



---

**Universidad de Valladolid**

**ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES**

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

**TESIS DOCTORAL:**

**OBTENCIÓN DE BIOETANOL 2G A PARTIR DE  
HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO.  
FERMENTACIÓN CONJUNTA DE LOS PENTA Y  
HEXA CARBOHIDRATOS CON *Pichia stipitis***

**Presentada por Carolina Bellido Díez para optar  
al grado de doctor por la Universidad de  
Valladolid**

**Dirigida por:**

**Gerardo González Benito  
M<sup>a</sup> Teresa García Cubero**



**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**  
**ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES**

**Secretaría**

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

Valladolid, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013

Fdo. El encargado del registro



**Gerardo González Benito**

Catedrático de Ingeniería Química

y

**María Teresa García Cubero**

Profesora Titular de Ingeniería Química

Certifican que:

CAROLINA BELLIDO DÍEZ ha realizado bajo su dirección el trabajo "*Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación de los penta y hexa carbohidratos con Pichia stipitis.*", en el departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid. Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos para ser presentado como Tesis Doctoral expresan su conformidad con dicha presentación.

Valladolid, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013

Fdo. Gerardo González Benito

Fdo. María Teresa García Cubero



Reunido el tribunal que ha juzgado la Tesis Doctoral: *“Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación de los penta y hexa carbohidratos con Pichia stipitis.”* presentada por la Ingeniera Química Carolina Bellido Díez, y en cumplimiento de lo establecido por el Real Decreto 99/2011 de 28 de enero de 2011 acuerda conceder por \_\_\_\_\_ la calificación de \_\_\_\_\_.

Valladolid, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

PRESIDENTE

SECRETARIO

1<sup>er</sup> VOCAL

2<sup>o</sup> VOCAL

3<sup>er</sup> VOCAL





## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y amigos, especialmente Tina y Dani, que siempre estáis ahí.

A Guille por su cariño y sus ánimos.

A toda la gente con la que he compartido buenos momentos en el Departamento y CTA.

A Gerardo y Maite, especialmente, por apoyarme y ayudarme en esta labor.



## **CONTENIDOS**

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. ANTECEDENTES .....	5
1.2. BIOCOMBUSTIBLES EN EL SECTOR TRANSPORTE.....	7
1.2.1. BIOETANOL COMO CARBURANTE .....	9
1.3. PROCESO DE OBTENCIÓN DE ETANOL DE 2ª GENERACIÓN.....	13
1.3.1. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA .....	13
1.3.2. PRETRATAMIENTO.....	18
1.3.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES.....	26
1.3.4. FERMENTACIÓN.....	28
1.3.5. CONFIGURACIÓN DE LAS ETAPAS DEL PROCESO .....	32
1.4. REFERENCIAS .....	34
CAPÍTULO II. OBJETIVO .....	41
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
3.1. MATERIA PRIMA.....	49
3.2. PRETRATAMIENTO DE LA PAJA DE TRIGO.....	50
3.2.1. EXPLOSIÓN DE VAPOR.....	50
3.2.2. PRETRATAMIENTO CON OZONO .....	51
3.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	53
3.4. FERMENTACIÓN .....	54
3.4.1. <i>Pichia stipitis</i> : MANTENIMIENTO Y CULTIVO.....	54
3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	58
3.6. REFERENCIAS .....	61
CAPÍTULO IV. PRETRATAMIENTO E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA MATERIA PRIMA .....	63
4.1. INTRODUCCIÓN .....	67
4.2. METODOLOGÍA.....	71
4.2.1. CONDICIONES DE OPERACIÓN .....	71

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
4.3.1. EFECTO DE LOS PRETRATAMIENTOS DE EXPLOSIÓN DE VAPOR Y OZONOLISIS SOBRE LA PAJA DE TRIGO .....	73
4.3.2. RENDIMIENTOS GLOBALES DE LIBERACIÓN DE AZÚCARES DESPUÉS DEL PRETRATAMIENTO Y DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA PAJA DE TRIGO.....	77
4.4. CONCLUSIONES .....	82
4.5. REFERENCIAS .....	84
CAPÍTULO V. FERMENTACIÓN EN MEDIOS MODELO .....	85
5.1. INTRODUCCIÓN .....	89
5.2. METODOLOGÍA.....	92
5.2.1. MEDIOS DE FERMENTACIÓN Y CONDICIONES DE OPERACIÓN.....	92
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	94
5.3.1. COMPORTAMIENTO DIAÚXICO DEL MICROORGANISMO <i>P. stipitis</i> EN MEZCLAS DE GLUCOSA Y XILOSA COMO FUENTE DE CARBONO. ....	94
5.3.2. EFECTO DE LOS PRINCIPALES INHIBIDORES FORMADOS EN EL PRETRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA.....	96
5.4. CONCLUSIONES .....	113
5.5. REFERENCIAS .....	115
CAPÍTULO VI. FERMENTACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO PRETRATADA.....	117
6.1. INTRODUCCIÓN .....	121
6.2. METODOLOGÍA.....	125
6.2.1 FERMENTACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE CEREAL SOMETIDA A EXPLOSIÓN DE VAPOR .....	125
6.2.2. FERMENTACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE CEREAL SOMETIDA A TRATAMIENTO CON OZONO .....	126
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	127
6.3.1. FERMENTACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO EXPLOTADA.....	127
6.3.2. FERMENTACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO OZONIZADA. ....	133
6.3.3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE AMBOS PRETRATAMIENTOS .....	137
6.3.4. JUSTIFICACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE OPERACIÓN .....	137

6.4. CONCLUSIONES .....	140
6.5. REFERENCIAS .....	142
CAPÍTULO VII. INFLUENCIA DEL APORTE DE AIREACIÓN LIMITADA EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN .....	145
7.1. INTRODUCCIÓN .....	149
7.2. METODOLOGÍA.....	152
7.2.1. MEDIOS DE FERMENTACIÓN Y CONDICIONES DE OPERACIÓN.....	152
7.2.2. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO ( $K_{La}$ ) .....	153
7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	155
7.3.1. MEDIOS MODELO .....	155
7.3.2. HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO PRETRATADA .....	162
7.4. CONCLUSIONES .....	169
7.5. REFERENCIAS.....	171
CAPÍTULO VIII.....	173
ANEXOS	



**CAPÍTULO I**

**INTRODUCCIÓN**







## **RESUMEN**

En este capítulo se presentan los aspectos generales que sirven de introducción al estudio realizado. El capítulo se divide en las siguientes partes: en primer lugar, se plantean los antecedentes y estado actual de la problemática referente al consumo de combustibles fósiles y su progresiva sustitución por energías renovables. Posteriormente, se analiza el uso de biocombustibles en el sector transporte y las propiedades del bioetanol como carburante. Después de este apartado, se presenta el proceso de obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos, detallando los diferentes tipos de materias primas, así como los bloques principales de proceso: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación.



### **1.1. ANTECEDENTES**

Debido al crecimiento de la población mundial así como a los niveles de industrialización en algunos países, la demanda energética global se ha ido incrementando gradualmente. Actualmente se consumen 91,6 millones de barriles de petróleo al día en todo el mundo, y las estimaciones indican que esta cifra aumentará hasta llegar a los 112 millones de barriles diarios en 2020 (IEA, OMR Septiembre 2013). El suministro futuro de petróleo depende de la búsqueda de nuevos yacimientos, que serán de pequeño tamaño, y de la mejora de las tecnologías de extracción de los ya existentes. En este escenario, la escasez de petróleo está asegurada en el futuro, y dado que nuestra movilidad depende de dicha fuente energética es necesario plantearse un cambio en el modelo energético. Debe considerarse, así mismo, que la Unión Europea (UE) depende de terceros para obtener más de la mitad del petróleo que consume, mientras que en España el porcentaje supera el 70%.

En las últimas décadas, el excesivo consumo de combustibles fósiles, sobre todo en áreas urbanas, ha tenido como consecuencia el incremento en las emisiones de gases de efecto invernadero (GHG) a la atmósfera (Sarkar *et al.*, 2012). La mayor demanda de energía y el progresivo calentamiento del planeta junto con el notable encarecimiento de los precios de petróleo y la dependencia de las importaciones de combustibles fósiles, son las principales causas que han motivado el aumento del uso de energías renovables. Así, la Unión Europea ha desarrollado en los últimos años una política estratégica conjunta en el marco de las energías renovables. La directiva 2009/28/CE establece que, para el año 2020, el 20% del consumo final de energía del conjunto de los Estados debe proceder de fuentes de carácter renovable. El 10% de este consumo renovable debe estar destinado específicamente al sector transporte, por lo que en este escenario los biocombustibles cobran especial importancia como primera alternativa para sustituir a los derivados del petróleo utilizados en automoción. En octubre de 2012, la Comisión publicó una propuesta con el objetivo de limitar el uso de biocombustibles procedentes de cultivos, que no podrá superar el 5%, para alcanzar la meta del 10% marcada en la directiva.

El bioetanol es el biocombustible más utilizado mundialmente en el sector transporte (Balat, 2011). La mayor parte del bioetanol comercializado procede de caña de azúcar o remolacha o granos de cereales. El etanol obtenido de estos cultivos se denomina etanol de primera generación (1G). Dado que dichas materias primas constituyen parte del sustento humano y animal, y su disponibilidad es limitada, tanto por el exceso de demanda de bioetanol por parte de los países industrializados como por la controversia generada por la competencia con la alimentación, se está tratando de desarrollar la obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica (Martínez-Alcalá, 2012; Alvira *et al.*, 2010; Sun y Cheng, 2002). El fomento y utilización de biomasa con fines energéticos, tanto para la producción de calor y electricidad como materia prima para la producción de biocombustibles, cuenta con políticas ambientales en diferentes países que están especialmente dirigidas a cumplir los objetivos establecidos en el protocolo de Kyoto y mitigar la dependencia del suministro de combustibles fósiles. El bioetanol así obtenido se denomina etanol de segunda generación (2G), y se estima que la producción mundial a partir de biomasa lignocelulósica podría alcanzar niveles 16 veces superiores a la actual (Sarkar *et al.*, 2012). Estudios del Análisis de Ciclo de Vida (ACV) (ISO 14040), sugieren una reducción de hasta un 60% en emisiones de gases de efecto invernadero para los biocombustibles producidos a partir de biomasa lignocelulósica con respecto a los combustibles fósiles (Singh *et al.*, 2010).

## **1.2. BIOCOMBUSTIBLES EN EL SECTOR TRANSPORTE**

En la actualidad, el sector transporte se encuentra fuertemente relacionado con los combustibles fósiles y se considera que el 60% del consumo de crudo está destinado a este sector. Las emisiones procedentes del sector transporte suponen un 70% de las emisiones globales de monóxido de carbono y un 19% de las emisiones globales de dióxido de carbono (Balat, 2011). Como se ha reseñado anteriormente, el incremento en la dependencia de las importaciones de petróleo y el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (GHG) son dos aspectos importantes que justifican los esfuerzos llevados a cabo para la obtención de biocombustibles destinados al transporte.

El término biocombustible engloba a los siguientes carburantes líquidos y gaseosos: bioetanol, biodiésel, biometanol, biobutanol, aceites vegetales, biogás, gas de síntesis (bio-syngas), biohidrógeno y biocombustibles líquidos obtenidos por el proceso Fischer-Tropsch. Los biocombustibles pueden generarse a partir de biomasa vegetal fácilmente disponible y abundante, son medioambientalmente sostenibles, poseen un impacto económico positivo debido a que reducen la dependencia en las importaciones del petróleo y aumento de inversiones, tienen un balance energético positivo, ya que la cantidad de energía contenida en el producto es superior a la requerida para su producción y distribución (Lechón *et al.*, 2005), y emiten menos dióxido de carbono porque están producidos por un ciclo de carbono a corto plazo, estimándose que en su combustión devuelven a la atmósfera el dióxido de carbono que la planta ha fijado para su crecimiento (Gómez *et al.*, 2008). Debido a dichos beneficios, la producción global de biocombustibles ha experimentado un crecimiento sostenido en la pasada década, desde los 16 mil millones de litros en el año 2000 hasta más de 100 mil millones de litros en el año 2011. Actualmente, los biocombustibles proporcionan el 3% del combustible total demandado por el sector transporte en todo el mundo (IEA, Biofuels 2013).

Así, la producción de biocombustibles a partir de biomasa vegetal proporciona una fuente de energía renovable y limpia, ya que no contribuyen a aumentar la cantidad de dióxido de carbono emitido a la atmósfera. Sin embargo, la competencia con los productos básicos y las tierras agrícolas y el impacto sobre los recursos hídricos y la

biodiversidad son algunos de los inconvenientes para la expansión de la producción de biocombustibles de primera generación (1G) (Fischer *et al.*, 2010). El desarrollo de tecnologías para la obtención de biocombustibles avanzados, utilizando materias primas de biomasa no alimentaria (2G), podría ayudar a superar la mayoría de los obstáculos para producir biocombustibles rentables, sostenibles y con bajas emisiones de dióxido de carbono.

La figura 1.1 muestra la tendencia de producción mundial de biocombustibles representando los millones de barriles al día (mb/d) en función de las expectativas de producción hasta el año 2017. Como puede observarse, se espera que la producción mundial de biocombustibles de primera generación se incremente en 0,5 mb/d a medio plazo, con un volumen creciente desde 1,9 mb/d en 2011 hasta 2,4 mb/d en 2017. En el caso de los biocombustibles de segunda generación, se espera un crecimiento sólido, ya que existen nuevas plantas que han comenzado su producción recientemente y varios proyectos se encuentran en vías de ejecución, mostrando una capacidad total creciente desde 55.000 barriles al día en 2011 hasta cerca de 180.000 barriles al día en 2017.

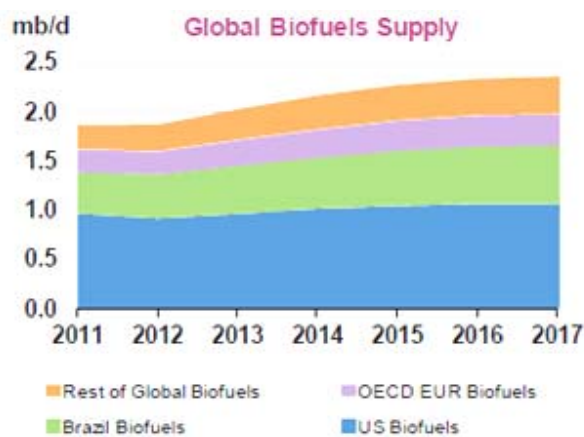


Figura 1.1. Evolución producción biocombustibles (MTOMR 2012, IEA)

Dentro de los biocombustibles se encuentran los biocarburantes, entre los que destacan principalmente el biodiésel y el bioetanol. El biodiésel es un combustible líquido similar al gasóleo producido a partir de aceites vegetales, grasas animales o grasas recicladas procedentes del sector hostelero. Es un carburante biodegradable, seguro y no tóxico que puede usarse en los motores diesel existentes mezclado con gasóleo (B20, B5, B2) dependiendo de las especificaciones del fabricante, o en su forma

pura (B100) en motores adaptados. El bioetanol es un combustible líquido similar a la gasolina que se obtiene como producto de la fermentación de materias vegetales ricas en azúcares o almidón o de biomasa lignocelulósica.

Al contrario de lo que sucede en el resto del mundo, en Europa la producción de biodiésel es más importante que la producción de bioetanol. En 2008, el 56% del biodiésel mundial fue producido en los países europeos de la OECD. El biodiésel de segunda generación tiene un gran potencial de desarrollo en Europa comparado con el bioetanol debido al aumento del motor diésel en el parque automovilístico. Sin embargo, la reducción potencial en el coste de producción es más significativa en el caso del bioetanol. Por tanto, el desarrollo de ambos biocombustibles es altamente relevante, especialmente si se tiene en cuenta el concepto de biorefinería en el cual se integran los procesos de conversión de biomasa y equipamiento para producir combustibles, energía y productos químicos a partir de biomasa (Gnansounou, 2010)

### **1.2.1. BIOETANOL COMO CARBURANTE**

El uso de etanol como combustible tiene su origen en los inicios del transporte motorizado (Demirbas, 2009). En 1820, Samuel Morey, inventor norteamericano, fue el primero en utilizar una mezcla de etanol y trementina en motores de combustión interna. De manera posterior en ese mismo siglo, el ingeniero alemán Nicholas Otto desarrolló el primer motor de combustión interna que funcionaba con etanol. Henry Ford fue el primer fabricante de un automóvil con etanol como carburante y años después, en 1908, diseñó el modelo T que podía funcionar tanto con alcohol como con gasolina, o con una mezcla de los dos (Solomon *et al.*, 2007).

A partir del año 1920, el petróleo dejó atrás a los combustibles vegetales debido a que resultaba más económico y generaba más energía por litro que el etanol. Después de la Segunda Guerra Mundial, el precio del petróleo disminuyó y provocó un uso limitado del bioetanol hasta la crisis desencadenada por la Organización de Países Árabes Exportadores de Petróleo (OPEP) en 1973, que limitó la producción de crudo

aumentando los precios. Esta acción de la OPEP puso en evidencia la dependencia en el suministro de petróleo, por lo que surgió de nuevo la posibilidad de utilizar combustibles alternativos.

Brasil y EEUU fueron los primeros países en empezar a producir etanol convencional a partir de caña de azúcar y maíz, respectivamente, para reducir su dependencia de los recursos fósiles y hoy en día, son dos de los países que más producen y exportan este alcohol. A partir del año 2000, la producción de bioetanol tuvo una gran expansión en el resto del mundo, cuando Europa y otros países se unieron a la búsqueda de biocombustibles alternativos. Entre el año 2000 y 2007, la producción total de bioetanol a partir de materias azucaradas o amiláceas se triplicó hasta alcanzar los 25,5 Mtep (Sims *et al.*, 2008). La materia azucarada más comúnmente empleada para la producción de etanol es la caña de azúcar (Sánchez y Cardona, 2008) y en cuanto a los cultivos amiláceos, la mayor parte proviene del maíz (Bothast y Schlicher, 2005) y en menores cantidades de otros productos como el trigo, centeno, cebada o sorgo (Wang *et al.*, 1999a; Blanco y Azqueta, 2008; Zhan *et al.*, 2003).

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 con 984.000 y 530.000 barriles al día, respectivamente. China y Canadá aumentarán su producción de 37.000 a 55.000 y de 28.000 a 36.000 barriles diarios, respectivamente. En la figura 1.2a-b se muestra un gráfico con la previsión realizada por la IEA (International Energy Agency).



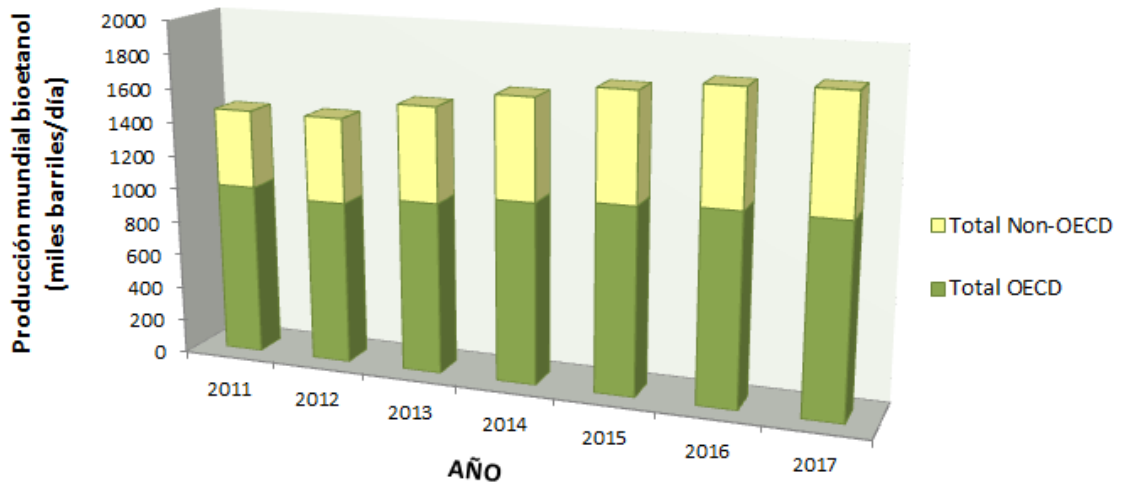


Figura 1.2a. Previsión del aumento en la producción mundial de bioetanol (IEA, 2012).

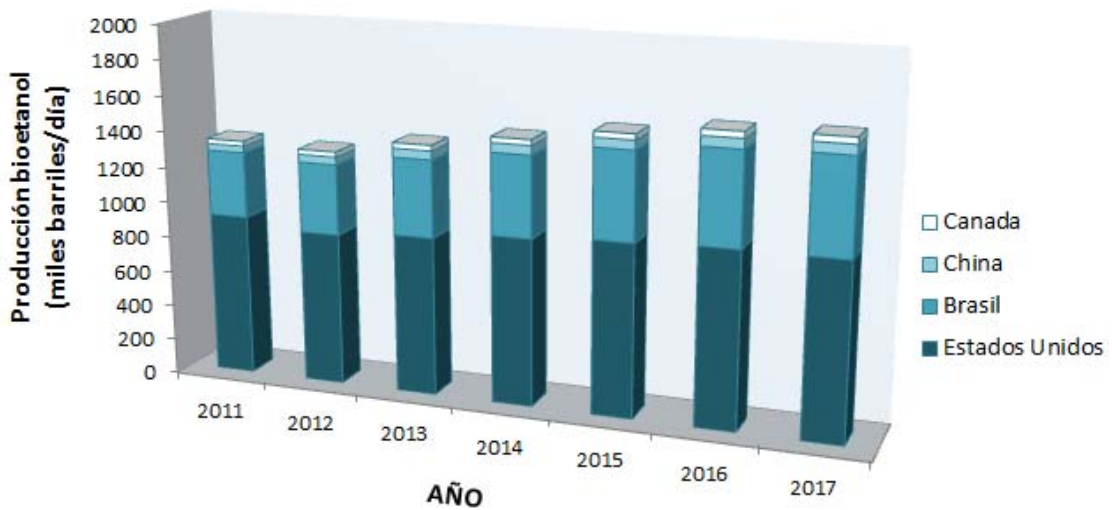


Figura 1.2b. Previsión del aumento en la producción de bioetanol para los principales productores (IEA, 2012).

El bioetanol puede usarse como biocombustible único, mezclado con gasolina en diferentes proporciones o también puede emplearse como un aditivo de la misma en forma de ETBE (Etil Ter-Butil Éter). Las especificaciones para la utilización del bioetanol se encuentran en la Norma Europea de Gasolinas EN 228 y en la Directiva 2003/17/CE, relativa a la calidad de las gasolinas y el gasóleo, que en España se encuentra recogida en el Real Decreto RD 61/2006.

El ETBE, al ser obtenido por síntesis química de etanol (45%) con isobutileno (55%), apareció como alternativa al MTBE (Metil Ter-Butil Éter, 36% metanol, 64% isobutileno). Ambos compuestos sustituyeron al tetraetilo de plomo (TEP), compuesto muy contaminante, como aditivos de la gasolina cuya función es aumentar su octanaje y así disminuir su capacidad autodetonante, incrementando su resistencia a la compresión. El ETBE presenta ciertas ventajas sobre el MTBE, ya que es menos tóxico, con un poder calorífico ligeramente superior y produce mejor oxidación de los hidrocarburos aromáticos de la gasolina lo que se traduce en menores emisiones de monóxido de carbono, pero presenta el inconveniente de que es algo más caro (Gómez *et al.*, 2008).

El bioetanol se utiliza normalmente mezclado con gasolina en concentraciones del 5%, 10% y 15%, denominadas E5, E10 y E15, respectivamente. Estas son mezclas habituales autorizadas por la normativa europea y que no requieren modificaciones en el motor de los vehículos cumpliendo las garantías del fabricante. En concentraciones superiores, se necesitan vehículos adaptados llamados vehículos de carburante flexible o FFVs (Flexible Fuel Vehicles) que pueden utilizar tanto gasolina convencional como gasolinas con bioetanol en altos porcentajes que varían entre el 85% (E85), 95% (E95) hasta el 100% (E100) (Balat, 2011).

El bioetanol también puede utilizarse como aditivo para gasóleo, de tal forma que facilita la combustión y contribuye a reducir la emisión de gases contaminantes, ofreciendo una alternativa al bioetanol en el campo de los vehículos diésel. En EEUU y Brasil, el E-Diésel ya se comercializa con éxito en mezclas E3 y E15 para vehículos pesados, consiguiendo reducciones de hasta el 30% en emisiones de partículas, más del 20% en emisiones de CO y hasta un 5% en emisiones de NO<sub>x</sub> (Rakopoulos *et al.*, 2008).

### **1.3. PROCESO DE OBTENCIÓN DE ETANOL DE 2ª GENERACIÓN**

El etanol producido a partir de biomasa lignocelulósica, también llamado bioetanol de segunda generación (2G), se obtiene mediante la consecución de las siguientes etapas (Merino y Cherry, 2007): i) reducción tamaño, si es necesario ii) pretratamiento, iii) hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, iv) fermentación, v) recuperación y purificación del bioetanol (figura 1.3). Estas etapas pueden llevarse a cabo mediante distintas configuraciones de proceso y dentro de cada una de ellas, existen múltiples alternativas. En los siguientes apartados se van a discutir dichas alternativas y se van a mostrar diferentes niveles de integración.

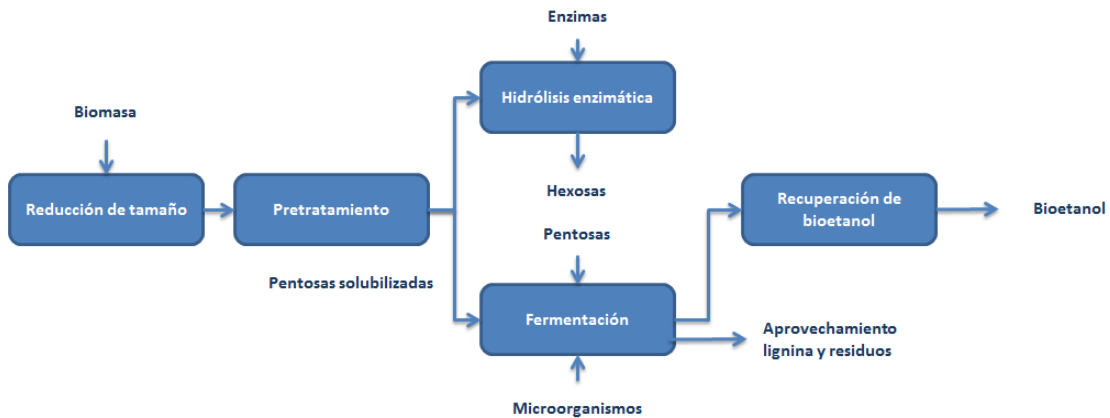


Figura 1.3. Esquema de las etapas de obtención de bioetanol (2G).

#### **1.3.1. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA**

Debido a los aspectos medioambientales y económicos mencionados con anterioridad, se evidencia la importancia de la biomasa lignocelulósica como materia prima para la producción de bioetanol. La lignocelulosa es el biopolímero más abundante en la tierra. Se considera que la biomasa lignocelulósica comprende cerca del 50% de la biomasa existente en el mundo y se estima que su producción anual se encuentra entre 10-50 mil millones de toneladas (Sánchez y Cardona, 2008).

La biomasa lignocelulósica destinada a la producción de etanol puede dividirse en seis grupos: i) residuos agrícolas (bagazos de caña de azúcar, de maíz y de sorgo



microbiana (Pu *et al.*, 2013). La proporción de los componentes varía dependiendo del tipo de material lignocelulósico como puede observarse en la tabla 1.1.

