2009).
- [51] W. Neely, «Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone,» *Biotechnology and Bioengineering* 26, 59-65, (1984).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [52] P. Vidal y J. Molinier, «Ozonolysis of lignin - Improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust,» *Biomass* 16,1-17, (1988).
- [53] M. García-Cubero, L. Palacín, G. González-Benito, S. Bolado, S. Lucas y M. Coca, «An analysis of lignin removal in a fixed bed reactor by reaction of cereal straws with ozone,» *Bioresource Technology* 107, 229-234, (2012).
- [54] P. García-Aparicio, I. Ballesteros, A. González, J. Oliva, M. Ballesteros y M. Negro, «Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis,» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129, 278-288, (2006).
- [55] S. Larsson, S. Quintana, A. Reimann, N. Nilvebrant y L. Jonsson, «Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*,» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86, 617-632, (2000).
- [56] H. Klinker, A. Thomsen y B. Ahring, «Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass,» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 66, 10-26, (2004).
- [57] J. Almeida, T. Moding, A. Petersson, B. Hahn-Hägerdal, G. Liden y M. Gorwa-Grauslund, «Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*,» *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82, 340-349, (2007).
- [58] H. Klinker, B. Ahring, A. Schmidt y A. Thomsen, «Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw,» *Bioresource Technology* 82, 15-26, (2002).
- [59] E. Palmqvist y B. Hahn-Hägerdal, «Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition,» *Bioresource Technology* 74, 25-33, (2000).
- [60] E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, Z. Szengyel, G. Zacchi y K. Réczey, «Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment,» *Enzyme and Microbial Technology* 74, 25-33, (1997).

- [61] C. van Zyl, B. Prior y J. Du Preez, «Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia Stipitis* CBS 5776,» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 17, 357-369, (1988).
- [62] S. Larsson, A. Reimann, N. Nilvebrant y L. Jönsson, «Comparison of different methods for detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce,» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 77-79, 91-103, (1999).
- [63] J. López, J. Pérez y J. López, «La partición de las zeolitas en la conservación de las aguas,» *AquaTIC* 9, (2000).
- [64] I. Maddox y A. Murray, «Production of n-butanol by fermentation of wood hydrolysate,» *Biotechnolgy Letter* 5, 175-178, (1983).
- [65] H. Miyafuji, H. Danner, M. Neureiter, C. Thomasser , J. Bvochora, O. Szolar y R. Braun, «Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates,» *Enzyme Microbiology Technology* 32, 396-400, (2003).
- [66] J. Buchert, K. Niemelä, J. Puls y K. Poutanen, «Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolysate by ion exclusion,» *Bioresource Technology* 25, 176-180, (1990).
- [67] B. Montenecourt y D. Eveleigh, «Production and characterization of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*,» *TAPPI Annual Meeting Proceeding, Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Atlanta*, 101-108, (1979).
- [68] Z. Yue, W. Bin , Y. Baixu y G. Peiji, «Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase,» *Science in China series C: Life Science* 47, 48-24, (2004).
- [69] M. García-Cubero, M. Marcos, S. Bolado, M. Coca y G. González-Benito, «Optimization of operating conditions in enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic materials,» *Chemical Engineering Transactions* 21, 1285-1290, (2010).
- [70] A. Martínez-Alcalá, «Producción de bioetanol: mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con steam explosion,» *Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España*, (2012).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [71] D. Grootjen , L. Meijlink, R. van der Lans y K. Luyben, «Cofeimentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*,» *Enzyme and Microbial Technology* 12, 860-864, (1990).
- [72] T. Jeffries y J. Headman, «*Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters,» *FEMS Yeast Research* 9, 793-807, (2009).
- [73] T. Lebeau, T. Jouenne y G. Junter , «Long-term incomplete xylose fermentation, after glucose exhaustion, with *Candida shehatae* co-immobilized with *Saccharomyces cerevisiae*,» *Microbiological Research* 162, 211-218, (1997).
- [74] K. Öhgren, O. Bengtsson, M. Gorwa-Grauslund, M. Galbe , B. Hahn-Hägerdal y G. Zacchi, «Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400,» *Journal of Biotechnology* 105, 87-100, (2006).
- [75] J. du Preez, M. Bosch y B. Prior, «Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. Effects of pH, temperatura and substrate concentration,» *Enzme Microbiotechnology* 8, 360-364, (1986).
- [76] «Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*,» *Nature Biotechnology* 25, 319-326, (2007).
- [77] U. Klinner, S. Fluthgraf, S. Freese y V. Passoth, «Aerobic induction for respire-fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*,» *Applied Microbiology amd Biotechnology* 67, 247-253, (2005).
- [78] J. Fiaux, Z. Petek, M. Sonderegger , K. Wüthrich , T. Szyperski y U. Sauer, «Metabolic-flux profiling of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*,» *Eucariotic Cell* 2, 170-180, (2003).
- [79] J. Du Preez, «Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeast,» *Enzyme and Microbial Technology* 16, 944-956 , (1994).
- [80] M. Peña, «Optimización de las condiciones de cultivo de las cepas *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054 para la producción de bioetanol a partir del hidrolizado de aserrín de Curupau como residuo lignocelulósico,» Tesis Doctoral, (2008).