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

Tabla 1.1. Composición de diferentes materiales lignocelulósicos.  
(Fuente: Wyman, 1996; Sun y Cheng, 2002; Negro *et al.*, 2003; Ballesteros *et al.*, 2006)

## Celulosa

La celulosa es la molécula más abundante en la tierra ya que es el polímero mayoritario de las paredes celulares de las plantas. Es un homopolímero formado por unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales, llamadas microfibrillas, unidas por puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo intra e intermoleculares y fuerzas de van der Waals intramoleculares (Cuervo *et al.*, 2009). Es un polímero semicristalino, ya que presenta regiones cristalinas donde las microfibrillas tienen una estructura altamente ordenada y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática.

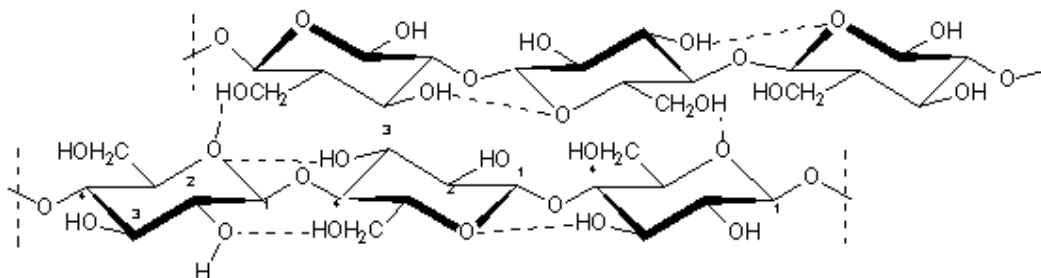


Figura 1.5. Estructura de la celulosa.

Existen dos formas cristalinas de la celulosa nativa denominadas celulosa I, que se encuentra en las fibras naturales y celulosa II, sintetizada por bacterias del género *Acetobacter* y algunas algas (Czaja *et al.*, 2007). En el primer caso, las cadenas de glucosa se encuentran orientadas paralelamente mientras que en el segundo caso las cadenas de glucosa son antiparalelas (Brown, 2003).

### Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante de la tierra que forma las paredes celulares de las plantas. Es un heteropolímero formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa), desoxihexosas (L-ramnosa, L-fucosa) y ácidos urónicos (D-glucurónico, D-galacturónico, 4-O-metilglucurónico). La cadena principal puede estar constituida por una sola unidad (homopolímero) o varias unidades (heteropolímero) como por ejemplo: xilanos mananos, galactanos, glucanos, glucomananos, galactoglucomanano, etc., que a su vez puede presentar una gran variedad de ramificaciones.

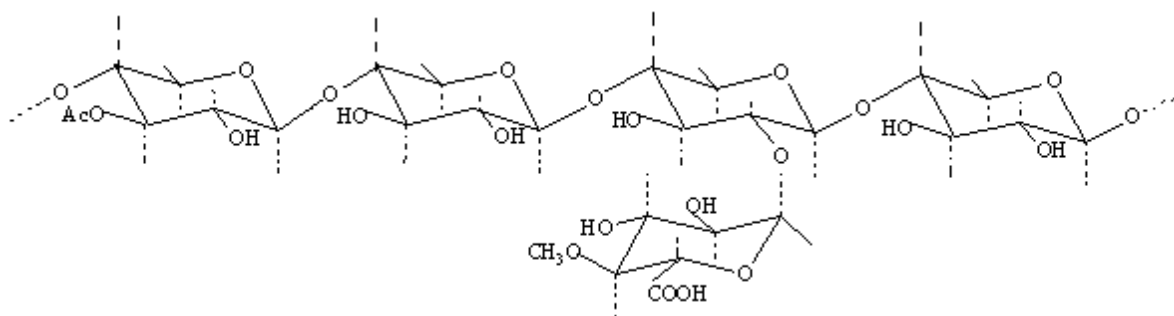


Figura 1.6. Estructura de la hemicelulosa.

Las unidades de las cadenas de hemicelulosa varían dependiendo del tipo de material lignocelulósico. En el caso de las maderas duras, el xilano es el polímero dominante altamente sustituido por grupos acetilados, siendo su composición similar en las plantas herbáceas aunque con menor proporción de grupos acetilos. Por el contrario, en las maderas blandas el galactoglucomanano es la unidad más abundante (Dahlman *et al.*, 2003; Fengel y Wegener, 1984).

En la mayoría de los cereales (cebada, trigo), los xilanos, cuantitativamente predominantes en el componente hemicelulósico, contienen una cadena principal formada por residuos de D-xilopiranosos unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. Los xilanos más abundantes son los arabinoxilanos que presentan unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa distribuidas al azar, con enlaces O-glucosídico  $\beta$ -1,3 a lo largo de la cadena de xilosa, pudiendo estar sustituidos por unidades de galactosa, ácido glucurónico o ácido 4-O-metil glucurónico (Sun *et al.*, 2000; Sun y Tomkinson, 2003; Gírio *et al.*, 2010)

### Lignina

La lignina, después de la celulosa y la hemicelulosa, es el tercer polímero más abundante de la tierra que forma los materiales lignocelulósicos (Buranov y Mazza, 2008). Es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado, formado por alcoholes aromáticos llamados alcoholes cinamílicos:  $p$ -cumarílico (4-hidroxicinamílico) , coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamílico) y sinapílico (4-hidro-3,5-dimetoxicinamílico), que actúan como precursores de la lignina y representan las unidades básicas de este polímero: (H) 4-hidroxifenilo, (G) guayacilo y (S) siringilo, respectivamente (Higuchi, 1990, Boerjan *et al.*, 2003). La lignina, del mismo modo que la hemicelulosa, se solubiliza en agua a una temperatura de 180 °C bajo condiciones neutras. Su solubilidad en medios ácidos, neutros o alcalinos depende del precursor dominante (Hendriks y Zeeman, 2009).

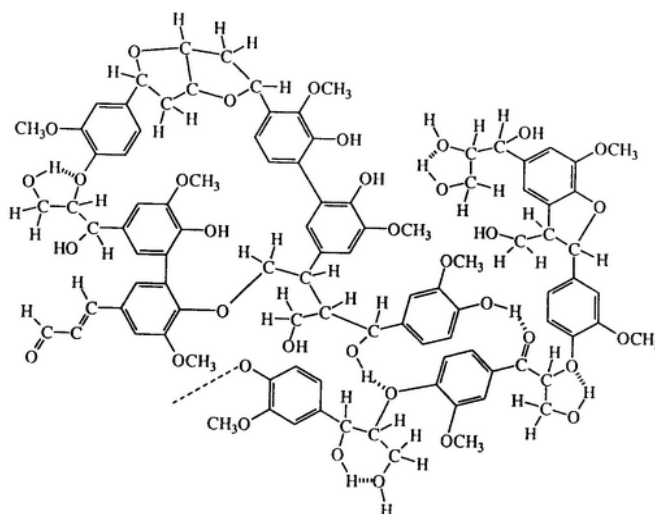


Figura 1.7. Estructura de la lignina.

La lignina actúa como material de soporte en la pared celular, ofrece rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales. En el proceso de producción de bioetanol, la presencia de este compuesto recalcitrante altamente resistente a la degradación química y biológica hace necesario un pretratamiento que solubilice o degrade este compuesto para que la estructura lignocelulósica sea accesible al ataque enzimático y microbiano.

#### 1.3.1.2. Paja de trigo

En el presente trabajo se ha utilizado paja de trigo como materia prima lignocelulósica para la obtención de bioetanol de segunda generación. Es una de las fuentes de biomasa más abundantes del mundo cuya asignación para propósitos energético podría superar el 60% (Kim y Dale, 2004). En la región de Castilla y León, donde el cultivo de cereal ocupa más del 80% de la superficie disponible, se estima que la producción de paja de trigo pueda exceder los tres millones de toneladas por año (García-Cubero et al., 2012).

La paja de trigo constituye una materia prima abundante, barata y de fácil disponibilidad, con un alto contenido en celulosa, por lo que es una opción prometedora en el proceso de producción de etanol.

#### **1.3.2. PRETRATAMIENTO**

El pretratamiento es una etapa crucial en el proceso de obtención de bioetanol debido a la compleja estructura de la biomasa lignocelulósica. En la bibliografía existe una gran variedad de pretratamientos cuya finalidad es mejorar la digestibilidad de los materiales lignocelulósicos. Las propiedades físico-químicas y el comportamiento de cada materia prima es diferente por lo que es necesario aplicar el pretratamiento más adecuado dependiendo del tipo de biomasa (Karagöz *et al.*, 2012; Hendriks y Zeeman, 2009).



Para que un pretratamiento sea considerado como bueno y efectivo debe cumplir los siguientes objetivos: i) provocar la solubilización y/o redistribución de la lignina; ii) disociar el revestimiento que la lignina y la hemicelulosa forman alrededor de la celulosa con el fin de aumentar la accesibilidad de las enzimas; iii) alterar las características estructurales de la celulosa como la cristalinidad y el grado de polimerización; iv) ser efectivo para una variedad de materias primas; v) asegurar la recuperación de los componentes de la biomasa lignocelulósica: celulosa, hemicelulosa y lignina; vi) evitar la formación de productos de degradación y compuestos potencialmente inhibitorios; vii) evitar la degradación de azúcares; viii) evitar la necesidad de pasos previos de preparación de la materia prima; ix) ser efectivo para grandes cargas de sólido; x) tener un coste moderado, tanto en la inversión como en la operación, ya que se ha estimado que el pretratamiento representa aproximadamente el 33% del coste total del proceso. (Alvira *et al.*, 2010; Sun y Cheng, 2002; Lynd, 1996).

Se han propuesto y desarrollado una gran variedad de tecnologías de pretratamiento de biomasa lignocelulósica que pueden ser clasificadas en cuatro grupos: métodos físicos, físico-químicos, químicos y biológicos (Sun y Cheng, 2002).

### Métodos físicos

En este tipo de pretratamiento, el material lignocelulósico es fragmentado, triturado y molido con el objetivo de reducir la cristalinidad de la celulosa. Este proceso de reducción de tamaño facilita la accesibilidad de las enzimas a la superficie de la biomasa aumentando la conversión de la celulosa. Los requerimientos energéticos de estos pretratamiento mecánicos dependen del tamaño final de partícula que se quiera alcanzar y del tipo de biomasa (Sánchez y Cardona, 2008; Cuervo *et al.*, 2009).

### Métodos físico-químicos

Dentro de este tipo de pretratamiento se pueden destacar tres procesos: la explosión de vapor (o steam explosion SE), la termohidrólisis (o Liquid Hot Water LHW) y la explosión de fibra de amoníaco (AFEX). La explosión de vapor es un método en el que

la biomasa se somete a la acción de vapor saturado (20-50 bar, 160-290°C) durante unos pocos minutos transcurridos los cuales se provoca una descompresión súbita hasta presión atmosférica. La termohidrólisis consiste en someter a la biomasa a un proceso con agua caliente a presión durante un determinado tiempo. Los valores típicos de las variables de operación de este proceso son temperatura dentro del rango 160-230°C y presión superior a 5 MPa durante 20 minutos. Esta tecnología presenta elevadas tasas de recuperación de azúcares de cinco carbonos y no produce inhibidores (Pérez *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2009). El pretratamiento AFEX, cuyo fundamento es similar al de la explosión de vapor pero realizado a temperaturas inferiores (60-100°C) durante un tiempo de residencia entre 5 y 30 minutos, sometiendo posteriormente a la biomasa impregnada en amoníaco a una descompresión repentina. Este pretratamiento presenta elevadas eficiencias en materiales herbáceos (Himmel *et al.*, 1997; Sun y Cheng, 2002; Sarkar *et al.*, 2012).

La explosión de vapor es el método más estudiado y ampliamente utilizado para la biomasa lignocelulósica debido a su idoneidad y eficacia para un amplio rango de materias primas. Este ha sido uno de los tratamientos elegidos para pretratar la paja de trigo en este trabajo y será discutido en un apartado posterior.

### Métodos químicos

En este tipo de tecnologías se emplean diferentes agentes químicos como ozono, ácidos, bases, peróxidos y solventes orgánicos. Los pretratamientos en los que se emplea ácido sulfúrico o clorhídrico diluido han sido los más estudiados debido que mejoran notablemente el proceso de hidrólisis enzimática de la celulosa sobre todo en materiales herbáceos (Herrera *et al.*, 2004; Irfan *et al.*, 2010; Chandel *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2012). La adición de bases diluidas, principalmente hidróxidos de sodio, potasio y calcio, permite la disolución de la lignina causando un aumento en el área de la superficie interna de la biomasa reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa. Los pretratamientos con hidróxido de sodio o de potasio son los más ampliamente utilizados para paja de cereal (Akhtar *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012). El pretratamiento con peróxido de hidrógeno puede llegar a eliminar el 50%

de la lignina y la mayoría de la hemicelulosa, las cuales son solubilizadas liberando glucosa durante la sacarificación (Cuervo *et al.*, 2009). El proceso “organosolv” consiste en la adición de solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona así como también ácidos inorgánicos que actúan como catalizadores que rompen los enlaces de la lignina y la celulosa (Zhao *et al.*, 2009). Todos estos procesos tienen el inconveniente de que su coste es alto en comparación con otros pretratamientos, ya que la adición de agentes químicos y la eliminación de dichos compuestos suponen un coste adicional.

En los últimos años se han desarrollado otras tecnologías químicas como la adición de peróxido de hidrógeno combinado con álcalis y el pretratamiento con ozono. El primer método es muy efectivo para la eliminación de lignina y la fracción hemicelulósica (Monte *et al.*, 2011). La ozonólisis ha sido otro de los pretratamientos elegidos en este estudio y por tanto se explicará más extensamente en un apartado posterior.

### Métodos biológicos

Los tratamientos biológicos son medioambientalmente sostenibles ya que implican el uso de microorganismos como los hongos de la podredumbre blanca, parda o blanda, que son capaces de degradar la lignina y la hemicelulosa (Sun y Cheng, 2002). Estos métodos requieren poca cantidad de energía y no generan compuestos tóxicos, sin embargo, es un proceso lento que limita su aplicación industrial (Talebnia *et al.*, 2010).

Los hongos de la podredumbre blanca son los microorganismos que presentan una mayor eficiencia en el proceso de degradación de lignina de la biomasa lignocelulósica mediante la acción de enzimas ligno-degradantes como las peroxidasa y lacasa (Kumar *et al.*, 2009a). Se ha estudiado la eficiencia de estos microorganismos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyanthus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispota*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus* mostrando altas eficiencias delignificadoras (Shi *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009a; Alvira *et al.*, 2010)

En la tabla 1.2 en la que se comparan los efectos de los pretratamiento citados a modo de resumen.

Tipo	Incremento	Disminución	Degradación	Redistribución	Eliminación
Físico	Área superficial específica Tamaño de poro	Grado de polimerización Cristalinidad			
Fco.-Qco.	Área superficial específica Tamaño de poro		Hemicelulosa (Parcial)	Lignina	
Químico	Área superficial interna Porosidad	Grado de polimerización Cristalinidad	Hemicelulosa		Lignina
Biológico	Área superficial específica Tamaño de poro		Hemicelulosa Lignina		

Tabla 1.2. Efecto de los diferentes pretratamientos sobre los componentes de la biomasa lignocelulósica (Fuente: Adaptado de Mosier *et al.*, 2005; Talebnia *et al.*, 2010)

### 1.3.2.1. Explosión de vapor

La explosión de vapor (EV), también llamada autohidrólisis, es uno de los métodos más utilizados para el pretratamiento de paja de trigo debido a su eficacia y a su bajo coste (Alfani *et al.*, 2000; Ballesteros *et al.*, 2006). En la EV se calienta rápidamente la biomasa mediante vapor saturado a alta presión durante un determinado período de tiempo y posteriormente se reduce la presión bruscamente, por lo que el material lignocelulósico se somete a una descompresión súbita. Las condiciones de operación empleadas para paja de trigo son temperatura entre 160 y 230 °C y tiempo de residencia entre varios segundos a unos pocos minutos (Talebnia *et al.*, 2010). La adición de agentes químicos como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o SO<sub>2</sub> puede favorecer la eliminación de la fracción hemicelulósica y mejorar el rendimiento de hidrólisis enzimática cuando el proceso se lleva a cabo a bajas temperaturas (Jurado *et al.*, 2009).

La EV combina dos efectos, uno mecánico que consiste en la separación de fibras debida a las fuerzas de cizalladura provocadas por la despresurización y otro químico, debido a la hidrólisis de algunos grupos aceto de las hemicelulosas, dando lugar a la presencia de ácido acético que disminuye el pH del agua y provoca la hidrólisis catalítica de la hemicelulosa (Tomás-Pejó, 2009). La lignina es redistribuida y parcialmente

solubilizada junto con la hemicelulosa, lo que hace que la celulosa sea más accesible al ataque enzimático debido al aumento del área superficial (García-Aparicio *et al.*, 2006).

Varios autores han probado la eficacia de la EV en diferentes materiales lignocelulósicos como maderas duras (Negro *et al.*, 2003; Emmel *et al.*, 2003), maderas blandas (Galbe y Zacchi, 2002); bagazo de maíz (Varga *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2011); bagazo de caña de azúcar (Glasser y Wright, 1998); y paja de trigo (Alfani *et al.*, 2000; Ballesteros *et al.*, 2006; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2010). Este pretratamiento es más favorable en el caso de maderas duras y residuos agrícolas ya que el contenido en lignina es menor y poseen un mayor número de grupos acetilo, por lo que el proceso de autohidrólisis es más efectivo (Tomás-Pejó, 2009).

Las ventajas de este método son un requerimiento bajo de energía comparado con otras tecnologías, la posibilidad de utilizar tamaños relativamente grandes de partícula, la alta recuperación de azúcares y la poca o nula utilización de agentes químicos. Sin embargo presenta algunas limitaciones como la degradación de los azúcares derivados de la fracción hemicelulósica y que provoca la solubilización y transformación de la lignina en compuestos potencialmente inhibitorios de las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación. Es probable también que se produzca la solubilización de extractivos durante el pretratamiento dando lugar a compuestos tóxicos en bajas concentraciones (García-Aparicio *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.2. Ozonolisis

La ozonolisis (OZ) consiste en la adición controlada de ozono a presión y temperatura ambiente. El ozono es un oxidante muy potente y muy reactivo con grupos funcionales de alta densidad electrónica como son los que aparecen en la lignina, aguas residuales, melazas de azucarera, etc.

En las últimas décadas se ha producido un aumento sustancial tanto en número como en diversidad de aplicaciones del ozono. El ozono ha sido utilizado para el tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales y en el blanqueo de pasta de

papel (Roncero *et al.*, 2003; Shatalov y Pereira, 2008), así como en el tratamiento de efluentes de fermentación (Coca *et al.*, 2007).

En el caso de materiales lignocelulósicos, la eficacia de este pretratamiento reside en la degradación de la lignina y en la ligera solubilización de las hemicelulosas (García-Cubero *et al.*, 2009). Este pretratamiento ha mejorado la etapa de hidrólisis enzimática de paja de trigo y centeno (García-Cubero *et al.*, 2009; García-Cubero *et al.*, 2012).

El pretratamiento con ozono es selectivo, por lo que da lugar a un alto porcentaje de retención de polisacáridos en la materia lignocelulósica pretratada. Otra de sus ventajas es que mejora la digestibilidad de la celulosa de la biomasa debido a la eliminación de lignina y a la reducción del grado de polimerización. Este método produce una menor cantidad de compuestos potencialmente tóxicos comparado con otros pretratamientos ya que el ozono ataca a la lignina liberando compuestos de bajo peso molecular, principalmente ácidos orgánicos como ácido acético, fórmico y también ácido oxálico, que es un producto de degradación generado de la reacción de compuestos fenólicos con el ozono (Vidal y Molinier, 1988; García-Cubero *et al.*, 2009).

#### 1.3.2.3. Inhibidores generados en el pretratamiento

Dependiendo de las condiciones del pretratamiento (temperatura, presión, tiempo de residencia), de la materia prima (maderas duras, maderas blandas o residuos agrícolas) y de la presencia de catalizadores ácidos, la naturaleza y la concentración de compuestos potencialmente tóxicos generados pueden variar en gran medida (García-Aparicio *et al.*, 2006).

Estos compuestos potencialmente inhibidores para los microorganismos encargados de la etapa de fermentación pueden clasificarse de acuerdo a su estructura química en ácidos carboxílicos (alifáticos), furaldehídos y compuestos aromáticos. Los furaldehídos generados son principalmente furfural, producto de degradación de las

pentosas e 5-hidroximetilfurfural (HMF), producto de degradación de la celulosa (Martín y Jönsson, 2003). Los compuestos aromáticos son compuestos fenólicos procedentes de la degradación de la lignina siendo el 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, acetosiringona, ácido vainílico y ácido sirínico los que se suelen encontrar en mayor medida (Klinke *et al.*, 2002). Los ácidos alifáticos que pueden generarse son principalmente el ácido acético, producido a partir de los restos acetilo de las hemicelulosas, y el ácido fórmico y levulínico, procedente de la degradación del furfural y HMF (Almeida *et al.*, 2007). El ácido oxálico, ácido bicarboxílico, se genera de la reacción del ozono con compuestos de degradación de la lignina como la vainillina o el siringaldehído.

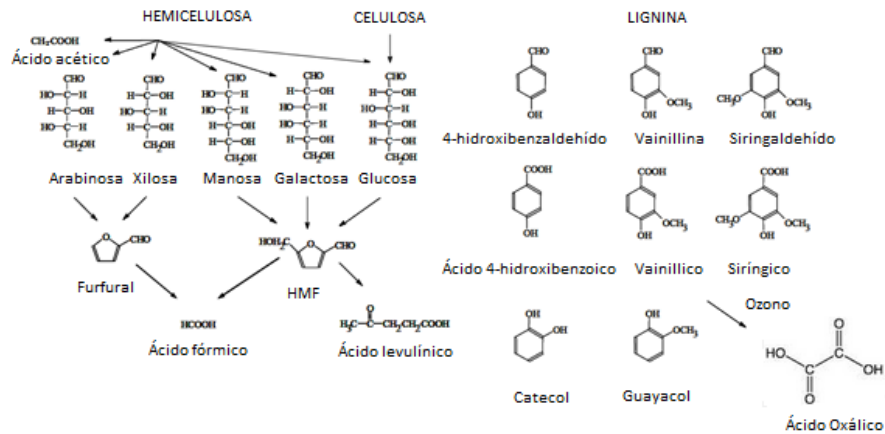


Figura 1.8. Compuestos potencialmente inhibidores generados del pretratamiento de materiales lignocelulósicos. (Fuente: Adaptado de Tomás-Pejó, 2009)

Estos compuestos pueden eliminarse por medio de lavado o de mecanismos de detoxificación como el uso de carbonato cálcico o carbón activo en una gran variedad de materiales lignocelulósicos (Kuhad *et al.*, 2010; Arslan y Eken-Saraçoglu, 2010; Cantarella *et al.*, 2004). También se puede realizar un proceso de adaptación a dichos compuestos tóxicos de tal forma que se cree un microorganismo altamente tolerante (Yang *et al.*, 2011).

De todos los compuestos estudiados con anterioridad, el ácido acético, furfural y HMF son los compuestos mayoritarios formados durante el pretratamiento de la paja de trigo con EV, mientras que ácido acético y ácido oxálico son los principales inhibidores formados durante el pretratamiento con OZ (Moreno *et al.*, 2013; Miura *et al.*, 2012).

### 1.3.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES

Una vez pretratada la materia prima, es necesario llevar a cabo una hidrólisis para liberar los azúcares monoméricos potencialmente fermentables. Para ello, se desarrollan diferentes tecnologías como la hidrólisis ácida, empleando ácidos concentrados o diluidos, o la hidrólisis enzimática. El uso de ácidos concentrados no es rentable económicamente debido a que conlleva problemas de corrosión y exigen procesos de recuperación y neutralización. En el caso de ácidos diluidos, para que el proceso de hidrólisis alcance buenos rendimientos es necesario el empleo de temperaturas elevadas, lo que provoca problemas de corrosión y degradación de azúcares (Tomás-Pejó, 2009).

Por tanto, la hidrólisis enzimática se presenta como la alternativa adecuada. En este proceso las condiciones de operación se encuentran en el rango de temperatura (45-50°C) y pH (4-5) óptimo de trabajo de las enzimas. Para el desarrollo de esta etapa, existen diferentes enzimas capaces de hidrolizar tanto celulosa como hemicelulosa y se engloban en celulasas y xilanasas, respectivamente.

Las celulasas extracelulares son producidas por microorganismos degradadores de la celulosa: hongos basidiomicetos, dentro de los cuales se encuentran *Sclerotium rolfsii* y *Schizophyllum commune*, hongos ascomicetos como *Thricoderma reesei* y algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* y las bacterias aerobias como *Cellulomonas* y *Streptomyces* (Elberson *et al.*, 2000; Alani *et al.*, 2008; Quiroz-Castañeda *et al.*, 2009). Estos microorganismos aerobios producen celulasas con diferentes especificaciones y modos de acción que actúan de manera sinérgica para hidrolizar la celulosa.

Existen tres tipos de celulasas que actúan de forma conjunta: i) endoglucanasas (EGs), que actúan hidrolizando las regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos, causando un acortamiento de las cadenas de celulosa, ii) exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBHs), que actúan sobre los extremos de las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa, y iii)  $\beta$ -glucosidasas (BG), que se encargan de hidrolizar una molécula de celobiosa para liberar dos moléculas de glucosa y de este modo evita



que la celobiosa actúe de forma inhibitoria sobre los otros dos tipo de celulasas (Lynd *et al.*, 2002).

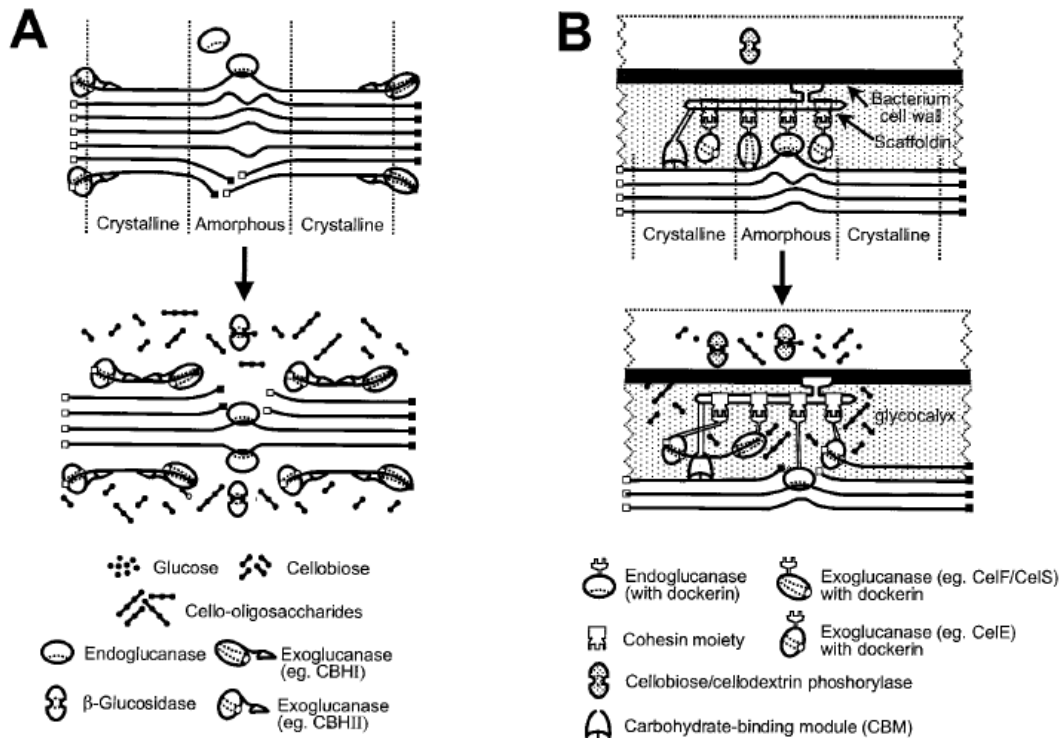


Figura 1.9. Mecanismo propuestos para la hidrólisis de la celulosa mediante una acción combinada de las celulasas (Fuente: Lynd *et al.*, 2002)

El uso de otras enzimas como las xilanasas, puede ayudar a mejorar la eficiencia y recuperación de azúcares monoméricos en la etapa de hidrólisis (García-Cubero *et al.*, 2010). En el caso de las xilanasas, las enzimas mayoritarias que participan son; i) endo-(1,4)-xilanasas, y ii)  $\beta$ -xilosidasas, implicadas en la despolimerización del esqueleto principal de los xilanos y su transformación en xilosa, respectivamente (Martínez-Alcalá, 2012). La hidrólisis enzimática de la hemicelulosa es un proceso complejo, no solo por la compleja estructura de la hemicelulosa, sino también debido a la acción coordinada de varias enzimas.

Los rendimientos de hidrólisis enzimática de paja de trigo dependen del tipo y severidad de pretratamiento encontrándose en un rango del 50-90% de digestibilidad en la mayoría de los casos (Sarkar *et al.*, 2012). En el caso de la explosión de vapor, los rendimientos de hidrólisis de celulosa varían desde un 54% hasta valores superiores al 90% al añadir ácidos, álcalis o peróxido de hidrógeno en el proceso (Ballesteros *et al.*,

2006; Chen *et al.*, 2008). En el caso de la ozonólisis, se puede alcanzar rendimientos hasta el 89% (Binder *et al.*, 1980; García-Cubero *et al.*, 2009).

La etapa de hidrólisis enzimática, limitante en el proceso de obtención de etanol, está influenciada por varios factores referentes a la materia prima pretratada y a las propias enzimas, dentro de los cuales se encuentran el uso de complejos enzimáticos adecuadamente combinados, el índice de cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización, el área superficial disponible, el contenido y distribución de lignina, el contenido en hemicelulosa, el tamaño de partícula y la porosidad (Alvira *et al.*, 2010). Por tanto, se evidencia que el pretratamiento es una etapa clave para reducir costes en la etapa de hidrólisis enzimática, ya que cuanto más efectivo sea, menores cantidades de enzimas serán necesarias.

#### **1.3.4. FERMENTACIÓN**

La etapa de fermentación consiste en transformar los azúcares liberados en la etapa de hidrólisis enzimática en etanol y dióxido de carbono por medio de microorganismos adecuados, levaduras principalmente. Estos microorganismos pueden ser cepas naturales que metabolizan azúcares de seis carbonos, cepas naturales que consuman tanto azúcares de seis como de cinco carbonos, microorganismos modificados genéticamente con la finalidad de aprovechar todo el sustrato presente en el medio o un cultivo mixto para realizar una co-fermentación.

##### 1.3.4.1. Microorganismos

Con el objetivo de aumentar la eficiencia del proceso de producción de etanol y hacerlo económicamente viable, las cualidades que debe cumplir el microorganismo ideal son las siguientes: i) ser capaz de utilizar una amplia variedad de sustratos, ii) tener elevados rendimientos de etanol y productividad, iii) ser capaz de soportar elevadas concentraciones de etanol y altas temperaturas, iv) ser tolerante a los inhibidores presentes en los hidrolizados, y v) tener actividad celulolítica (Sarkar *et al.*, 2012).

Algunos de los microorganismos naturales que pueden llevar a cabo la fermentación alcohólica son *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis*, *Candida brassicae*, *Mucor indicus*, etc. (Sarkar *et al.*, 2012). La fermentación de glucosa puede llevarse a cabo de forma eficiente por medio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o la bacteria *Zymomonas mobilis*. *S. cerevisiae* ha sido comúnmente empleada a nivel industrial en los procesos de fermentación alcohólica ya que posee buenos rendimientos de obtención de etanol a partir de todo tipo de hexosas. Sin embargo, esta levadura en su estado natural no es capaz de fermentar pentosas lo que supone una limitación en el proceso de fermentación de los hidrolizados de biomasa lignocelulósica pretratada (Karagöz *et al.*, 2012). Microorganismos naturales de las especies *Pichia* y *Candida* son capaces de fermentar xilosa a etanol aunque con rendimientos inferiores que los obtenidos con *S. cerevisiae* a partir de glucosa.

En los últimos años se han llevado a cabo estudios en los que se ha modificado genéticamente la levadura *S. cerevisiae* introduciendo genes de microorganismos capaces de fermentar pentosas como *Pichia stipitis*. De esta forma se han creado diferentes cepas genéticamente modificadas como *S. cerevisiae* TMB3400 que han sido empleadas en procesos de producción de etanol con diferentes materiales lignocelulósicos (Öhgren *et al.*, 2006). Sin embargo, la velocidad de consumo de xilosa de estas especies es baja debido a que no presenta transportadores específicos para la xilosa y a los insuficientes niveles de asimilación genética (Jeffries y Headman, 2009).

Otros estudios se basan en 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 como en el caso de co-cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* (Grootjen *et al.*, 1990; Rudolf *et al.*, 2007), *Zymomonas mobilis* y *Pichia stipitis* (Laplace *et al.*, 1993; Fu *et al.*, 2009) o *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida shehatae* (Lebeau *et al.*, 2007).

1.3.4.1.1. *Pichia stipitis*

En este trabajo se ha utilizado el microorganismo *Pichia stipitis*, también llamado *Scheffersomyces stipitis*, debido a sus buenas cualidades, ya que puede fermentar glucosa y xilosa con buenos rendimientos de etanol lo que supone una mejora en la eficiencia del proceso al aprovechar todos los azúcares presentes en los hidrolizados de biomasa lignocelulósica. Por tanto, se evita la complejidad de utilizar un microorganismo modificado genéticamente o un co-cultivo. La figura 1.10 muestra la ruta metabólica de obtención de etanol característica de la levadura *P. stipitis* a partir de glucosa y xilosa.

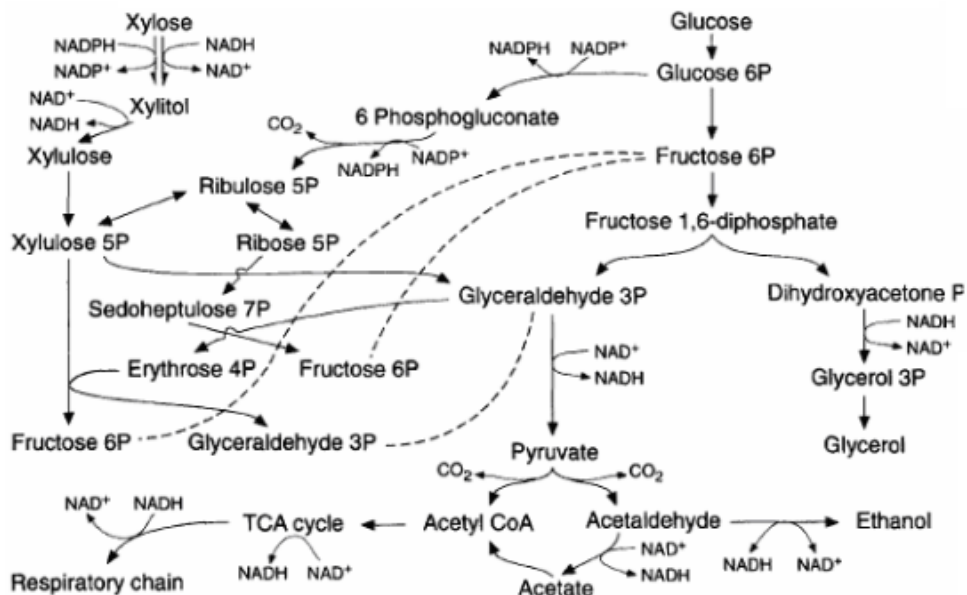


Figura 1.10. Ruta metabólica de la levadura *Pichia stipitis* a partir de glucosa y xilosa (Fuente: Peña, 2008)

El hongo *P. stipitis* es una levadura del género *Schefferomyces*. Al igual que la mayoría de los miembros del orden de los *Saccharomycetales*, *P. stipitis* tiene un tamaño de 3 a 5 µm de diámetro. Su forma habitual es esférica o elipsoidal, aunque puede haber desviaciones y formar pseudomicelios. Un hábitat adecuado para *P. stipitis* incluye áreas húmedas ricas en biomasa orgánica, así, bosques de madera dura o zonas con alto contenido en residuos agrícolas son ambientes comunes. El crecimiento de esta levadura se produce en un rango de temperatura entre 25°C y 37°C y pH entre 5-6, siendo su temperatura óptima alrededor de 30°C. Temperaturas superiores a 40°C no permiten desarrollar su crecimiento (Jeffries *et al.*, 2007).

La importancia de *P. stipitis* a nivel industrial proviene de su capacidad para fermentar xilosa y obtener buenos rendimientos de producción de etanol. Además, *P. stipitis* no requiere complejos vitamínicos adicionales para la fermentación de xilosa y es capaz de fermentar un amplio rango de azúcares como la celobiosa (Agbogbo y Wenger, 2006). La mayor conversión teórica que se puede alcanzar es 0,51 g de etanol por cada gramo de glucosa y xilosa presente en el medio, pero es un rendimiento difícil de conseguir ya que parte de la energía se deriva a crecimiento celular y en ocasiones, tanto el crecimiento como la producción de etanol se encuentran inhibidos por diversos compuestos estudiados anteriormente.

*P. stipitis* es una levadura facultativa, crece rápidamente en condiciones aerobias y 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 (Fiaux *et al.*, 2003, Klinner *et al.*, 2005). 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 (du Preez, 1994). La cantidad de oxígeno presente determina el mantenimiento de la viabilidad celular y el balance NADH (Agbogbo *et al.*, 2007).

La etapa crítica en la conversión de xilosa a etanol puede ser la conversión de xilosa en xilulosa que se lleva a cabo mediante dos reacciones: i) reducción de xilosa a xilitol, y ii) oxidación de xilitol a xilulosa. La regeneración de los cofactores necesarios en dicho metabolismo es altamente dependiente de la velocidad de transferencia de oxígeno (Furlan *et al.*, 1994). En el siguiente paso, la conversión anaerobia de xilulosa a etanol crea un exceso de NADH que debe ser corregido por la presencia de oxígeno como aceptor electrones. Algunas levaduras, como *P. stipitis*, son capaces de autorregular el desequilibrio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  que se produce y no necesitan necesariamente oxígeno para producir etanol a partir de xilosa, pero la presencia de aireación limitada y controlada permite alcanzar mejores rendimientos de etanol (Dellweg *et al.*, 1989).

### 1.3.5. CONFIGURACIÓN DE LAS ETAPAS DEL PROCESO

Después de la etapa de pretratamiento, la hidrólisis enzimática puede realizarse de forma simultánea o separada con la etapa de fermentación. La hidrólisis y fermentación simultánea (SSF) consiste en la conjugación de ambos procesos en un mismo reactor. Presenta como ventajas la amplia disponibilidad de microorganismos eficientes para el aprovechamiento de glucosa, la menor cantidad de enzimas empleadas y la minimización de la inhibición por producto final. Sin embargo, las condiciones del proceso deben ser un compromiso entre las condiciones óptimas para cada etapa, no se pueden reciclar células y no se produce fermentación de las pentosas (Tomás-Pejó, 2009).

La hidrólisis y fermentación separada (SHF) consiste en un proceso secuencial en el que se realiza la hidrólisis de la celulosa y recuperación de parte de la xilosa y posteriormente la fermentación de dichos azúcares. La principal ventaja es que cada etapa se puede llevar a cabo en sus condiciones óptimas de pH y temperatura y es posible el reciclaje de células. Sin embargo, presenta como inconveniente la acumulación de glucosa y celobiosa que puede provocar inhibición de las celulasas implicadas en el proceso y un aumento de costes al realizar el proceso en dos pasos (Stenberg *et al.*, 2000). En el presente estudio se ha optado por esta configuración debido a que levadura *Pichia stipitis* necesita unas condiciones óptimas para la co-fermentación de glucosa y xilosa.

A parte de las configuraciones anteriormente mencionadas, existe la posibilidad de llevar a cabo un bioproceso consolidado (CBP) y una sacarificación y co-fermentación simultáneas (SSCF). En el caso del CBP, la producción de celulasas, la hidrólisis de biomasa y el proceso de fermentación se llevan a cabo en el mismo reactor por uno o varios microorganismos, aunque en la actualidad el proceso no tiene elevadas eficiencias. En el proceso SSCF la etapa de hidrólisis y fermentación se llevan a cabo en el mismo reactor con la presencia de varios microorganismos compatibles en términos de temperatura y pH capaces de metabolizar todos los sustratos presentes.

Los procesos anteriormente citados pueden llevarse a cabo de manera continua, discontinua (batch) o semi-continuo (fed-batch). El proceso continuo consiste en un sistema abierto en el que existe entrada de sustrato y salida de producto y biomasa celular. Los procesos en discontinuo (batch) se utilizan para la conversión por cargas de azúcares a etanol. En los procesos fed-batch, el sustrato se añade alimentando al reactor con la estrategia adecuada, favoreciendo el manejo y homogeneización del medio y disminuyendo el efecto inhibitorio de los productos tóxicos. Es uno de los métodos más utilizados en la industria para producción de etanol debido a que las productividades son mayores, el tiempo de fermentación es menor y se consiguen elevadas velocidades de sacarificación (Chang *et al.*, 2012). En cuanto a los microorganismos encargados de la fermentación, pueden permanecer libres en el medio o estar inmovilizados en cápsulas de hidrogel normalmente (alginato de calcio), lo que aumenta la eficiencia del proceso (De Bari *et al.*, 2013).

## **1.4. REFERENCIAS**

**Agbogbo, F.K., Wenger, K.S.,** 2006. "Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia stipitis*." *Biotechnology Letters* 28, 2065-2069.

**Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K., Jeffries, T.W.,** 2007. "The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stipitis*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136-140, 653-662.

**Akhtar, M.S., Saleem, M., Akhtar, M.W.,** 2001. "Saccharification of Lignocellulosic Materials by the cellulases of *Bacillus subtilis*." *International Journal of Agriculture & Biology* 3, 199-202.

**Alani, F., Anderson, W.A., Moo-Young, M.,** 2008. "New isolate of *Streptomyces sp.* with novel thermoalkalotolerant cellulases." *Biotechnology Letters* 30, 123-126.

**Alfani, F., Gallifuoco, A., Saporosi, A., Spera, A., Cantarella, M.,** 2000. "Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25, 184-192.

**Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Liden, G., Gorwa-Grauslund, M.F.,** 2007. "Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82, 340-349.

**Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J.,** 2010. "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review." *Bioresource Technology* 101, 4851-4861.

**Arslan, Y., Eken-Saraçoglu, N.,** 2010. "Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia stipitis* to ethanol." *Bioresource Technology* 101, 8664-8670.

**Balat, M.,** 2011. "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review." *Energy Conversion and Management* 52, 858-875.

**Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M.,** 2006. "Ethanol production from steam-explosion pretreatment wheat straw." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 6, 129-132.

**Binder, A., Pelloni, L., Fietcher, A.,** 1980. "Delignification of straw with ozone to enhance biodegradability." *Applied Microbiology and Biotechnology* 11, 1-5.

**Blanco, M.I., Azqueta, D.,** 2008. "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.

**Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M.,** 2003. "Lignin biosynthesis." *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 519-546.

**Bothast R.J., Schlicher M.A.,** 2005. "Biotechnological process for conversion of corn into ethanol." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 67, 19-25.

**Brown, R.M.,** 2003. "Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century?" *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 42, 487-495.

**Buranov, A.U. y Mazza, G.,** 2008. "Lignin in straw of herbaceous crops." *Industrial Crops and Products* 28, 237-259.



- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera A., Alfani.,** 2004. "Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF." *Biotechnology Progress* 20, 200-206.
- Chandel A.K., Singh, O.V., Venkateswar, R., Chandrasekhar, G., Narasu, M.L.,** 2011. "Bioconversion of novel substrate *Saccharum spontaneum*, a weedy material, into ethanol by *Pichia stipitis* NCIM3498." *Bioresource Technology* 102, 1709-1714.
- Chang, Y.H., Chang, K.S., Huang, C.W., Hsu, C.L., Jang, H.D.,** 2012. "Comparison of batch and fed-batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production." *Fuel* 97, 166-173.
- Chen, H., Han, Y., Xu, J.,** 2008. "Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide." *Process Biochemistry* 43, 1462-1466.
- Coca, M., Peña, M., González, G.,** 2007. "Kinetic study of ozonization of molasses fermentation wastewater." *Journal of Hazardous Materials* 149, 364-370.
- Cuervo, L., Folch, J.L., Quiroz, R.E.,** 2009. "Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol." *BioTecnología* 13:3.
- Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki, M., Brown, R.M.,** 2007. "The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications." *Biomacromolecules* 8, 1-12.
- Dahlman, O., Jacobs, A., Sjoberg, J.,** 2003. "Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps." *Cellulose* 10, 325-334.
- De Bari, I., De Canio, P., Cuna, D., Liuzzi, F., Capece, A., Romano, P.,** 2013. "Bioethanol production from mixed sugars by *Scheffersomyces stipitis* free and immobilized cells, and co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*." *New Biotechnology* 30, 591-597.
- Dellweg, H., Rizzi, M., Klein, C.,** 1989. "Controlled limited aeration and metabolic regulation during the production of ethanol from D-xylose by *Pichia stipitis*." *Journal of Biotechnology* 12, 111-122.
- Demirbas, M.F.,** 2009. "Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review." *Applied Energy* 36, S151-S161.
- Du Preez, J.C.,** 1994. "Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts." *Enzyme and Microbial Technology* 16, 944-956.
- Elberson, M.A., malekzahed, F., Yazdi, M.T., Kameranpour, N., Noori-Dalooi, M.R., Matte, M.H., Shahamat, M., Colwell, R.R., Sowers, K.R.,** 2000. "*Cellulomonas persica* sp. nov., and *Cellulomonas iranensis* sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 993-996.
- Emmel, A., Mathias, A.L., Wypych, F., Ramos, L.P.,** 2003. "Fractionation of *Eucalyptus grandis* chip by dilute acid-catalysed steam explosion." *Bioresource Technology* 86, 105-115.
- Fengel, D., Wegener, G.,** 1989. "Wood, Chemistry, Ultrastructure and Reactions." Berlin-New York: Walter de Gruyter.
- Fiaux, J., Petek, Z., Sonderegger, M., Wüthrich, K., Szyperski, T., Sauer, U.,** 2003. "Metabolic-flux profiling of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*." *Eucariotic Cell* 2, 170-180.
- Fischer, G., Prieler, S., van Velthuisen, Lensink, S.M., Londo, M., de Wit, M.,** 2010. "Biofuel production potentials in Europe: Sustainable use of cultivated land and pastures. Part I: Land productivity potentials." *Biomass and Bioenergy* 34, 159-172.

**Fu, N., Peiris, P., Markham, J., Bavor, J.,** 2009. "a novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures." *Enzyme and Microbial Technology* 45, 210-217.

**Furlan, S.A., Bouilloud, P., de Castro, H.F.,** 1994. "Influence of oxygen on ethanol and xilitol production by xylose fermenting yeasts." *Process Biochemistry* 29, 657-662.

**Galbe, M. Zacchi, G.,** 2002. "A review of the production of ethanol from softwood." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 59, 609-617.

**García-Aparicio, P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Negro, M.J.,** 2006. "Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129, 278-288.

**García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacochea, I., Coca, M., Bolado, S.,** 2009. "Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw." *Bioresource Technology* 100, 1608-1613.

**García-Cubero, M.T., Marcos, M., Bolado, S., Coca, M., González-Benito, G.,** 2010. "Optimization of operating conditions in enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic materials." *Chemical Engineering Transactions* 21, 1285-1290.

**García-Cubero, M.T., Palacín, L.G., González-Benito, G., Bolado, S., Lucas, S., Coca, M.,** 2012. "An analysis of lignin removal in a fixed bed reactor by reaction of cereal straws with ozone." *Bioresource Technology* 107, 229-234.

**Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, L.C., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R.,** 2010. "Hemicelluloses for fuel ethanol: A review." *Bioresource Technology* 101, 4775-4800.

**Glasser, W.G., Wright, R.S.,** 1998. "Steam-assisted biomass fractionation. II. Fractionation behavior of various biomass resources." *Biomass and Bioenergy* 14, 219- 235.

**Gnansounou, E.,** 2010. "Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: Current situation and perspectives." *Bioresource Technology* 101, 4842-4850.

**Gómez, L.D., Steele-King, C.G., Mc Queen-Mason, S.J.,** 2008. "Sustainable liquid biofuels from biomass: The writing's on the walls." *New Phytologist* 178, 473-485.

**Grootjen, D.R.J., Meijlink, L.H.H.M., van der Lans, R.G.J.M., Luyben, K.Ch.A.M.,** 1990. "Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Enzyme and Microbial Technology* 12, 860-864.

**Han, G., Deng, J., Zhang, S., Bicho, P., Wu, Q.,** 2010. "Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw." *Industrial Crops and Products* 31, 28-33.

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

**Herrera, A., Téllez-Luis, S.J., González-Cabriales, J.J., Ramírez, J.A., Vázquez, M.,** 2004. "Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure." *Journal of Food Engineering* 63, 103-109.

**Higuchi, T.,** 1990. "Lignin Biochemistry - Biosynthesis and Biodegradation." *Word Science and Technology* 24, 23-63.

Himmel, M.E., Adney, W.S., Baker, J.O., Elander, R., Mc Millan, J.D., Nieves, R.A., Sheehan, J.J., Thomas, S.R., Vinzant, T.B., Zhang, M., 1997. "Advanced Bioethanol Production Technologies: A Perspective." *Fuels and Chemicals for Biomass*. ACS Symposium Series 666, 2-45.

IEA, **Internacional Energy Agency**, Oil Market Report Septiembre 2013.

IEA, **Internacional Energy Agency**, Biofuels 2013.

Irfan, M., Syed, Q., Yousaf, M., Nadeem, M., Baig, S., Jafri, S.A., 2010. "Studies on the pretreatment of wheat straw for improve production of carboxymethyl cellulase by thermophilic *Trichoderma viride*FBL1 in solid state fermentation." *Academia Arena* 2010:2(7).

Jeffries, T., Grigoriev, I., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.S., Passoth, V., Richardson, P.M., 2007. "Genome sequence of the lignocellulosic-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*." *Nature Biotechnology* 25, 319-326.

Jeffries, T., Headman, J., 2009. "*Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters." *FEMS Yeast Research* 9, 793-807.

Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, A., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 2009. "Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol." *Bioresorce Technology* 100, 6378-6384.

Karagöz, P., Rocha, I.V., Özkan, M., Angelidaki, I., 2012. "Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation." *Bioresource Technology* 104, 349-357.

Kim, S., Dale, B.E., 2004. "Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues." *Biomass and Bioenergy* 26, 361-375.

Klinke, H.B., Ahring, B.K., Schmidt, A.S., Thomsen, A.B., 2002. "Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw." *Bioresource Technology* 82, 15-26.

Klinner, U., Fluthgraf, S., Freese, S., Passoth, V., 2005. "Aerobic induction for respire-fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 247-253.

Kuhad, R.C., Gupta, R., Khasa, Y.P., Singh, A., 2010. "Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): Pretreatment, saccharification and fermentation." *Bioresource Technology* 101, 8348-8354.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009a. "Methods for the pretreatment of lignocellulosic biomasa for efficient hydrolysis and biofuel production." *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48, 3713-3729.

Laplace, J.M., Delgenes, J.P., Moletta, R., Navarro, J.M., 1993. "Cofermmentation of glucose and xylose to ethanol by a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae kco-cultivated* with xylose-fermenting yeast." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75, 207-212.

Lebeau, T., Jouenne, T., Junter, G.A., 1997. "Long-term incomplete xylose fermentation, after glucose exhaustion, with *Candida shehatae* co-immobilized with *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiological Research* 162, 211-218.

Lechón, Y., Cabal, H., Lago, C., De la Rúa, C., Sáez, R., Fernández, M., 2005. "Análisis de Ciclo de Vida de Combustibles alternativos para el transporte. Fase I. Análisis del Ciclo de Vida Comparativo de Etanol de Cereales y de la Gasolina. Energía y Cambio Climático." Ministerio de Medio Ambiente. Ministerio de Educación y Ciencia. ISBN.84-8320-312-X.

- Li, Y., Park, J.Y., Shiroma, R., Tokuyasu, K.,** 2010. "Bioethanol production from rice straw by a sequential use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* with heat inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* cells prior to xylose fermentation." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111, 682–686.
- Lin, T., Huang, C., Guo, G., Hwang, W., Huang, S.,** 2012. "Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*." *Bioresource Technology* 116, 314-319.
- Lynd, L.R.,** 1996. "Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy." *Annual Review of Energy and the Environment* 21, 403-465.
- Lynd, L.R., Weimer, P. J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I. S.,** 2002. "Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 506-577.
- Martín, C., Jönsson, L.J.,** 2003. "Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors." *Enzyme and Microbial Technology* 32, 386-395.
- Martínez-Alcalá, A.,** 2012. Tesis Doctoral: "Producción de bioetanol: mejora del proceso a partir de grano de cereal y de biomasa lignocelulósica tratada con steam explosion." Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Menon, V., Rao, M.,** 2012. "trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept." *Progress in Energy and Combustion Science* 38, 522-550.
- Merino, S., Cherry, J.,** 2007. "Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization". *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 108, 95-120.
- Miura, T., Leun, S.H., Inoue, S., Endo, T.,** 2012. "Combined pretreatment using ozonolysis and wet-disk milling to improve enzymatic saccharification of Japanese cedar." *Bioresource Technology* 126, 182-186.
- Molina-Sabio, M., Rodríguez-Reinoso, S.,** 2004. "Role of chemical activation in the development of carbon porosity." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 241, 15-25.
- Monte, J.R., Brienzo, M., Milagres, A.M.F.,** 2011. "Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide." *Applied Energy* 88, 403-408.
- Moreno, A.D., Tomás-Pejó, E., Ibarra, D., Ballesteros, M., Olsson, L.,** 2013. "In situ lacasse treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistences." *Bioresource Technology* 143, 337-343.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M.,** 2005. "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology* 96, 673-686.
- Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, J.M., Cabañas, A., Ballesteros, M.** 2003. "Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105, 87-100.
- Öhgren, K., Bengtsson O., Gorwa-Grauslund, M.F., Galbe, M., Hahn-Hägerdal, B., Zacchi, G.,** 2006b. "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* 126, 488-498.
- Peña, M.,** 2008. Tesis doctoral: "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."

- Pérez, J.A., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Manzanares, P.,** 2007. "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. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés.
- Pu, Y., Hu, F., Huang, F., Davison, B.H., Ragauskas, A.J.,** 2013. "Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments." *Biotechnology for Biofuels*, 6:15.
- Quiroz-Castañeda, R.E., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., Martínez, A., Folch-Mallol, J.L., Martínez-Anaya, C.,** 2009. "Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium." *Electron Journal of Biotechnology* (online) <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol12/issue4/full/3/index.html>
- Rakopoulos, C.D., Akaras, E.C., Giakoumis, E.G.,** 2008. "Effects of ethanol-diésel fuel blends on the performance and exhaust emissions of heavy duty DI diésel engine." *Energy Conversion and Management* 49, 3155-3162.
- Roncero, M.B., Torres, A.L., Colom, J.F., Vidal, T.,** 2003. "TCF bleaching of wheat straw pulp using ozone and xylanase. Part A: paper quality assessment." *Bioresource Technology* 87, 305-314.
- Rudolf, A., Baudel, H., Zacchi, G., Hahn-Hägerdal, B., Lidén, G.,** 2007. "Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054." *Biotechnology and Bioengineering* 99, 783-790.
- Sánchez, O.J., Cardona, C.A.,** 2008. "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks." *Bioresource Technology* 99, 5270-5295.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K.,** 2012. "Bioethanol production from agricultural wastes: An overview." *Renewable Energy* 37, 19-27.
- Shatalov, A.A., Pereira, H.,** 2008. "*Arundo donax* L. reed: New perspectives for pulping and bleaching. 5. Ozone-based TCF bleaching of organosolv pulps." *Bioresource Technology* 99, 472-478.
- Shi, J., Chinn, M.S., Sharma-Shivappa, R.R.,** 2008. "Microbial Pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*." *Bioresource Technology* 99, 6556-6564.
- Sims, R., Taylor, M., Saddler, J., Mabee, W.E.,** 2008. "From 1st to 2nd generation biofuel technologies: An overview of current industry and RD&D activities." International Energy Agency.
- Singh, A., Pant, D., Korres, N.E., Nizami, A., Prasad, S., Murphy, J.D.,** 2010. "Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: Challenges and perspectives." *Bioresource Technology* 101, 5003-5012.
- Solomon, B.D., Barnes, J.R. y Halvorsen, K.E.,** 2007. "Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy." *Biomass and Bioenergy* 31, 416-425.
- Sousa, L.C., Chundawat, S.P.S., Balan, V., Dale, B. E.,** 2009. " 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocelullose pretreatment technologies." *Current Opinion in Biotechnology* 20, 339-347.
- Stenberg, K., Bollók, M., Réczey, K., Galbe, M., Zacchi, G.,** 2000. "Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steampretreated softwood for ethanol production." *Biotechnology and Bioengineering* 68, 205-210.
- Sun, Y., Cheng, J.,** 2002. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review." *Bioresource Technology* 83, 1-11.