- [81] C. Pérez, «La levadura *Saccharomyces cerevisiae* en alimentación animal,» Aplicaciones Biológicas a la nutrición.
- [82] «Eliminate 'enemy' yeast. Ingredients an EFood Article at Scientist Live,» Scientist Live- the Latest Science News an Opnion, (2011). [En línea].
- [83] A. Peña y G. Dreyfus, «La energía y la vida. Bioenergética.La energía del mundo animal: el aprovechamiento de los alimentos,» La Ciencia desde México 968-16-5229-0, (1990).
- [84] B. Chu y H. Lee, «Genetic improvement os *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation,» Biotechnology Advances 25, 425-441, (2007).
- [85] T. Hamacher, J. Becker, M. Gardonyi, B. Hahn-Hägerdal y E. Boles, «Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization,» Microbiology 148, 2783-2788, (2002).
- [86] NREL, National Renewable Energy Laboratory. Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures. Golde. CO.
- [87] T. Björling y B. Lindman, «Evaluation of xylose-fermenting yeast for ethanol production from spent sulfite liquor,» Enzyme and Microbial Technology 11, 240-246, (1989).
- [88] M. Díaz, E. Ruiz, I. Romero , C. Cara, M. Moya y E. Castro, «Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings,» World Journal of Microbiology and Biotechnology 25, 891-899, (2009).
- [89] M. García-Cubero, C. Bellido, S. Bolado, M. Coca, S. Lucas y G. González-Benito, «Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*,» Bioresource Technology 102, 10868-10874, (2011).
- [90] T. Miura, S. Leun, S. Inoue y T. Endo, «Combined pretreatment using ozonolysis and wet-disk milling to improve enzymatic saccharification of Japanese cedar,» Bioresource Technology 126, 182-186, (2012).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

## Anexos

### ANEXO I: Caracterización de la materia prima

Para la caracterización de la paja de trigo se siguen los métodos del National Renewable Energy Laboratory [86]. Este método se muestra de forma esquemática en la Figura 7.1.