**Sun, R.C., Tomkinson, J., Wang, Y.X., Xiao, B.,** 2000. "Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction." *Polymer* 41, 2647-2656.

**Sun, R.C. y Tomkinson, J.,** 2003. "Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pretreated wheat straw." *European Polymer Journal* 39, 751-759.

**Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I.,** 2010. "Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation." *Bioresource Technology* 101, 4744-4753.

**Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Olsson, L.,** 2008. "Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains." *Biotechnology and Bioengineering* 100, 1122-1131.

**Tomás-Pejó, E.,** 2009. Tesis Doctoral: "Bioetanol de paja de trigo: Estrategias de integración de las etapas del proceso." Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

**Varga, E., Klinke, H.B., Réczey, K., Thomsen, A.B.,** 2004. "High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol." *Biotechnology and Bioengineering* 88, 567-574.

**Vidal, P.F., Molinier, J.,** 1988. "Ozonolysis of lignin – Improvement of *in vitro* digestibility of poplar sawdust." *Biomass* 16, 1-17.

**Wang, S., Ingledew, W.M., Thomas, K.C., Sosulski, K., Sosulski, F.W.,** 1999a. "Optimization of fermentation temperature and mash specific gravity for fuel alcohol production." *Cereal Chemistry* 76, 82-86.

**Wyman, C.E.,** 1996. "Handbook on Bioethanol: Production and Utilization." Taylor & Francis, Washington.

**Yang, X., Zhang, S., Zuo, Z., Men, X., Tian, S.,** 2011. "Ethanol production from enzymatic hydrolysis of no-detoxified steam-exploded corn stalk." *Bioresource Technology* 102, 7840-7844.

**Zhan, X., Wang, D., Tuinstra, M.R., Bean, S., Seib, P.A., Sun, X.S.,** 2003. "Ethanol and lactic acid production as affected by sorghum genotype and location." *Industrial Crops and Products* 18, 245-255.

**Zhao, X., Cheng, K., Liu, D.,** 2009. "Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis." *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 815-827.

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVO**







El objetivo general del presente estudio es incrementar el rendimiento en la producción de etanol de segunda generación a partir de paja de trigo, mediante el empleo de la levadura *Pichia stipitis*, que es capaz de metabolizar tanto pentosas como hexosas y por tanto permite un mayor aprovechamiento de las fracciones celulosa y hemicelulosa presentes en el material lignocelulósico. Para alcanzar este objetivo global, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer un pretratamiento adecuado que permita alterar la estructura lignocelulósica del material para facilitar su posterior sacarificación. Se estudian dos pretratamientos diferentes: uno de tipo físico-químico como es la explosión de vapor y otro de tipo químico como es la ozonolisis. Además, se determinan los posibles compuestos tóxicos que pudieran generarse en dichos pretratamientos.
2. Estudiar la etapa de sacarificación mediante hidrólisis enzimática utilizando una mezcla compleja de celulasas y  $\beta$ -glucosidasas, para liberar de la materia lignocelulósica los sacáridos fermentables.
3. Optimizar el proceso de fermentación utilizando la levadura *Pichia stipitis* llevando a cabo ensayos que informen de su crecimiento y de su capacidad de utilización conjunta de los hexa y penta sacáridos para la generación de etanol. Se plantean ensayos de sacarificación y fermentación secuencial (SHF) o simultánea (SSF), que informen de la mejor estrategia operacional.
4. Analizar la influencia de los inhibidores generados durante los pretratamientos en el proceso de fermentación en cuanto a rendimiento y productividad de bioetanol. Se plantea el estudio analizando el efecto individual y conjunto que producen dichos inhibidores tanto en medios modelo con sustrato mixto (glucosa/xilosa) como en hidrolizados reales de paja pretratada.
5. Analizar la influencia de la microaireación y tamaño de inóculo en el proceso de fermentación (rendimiento, productividad y selectividad). Se plantea el estudio con hidrolizados reales tomando como referencia los resultados de la operación con medios modelo.



**CAPÍTULO III**

**MATERIALES Y MÉTODOS**





## **RESUMEN**

En este capítulo se describen los materiales, equipos y técnicas analíticas empleadas para la consecución de este trabajo. En primer lugar, se presenta la caracterización de la materia prima utilizada; a continuación, se hace referencia a la cepa de microorganismo, y de sus condiciones de mantenimiento, cultivo y preparación de inóculos. Se especifican también los equipos utilizados en el pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación de la paja de trigo. Por último, se exponen los métodos analíticos utilizados en la determinación de diferentes parámetros: caracterización de la materia prima, actividades enzimáticas, concentración de azúcares, ácidos, alcoholes y productos de degradación, densidad óptica y masa celular.



### **3.1. MATERIA PRIMA**

Como materia prima se utilizó paja de trigo que fue suministrada por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, así como de áreas agrícolas de la provincia de Valladolid. Se utilizó un tamaño de partícula entre 10 y 15mm, mediante un proceso de molienda y tamizado, posteriormente se mantuvo en una estufa a 45°C (J.P. SELECTA, INCUDIGIT) durante 48 horas para eliminar la humedad residual, almacenándose después a temperatura ambiente hasta su uso. La figura 3.1 muestra la paja de trigo preparada para el pretratamiento.



Figura 3.1. Paja de trigo molida.

### **3.2. PRETRATAMIENTO DE LA PAJA DE TRIGO**

Para la obtención de bioetanol de segunda generación es necesario un pretratamiento que haga que la estructura del material lignocelulósico sea accesible al ataque enzimático para conseguir la liberación de las cadenas de azúcares. En este trabajo se emplearon dos tipos de pretratamiento: explosión de vapor (EV) que combina un doble efecto físico-químico, y ozonólisis (OZ) con un efecto químico únicamente. Una vez alterada la estructura lignocelulósica, se llevó a cabo un proceso de sacarificación de la materia pretratada mediante la adición de enzimas comerciales.

#### **3.2.1. EXPLOSIÓN DE VAPOR**

Los ensayos de explosión de vapor se llevaron a cabo en un reactor de acero inoxidable diseñado por el grupo de investigación. Consiste en un depósito de 5L de capacidad recubierto con material aislante. El equipo dispone de una tapa en la parte superior donde se encuentra situada una válvula de alivio de presión y un manómetro. La materia prima se introduce en el reactor y se cierra la tapa mediante seis tornillos que sirven de anclaje con el depósito. En la parte lateral del depósito se encuentra situado un termopar para la medida de temperatura y en la parte inferior se sitúa una válvula automática de apertura rápida que permite la salida del material pretratado y su descompresión súbita. La salida del material pretratado está conectada a un depósito de acero inoxidable mediante una manguera de acero flexible, y a su vez, dicho depósito lleva conectada una manguera de goma para la recogida del material en el exterior.

El sistema dispone de un controlador de tiempo que actúa sobre la válvula y acciona su apertura tras el tiempo de residencia deseado. Por otra parte, existe un controlador de temperatura que permite que el contador de tiempo se ponga en marcha después de alcanzar las condiciones deseadas. Todos los controladores y sondas se encuentran conectados a un panel de control que permite fijar y leer las variables de proceso. El dispositivo dispone de ruedas y una manguera flexible de acero inoxidable que hacen posible conectarlo a una caldera para la producción de vapor a alta presión. La



figura 3.2a-b muestra un esquema e imagen del equipo y en la figura 3.3 se puede observar el aspecto de la paja de trigo después del pretratamiento.

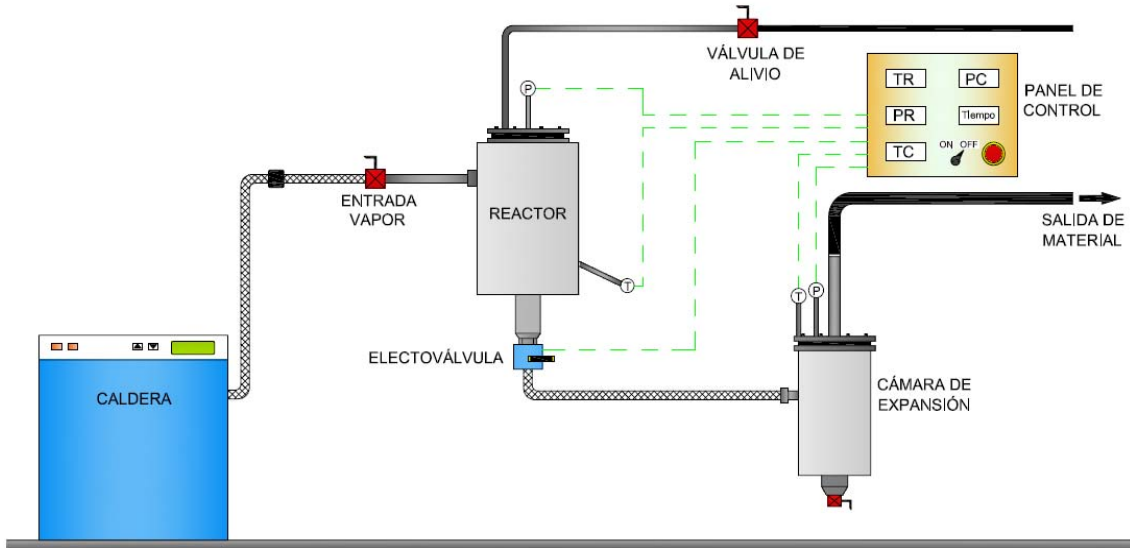


Figura 3.2a. Esquema del equipo de explosión de vapor.



Figura 3.2b. Equipo de EV.



Figura 3.3. Paja de trigo después del pretratamiento de EV.

### 3.2.2. PRETRATAMIENTO CON OZONO

La ozonolisis se llevó a cabo en un dispositivo compuesto por varios elementos: (a) un ozonizador (SANDER 301) , donde se genera ozono a partir de aire a temperatura ambiente, dotado de refrigeración mediante agua, un controlador de potencia eléctrica,

que permite ajustar la cantidad de ozono producida y un controlador de flujo de la corriente de salida; (b) una botella de aire a presión conectada mediante tubo de goma al ozonizador; (c) una columna de vidrio conectada a la entrada de la corriente de ozono y unos depósitos con disolución de yoduro potásico (20 g/L) para la medida de ozono a la entrada, salida y destrucción de ozono no reaccionado. La columna de vidrio (AFORA), cuyas dimensiones son 50cm. de altura y 2,7cm. de diámetro, se rellena con paja de trigo formando un lecho fijo a través del cual la corriente de ozono entra por la parte inferior y sale por la parte superior. La figura 3.4a-b muestra un esquema e imagen del equipo y en la figura 3.5 se puede observar el aspecto de la paja de trigo después del pretratamiento.

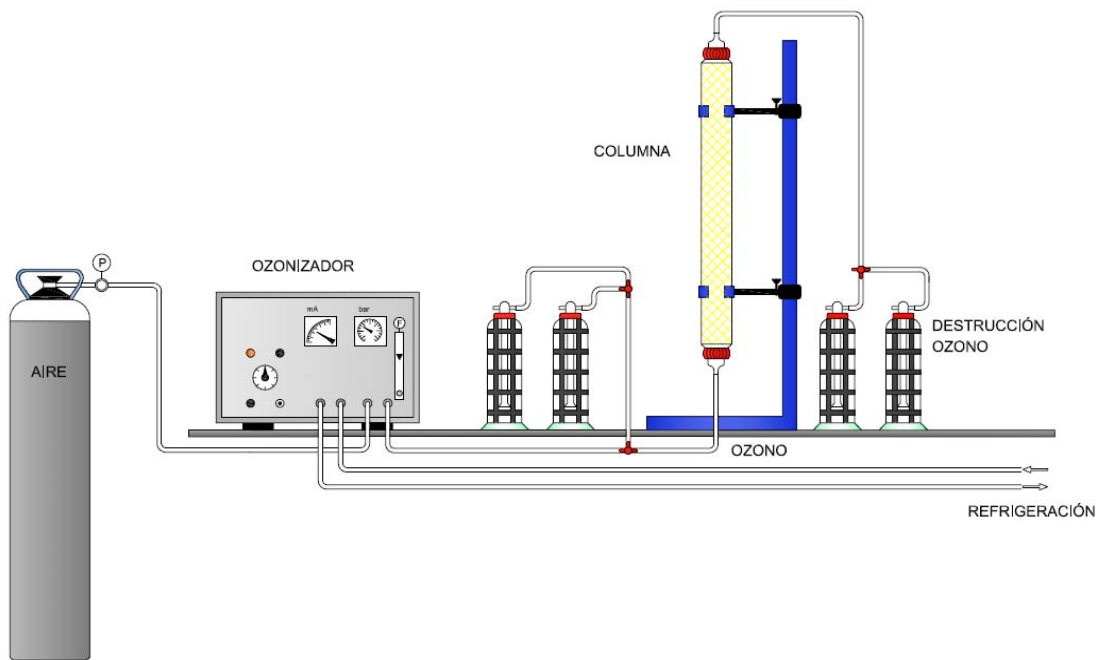


Figura 3.4a. Esquema del equipo de ozonolisis.



Figura 3.4b. Equipo de OZ.



Figura 3.5. Paja de trigo después de OZ.

### 3.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática de la paja de trigo pretratada bien por EV o por OZ se llevó a cabo en reactores de tanque agitado de vidrio de 250mL de capacidad (AFORA). El sistema se encuentra encamisado y conectado a un baño de agua termostatado (J.P. SELECTA, ULTRATERM) que permite el mantenimiento de la temperatura de operación. En la tapa superior se disponen de una serie de puertos que permiten la inserción de puntual o permanente de sondas de pH (CRISON, Basic 20) y toma de muestras, así como una varilla de palas conectada mediante un cierre hidráulico a un agitador mecánico regulable (HEIDOLPH, RZR 2020). La figura 3.6a-b muestra un esquema e imagen del montaje del equipo para hidrólisis enzimática.

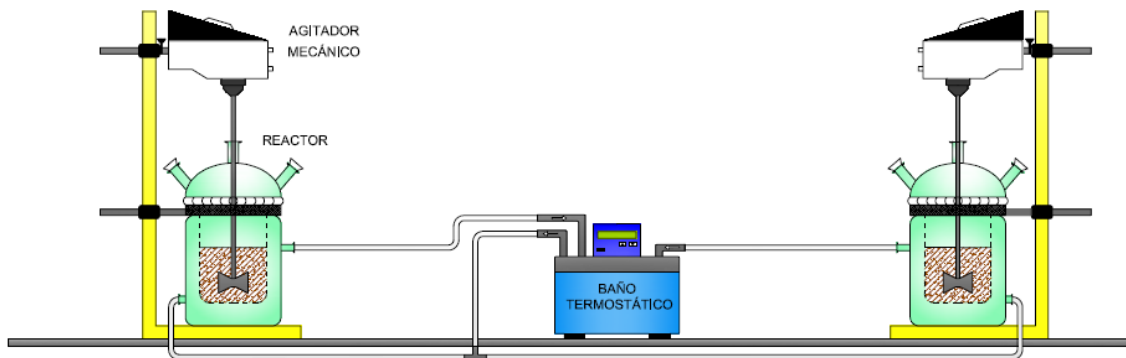


Figura 3.6a. Esquema del dispositivo de hidrólisis enzimática.



Figura 3.6b. Equipo de hidrólisis enzimática.

### **3.4. FERMENTACIÓN**

#### **3.4.1. *Pichia stipitis*: MANTENIMIENTO Y CULTIVO**

El microorganismo utilizado en los procesos de fermentación fue *Pichia stipitis* DSM 3651, adquirido en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos. El mantenimiento a corto plazo se realizó en placas Petri a una temperatura de 4°C con el siguiente medio: 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 la conservación de la cepa a largo plazo se mantuvo en glicerol (40%) a una temperatura de -85°C.

El medio de cultivo para el crecimiento de inóculos se compuso de 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de peptona de soja esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 120°C de temperatura, mientras que la xilosa (20 g/L) se añadió al medio posteriormente utilizando filtros estériles (Ministart SARTORIUS, 0,20µm Sterile Filtres). El microorganismo se transfirió desde la placa de mantenimiento al medio de cultivo y se incubó aeróbicamente durante 24 horas a 175 revoluciones por minuto y 30°C en un agitador rotatorio (COMECTA). Todas las operaciones de trasvase de microorganismo se realizaron en cámara de flujo laminar (FOSTER WHEELER, STERIL, BioBan 48)

#### **Formación de pseudomicelios**

Durante el proceso de fermentación se observaron cambios en la morfología del microorganismo *Pichia stipitis*. Las células de la cepa original DSM 3651 presentaron una forma redondeada típica de las levaduras. Sin embargo, al cabo de varios trasvases, se observó un cambio en la morfología del microorganismo ya que las células se habían transformado en pseudomicelios. La figura 3.7 muestra las imágenes tomadas en el microscopio (LEICA DM 400B) de ambos tipos de células.

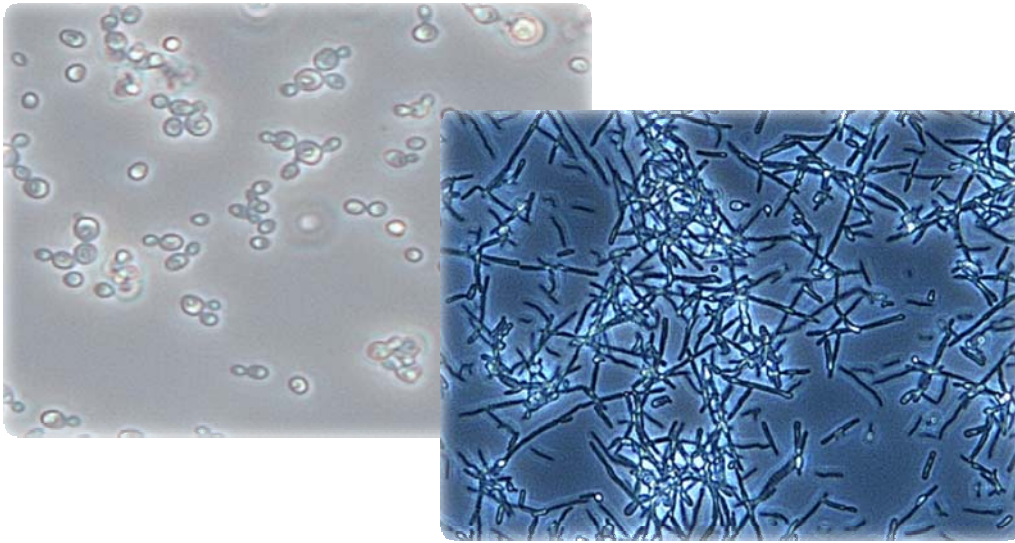


Figura 3.7. Comparación entre ambas morfologías de la levadura *P. stipitis*: Células redondeadas (izq., 20x) y células formando pseudomicelios (dcha., 10x).

La formación de estos microflóculos se puede explicar por varios mecanismos como una incompleta división de las células, lo que pudo causar grupos de células ramificadas o por interacciones entre las paredes de las células (Grootjen *et al.*, 1991). La limitación de la fuente de carbono favorece la aparición de pseudomicelios en el microorganismo *Pichia stipitis* reproduciéndose en microflóculos cuando se añade medio con nuevos nutrientes (Jeffries *et al.*, 2007; Grootjen *et al.*, 1991). El cambio de morfología pudo tener lugar cuando el trasvase entre placas se realizó tomando cepa al final de la fase estacionaria de crecimiento, momento en el cual no existe fuente de carbono disponible. El uso de esta variante puede tener beneficios en su uso en reactores continuos, ya que al aumentar la concentración de la biomasa, puede aumentar la velocidad de consumo de azúcares, y por tanto aumentar la productividad de formación de etanol.

### 3.4.2. DISPOSITIVOS DE FERMENTACIÓN

#### Recipientes de vidrio encapsulados (penicilin flasks)

Una parte de los ensayos de fermentación se llevó a cabo en recipientes de vidrio encapsulados de 125mL de capacidad (penicilin flasks) provistos con una aguja para la

eliminación del dióxido de carbono generado en el proceso. En cada uno de los recipientes se introdujeron 25mL de medio de fermentación inoculados al 10% (v/v). Los recipientes se introdujeron en incubadores orbitales (COMECTA) provistos de control de temperatura y agitación automático. Todos los recipientes fueron previamente esterilizados en autoclave (J.P. SELECTA, AUTESTER). La figura 3.8 muestra una imagen del dispositivo.



Figura 3.8. Recipientes de vidrio encapsulados provistos de aguja en agitador orbital.

### Reactor de vidrio

Otros ensayos de fermentación fueron llevados a cabo en reactores de vidrio encamisados de 250mL de capacidad (AFORA). Consiste en un dispositivo similar al empleado en la hidrólisis enzimática y dependiendo del caso, se acoplaron difusores de aire y sondas para la medida de oxígeno disuelto (HAMILTON, OXYFERM FDA 225). La figura 3.9 muestra un esquema con los difusores y la sonda de oxígeno acoplada al montaje 3.6.

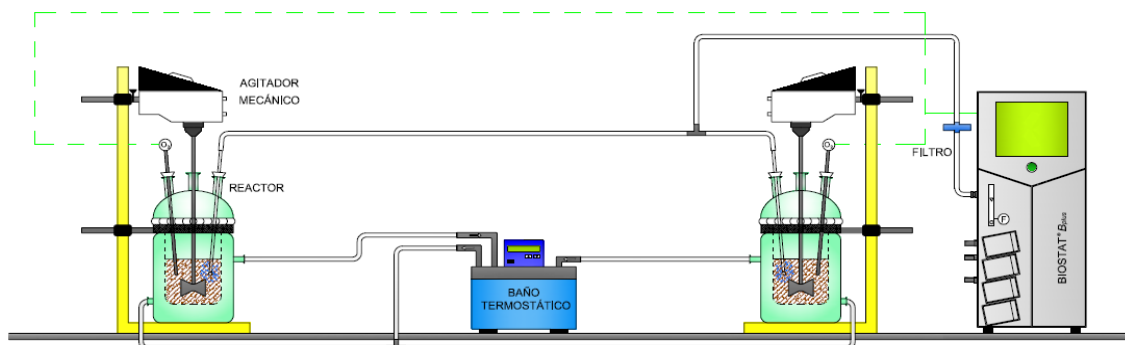


Figura 3.9. Esquema del dispositivo de fermentación de hidrolizados con difusores y medidores de oxígeno disuelto.

### Reactor BIOSTAT BPlus-2L

El reactor BIOSTAT BPlus-2L es un reactor de la casa comercial SARTORIUS de 2L de volumen útil. En la tapa superior del reactor se disponen una serie de puertos que permiten la inserción de un termopar, de sondas de pH (HAMILTON, Easyferm plus k8 200), nivel y oxígeno (HAMILTON, OXYFERM FDA 225), una toma de muestras, un condensador, una inyección de gases y un tapón con varios orificios para adicionar ácido, base y antiespumante. La tapa lleva acoplado también un agitador de palas y un difusor para la dispersión de gases.

Es un reactor totalmente automatizado que permite el control de temperatura, mediante un encamisado utilizando agua como agente de termostatación; de pH y espumas, mediante bombas peristálticas que controlan la adición de disoluciones de ácido y base y antiespumante, respectivamente; de agitación, mediante un agitador mecánico; de oxígeno disuelto en el medio, mediante la inyección de aire o nitrógeno; de nivel, mediante una bombas peristálticas que permiten la entrada y salida de medio. El control de parámetros, la calibración y otras tareas se realizan mediante un panel táctil. La figura 3.10 muestra una imagen tomada del reactor.



Figura 3.10. Reactor BIOSTAT Bplus-2L.

**3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS**

Caracterización de la paja de trigo

La caracterización de la paja de trigo se realizó siguiendo los métodos del National Renewable Energy Laboratory (NREL, U.S. Department of Energy, LAP-002, LAP-003, LAP-004, LAP-017, LAP-019) para determinación de sólidos totales, extractivos, carbohidratos estructurales, lignina y cenizas en la biomasa lignocelulósica. La figura 3.11 muestra el esquema del proceso de caracterización de la paja de trigo y la tabla 3.1 muestra el resultado de dicha caracterización.

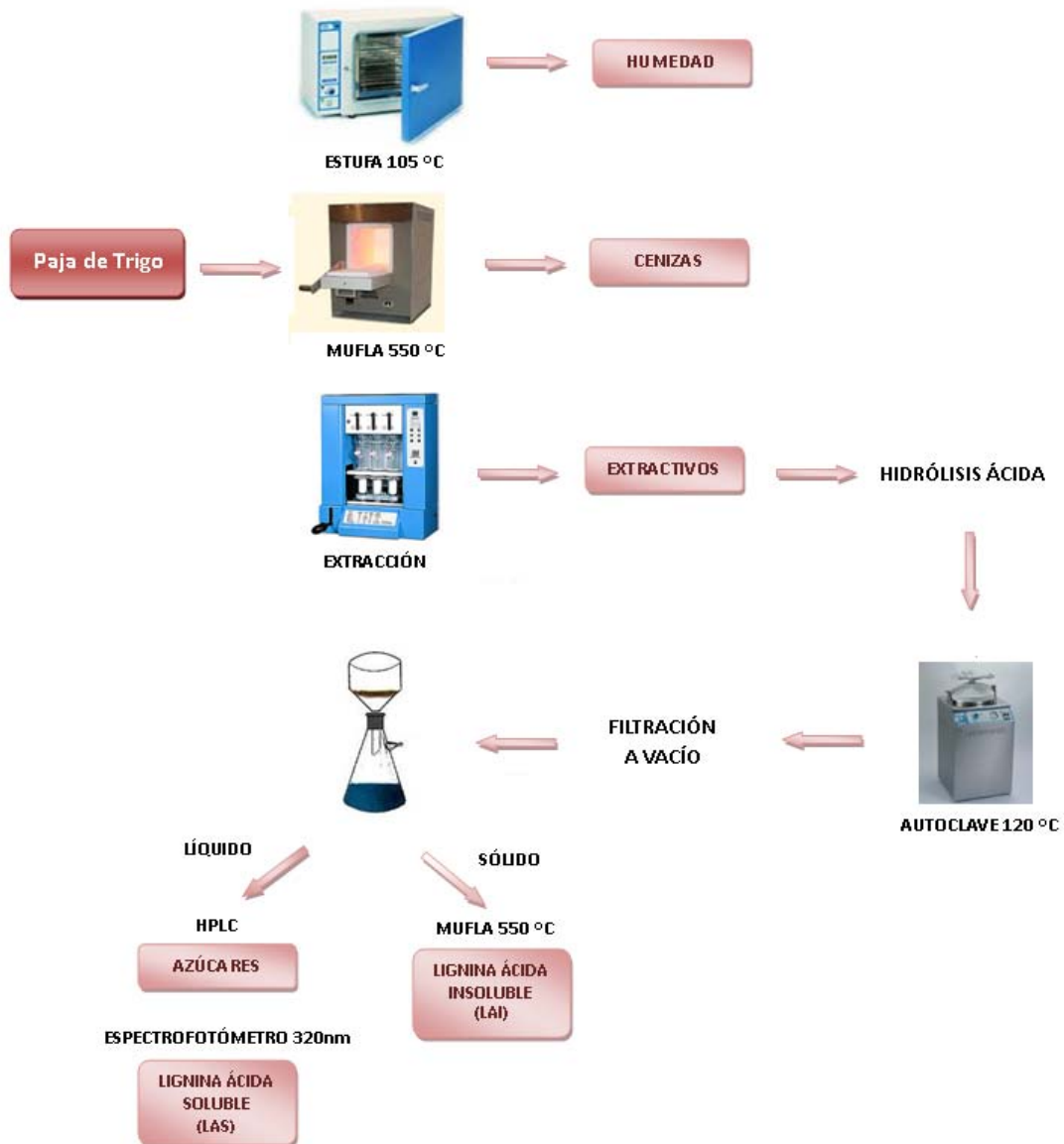


Figura 3.11. Esquema del proceso de caracterización de la paja de trigo.



Compuesto	Materia Prima
Celulosa (Glucosa)	33,8 ± 1,7
Hemicelulosa (Xilosa)	20,6 ± 0,9
Lignina Ácida Insoluble (LAI)	17,3 ± 2,5
Lignina Ácida Soluble (LAS)	3,5 ± 0,4
Cenizas	7,0 ± 1,2
Humedad	6,5 ± 0,3

Tabla 3.1. Caracterización de la materia prima

### Medida de la cantidad de ozono

Las mediciones de ozono a la entrada, a la salida y el ozono no reaccionado se realizaron mediante el método yodométrico (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1995) para el cálculo del consumo de ozono durante el proceso.

### Determinación de actividades enzimáticas (celulasa y $\beta$ -glucosidasa)

La determinación de la actividad enzimática de la celulasa comercial Novozym NS50013 (Novozymes) se realizó siguiendo el método del National Renewable Energy Laboratory (NREL, U.S. Department of Energy, LAP-006) que permite calcular la actividad en FPU/mL. La determinación de la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa comercial Novozym NS50010 (Novozymes) se realizó mediante un kit comercial (Glucosa (GO) Assay Kit, SIGMA) que permite calcular la actividad en CBU/mL.

### Determinación de la concentración de azúcares, ácidos, alcoholes y productos de degradación

Las concentraciones de glucosa, xilosa, etanol, xilitol, ácido acético, ácido oxálico, furfural e hydroxymethylfurfural se determinaron mediante un cromatógrafo de líquidos (WATERS HPLC) dotado de un detector con medida del índice de refracción y una columna Aminex HPX-87H. Se utilizó una disolución de ácido sulfúrico 0.01N como fase móvil con un flujo de 0.6L/min, 60°C de temperatura en la columna, 35°C de temperatura en el detector y 6°C de temperatura en el inyector. Todas las muestras se centrifugaron a

5000 revoluciones por minuto (EPPENDORF, MiniSpin) durante 5 minutos y se filtraron (SARTORIUS, 0,20  $\mu\text{m}$ ) antes de ser analizadas.

#### Determinación de la concentración celular

##### a) Densidad óptica

La concentración de células se determinó midiendo la densidad óptica en un refractómetro (HITACHI, U-2000) a una longitud de onda de 600nm y correlacionando los valores en una curva de peso seco de las células frente a absorbancia mediante una ecuación del tipo  $C_{\text{biomasa}} \text{ (g/L)} = 0,346 \cdot \text{Absorbancia}$  (Anexo II).

##### b) Masa seca de los microorganismos

La masa seca de los microorganismos se obtuvo secando un volumen de muestra de 40mL en una estufa a 105 °C (J.P. SELECTA, 381) hasta pesada constante, previamente centrifugado (KUBOTA 5100) para separar el microorganismo del medio de cultivo.

#### Observación microscópica de cultivos

Se empleó un microscopio (LEICA DM 400B) con lámpara halógena y de mercurio y provisto de cuatro lentes (5x, 10x, 20x y 100x). Para la obtención de fotografías se utilizó una cámara (LEICA) acoplada al microscopio y software para el análisis de las imágenes (LEICA APPLICATION SUITE).

### **3.6. REFERENCIAS**

**Grootjen, D.R.J., Vleesenbeek, R., Windmeijer, M.G.A., van der Lans, R.G.J.M., Luyben, K.Ch.A.M., 1991.** "A flocculating strain of *Pichia stipitis* for the conversion of glucose/xylose mixtures." *Enzyme and Microbiology Technology* 13, 735-739.

**Jeffries, T., Grigoriev, I., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.S., Passoth, V., Richardson, P.M., 2007.** "Genome sequence of the lignocellulosic-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*." *Nature Biotechnology* 25, 319-326.

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

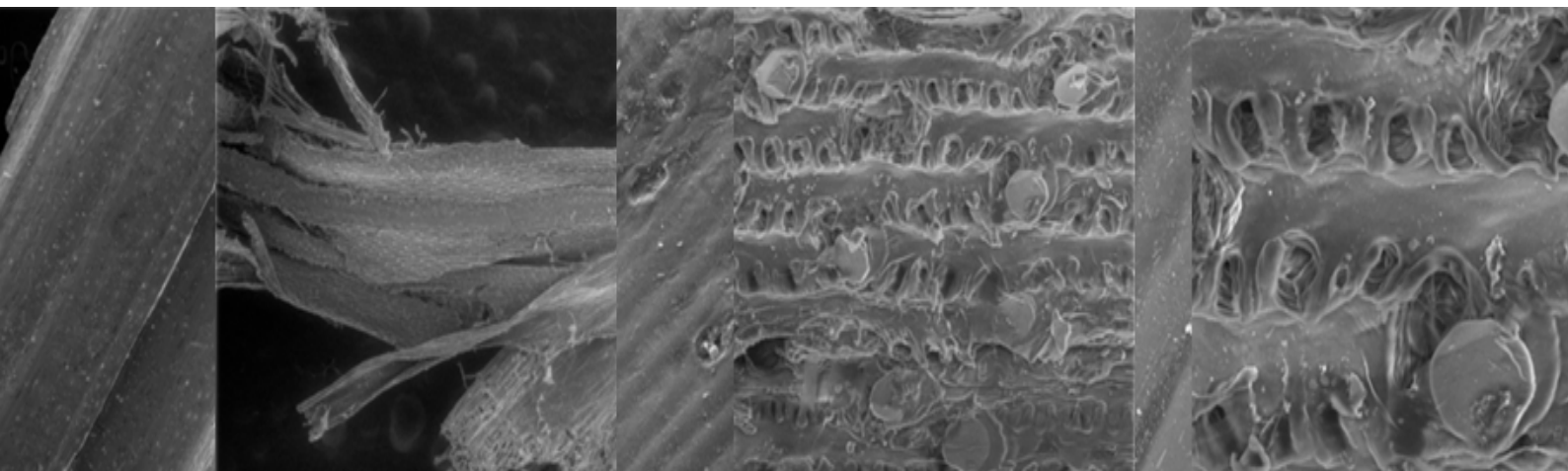


## CAPÍTULO IV

### PRETRATAMIENTO E HIDRÓLISIS

### ENZIMÁTICA DE LA MATERIA PRIMA:

COMPARACIÓN DEL PROCESO A PARTIR DE PAJA  
SOMETIDA A EXPLOSIÓN DE VAPOR Y OZONOLISIS





## **RESUMEN**

En este capítulo se presentan los resultados más significativos del estudio comparativo de las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática de paja trigo, analizando el efecto producido por los pretratamientos de explosión de vapor y ozonólisis en la estructura del material lignocelulósico, adoptando diferentes estrategias de operación en la etapa de sacarificación por vía enzimática. Se han determinado los rendimientos globales de liberación de azúcares para cada alternativa de pretratamiento y se ha realizado un estudio comparativo, dependiendo de la fase empleada, en la etapa de hidrólisis enzimática.

Una parte de los resultados expuestos en este capítulo han sido publicados en el siguiente artículo incluido en el Anexo I de la presente memoria:

**Bellido C., Bolado, S., Coca, M., Lucas, S., González-Benito, G., García-Cubero, M.T., 2011.** Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology* 102, 10868-10874.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.128>





#### **4.1. INTRODUCCIÓN**

El pretratamiento es una etapa crucial en la obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica ya que mejora notablemente el acceso de las enzimas a las cadenas de celulosa y/o hemicelulosa. Su principal objetivo es debilitar la estructura lignocelulósica de manera que, por una parte, la lignina y la hemicelulosa se disgreguen, y por otra, que las características estructurales de la celulosa se alteren reduciendo su cristalinidad o grado de polimerización (Cuervo *et al.*, 2009, Wyman *et al.*, 2005). Como ya se ha comentado con anterioridad, en este trabajo se han empleado dos tipos de pretratamiento para provocar dichos efectos en la paja de trigo: explosión de vapor (EV), que combina un efecto químico o autohidrólisis con un efecto mecánico y ozonólisis (OZ), que es un pretratamiento meramente químico.

Una vez realizado el pretratamiento de la paja de trigo, se ha utilizado un cocktail enzimático comercial compuesto por celulasas y  $\beta$ -glucosidasas para obtener azúcares fermentables. Diversos autores sugieren que el uso de hemicelulasas favorecen la hidrólisis de la celulosa aumentando la accesibilidad de las enzimas celulolíticas (Berlin *et al.*, 2005, Tomás-Pejó, 2009); sin embargo, no se han utilizado en este caso ya que estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación añadiendo xilanasas al cocktail enzimático no ofrecieron una mejora significativa en las concentraciones de glucosa y xilosa en los hidrolizados de paja de trigo pretratada con EV (García-Cubero *et al.*, 2010), por lo que no fueron empleados en el presente trabajo. Por tanto, es evidente la necesidad de alcanzar un compromiso entre las cantidades de enzima utilizada y el rendimiento de hidrólisis enzimática debido a que esta etapa supone una parte significativa del coste total del proceso.

En este capítulo se hace referencia al rendimiento global de recuperación de azúcares, que ha sido definido de la siguiente manera:

$$RGG/RGX = \frac{\text{glucosa/xlosaliberada(g/100gMS)}}{\text{glucosa/xloapresenteenlapajade trigo(g/100gMS)}} \cdot 100 \text{ (ec. 4.1)}$$

Con el objetivo de aumentar la eficiencia en la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es necesario tener en cuenta distintas configuraciones posibles del proceso. Se pretende alcanzar altas concentraciones de azúcares en un medio apropiado, de manera que puedan ser fermentados por el microorganismo seleccionado junto con la menor pérdida posible de material lignocelulósico y agua durante el proceso, con el propósito de reducir costes totales. La experimentación llevada a cabo en este capítulo se esquematiza a continuación:

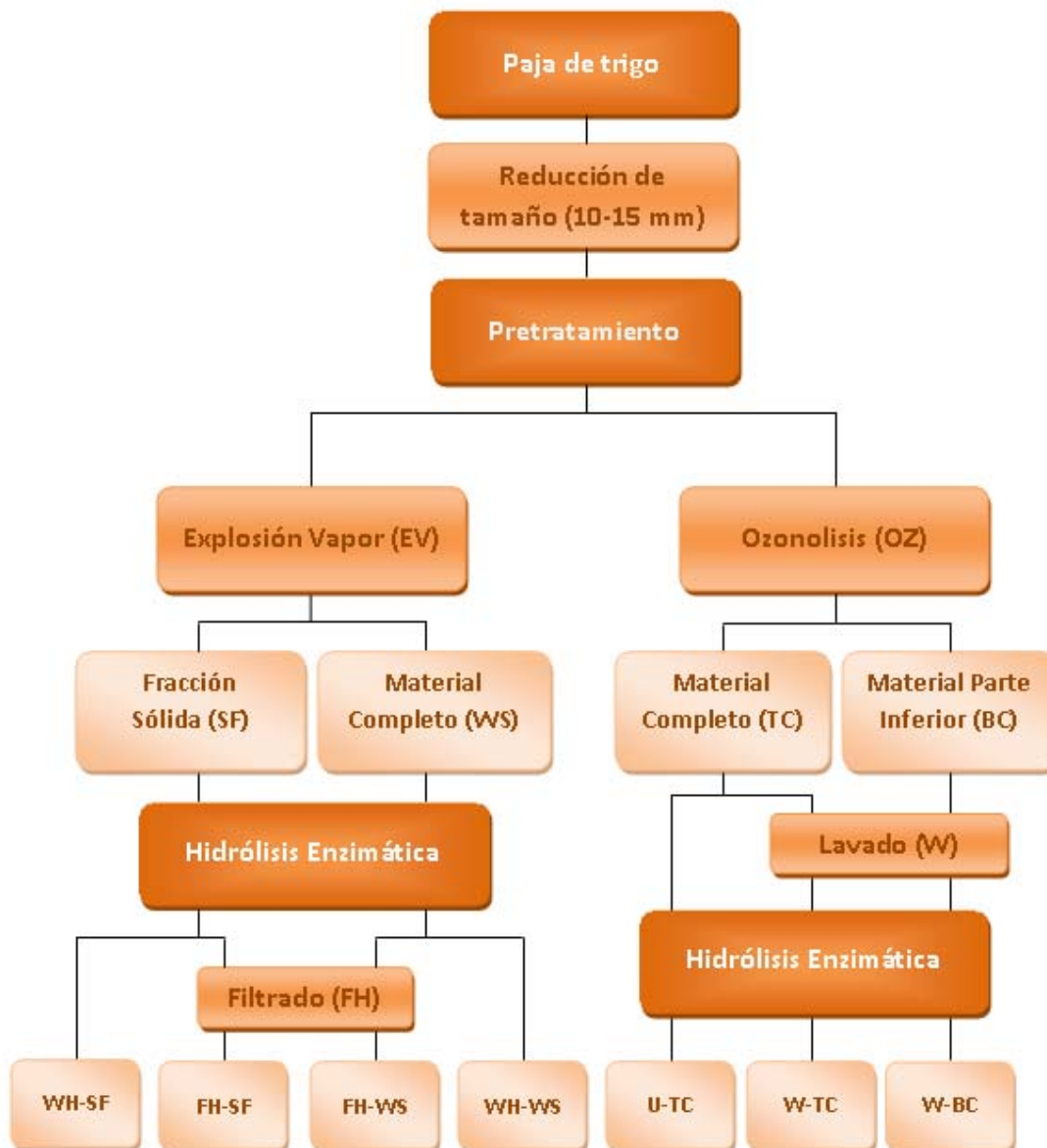


Figura 4.1. Esquema de la experimentación llevada a cabo para el pretratamiento e hidrólisis enzimática de paja de trigo.

La paja de trigo se sometió en primer lugar a un proceso de molienda y tamizado hasta obtener una materia prima de 10-15mm aproximadamente. Después se llevaron a cabo dos pretratamientos, explosión de vapor (EV) y ozonolisis (OZ).

En el caso de la EV, después del pretratamiento se obtuvieron dos fases: una fracción sólida (SF) rica en celulosa y lignina y una fracción líquida en la que predominaron azúcares hemicelulósicos, principalmente xilosa, y compuestos potencialmente tóxicos, principalmente ácido acético, furfural y HMF. Por tanto, en las siguientes etapas se trabajó únicamente con la fracción sólida (SF), evitando problemas de inhibición, o con todo el material (WS) para aprovechar los azúcares hemicelulósicos y la fase acuosa a expensas de la presencia de compuestos inhibitorios. Después de la hidrólisis enzimática (WH), dependiendo del caso, se realizó una etapa de filtrado (FH), de tal forma que se obtuvieron cuatro grupos de ensayo que se sometieron a la etapa de fermentación posterior. Los experimentos del grupo WH-SF (whole hydrolysate – solid fraction) se corresponden con los hidrolizados de la fase sólida de la explosión de vapor y de todo el material de la sacarificación. Los experimentos del grupo FH-SF (filtered hydrolysate – solid fraction) se corresponden con los hidrolizados de la fase sólida de la explosión de vapor y la fase líquida de la hidrólisis enzimática. Los experimentos del grupo WH-WS (whole hydrolysate – whole slurry) se corresponden con los hidrolizados de la fase sólida junto con la fase líquida procedente de la explosión de vapor y todo el material de la hidrólisis enzimática. Los experimentos del grupo FH-WS (filtered hydrolysate – whole slurry) se corresponden con los hidrolizados de fase sólida junto con la fase líquida de la explosión de vapor y la fase líquida de la hidrólisis enzimática.

En el caso de la OZ, el pretratamiento sólo generó una fase sólida lo que supuso una ventaja inicial en cuanto a pérdida de materia sólida, aunque debido a la configuración del reactor que se ha usado en el presente estudio (lecho fijo), se analizó la posibilidad de utilizar todo el material pretratado (TC) o únicamente el procedente de la mitad inferior del reactor (BC), ya que había sido sometido a una mayor incidencia de ozono y, por tanto, presentaba mayor digestibilidad. Se realizó una etapa de lavado con agua anterior al proceso de hidrólisis enzimática de la paja procedente de toda la columna de pretratamiento así como de la zona inferior. Por tanto, se obtuvieron tres

grupos de ensayo que también fueron estudiados en la etapa de fermentación posterior. Los experimentos del grupo U-TC (Unwashed straw – total column) se corresponden con los hidrolizados de todo el material procedente de la hidrólisis enzimática utilizando paja de trigo sin lavar de toda la columna del pretratamiento de OZ. Los experimentos del grupo W-TC (washed straw – total column) se corresponden con los hidrolizados de todo el material de la hidrólisis enzimática utilizando paja de trigo lavada de toda la columna. Los experimentos del grupo W-BC (washed straw – bottom column) se corresponden con los hidrolizados de todo el material de la hidrólisis enzimática utilizando paja de trigo lavada de la parte inferior de la columna. En este caso todos los ensayos de fermentación fueron llevados a cabo con todo el hidrolizado procedente de la etapa de sacarificación.

## **4.2. METODOLOGÍA**

### **4.2.1. CONDICIONES DE OPERACIÓN**

Los dispositivos experimentales utilizados tanto en el pretratamiento con explosión de vapor y ozono como en la etapa de hidrólisis enzimática han sido descritos en el Capítulo III de la presente memoria. En este apartado, se detallan las condiciones de operación utilizadas en los diferentes ensayos realizados para ambos pretratamientos y la hidrólisis enzimática.

#### **Explosión de vapor**

Las variables de operación de este pretratamiento fueron temperatura, tiempo de residencia y tamaño de partícula, cuya optimización fue llevada a cabo en trabajos previos realizados por el grupo de investigación (García-Cubero *et al.*, 2008). Para este estudio, se utilizó un tamaño de partícula de 10-15mm, se trabajó a 210°C con un tiempo de reacción de 10 minutos.

Se operó por cargas introduciendo 50g de paja de trigo seco en cada una. Después del pretratamiento, la fase sólida se separó de la fase líquida mediante filtración a vacío y se mantuvo a 45°C, conservando la fase líquida en frigorífico hasta su uso.

#### **Ozonolisis**

Los ensayos fueron realizados en las siguientes condiciones: 40% humedad en la paja de trigo, 2 horas de tiempo de reacción y 60 L/h de flujo de gas con una concentración del 2,7% (v/v) en ozono, lo que supuso un consumo aproximado de 0,12 - 0,13g ozono/g de materia seca (MS). Estas condiciones fueron optimizadas para el pretratamiento de paja de trigo con ozono en estudios anteriores realizados por el grupo (García-Cubero *et al.*, 2009).

Se operó por cargas de 45-50g de material lignocelulósico formando un lecho fijo en la columna. Después del pretratamiento, la paja de trigo se lavó con agua (0,1 L/g MS) y se mantuvo a 45°C hasta su uso.

#### Hidrólisis enzimática

Las condiciones experimentales fueron las siguientes: 175 revoluciones por minuto mediante agitación mecánica, temperatura de 50°C, pH ajustado a 5 mediante disoluciones de NaOH y HCl 2M y 72 horas de tiempo de reacción. La operación se realizó por cargas añadiendo 20g de paja de trigo pretratada ajustando la cantidad de sólido al 10% MS (% w/v) bien con agua destilada o con el líquido del pretratamiento dependiendo del caso. Se utilizó un cocktail de enzimas comerciales proporcionadas por Novozymes (Dinamarca), mezcla de celulasa Novozym NS50013 y  $\beta$ -glucosidasa Novozym NS50010. En todos los ensayos se añadieron 0,11g celulasa/g celulosa y 0,05g  $\beta$ -glucosidasa/g celulosa en la materia prima, lo que supone una carga de 16 FPU/g MS y 11 CBU/g MS, respectivamente.

### **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.3.1. EFECTO DE LOS PRETRATAMIENTOS DE EXPLOSIÓN DE VAPOR Y OZONOLISIS SOBRE LA PAJA DE TRIGO**

Como ya se ha comentado con anterioridad, para que un pretratamiento sea eficaz, debe redistribuir o solubilizar la lignina y evitar la degradación o pérdida de carbohidratos. Por tanto, las condiciones de los pretratamientos deben optimizarse de tal forma que se establezca un balance entre la mejora del rendimiento de hidrólisis enzimática y la degradación de la fracción celulósica y hemicelulósica.

##### Explosión de Vapor

En la fase sólida obtenida después del pretratamiento con EV se produjo un aumento en el porcentaje de lignina y celulosa debido a la solubilización parcial de la fracción hemicelulósica con respecto a la materia prima. En la tabla 4.1 se muestra la caracterización de la fracción sólida obtenida en la EV junto con la materia prima (% materia seca).

Compuesto	Materia Prima	Paja Pretratada EV
Celulosa (Glucosa)	33,8 ± 1,7	47,1 ± 2,0
Hemicelulosa (Xilosa)	20,6 ± 0,9	12,7 ± 0,7
Lignina Ácida Insoluble (LAI)	17,3 ± 2,5	33,2 ± 3,4
Lignina Ácida Soluble (LAS)	3,5 ± 0,4	1,3 ± 0,3
Cenizas	7,0 ± 1,2	3,9 ± 0,8
Humedad	6,5 ± 0,3	--

Tabla 4.1. Caracterización de la materia prima y la fracción sólida de la EV.

En cuanto a la composición de la paja de trigo pretratada por EV, se observaron variaciones en el contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina con respecto a la materia prima. Se produjo un aumento en el porcentaje de la fracción celulósica y de la lignina con respecto a la materia prima, de 33,8% a 47,1% y de 20,8% a 34,5%, respectivamente. El contenido en hemicelulosa disminuyó hasta un 12,7% debido a la solubilización provocada por el efecto físico-químico del pretratamiento. Comparando estos resultados con otros estudios en los que se emplearon tamaños de partícula y tiempos de residencia

inferiores, se produjo una menor solubilización de la fracción hemicelulósica, ya que la recuperación de xilanos en la fracción sólida del pretratamiento se ve favorecida por la utilización de tamaños de partícula más elevados como es este caso (Ballesteros *et al.*, 2006; Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008).

En la tabla 4.2 se pueden apreciar las concentraciones medias de glucosa, xilosa, ácido acético, furfural y HMF que aparecieron en la fase líquida del pretratamiento por EV llevado a cabo en este estudio. Dependiendo de la estrategia de operación de hidrólisis enzimática y fermentación, en los apartados posteriores se expondrán los resultados obtenidos al añadir dicha fase a la etapa de fermentación.

Compuesto	C (g/L)	C (g/100 g MS)
Glucosa	0,47 ± 0,12	0,88
Xilosa	1,83 ± 0,28	3,45
Ácido acético	0,70 ± 0,09	1,32
Furfural	0,08 ± 0,02	0,15
HMF	0,03 ± 0,01	0,06

Tabla 4.2. Caracterización de la fase líquida de la EV.

### Ozonolisis

En la fase sólida obtenida después del pretratamiento con ozono se produjo una degradación y/o solubilización parcial de la lignina con respecto a la materia prima, de tal forma que el porcentaje de lignina ácida insoluble disminuyó y aumentó el contenido en lignina ácida soluble permaneciendo el porcentaje de lignina ácida total esencialmente constante (García-Cubero *et al.*, 2010). En la tabla 4.3 se muestran la caracterización de la fracción sólida obtenida en la OZ junto con la materia prima (% materia seca).



Compuesto	Materia Prima	Paja Pretratada OZ (TC)	Paja Pretratada OZ (BC)
Celulosa (Glucosa)	33,8 ± 1,7	39,6 ± 2,1	40,5 ± 1,8
Hemicelulosa (Xilosa)	20,6 ± 0,9	22,5 ± 0,9	22,9 ± 1,0
Lignina Ácida Insoluble (LAI)	17,3 ± 2,5	12,6 ± 2,3	11,3 ± 1,9
Lignina Ácida Soluble (LAS)	3,5 ± 0,4	7,4 ± 0,5	8,9 ± 0,6
Cenizas	7,0 ± 1,2	5,9 ± 0,6	6,2 ± 0,7
Humedad	6,5 ± 0,3	-	-

Tabla 4.3. Caracterización de la materia prima y la fracción sólida de la OZ.  
(Columna completa y parte inferior)

Del mismo modo que en el caso anterior, se observaron variaciones en el contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina con respecto a la materia prima. En los experimentos posteriores de hidrólisis y fermentación de paja de trigo se trabajó con paja ozonizada procedente de toda la columna o únicamente de la parte inferior. Por tanto, se realizaron sendas caracterizaciones para observar el efecto producido por el ozono en la parte inferior (BC), donde la severidad del pretratamiento es mayor, y en el conjunto de toda la columna (TC). De manera general, el pretratamiento con ozono provocó una disminución del porcentaje de lignina ácida insoluble de 17,3% a 12,6% con respecto a la materia prima sin tratar. El porcentaje de lignina ácida soluble aumentó de 3,5% a 7,4%, por lo que, efectivamente, se produjo una solubilización de la lignina. La concentración de la fracción celulósica y hemicelulósica aumentó ligeramente un 5,8 % y un 1,9 %, respectivamente.

En este caso, después del pretratamiento sólo se obtuvo una fase sólida, no obstante, se realizó un proceso de lavado con agua fría (0,1 L agua/g MS) para eliminar el exceso de compuestos inhibidores. En la tabla 4.4 se pueden apreciar las concentraciones medias de glucosa, xilosa, ácido acético y ácido oxálico que aparecieron en el agua de lavado de la paja pretratada procedente de toda la columna. En este caso, no se detectó presencia de furfural y HMF.

Compuesto	C (g/L)	C (g/100 g MS)
Glucosa	0,07 ± 0,02	0,69
Xilosa	0,15 ± 0,05	1,51
Ácido oxálico	0,18 ± 0,04	1,80
Ácido acético	0,02 ± 0,01	0,19

Tabla 4.4. Caracterización del agua de lavado de paja de trigo sometida a OZ

El pretratamiento con ozono tuvo una mayor incidencia sobre la paja situada en la zona inferior de la columna, por lo que se observaron diferencias en cuanto a su composición con respecto a la media de todo el material pretratado. En otros estudios llevados a cabo por el grupo de investigación (García-Cubero *et al.*, 2012), la columna se dividió en cuatro partes para analizar la evolución de la variación del porcentaje de lignina ácida soluble e insoluble con respecto al tiempo de reacción. La influencia del pretratamiento con ozono fue superior en la mitad inferior de la columna, aumentando la digestibilidad enzimática de la paja de trigo. En el presente estudio, la paja ozonizada procedente de la parte inferior de la columna tuvo una variación de 17,3% a 11,3% en el porcentaje de lignina ácida insoluble con respecto a la materia prima sin tratar. El porcentaje de lignina ácida soluble aumentó de 3,5% a 8,9%, y la concentración de la fracción celulósica y hemicelulósica aumentó un 6,7% y un 2,3%, respectivamente. Del mismo modo, se observaron diferencias en el agua de lavado, ya que la concentración de ácidos fue superior debido a la mayor reactividad del ozono con la paja de trigo.