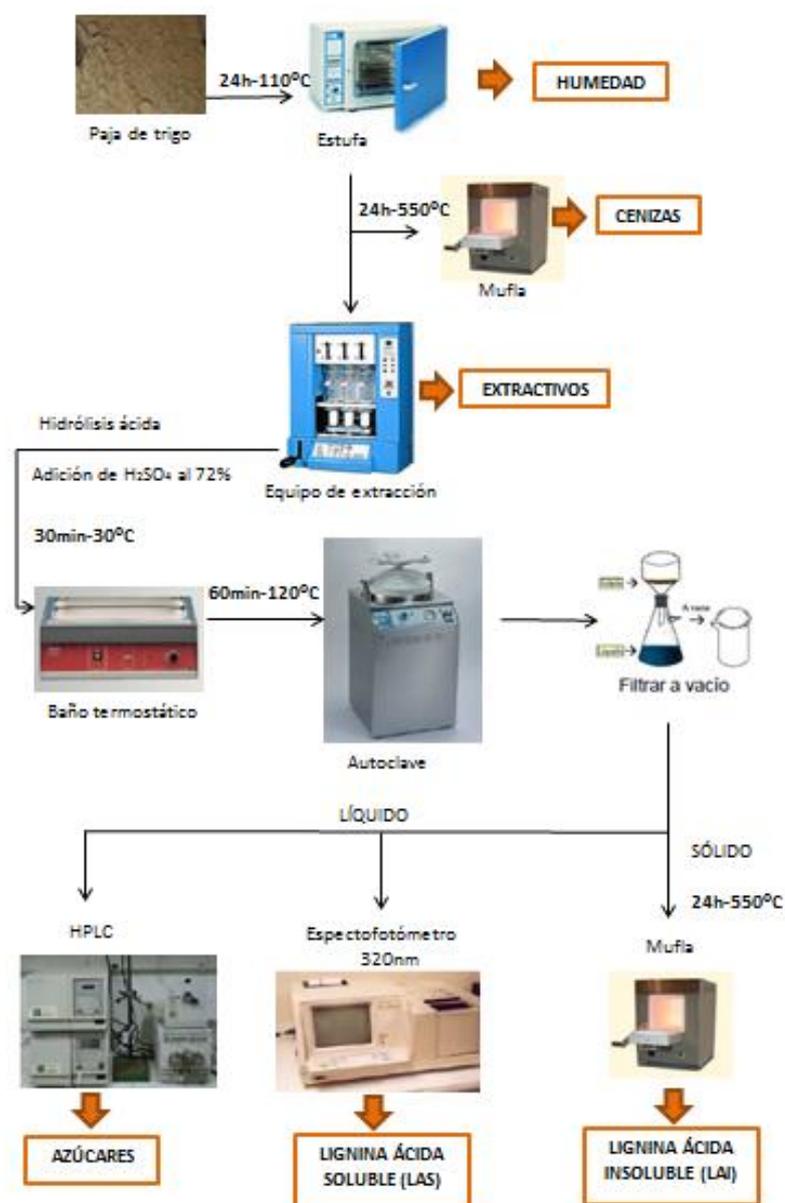
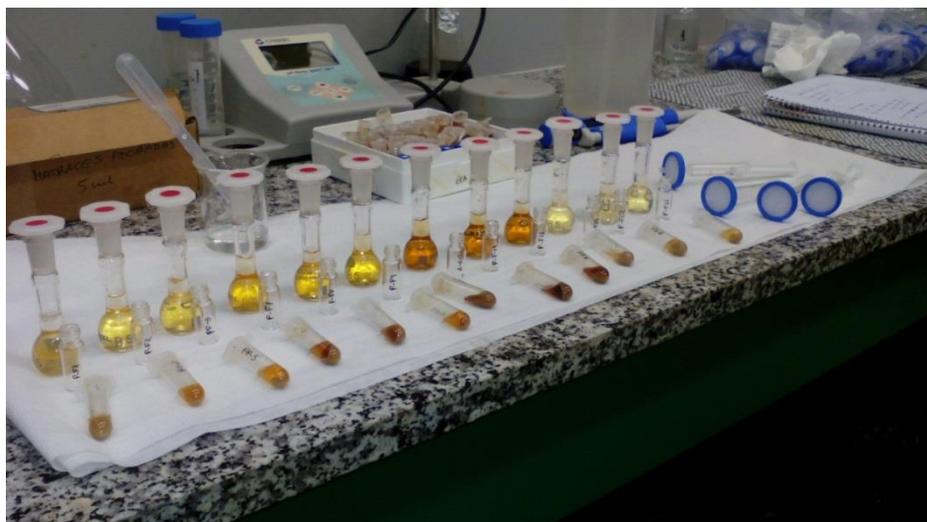


Figura 7.1. Esquema del proceso de caracterización de paja de trigo.

## Anexo II: Análisis de azúcares, alcoholes y productos inhibidores mediante HPLC. Preparación de muestras y patrones

El equipo de cromatografía líquida del laboratorio (WATERS HPLC) está dotado de un detector con medida del índice de refracción (Waters 2414) y una columna Aminex HPX-87H. Se utiliza con una disolución de ácido sulfúrico 0,01N como fase móvil, con un flujo de 0,6 l/min, la temperatura de la columna es de 60 °C, la del detector 35 °C y 10 °C la del inyector. El volumen de inyección fue de 20 µL

Las muestras que se analizan por HPLC se centrifugan con una microcentrífuga y el sobrenadante se diluye con agua MilliQ en una proporción 1:5. Las muestras diluidas se pasan por un filtro de nylon 0.22 µm. Este proceso se muestra en la Figura 7.2.