#### Comparación de los efectos provocados por ambos pretratamientos a nivel estructural

La diferencia entre los efectos provocados sobre la materia prima dependiendo del tipo de pretratamiento pueden observarse de forma cualitativa en las imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB). En la figura 4.2a-c se observa el efecto de ruptura que provoca la explosión de vapor sobre la estructura de la paja de trigo, mientras que en el caso del ozono, se observa cómo la lignina se solubiliza y forma depósitos globulares. En ambos casos existe una gran diferencia con la paja de trigo sin pretratar, en la que no existen puntos de acceso para el ataque enzimático.

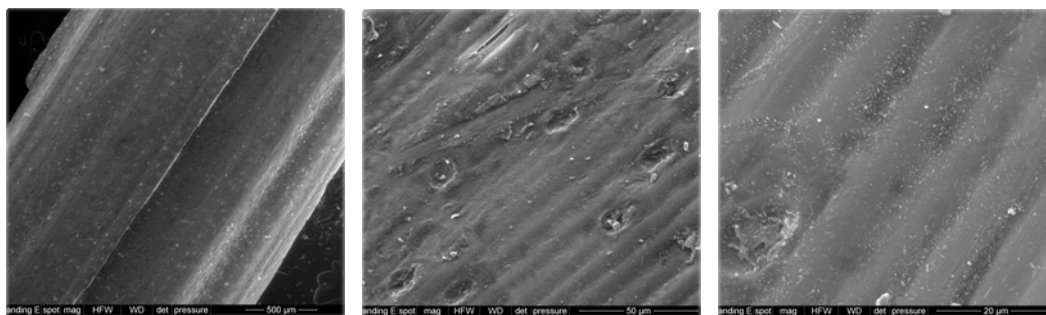


Figura 4.2a. Imagen realizada por MEB de paja de trigo.

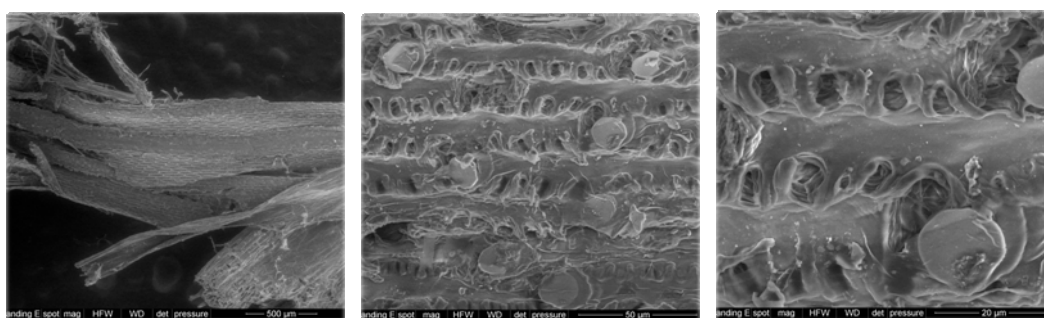


Figura 4.2b. Imagen realizada por MEB de paja de trigo pretratada con EV.

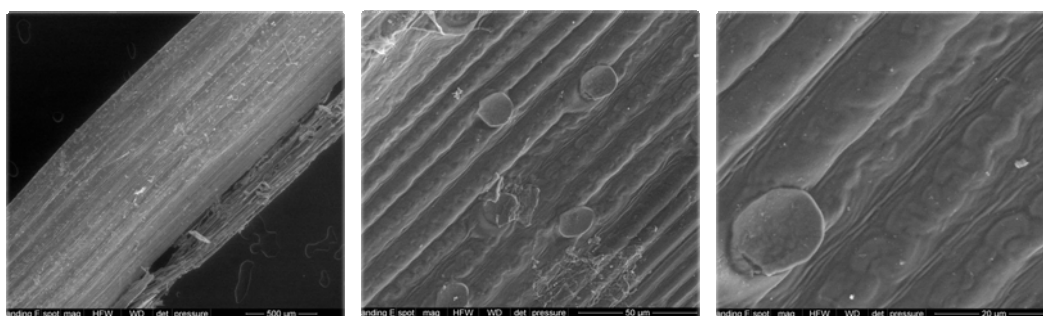


Figura 4.2c. Imagen realizada por MEB de paja de trigo pretratada con OZ.

#### 4.3.2. RENDIMIENTOS GLOBALES DE LIBERACIÓN DE AZÚCARES DESPUÉS DEL PRETRATAMIENTO Y DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA PAJA DE TRIGO

##### Explosión de Vapor

La figura 4.3 muestra el rendimiento global después del pretratamiento mediante EV y de la hidrólisis enzimática en relación a la fracción celulósica, como glucosa (RGG), y a la fracción hemicelulósica, como xilosa (RGX), presente en la materia prima. Como se

observa, no existieron grandes diferencias entre el rendimiento global basado en glucosa en los grupos de ensayo, cuya liberación fue debida a la acción enzimática casi exclusivamente, tomando valores alrededor del 72% en todos los ensayos. Cuando se utilizó la fase sólida de la EV para la etapa de hidrólisis enzimática, la liberación de xilosa se produjo por el uso de enzimas celulolíticas, siendo el rendimiento global basado en xilosa alrededor del 30%, aumentando hasta un 57% aproximadamente cuando se añadió el líquido de la explosión de vapor al proceso. Este hecho es debido a que la fase líquida de la EV contenía cantidades significativas de xilosa, sin embargo, el contenido en glucosa no aumentó de manera destacable debido a la adición de dicha fase. La hidrólisis parcial de la fracción hemicelulósica se produjo debido a que la solución utilizada en esta etapa posee también la capacidad de liberar xilosa (Tomás-Pejó, 2009). Los rendimientos globales se encuentran dentro del rango para paja de trigo pretratada con EV según la bibliografía (Ballesteros *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008). No obstante, éstos pudieron verse reducidos debido al secado, posterior a la etapa de pretratamiento, al que se sometía la fracción sólida pudiendo alterar la estructura de los poros de la paja de trigo como han señalado algunos autores (Hendricks y Zeeman, 2009). Utilizando únicamente la fracción sólida de la EV, las concentraciones medias finales de glucosa y xilosa tras 72 horas de hidrólisis enzimática fueron de 23,0 g/L y 6,0 g/L, mientras que utilizando el material completo fueron 23,5 g/L y 11,3 g/L, respectivamente. Como puede observarse, la presencia de compuestos potencialmente tóxicos en el líquido de la explosión no afectó negativamente a la actividad de las celulasas.

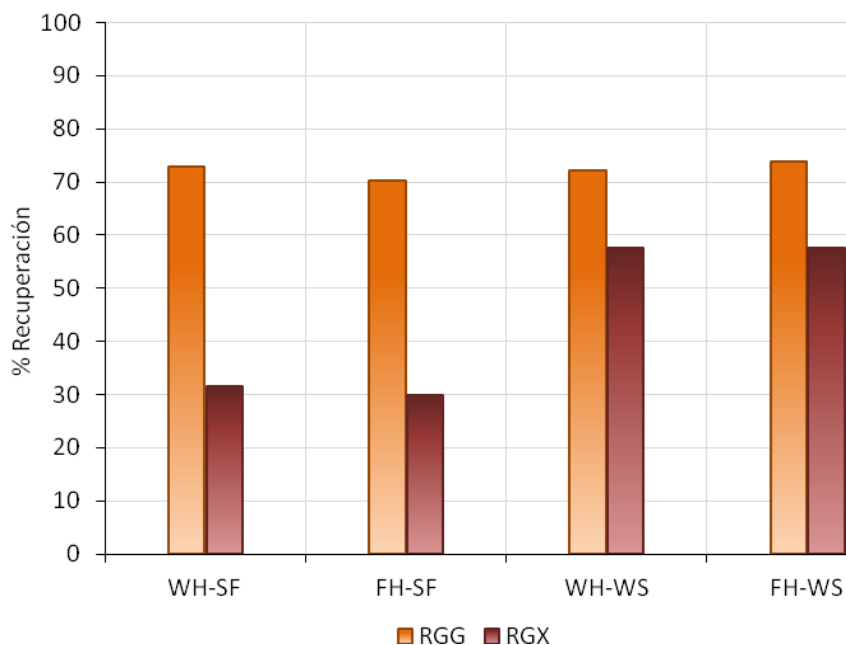


Figura 4.3. Rendimientos globales de recuperación de azúcares después del pretratamiento con EV y de la hidrólisis enzimática.

### Ozonolisis

En cuanto a la paja ozonizada, la figura 4.4 muestra el rendimiento global después del pretratamiento y de la hidrólisis enzimática de forma análoga a la paja explotada (EV). En este caso, la paja que no se sometió al proceso de lavado con agua ofreció los mejores rendimientos globales en base a glucosa y xilosa, alcanzando valores del 62% y 52%, respectivamente. Los rendimientos disminuyeron hasta valores del 56% y 38% debido a la solubilización de azúcares en el agua de lavado, afectando principalmente a la fracción hemicelulósica. Miura *et al.* (2012) obtuvieron mejores resultados de obtención de glucosa en los hidrolizados de cedro japonés pretratado con ozono que fueron lavados aumentando desde 61,6% (sin lavar) hasta 68,8% (lavando). En este estudio, la presencia de productos generados a consecuencia del pretratamiento con ozono (ácido oxálico y ácido acético) no interfirió en la etapa de hidrólisis enzimática. Según estudios realizados con anterioridad (Coca *et al.*, 2012), los rendimientos de glucosa y xilosa aumentaron en la hidrólisis enzimática realizada a la paja procedente de la parte inferior de la columna. En el presente estudio, se comprueba que en la paja ozonizada lavada de la mitad inferior de la columna, los rendimientos aumentan hasta un 61% en glucosa y hasta un 45% en

xilosa, con respecto a los rendimientos obtenidos utilizando todo el material pretratado. Este aumento es debido a que el ozono tuvo una mayor incidencia en esta zona de la columna produciendo una mayor eliminación y/o solubilización de la lignina ácida insoluble. Las concentraciones medias finales de glucosa y xilosa tras 72 horas de hidrólisis enzimática fueron de 19,6 g/L y 9,9 g/L para paja ozonizada sin lavar. En el caso de la paja ozonizada lavada, las concentraciones medias fueron 17,6 g/L y 7,3 g/L utilizando todo el material del pretratamiento y 19,3 g/L y 8,7 g/L para la paja ozonizada procedente de la mitad inferior de la columna.

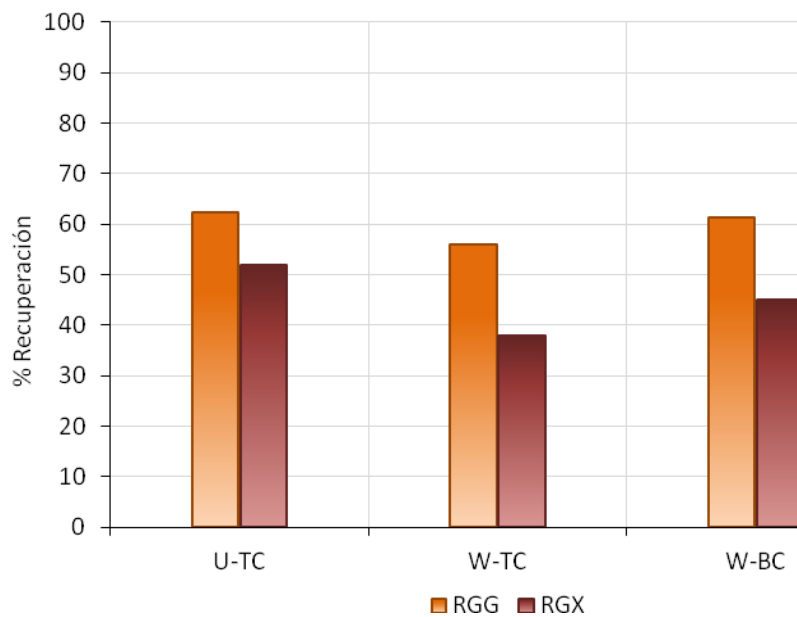


Figura 4.4. Rendimientos globales de recuperación de azúcares después del pretratamiento con OZ y de la hidrólisis enzimática.

### Comparación EV-OZ

Con objeto de facilitar la comparación entre ambos pretratamientos, la tabla 4.5 resume los rendimientos globales y las concentraciones medias de glucosa y xilosa. A la vista de los resultados, de manera general se consiguieron mejores rendimientos al pretratar la paja con explosión de vapor, y dentro de este pretratamiento el uso del material completo ofreció las concentraciones más elevadas de azúcares liberados. Los

rendimientos globales tomando como base la concentración de xilosa fueron comparables en el caso de paja ozonizada sin lavar.

Experimento	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	% RGG	% RGX
WH-SF	23,48 ± 0,72	6,21 ± 0,35	72,94	31,65
FH-SF	22,64 ± 0,54	5,84 ± 0,54	70,33	30,71
WH-WS	23,23 ± 0,97	11,32 ± 0,68	72,16	57,70
FH-WS	23,77 ± 1,02	11,29 ± 0,36	73,84	57,55
U-TC	19,63 ± 0,74	9,92 ± 0,48	62,43	51,94
W-TC	17,58 ± 0,69	7,32 ± 0,29	55,92	37,86
W-BC	19,32 ± 0,87	8,65 ± 0,32	61,24	45,15

Tabla 4.5. Concentraciones medias de glucosa y xilosa y rendimientos globales de liberación de glucosa y recuperación de xilosa en ambos pretratamientos

Dependiendo del tipo y severidad de pretratamiento realizado a la paja de trigo, los rendimientos de obtención de azúcares varían. Saha *et al.* (2011) consiguieron un rendimiento del 92% de liberación de glucosa mediante un pretratamiento con ácido sulfúrico 0,75% a una temperatura de 160°C durante 10 minutos formándose elevadas cantidades de compuestos potencialmente tóxicos en la fase líquida. Ruiz *et al.* (2012) obtuvieron un rendimiento del 90,8% de liberación de glucosa aplicando un pretratamiento de autohidrólisis que disminuyó hasta un 64,04% al realizar un proceso organosolv posterior para eliminación de lignina. Chen *et al.* (2008) alcanzaron un rendimiento de hidrólisis de celulosa del 54% a partir de paja de trigo explotada que ascendió un 26,7% al añadir álcali y un 63,6% al añadir álcali más agua oxigenada. Ballesteros *et al.* (2006) obtuvieron rendimientos similares a los obtenidos en este trabajo (72%) empleando el pretratamiento de explosión de vapor en condiciones análogas.

#### **4.4. CONCLUSIONES**

Ambos pretratamientos (EV y OZ) produjeron alteraciones tanto en la estructura como en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de la materia prima, lo que facilitó la etapa de hidrólisis enzimática posterior.

El pretratamiento mediante EV provocó una solubilización del 40% de la hemicelulosa presente en la materia prima, aumentando el porcentaje en celulosa y lignina en la fracción sólida en un 13 y 14%, respectivamente. El análisis de la fase líquida generada en el pretratamiento demostró la presencia de compuestos potencialmente inhibidores como son ácido acético, furfural y HMF y cierta cantidad de azúcares, principalmente xilosa.

Por otra parte, el pretratamiento mediante OZ produjo principalmente una solubilización de la lignina presente en la materia prima dado que el contenido en lignina ácida soluble se duplicó, manteniéndose el porcentaje de lignina ácida total esencialmente constante. El análisis de la paja de trigo de la parte inferior de la columna reflejó un aumento de 2,5 veces en el contenido de lignina ácida soluble. Pequeñas concentraciones de azúcares, ácido acético y ácido oxálico se encontraron en el agua de lavado de la paja de trigo pretratada.

En relación con la hidrólisis enzimática, se observó que la digestibilidad de la celulosa fue ligeramente superior en el caso de paja de trigo pretratada mediante EV. Los rendimientos globales de hidrólisis de celulosa se situaron entre un 70-74% y los rendimientos globales de hidrólisis de hemicelulosa aumentaron desde un 30%, cuando únicamente se utilizó la fracción sólida procedente de la EV, hasta un 57% de recuperación cuando se utilizó el material completo. En el caso de la OZ, los rendimientos globales de liberación de glucosa se situaron en valores inferiores (55-63 %), mientras que los porcentajes de hidrólisis de xilosa de la fracción sólida fueron superiores (38-52 %).



La digestibilidad de la paja de trigo fue mayor al emplear un pretratamiento que favorece la solubilización de la hemicelulosa, siendo ligeramente inferior cuando se sometió a un pretratamiento que solubiliza la lignina.

#### **4.5. REFERENCIAS**

- Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M.,** 2006. "Ethanol production from steam-explosion pretreatment wheat straw." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 6, 129-132.
- Berlin, A., Gilkes, N., Kilburnn, D., Bura, R., Harkov, A., Okunev, O., Gusarov, A., Maximenko, V., Gregg, D., Saddler, J.,** 2005. "Evaluation of novel fungal cellulase preparation for ability to hydrolyze softwood substrate-evidence of the role of accessory enzymes." *Enzyme and Microbial Technology* 37, 175-184.
- Chen, H., Han, Y., Xu, J.,** 2008. "Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide." *Process Biochemistry* 43, 1462-1466.
- Coca, M., Peña, M., González, G.,** 2007. "Kinetic study of ozonization of molasses fermentation wastewater." *Journal of Hazardous Materials* 149, 364-370.
- Cuervo, L., Folch, J.L., Quiroz, R.E.,** 2009. "Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol." *BioTecnología* 13:3.
- García-Cubero, M.T., Bolado, S., González-Benito, G., Catalina, I.,** 2008. "Comparison of ozonolysis and steam explosion of wheat straw to obtain bioethanol." *CHEMPOR, BRAGA*, Septiembre 2008.
- García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacochea, I., Coca, M., Bolado, S.,** 2009. "Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw." *Bioresource Technology* 100, 1608-1613.
- García-Cubero, M.T., Marcos, M., Bolado, S., Coca, M., González-Benito, G.,** 2010. "Optimization of operating conditions in enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic materials." *Chemical Engineering Transactions* 21, 1285-1290.
- García-Cubero, M.T., Palacín, L.G., González-Benito, G., Bolado, S., Lucas, S., Coca, M.,** 2012. "An analysis of lignin removal in a fixed bed reactor by reaction of cereal straws with ozone." *Bioresource Technology* 107, 229-234.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G.,** 2009. "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology* 100, 10-18.
- Miura, T., Leun, S.H., Inoue, S., Endo, T.,** 2012. "Combined pretreatment using ozonolysis and wet-disk milling to improve enzymatic saccharification of Japanese cedar." *Bioresource Technology* 126, 182-186.
- Ruiz, H.A., Vicente, A.A., Teixeira, J.A.,** 2012. "Kinetic modeling of enzymatic saccharification using wheat straw pretreated under autohydrolysis and organosolv process." *Industrial Crops and Products* 36, 100-107.
- Saha, B.C., Nichols, N.N., Cotta, M.A.,** 2011. "Ethanol production from wheat straw by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5 at high solid loading." *Bioresource Technology* 102, 10892-10897.
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Olsson, L.,** 2008. "Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains." *Biotechnology and Bioengineering* 100, 1122-1131.
- Tomás-Pejó, E.,** 2009. Tesis Doctoral: "Bioetanol de paja de trigo: Estrategias de integración de las etapas del proceso." Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y.,** 2005. "Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies." *Bioresource Technology* 96, 1959-1966.

**CAPÍTULO V**

**FERMENTACIÓN EN MEDIOS MODELO:**

EFFECTO DE LOS PRINCIPALES INHIBIDORES  
FORMADOS EN EL PRETRATAMIENTO DE LA PAJA DE  
TRIGO





## **RESUMEN**

En este capítulo se presentan los resultados más significativos del proceso de fermentación de *P. stipitis* utilizando medios modelo. Se han realizado ensayos para analizar el comportamiento diaúxico del microorganismo y el efecto en la fermentación de diferentes concentraciones de inhibidores formados en los pretratamientos de explosión de vapor y ozonolisis. Se ha analizado el crecimiento del microorganismo, la velocidad de consumo de sustrato, compuesto por una mezcla de glucosa/xilosa (35/20 g/L), y la producción de etanol en un medio modelo al que se añadieron diferentes cantidades de ácido acético (0,5 - 3,5 g/L), furfural (0,5 - 2,0 g/L) y HMF (0,1 - 0,5 g/L) como principales compuestos potencialmente tóxicos procedentes de la explosión de vapor de paja de trigo, y ácido oxálico (4,0 - 6,5 g/L) y ácido acético (0,0 - 1,5 g/L) como inhibidores del pretratamiento correspondiente a la ozonolisis de la materia prima.

Los resultados expuestos en este capítulo han sido publicados en los siguientes artículos incluidos en el Anexo I de la presente memoria:

**Bellido C., Bolado, S., Coca, M., Lucas, S., González-Benito, G., García-Cubero, M.T., 2011.** Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. Bioresource Technology 102, 10868-10874.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.128>

**Bellido C., González-Benito, G., Coca, M., Lucas, S., García-Cubero, M.T., 2013.** Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. Bioresource Technology 133, 51-58.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.104>



## 5.1. INTRODUCCIÓN

La fermentación en medios modelo tuvo como objetivo principal el estudio del patrón estándar del microorganismo *P. stipitis* en mezclas de glucosa/xilosa en el que añadiendo diferentes concentraciones de los compuestos potencialmente tóxicos que se generaban en el pretratamiento de la paja de trigo y que eran diferentes según dicho pretratamiento correspondiera a explosión de vapor u ozonolisis. De este modo se obtuvo una referencia para su posterior comparación con el proceso de fermentación de los hidrolizados de paja de trigo. A continuación se muestra un esquema general de los ensayos realizados en este capítulo:

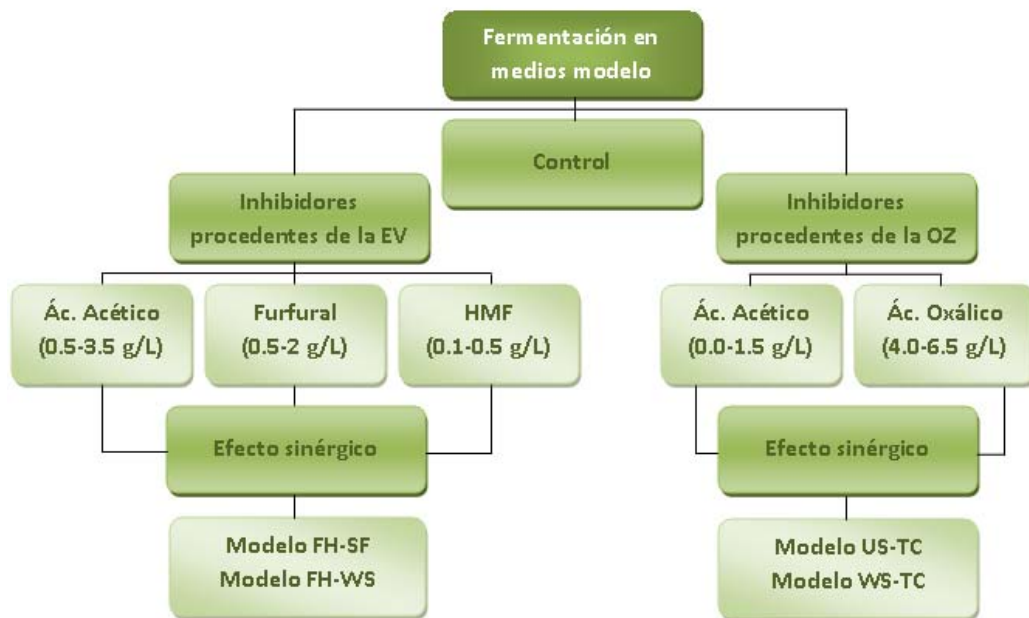


Figura 5.1. Esquema de la experimentación llevada a cabo para la fermentación con medios modelo.

Los ensayos en medios modelo se dividieron en dos grupos: por una parte se estudió el efecto inhibitorio de los compuestos potencialmente tóxicos característicos de la EV, y por otro, los correspondientes a la OZ, ambos comparados con un control en ausencia de dichos compuestos. En ambos casos se estudió su efecto tanto de forma individual en los rangos de concentración indicados en el esquema como su posible efecto sinérgico. Además, se hizo una comparativa con las concentraciones típicas de inhibidores en los medios modelo correspondientes a la fase líquida de la hidrólisis enzimática procedente tanto de la fase sólida como del material completo de la EV (FH-SF

y FH-WS), y con los medios modelo correspondientes a los hidrolizados de la paja de trigo pretratada con ozono sin lavar y lavada con agua (U-TC y W-TC). En este capítulo, y para su utilización en posteriores, se hace referencia a diferentes tipos de rendimiento, velocidad de consumo de sustrato y productividad de etanol que han sido definidos de la siguiente manera:

Rendimiento de etanol sobre el teórico: tanto por ciento de etanol producido con respecto a la cantidad total de etanol que podría producirse a partir de los azúcares fermentables disponibles en el medio.

$$RTE = \frac{g_{\text{etanol}}}{0,51 \cdot (g_{\text{glucosa}} + g_{\text{xilosa}})} \cdot 100 \quad (\text{ec. 5.1})$$

Coefficiente de rendimiento de etanol: gramos de etanol producido por cada gramo de glucosa y xilosa consumido.

$$Y_{p/s} = \frac{\text{etanol producido (g/L)}}{\text{azúcares consumidos (g/L)}} \quad (\text{ec. 5.2})$$

Coefficiente de rendimiento de biomasa con respecto al sustrato: gramos de células generadas por cada gramo de azúcar consumido.

$$Y_{x/s} = \frac{\text{biomasa generada (g/L)}}{\text{azúcares consumidos (g/L)}} \quad (\text{ec. 5.3})$$

Coefficiente de rendimiento de biomasa con respecto al producto: gramos de células generadas por cada gramo de etanol producido.

$$Y_{x/p} = \frac{\text{biomasa generada (g/L)}}{\text{etanol producido (g/L)}} \quad (\text{ec. 5.4})$$

Velocidad de consumo de azúcares: gramos de glucosa y xilosa consumidos por cada litro de medio y hora de proceso.

$$C_s = \frac{\text{azúcares consumidos (g/L)}}{\text{tiempo (h)}} \quad (\text{ec. 5.5})$$



Productividad de etanol: gramos de etanol producido por cada litro de medio y hora de proceso.

$$P_e = \frac{\text{etanoproducto(g/L)}}{\text{tiempo(h)}} \text{ (ec. 5.6)}$$

## **5.2. METODOLOGÍA**

### **5.2.1. MEDIOS DE FERMENTACIÓN Y CONDICIONES DE OPERACIÓN**

La composición de los medios de fermentación fue fijada a partir de datos bibliográficos (Díaz *et al.*, 2009). Se prepararon medios de fermentación compuestos por: 35 g/L de glucosa, 20 g/L de xilosa, 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 0,47 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 12,8 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,51 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,47 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y distintas concentraciones de compuestos tóxicos. El pH de los medios se ajustó a un valor de 5,0 con un buffer compuesto de dos disoluciones de ácido succínico 0,2M y NaOH 0,2M. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos a excepción de azúcares e inhibidores que fueron añadidos posteriormente mediante filtros estériles (0,20 µm Sterile Filtres, Ministart Sartorius).

Los principales inhibidores encontrados en los hidrolizados de paja explotada fueron ácido acético, furfural y HMF, que se estudiaron en un intervalo de concentración de 0,5 - 3,5 g/L, 0,5 - 2,0 g/L y 0,1 - 0,5 g/L, respectivamente. Del mismo modo, los inhibidores que aparecieron en los hidrolizados de paja ozonizada fueron ácido acético y ácido oxálico cuyos intervalos de estudio fueron 0,0 - 1,5 g/L y 4,0 - 6,5 g/L, respectivamente. Estos intervalos concuerdan con los datos que se reseñan en la bibliografía (Delgenes *et al.*, 1996; Agbogbo y Wenger, 2006).