*Figura 7.2. Preparación de muestras para HPLC*

Para cuantificar los compuestos presentes en las muestras, es necesario preparar unas rectas de calibrado. Para ello se preparan patrones con contienen los siguientes compuestos:

- Glucosa
- Xilosa
- Arabinosa
- Ácido láctico
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Ácido oxálico
- Ácido gálico
- Etanol

En primer lugar se prepara una disolución madre con una concentración de cada compuesto de 6 g/l y a partir de ella se preparan diluciones para obtener el resto de patrones.

Para preparar la disolución madre, se pesa en un vaso de precipitados de 100 ml 0,6 g de cada compuesto, excepto de ácido gálico que se pesan 0,1 g. Se añade agua Milli-Q para disolver los compuestos y se lleva a un matraz aforado de 100 ml para enrasar.

Con esta disolución recién preparada se prepara por dilución el resto de patrones, en matraces aforados de 50 ml:

Patrón 1: 50 ml de la disolución madre (6 g/l)

Patrón 2: 25 ml de la disolución madre + 25 ml agua MilliQ (3 g/l)

Patrón 3: 10 ml disolución madre + 40 ml agua MilliQ ( 1.2 g/l)

Patrón 4: 5 ml disolución madre + 45 ml de agua MilliQ ( 0.6 g/l)

Patrón 5: 2.5 ml de disolución madre + 47.5 ml de agua MilliQ (0.3 g/l)

Una vez tenemos preparadas todas las disoluciones, se hacen pasar por filtros de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  y se lleva a viales para el HPLC.

## ANEXO III: Análisis de compuestos fenólicos mediante espectrofotometría

### REACTIVOS

Agua Milli-Q

Reactivo Folin

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% (20 g en 100 ml, agitar bien)

Muestras (para evitar coger sólidos centrifugar los eppendorf previamente)

### MODO DE OPERAR

Lo primero que hay que hacer es preparar una recta de calibrado con patrones de concentración conocida. Para ello se prepara una disolución madre que tendrá una concentración de 900 ppm de ácido gálico (pesar 0.045g de ácido gálico y disolver en 50 ml de agua Mili-Q). A partir de ella preparamos las siguientes diluciones:

- P1 900 ppm ácido gálico → 1000 µl disol. Madre
- P2 675 ppm ácido gálico → 750 µl disol. Madre + 250 µl agua mili-Q
- P3 450 ppm ácido gálico → 500 µl disol. Madre + 500 µl agua mili-Q
- P4 225 ppm ácido gálico → 250 µl disol. Madre + 750 µl agua mili-Q
- P5 112.5 ppm ácido gálico → 125 µl disol. Madre + 875 µl agua mili-Q
- P6 56.25 ppm ácido gálico → 62.5 µl disol. Madre + 937.5 µl agua mili-Q

Una vez preparados los patrones, los pasos a seguir son los siguientes:

1. Codificar tubos: blanco, patrones y muestras.
2. Añadir 3 ml de H<sub>2</sub>O Mili-Q a todos los tubos
3. Añadir 40 µl con mestra, patrones o agua mili-Q en el caso del blanco.
4. Añadir 200 µl de Folin a cada tubo
5. Cerrar, agitar y esperar 5 minutos.
6. Abrir el tapón y añadir 600 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%).
7. Cerrar y agitar de nuevo.
8. Llevar a un baño termostático a 40<sup>0</sup>C durante 30 min (Figura 7.3).
9. Dejar enfriar
10. Medir absorbancia a  $\lambda=765$  nm.