Se llevaron a cabo ensayos de fermentación en medio sintético simulando las concentraciones de todos los compuestos inhibidores que aparecían en los diferentes hidrolizados de paja de trigo para cada uno de los pretratamientos. Por tanto, se simularon las concentraciones de ácido acético, furfural y HMF en la fase líquida después de la etapa de hidrólisis enzimática procedente de la fase sólida o de todo el material de la EV (FH-SF y FH-WS), así como las concentraciones de ácido acético y ácido oxálico en el hidrolizado procedente de la paja ozonizada lavada de toda la columna o de la mitad inferior (U-TC y W-TC).

La operación se llevó a cabo en recipientes de vidrio encapsulados de 125mL de capacidad (penicilin flasks) provistos con una aguja para la eliminación del dióxido de carbono generado en el proceso. En cada uno de los botes se añadieron 25mL de medio y se inocularon al 10% (v/v) con una concentración inicial de 0,5g células/L. Las fermentaciones se llevaron a cabo en incubadores rotatorios a una temperatura constante de 30°C y una agitación de 175 revoluciones por minuto durante 168 horas. Se tomaron muestras cada 24 horas para seguir el curso de la fermentación y cada tipo de ensayo se realizó por triplicado.

En la tabla 5.1 se muestra la composición inicial de azúcares e inhibidores de cada medio modelo, así como su nomenclatura, que hace referencia al compuesto analizado y su concentración de forma individual, y de forma conjunta en simulación de hidrolizados:

Nombre del experimento	Concentración inicial de azúcares (g/L)		Concentración inicial de inhibidores (g/L)			
	Glucosa	Xilosa	Ácido acético	Furfural	HMF	Ácido oxálico
Control	36,5 ± 0,8	21,0 ± 0,8	-	-	-	-
HAc3.5	35,0 ± 0,9	20,1 ± 0,5	3,5	-	-	-
HAc2.5	35,1 ± 1,3	20,5 ± 0,7	2,5	-	-	-
HAc1.5	35,0 ± 1,2	20,5 ± 0,6	1,5	-	-	-
HAc0.5	35,0 ± 0,9	20,1 ± 0,9	0,5	-	-	-
F2	35,8 ± 0,7	20,2 ± 0,7	-	2,0	-	-
F1	35,1 ± 1,0	21,4 ± 0,4	-	1,0	-	-
F0.5	34,8 ± 1,1	21,3 ± 0,8	-	0,5	-	-
HMF0.5	37,0 ± 0,9	20,5 ± 0,5	-	-	0,5	-
HMF0.1	36,7 ± 0,6	20,2 ± 0,6	-	-	0,1	-
Modelo FH-SF	22,3 ± 0,8	5,8 ± 0,3	0,5	-	-	-
Modelo FH-WS	21,4 ± 0,6	11,1 ± 0,6	1,5	0,15	0,05	-
HOx4	34,2 ± 1,3	20,3 ± 0,5	-	-	-	4,0
HOx6.5	36,0 ± 1,0	19,4 ± 0,7	-	-	-	6,5
Modelo U-TC	34,9 ± 0,9	21,8 ± 0,8	1,5	-	-	6,5
Modelo W-TC	35,4 ± 1,1	21,5 ± 0,7	0,6	-	-	4,0

Tabla 5.1. Composición inicial de azúcares e inhibidores en los ensayos en medio modelo.

### **5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.3.1. COMPORTAMIENTO DIAÚXICO DEL MICROORGANISMO *P. stipitis* EN MEZCLAS DE GLUCOSA Y XILOSA COMO FUENTE DE CARBONO.**

*P. stipitis* es una levadura capaz de fermentar tanto hexosas como pentosas y cuando ambos sustratos están presentes en el medio, muestra un comportamiento diaúxico, lo que significa que consume los azúcares de seis y cinco carbonos de forma secuencial (Agbogbo *et al.*, 2006). En mezclas de glucosa y xilosa, la glucosa inhibe el consumo de xilosa mediante un mecanismo competitivo en el que el microorganismo *P. stipitis* consume las hexosas de forma preferencial a las pentosas para la producción de etanol. La velocidad de consumo de glucosa es, por tanto, mucho mayor que la de xilosa y el transporte de los azúcares a las células es el factor limitante en el proceso de utilización del sustrato para la producción de etanol con esta levadura (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008).

#### **Proceso aerobio: Crecimiento del microorganismo**

La concentración inicial de sustrato fue 35 g/L glucosa y 20 g/L de xilosa, que se corresponde con las concentraciones de azúcares que podrían alcanzarse teóricamente en hidrolizados de paja de trigo, con una carga de sólido del 10%. Una vez inoculado el medio con 0,5 g células/L, se realizó un seguimiento del proceso de crecimiento del microorganismo de forma aerobia durante 24 horas determinando el aumento de concentración celular. En la figura 5.2 se observa el crecimiento diaúxico del microorganismo debido a la utilización secuencial de la glucosa y la xilosa. En este caso, las tasas máximas de crecimiento específico ( $\mu_{\text{máx}}$ ) tomaron valores de  $0,25\text{h}^{-1}$  para la glucosa y  $0,05\text{h}^{-1}$  para la xilosa, datos comparables con los encontrados en bibliografía (Grootjen *et al.*, 1991, Díaz *et al.*, 2009). En la gráfica se aprecia la meseta típica del comportamiento diaúxico entre las 14 y 16 horas de crecimiento aerobio, donde la concentración de células se estableció en 6,6 g/L y se incrementó hasta 7,5 g/L al final del ensayo.

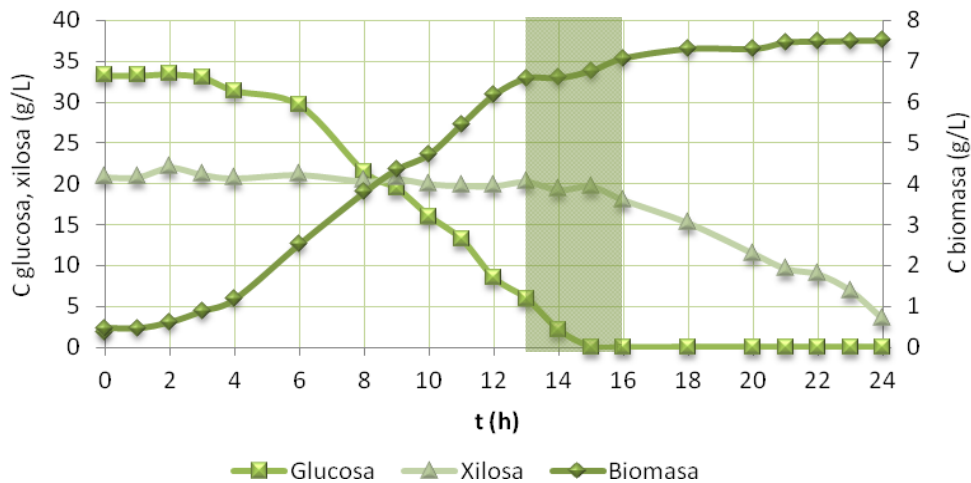


Figura 5.2. Perfil de concentraciones de glucosa, xilosa y biomasa. Proceso aerobio.

### Proceso anaerobio: Generación de etanol

En la figura 5.3 se representa la concentración de glucosa, xilosa, etanol y biomasa en el proceso anaerobio de fermentación durante las primeras 24 horas donde se realizó un seguimiento exhaustivo del proceso con objeto de observar el cambio en el consumo de sustrato. Para un tiempo de 18 horas, la glucosa se consumió casi en su totalidad, momento en el cual el microorganismo empezó a consumir xilosa de forma notable. Entre las 14 y 16 horas de fermentación, la concentración de glucosa disminuyó de 5,0 g/l a 1,5 g/l y la concentración de xilosa decreció ligeramente de 19,0 g/l a 18,3 g/l. El efecto inhibitorio de la presencia de glucosa desapareció en dicho intervalo de concentración para dar paso al consumo de xilosa. Aunque no se muestra en la gráfica, el consumo total de xilosa se produjo a las 168 horas aproximadamente y la concentración celular tomó valores de 4,9 g/L, notablemente inferiores a los obtenidos en presencia de oxígeno. El microorganismo creció de forma menos acusada cuando empezó a consumir xilosa de forma anaerobia, aumentando la concentración de 4,5 a 4,9 g/L.

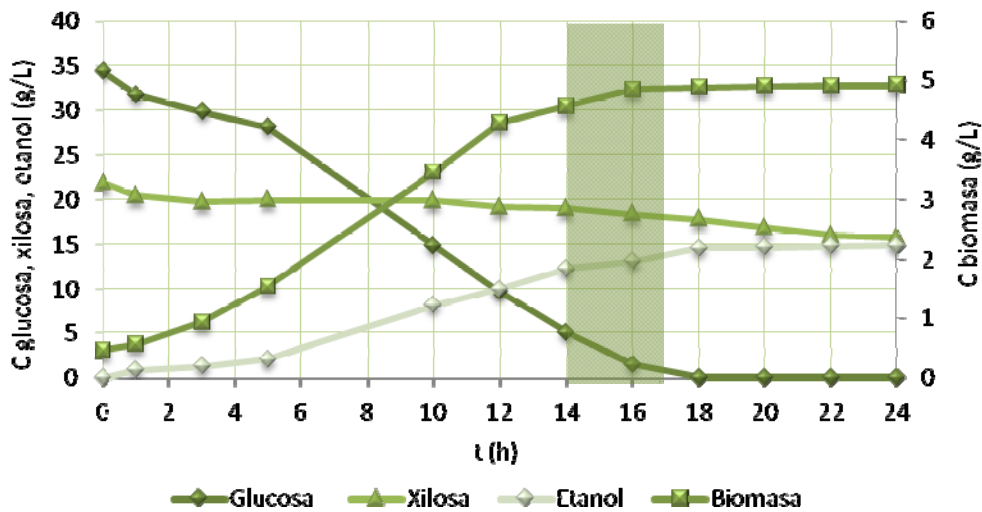


Figura 5.3. Perfil de concentraciones de glucosa, xilosa, etanol y biomasa. Proceso anaerobio.

### 5.3.2. EFECTO DE LOS PRINCIPALES INHIBIDORES FORMADOS EN EL PRETRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

Durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica se generan diferentes compuestos dependiendo de su naturaleza y del tipo de pretratamiento, que pueden inhibir el proceso de fermentación de los microorganismos productores de etanol. Dentro de estos compuestos se encuentran los ácidos alifáticos, como el ácido acético, fórmico o levulínico, y furaldehídos, como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), que son productos de degradación de los carbohidratos, así como una variedad de compuestos aromáticos, principalmente compuestos fenólicos procedentes de la degradación de la lignina, como vainillina o siringaldehído (Klinke *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2007).

Se planteó el estudio del efecto de los productos de degradación que aparecían mayoritariamente en los hidrolizados de paja de trigo sometida a EV y OZ en el proceso de fermentación con el microorganismo *P. stipitis*:

1. En el caso de paja de trigo pretratada con explosión de vapor los principales compuestos inhibidores encontrados fueron ácido acético, furfural y HMF.

2. En el caso de paja de trigo pretratada con ozono fueron ácido acético y ácido oxálico, procedente de la reacción de los compuestos fenólicos con el ozono.

En este sentido se propusieron diferentes ensayos de fermentación con medios modelo para estudiar el efecto tanto de los principales compuestos obtenidos de forma aislada (añadiendo diferentes concentraciones) como su efecto sinérgico (adición conjunta) simulando los hidrolizados reales. Todas las concentraciones estudiadas se encuentran dentro del rango encontrado en la bibliografía (Delgenes et al., 1996; Agbogbo y Wenger, 2006) y de la propia experimentación para hidrolizados de paja de trigo pretratada con explosión de vapor y ozono. A continuación se muestran los resultados obtenidos analizando la influencia de dichos inhibidores en el proceso de fermentación en términos de crecimiento de biomasa, consumo de azúcares y rendimiento y productividad de etanol.

#### 5.3.2.1. INHIBIDORES PRESENTES MAYORITARIAMENTE EN LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO PRETRATADA CON EV: ÁCIDO ACÉTICO, FURFURAL Y HMF.

##### Ácido acético

Con respecto al efecto individual del ácido acético como compuesto inhibidor, el rango de concentraciones iniciales estudiadas fue de 0,5 g/L a 3,5 g/L. La figura 5.4a-c muestra los perfiles de concentración referidos al consumo de glucosa y xilosa, a la producción de etanol y al crecimiento de biomasa para los procesos de fermentación añadiendo 0,5, 1,5 y 2,5 g/L de ácido acético junto con el experimento control sin inhibidor. El rendimiento teórico de etanol disminuyó de forma progresiva desde un 76,5% correspondiente al experimento control, a un 63,8% para 0.5 g/L (HAc0.5), un 61,8% para 1,5 g/L (HAc1.5), 36,4% para 2,5 g/L (HAc2.5) y un 0,0% para 3,5 g/L (HAc3.5). En el experimento control, la mayor parte de la glucosa se consumió durante las primeras 24 horas mientras que la xilosa se agotó a las 168 horas. Como puede observarse en la gráfica, la presencia de ácido acético en el medio tuvo un mayor impacto en el consumo de xilosa que en el de glucosa, siendo su efecto mayor a medida que la concentración

aumentó. Así mismo, el crecimiento del microorganismo y la producción de etanol se vieron notablemente afectados para una concentración de 2,5 g/L de ácido acético.

La concentración de etanol que se alcanzó en el experimento control fue de 22,8 g/L siendo 18,0 g/L, 17,5 g/L y 10,4 g/L las concentraciones resultantes para los experimentos HAc0.5, HAc1.5 y HAc2.5, respectivamente. En el ensayo control, se obtuvo una productividad de 0,61 g/L·h de etanol, valor que se correspondió con la máxima productividad de etanol a las 24 horas, tiempo en el que la glucosa se consumió completamente. La productividad decreció hasta 0,14 g/L·h cuando *P. stipitis* agotó toda la xilosa presente en el medio. Este efecto se observa también en los experimentos HAc0.5 y HAc1.5 con valores inferiores, 0,57 g/L·h (24 h), 0,11 g/L·h (168 h) y 0,15 g/L·h (24 h), 0,10 g/L·h (168 h), respectivamente.

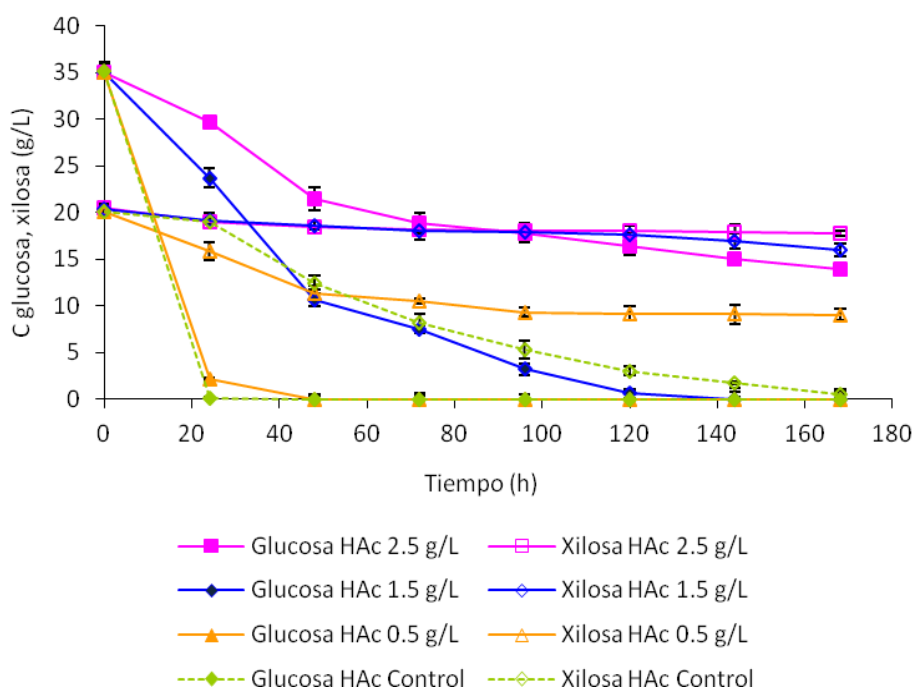


Figura 5.4a. Perfil de concentraciones de glucosa y xilosa añadiendo ácido acético como inhibidor.



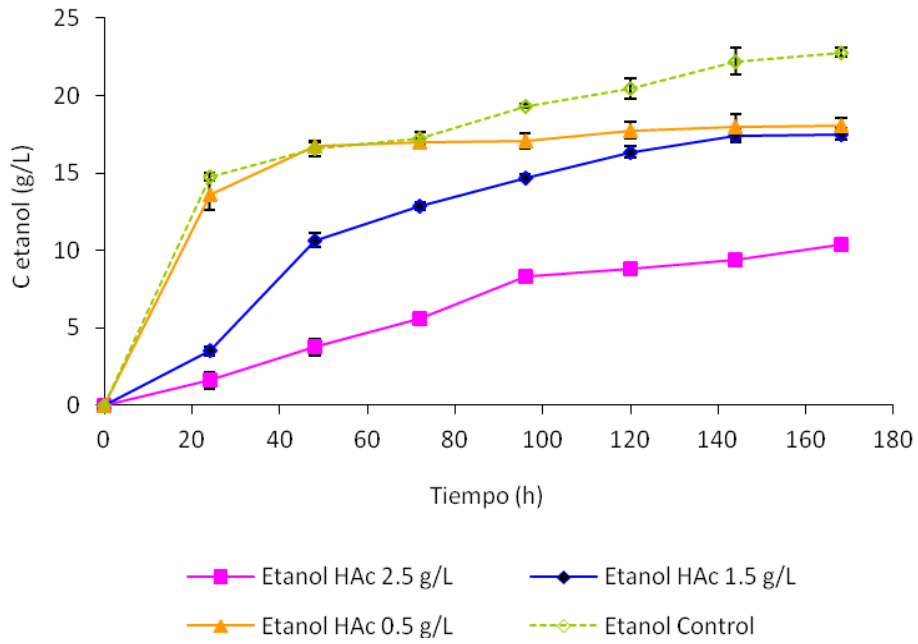


Figura 5.4b. Perfil de concentración de etanol añadiendo ácido acético como inhibidor.

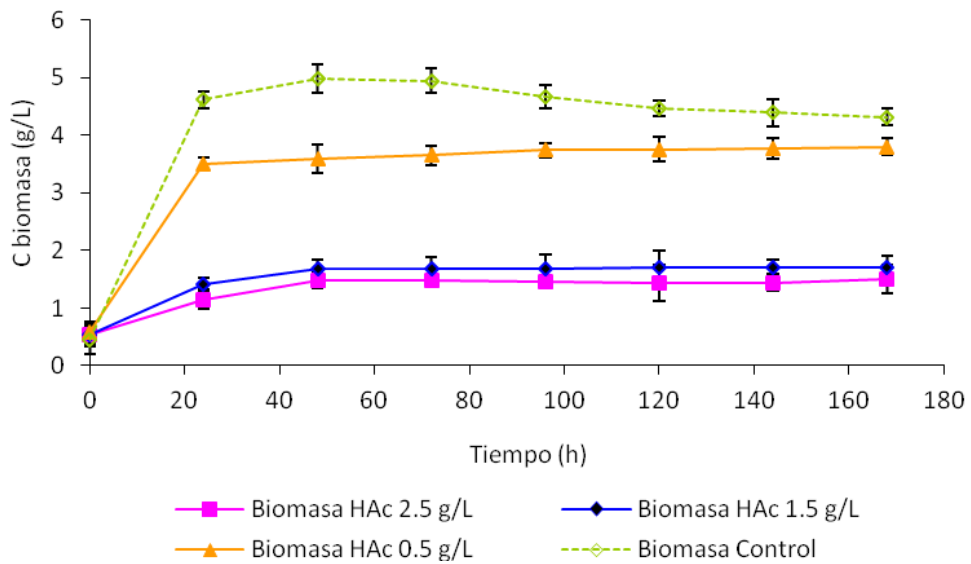


Figura 5.4c. Perfil de concentración de biomasa añadiendo ácido acético como inhibidor.

A pesar de que las concentraciones de etanol fueron inferiores en los ensayos con ácido acético, ya que afectaron al crecimiento celular, los rendimientos de etanol fueron mayores porque el etanol producido se obtuvo con un menor consumo de azúcares y esto provocó un incremento en el ratio alcohol/carbohidratos. El coeficiente de rendimiento de etanol en el control fue de 0,39g etanol/g azúcares, mientras que para los experimentos HAc0.5, HAc1.5 y HAc2.5 fue de 0,39g etanol/g azúcares, 0,44g etanol/g azúcares y 0,44g etanol/g azúcares, respectivamente. Otros autores también observaron que los rendimientos de etanol se incrementaron al aumentar la cantidad de ácido acético en las fermentaciones con *P. stipitis* CECT 1922 en medio sintético (20 g/L glucosa y 15 g/L xilosa) añadiendo 3 g/L y 6 g/L de ácido acético (Díaz *et al.*, 2009). Aunque no se muestra en la gráfica, al final del proceso la concentración de ácido acético decreció en todos los ensayos, lo que indica que el microorganismo *P. stipitis* asimiló en su metabolismo parte del compuesto.

Por tanto, el efecto inhibitorio del ácido acético en el proceso de fermentación de mezclas de glucosa y xilosa usando *P. stipitis* se incrementó a medida que se elevó su concentración en el medio. Para una concentración de 3,5 g/L de ácido acético en el medio tanto el crecimiento de la biomasa como la producción de etanol se inhibió completamente. Este resultado coincide con Björling y Lindman (1989), que observaron inhibición completa de crecimiento y producción de etanol con *P. stipitis* para 3,9 g/L de ácido acético.

### Furfural

El efecto inhibitorio del furfural tuvo un menor impacto que el ácido acético sobre los rendimientos de fermentación. El rango de concentraciones iniciales estudiadas fue de 0,5 g/L a 2,0 g/L de furfural en el medio. En este caso, la presencia de furfural en el medio ocasionó un retardo en el consumo de azúcares con la consecuente bajada de la productividad, cuyo efecto se produjo de forma más notable durante las primeras 24 horas. La figura 5.5a-c muestra los perfiles de concentración para el consumo de azúcares, la producción de etanol y el crecimiento celular añadiendo 0,5 g/L (F0.5), 1,0 g/L (F1) y 2,0 g/L (F2) de furfural junto con el experimento control sin inhibidor.

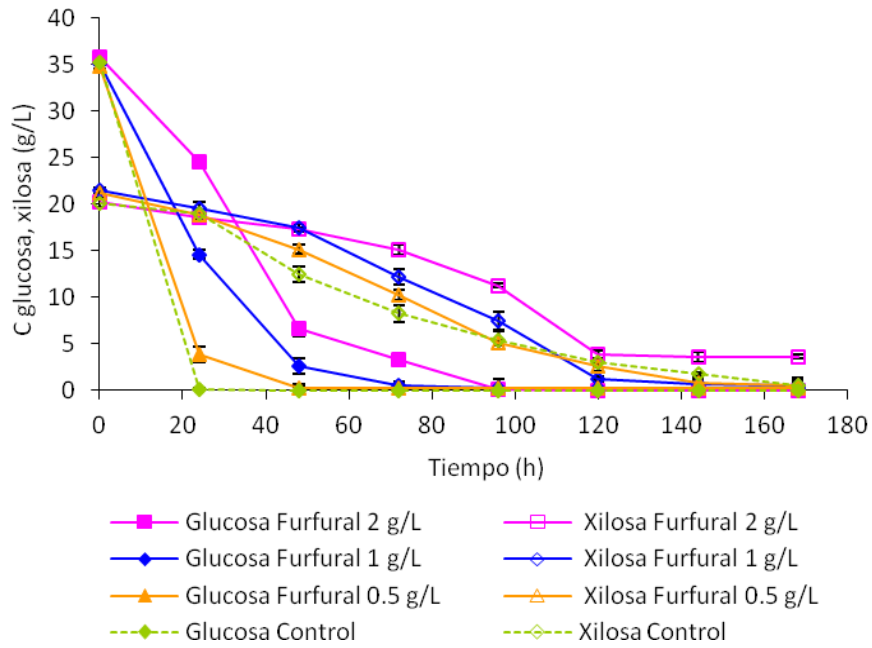


Figura 5.5a. Perfil de concentraciones de glucosa y xilosa añadiendo furfural como inhibidor.

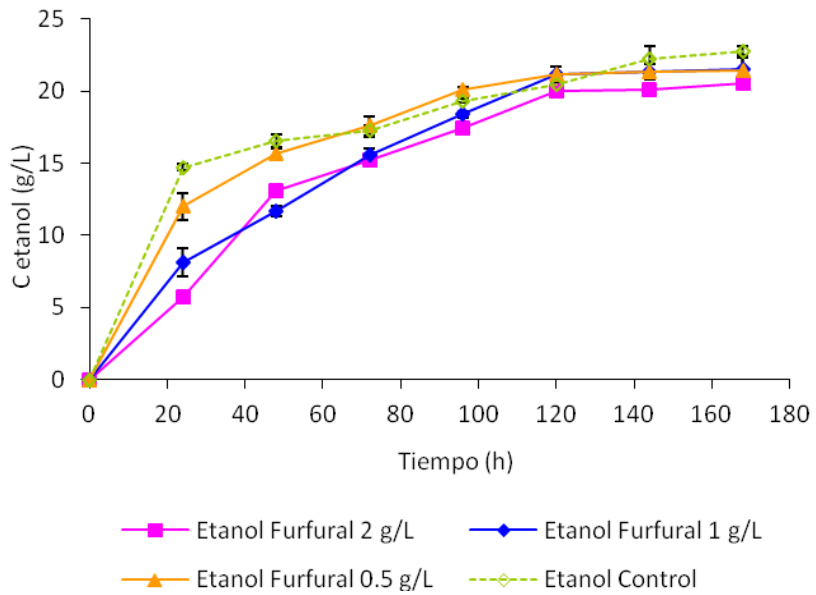


Figura 5.5b. Perfil de concentración de etanol añadiendo furfural como inhibidor.

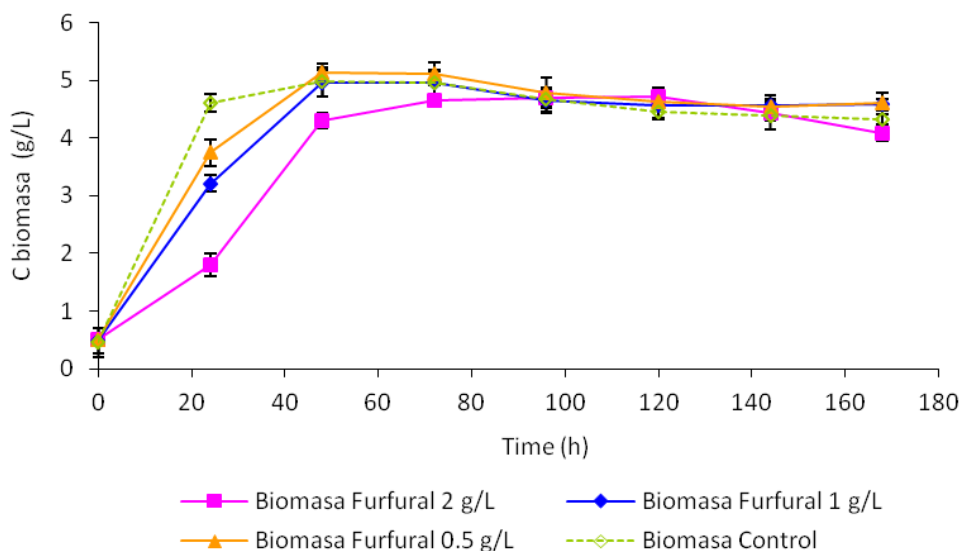


Figura 5.5c. Perfil de concentración de biomasa añadiendo furfural como inhibidor.

Los rendimientos teóricos de etanol en los ensayos F0.5, F1 y F2, alcanzaron valores de un 75,4%, 74,5% y 73,4%, respectivamente, que son similares al rendimiento teórico obtenido en el control (76,5%). Según se observa en la gráfica, la pendiente de las curvas del consumo de glucosa y xilosa disminuyó a medida que la concentración de furfural en el medio se incrementó. En el caso de la glucosa, la mayor concentración de furfural estudiada (2,0 g/L) provocó un mayor retardo en su consumo, siendo 96 horas el tiempo necesario para la asimilación total de dicho azúcar. En el caso de la xilosa, se observó un efecto menos acusado para concentraciones de furfural de 0,5 g/L y 1,0 g/L, mientras que para concentraciones de 2,0 g/L no se produjo un consumo total al final del ensayo.