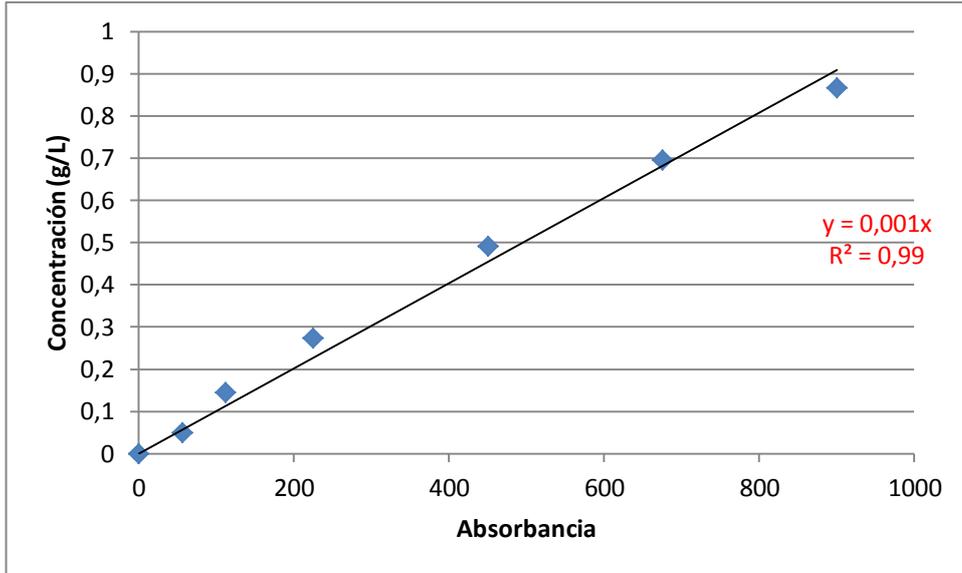


*Figura 7.3. Tubos para pruebas de fenólicos en baño termostado.*

Representando las absorbancias de los patrones frente a la concentración se determina la recta de calibrado, de tal forma que conociendo la absorbancia de las muestras y usando esta recta podemos conocer la concentración de compuestos fenólicos de las muestras. La Tabla 7.1 y la Figura 7.4 nos muestran la absorbancia obtenida para distintos patrones y su representación con la concentración de los mismos.

Patrones	Concentración (ppm)	Concentración (g/l)	Absorbancia
P1	900	0,900	0,866
P2	675	0,675	0,695
P3	450	0,450	0,492
P4	225	0,225	0,274
P5	112	0,113	0,145
P6	56	0,056	0,049
P7	0	0,000	0,000

*Tabla 7.1. Concentración y absorbancia de patrones.*



*Figura 7.4. Recta de calibrado concentración/absorbancia.*

Ontenemos una ecuación de la forma:

Con  $(g/l) = a \cdot abs$  (siendo  $a$  una constante obtenidas en el proceso)

## ANEXO IV: Caracterización de aguas de lavado

Caracterización de las aguas de lavado para D1:

Concentración (g/L)					
Agua de lavado	Ácido oxálico	Glucosa	Xilosa	Ácido Fórmico	Ácido acético
	0,09±0,02	0,00±0,00	0,04±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01

Caracterización aguas de lavado D3:

Concentración (g/L)					
Agua de lavado	Ácido oxálico	Glucosa	Xilosa	Ácido Fórmico	Ácido acético
1/2 LAV. T amb	0,08±0,04	0,02±0,01	0,01±0,01	0,02±0,01	0,02±0,00
2/2 LAV. T amb	0,03±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Caracterización aguas de lavado D4:

Concentración (g/L)					
Agua de lavado	Ácido oxálico	Glucosa	Xilosa	Ácido Fórmico	Ácido acético
1/2 LAV. 30°	0,08±0,03	0,02±0,01	0,01±0,00	0,02±0,01	0,02±0,01
2/2 LAV. 30°	0,03±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,01	0,00±0,00

Caracterización aguas de lavado D5:

Concentración (g/L)					
Agua de lavado	Ácido oxálico	Glucosa	Xilosa	Ácido Fórmico	Ácido acético
1/3 LAV. T amb	0,13±0,04	0,02±0,01	0,01±0,00	0,02±0,01	0,04±0,02
2/3 LAV. T amb	0,04±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
3/3 LAV. T amb	0,03±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

## ANEXOS

Caracterización aguas de lavado D6:

Concentración (g/L)					
Agua de lavado	Ácido oxálico	Glucosa	Xilosa	Ácido Fórmico	Ácido acético
1/3 LAV. 30°	0,14±0,05	0,03±0,01	0,01±0,00	0,02±0,01	0,04±0,02
2/3 LAV. 30°	0,05±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,01	0,00±0,00
3/3 LAV. 30°	0,03±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00