Las concentraciones máximas de etanol que se alcanzaron fueron similares a las del control (22,8 g/L), siendo 21,0 g/L, 21,6 g/L y 21,6 g/L las concentraciones máximas de etanol correspondientes a los experimentos F2, F1 y F0.5, respectivamente. Por tanto, el efecto inhibitorio del furfural se observó en la velocidad de producción de etanol y tuvo poca influencia en la concentración final alcanzada. En el ensayo F1 la velocidad de producción de etanol a las 24 horas alcanzó un valor de 0,34 g/L·h, lo que significó una reducción de casi un 50% con respecto al control. En el caso de los ensayos F2 y F0.5

dicho parámetro tomó valores de 0,24 g/L·h y 0,50 g/L·h, respectivamente. En todos los casos la velocidad de producción de etanol al final del ensayo, 0,11 g/L·h, fue similar al control. Estos datos coinciden con los encontrados en la bibliografía con respecto al comportamiento del microorganismo *P. stipitis* en medios con concentraciones de 2,0 g/L de furfural y cuyo efecto fue totalmente inhibitorio para concentraciones de 4,0 g/L (Díaz *et al.*, 2009). Los rendimientos de etanol al final del proceso no se vieron afectados por la presencia de furfural ya que el efecto inhibitorio solo provocó un retardo en el consumo de sustratos y consecuentemente en la producción de etanol. En todos los ensayos, los rendimientos de etanol se encontraron en el rango de 0,39 - 0,40g etanol/g azúcares.

Como puede observarse en la figura 5.5c, la presencia de furfural produjo un retardo en la velocidad de crecimiento celular más acusado cuanto mayor fue la concentración del compuesto inhibitorio. Según Delgenes *et al.* (1996), esto puede ser debido a que el microorganismo necesitó más tiempo para producir las enzimas encargadas de asimilar furfural y transformarlo en alcohol furfurílico. Al final de todos los ensayos no se encontró furfural en el medio lo que significa que, efectivamente, el microorganismo asimiló dicho compuesto y fue la causa de la disminución de la velocidad de crecimiento celular (Tomás-Pejó *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2004; Taherzadeh *et al.*, 2000). Una forma de minimizar este efecto es el aumento de densidad celular en el medio, que en un proceso en continuo puede llevarse a cabo por medio de la recirculación de microorganismos (Cantarella *et al.*, 2004).

### HMF

La presencia de HMF tuvo diferentes efectos dependiendo de la concentración, ya que a concentraciones bajas produjo un efecto estimulador mientras que a concentraciones más elevadas causó una ligera inhibición del proceso. Las concentraciones estudiadas fueron de 0,1 g/L y 0,5 g/L. La figura 5.6a-c muestra los perfiles de concentración para azúcares, etanol y biomasa.

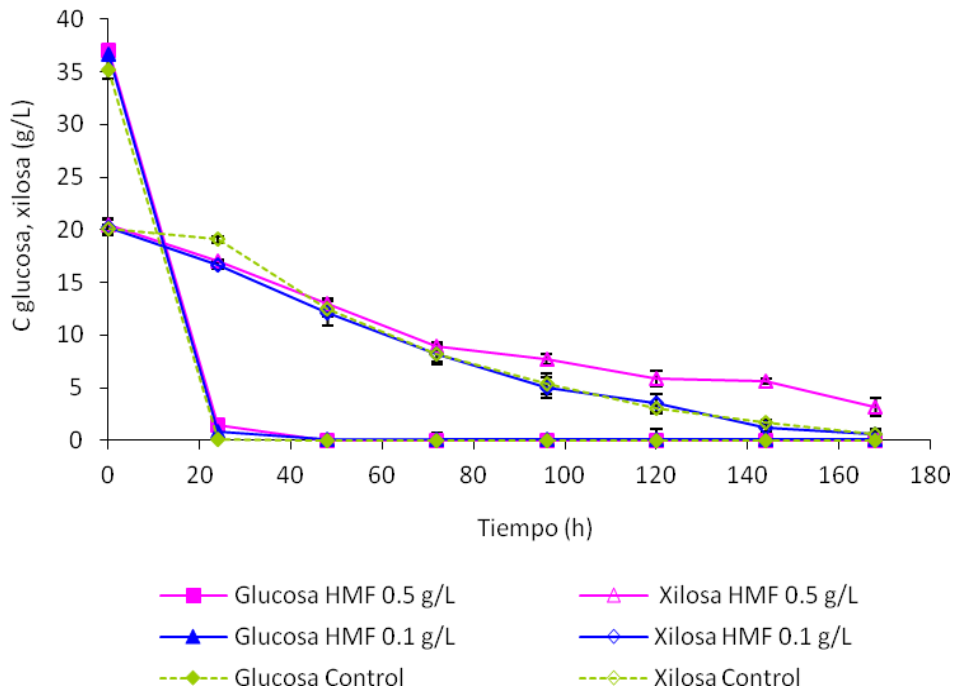


Figura 5.6a. Perfil de concentraciones de glucosa y xilosa añadiendo HMF como inhibidor.

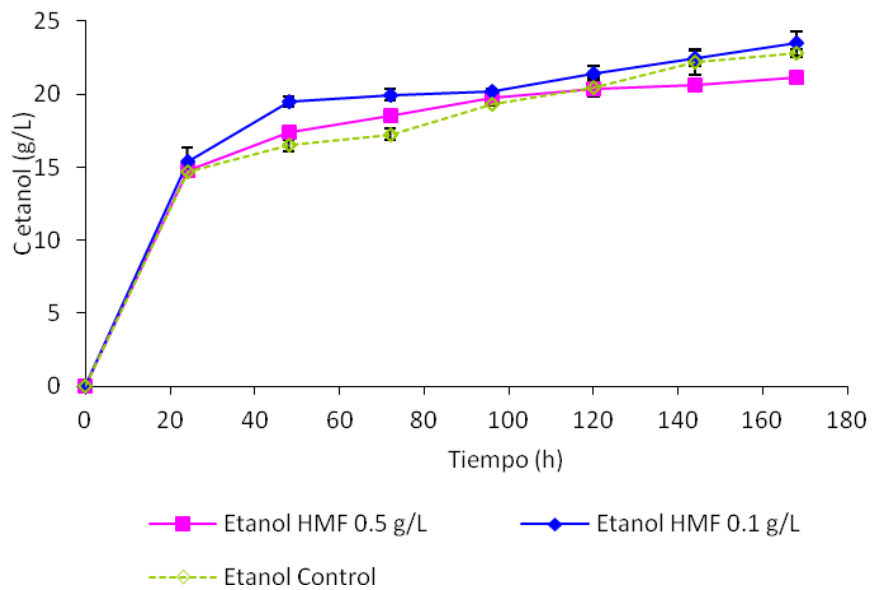


Figura 5.6b. Perfil de concentración de etanol añadiendo HMF como inhibidor.

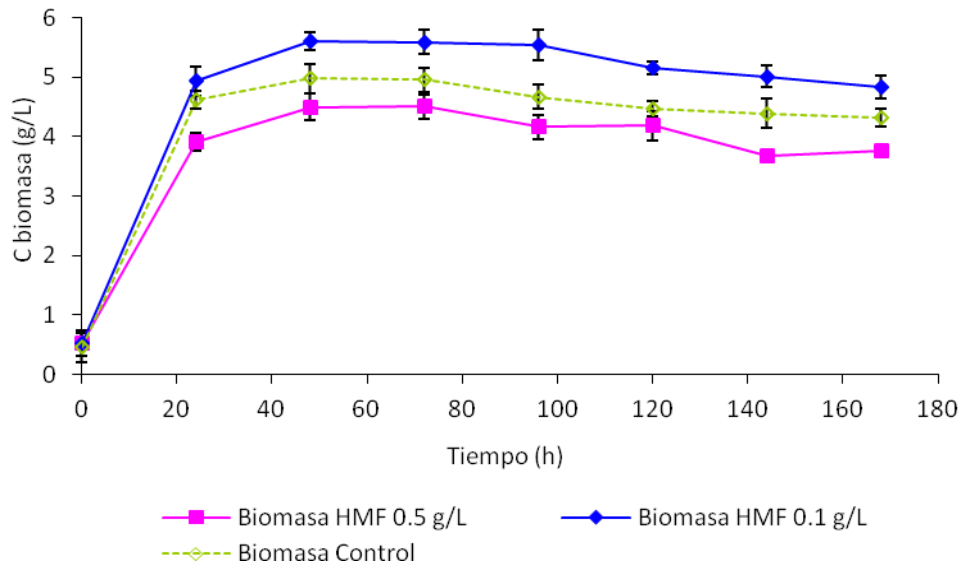


Figura 5.6c. Perfil de concentración de biomasa añadiendo HMF como inhibidor.

El rendimiento teórico de etanol que se obtuvo en el ensayo HMF0.1 fue de un 82,5%, lo que supone una leve mejoría con respecto al control (76,5%) ya que se alcanzó una concentración de etanol de 24,0 g/L. Sin embargo, en el ensayo HMF0.5 se alcanzó un rendimiento del 75,1%, ligeramente inferior al obtenido en el control. Como muestra la figura, no se produjeron cambios considerables en el consumo de glucosa o en la producción de etanol, aunque para concentraciones de 0,5 g/L de HMF, el consumo de xilosa empezó a disminuir levemente. Los rendimientos de etanol obtenidos en los ensayos HMF0.5 y HMF0.1 fueron 0,38g etanol/g azúcares y 0,42g etanol/g azúcares. La presencia de HMF en baja concentración estimuló el crecimiento celular lo que supuso una mejora en la velocidad de producción de etanol. El efecto inhibitorio del HMF en fermentaciones alcohólicas usando *P. stipitis* se hace más notable para concentraciones superiores a 1,0 g/L (Delgenes *et al.*, 1996).

### Efecto sinérgico

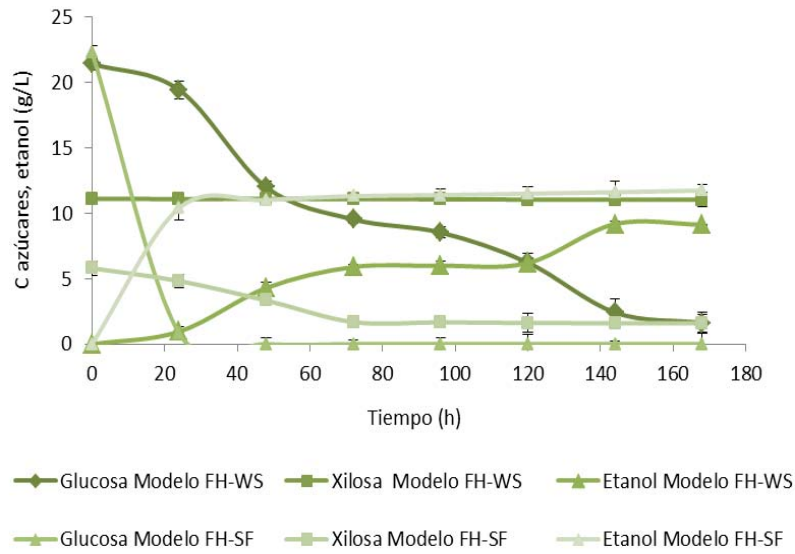
Con el objetivo de estudiar el comportamiento del microorganismo *P. stipitis* en presencia de los tres inhibidores en el medio de fermentación y realizar una comparación

posterior de dicho comportamiento entre los hidrolizados de paja de trigo y los medios modelo correspondientes, se llevaron a cabo dos grupos de experimentos:

- I. Fermentación en un medio modelo simulando las concentraciones iniciales de sustrato y compuestos inhibidores en un medio sintético correspondientes a la *fase líquida de la hidrólisis enzimática* procedente de la *fracción sólida de la EV*, siendo, por tanto, el ácido acético el único inhibidor presente con una concentración de 0,48 g/L y glucosa y xilosa con una concentración de 22,64 g/L y 5,84 g/L, respectivamente (hidrolizados FH-SF).
  
- II. Fermentación en un medio modelo simulando las concentraciones iniciales de sustrato y compuestos inhibidores en un medio sintético correspondientes a la *fase líquida de la hidrólisis enzimática* procedente del *material completo* de la EV. En este caso, los tres inhibidores estuvieron presentes: 1,52 g/L de ácido acético, 0,14 g/L de furfural y 0,05 g/L de HMF. Las concentraciones iniciales de glucosa y xilosa fueron 23,77 g/L y 11,29 g/L, respectivamente (hidrolizados FH-WS).

En los modelos de los hidrolizados FH-SF la presencia de 0,5 g/L de ácido acético afectó principalmente al consumo de xilosa como en el caso de los ensayos HAc0.5, ya que el 27,4% de la xilosa presente en el medio no fue consumida mientras que la glucosa se agotó completamente durante las primeras 24 horas. En los experimentos modelo de los hidrolizados FH-WS la presencia de los tres inhibidores tuvo un efecto sinérgico negativo produciéndose una interacción entre el ácido acético, el furfural y el HMF con un efecto mayor al que hubieran tenido si hubieran estado presentes individualmente en el medio en esas concentraciones. *P. stipitis* no fue capaz de asimilar la xilosa y la velocidad de consumo de la glucosa decreció de forma considerable, permaneciendo en el medio 1,62 g/L después de 168 horas de fermentación debido a la inhibición del crecimiento celular. La gráfica 5.7 muestra una comparación del curso de la fermentación en cuanto a concentraciones de glucosa, xilosa y etanol para ambos modelos.





5.7. Comparación del curso de la fermentación de los modelos FH-WS y FH-SF.

Otros autores han estudiado el efecto de estos inhibidores en otros microorganismos como *Candida shehatae*, *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. *C. shehatae* mostró una buena tolerancia al ácido acético, pero se inhibió el crecimiento celular y la producción de etanol cuando la concentración de furfural alcanzó valores de 2,0 g/L. Por el contrario, *Z. mobilis* no mostró ningún signo de inhibición frente a ninguno de los tres compuestos (ácido acético, furfural y HMF), mientras que la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae* se vio fuertemente afectada (Delgenes *et al.*, 1996). En el caso del furfural, algunos estudios sugieren operar con una elevada densidad de células en fermentación continua junto con una recirculación de las mismas para disminuir la fase de retardo y de este modo evitar el problema de toxicidad (Cantarella *et al.*, 2004)

### 5.3.2.2. INHIBIDORES PRESENTES MAYORITARIAMENTE EN LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO PRETRATADA CON OZONO: ÁCIDO ACÉTICO Y ÁCIDO OXÁLICO.

#### Ácido Acético

El efecto inhibitorio del ácido acético de forma individual ha sido analizado en el apartado anterior ya que apareció como compuesto potencialmente tóxico en ambos pretratamientos. Para niveles de concentración de 3,5 g/L en el medio de fermentación se produjo una inhibición completa del proceso de fermentación, y no se observó ni crecimiento celular ni producción de etanol. En el rango estudiado (0,5 - 2,5 g/L) la productividad de etanol decreció con la concentración de ácido acético. El rendimiento de etanol con respecto al teórico disminuyó hasta un 36,4 % para 2,5 g/L de ácido acético. En el menor nivel de concentración estudiado (0,5 g/L) dicho rendimiento se estableció en un 63,8 % y 0,39g etanol/a azúcares consumidos.

#### Ácido Oxálico

El ácido oxálico es un compuesto que aparece en los hidrolizados de paja de trigo ozonizada a consecuencia de la reacción del ozono con los compuestos fenólicos procedentes de la degradación de la lignina. Se estudió el efecto inhibitorio individual del ácido oxálico en dos niveles de concentración, 4,0 y 6,5 g/L, que son las concentraciones típicas que aparecen en los hidrolizados de paja ozonizada lavada con agua y sin lavar, respectivamente. La figura 5.8a-c muestra los perfiles de concentración para el consumo de azúcares, la producción de etanol y el crecimiento celular para las concentraciones de ácido oxálico estudiadas junto con el experimento control.

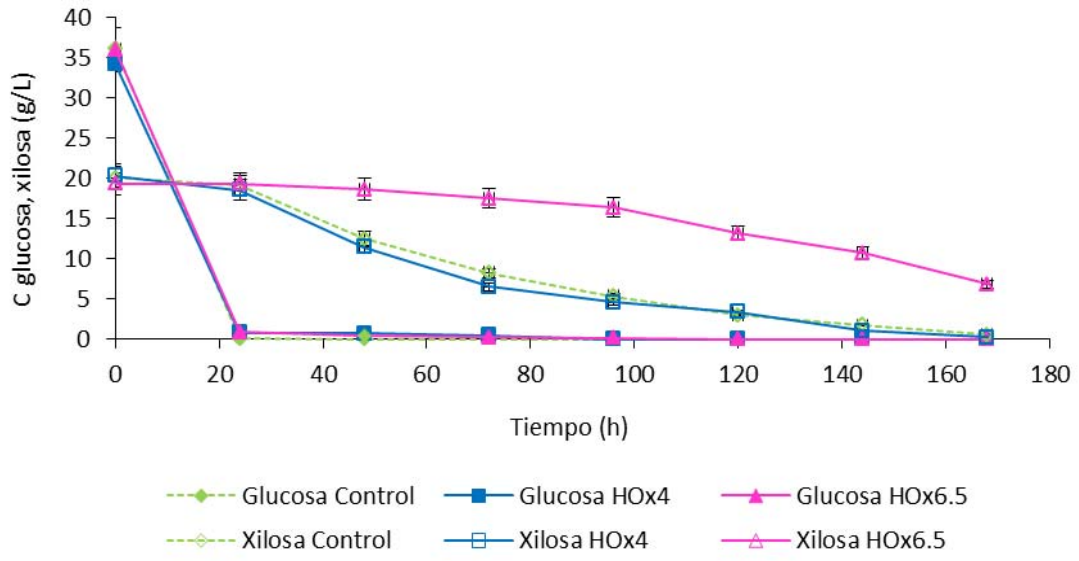


Figura 5.8a. Perfiles de concentraciones de glucosa y xilosa añadiendo ácido oxálico como inhibidor.

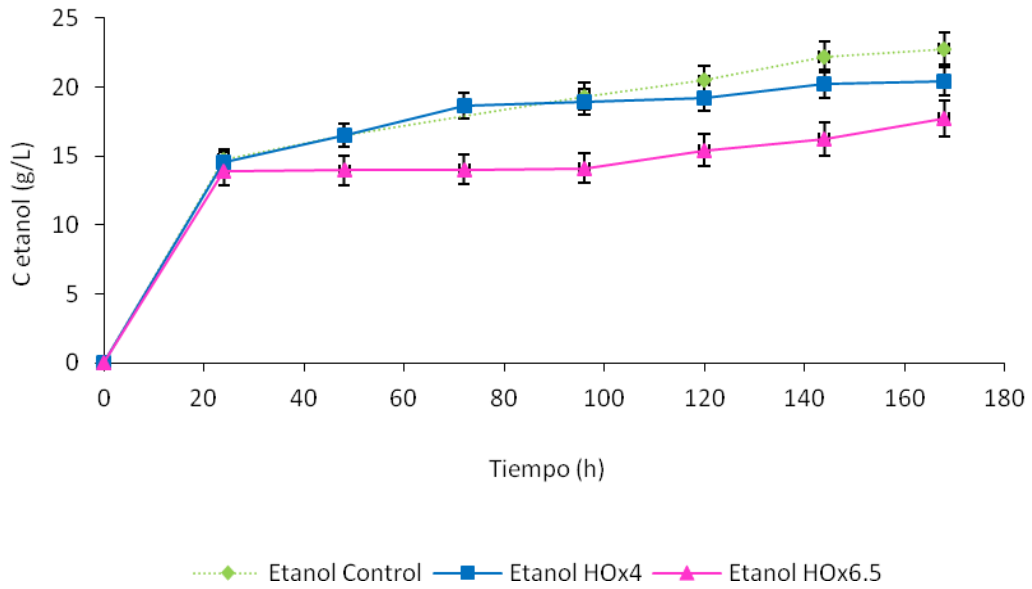


Figura 5.8b. Perfiles de concentración de etanol añadiendo ácido oxálico como inhibidor.

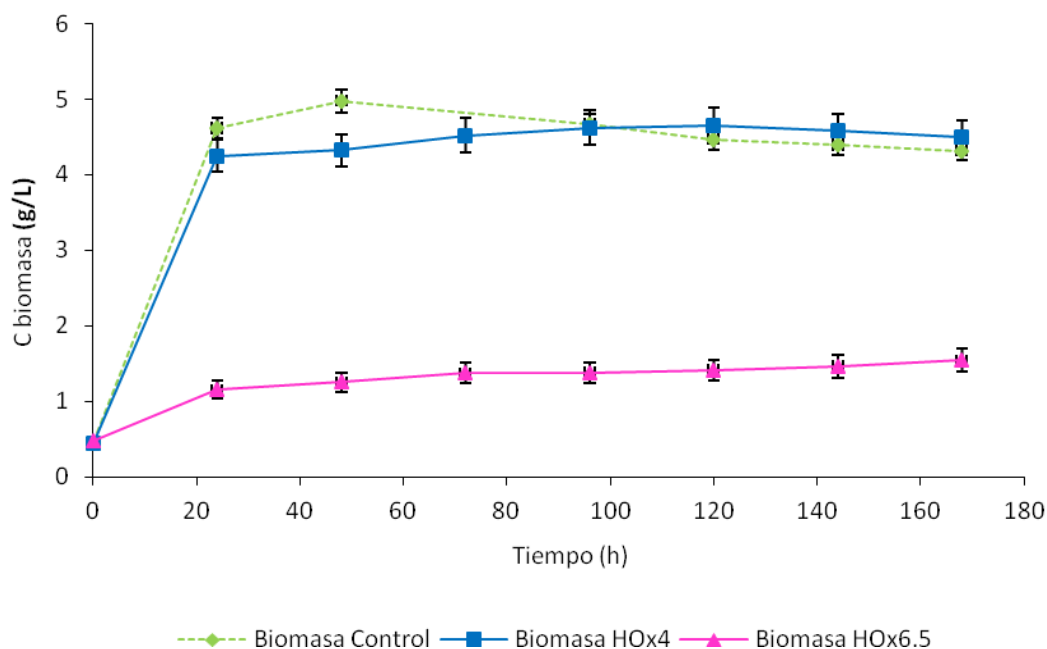


Figura 5.8c. Perfiles de concentración de biomasa añadiendo ácido oxálico como inhibidor.

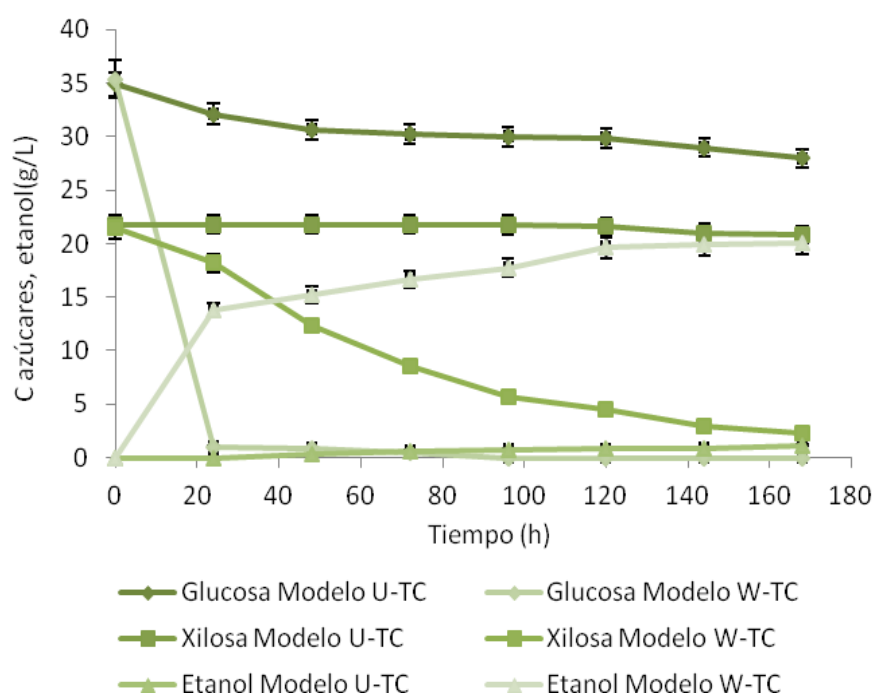
La presencia de concentraciones más elevadas de ácido oxálico en el medio ocasionaron un retardo en el consumo de xilosa, sin embargo, no se produjo ninguna alteración en el consumo de glucosa con respecto al control. Los rendimientos de etanol alcanzaron valores de un 73,2% y 68,8% para los ensayos HOx4 y HOx6.5, respectivamente. Las concentraciones de etanol que se alcanzaron fueron inferiores a las del control (22,8 g/L), siendo 20,4 y 17,7 g/L, respectivamente. El coeficiente de rendimiento de etanol en ambos casos (0,38 y 0,36 g/g) fue ligeramente inferior comparado con el del control (0,39 g/g). Por tanto, el efecto inhibitorio del ácido oxálico en el proceso de fermentación de mezclas de glucosa y xilosa usando *P. stipitis* se incrementó al elevar la concentración del compuesto en el medio, del mismo modo que ocurría con el ácido acético.

### Efecto sinérgico

Con el objetivo de estudiar el comportamiento del microorganismo *P. stipitis* en presencia de los dos inhibidores en el medio de fermentación y realizar una comparación

posterior de dicho comportamiento entre los hidrolizados de paja de trigo y los medios modelo correspondientes, se llevaron a cabo dos grupos de experimentos:

- I. Modelo U-TC; concentraciones de ácido oxálico (6,5 g/L) y ácido acético (1,5 g/L) características de los hidrolizados de paja ozonizada sin lavar.
- II. Modelo W-TC; concentraciones de ácido oxálico (4,0 g/L) y ácido acético (0,6 g/L) características de los hidrolizados de paja ozonizada lavada con agua.



1.7. Figura 5.9. Comparación del curso de la fermentación de los modelos U-TC y W-TC.

La figura 5.9 muestra los perfiles de concentración para el consumo de glucosa y xilosa, producción de etanol y crecimiento de biomasa para los dos grupos de ensayo. Para el caso del modelo U-TC, se observó una fuerte inhibición, ya que casi el 90% de los azúcares presentes no fueron fermentados. El rendimiento teórico de etanol del modelo W-TC fue ligeramente inferior al control (68,8%). Se alcanzó un rendimiento de 0,37g etanol/g azúcares, una concentración máxima de etanol de 20,0 g/L y se consumió el 100% de la glucosa y el 89% de la xilosa presente.

Comparando estos resultados con el efecto que produjo el ácido acético de forma individual se dedujo que concentraciones elevadas de ácido oxálico (6,5 g/L) ocasionaron un efecto sinérgico negativo para niveles de 1,5g ácido acético/L y que concentraciones inferiores de ácido oxálico (4,0 g/L) causaron un efecto sinérgico positivo para niveles de 0,5g ácido acético/L ya que se obtuvieron concentraciones de etanol ligeramente superiores.

#### **5.4. CONCLUSIONES**

La levadura *Pichia stipitis* presentó un comportamiento diaúxico debido a la presencia de dos sustratos, consumiendo de forma preferencial glucosa y posteriormente xilosa. Se observó que el crecimiento del microorganismo en medio aerobio se debía principalmente al consumo de glucosa, con una tasa de crecimiento específico de  $0,25 \text{ h}^{-1}$ , mientras que en el caso de la xilosa la tasa de crecimiento específico disminuyó hasta  $0,05 \text{ h}^{-1}$ . En el proceso anaerobio, el crecimiento de microorganismo fue menor y el consumo de xilosa se empezó a producir cuando la concentración de glucosa se situó entre 5,0 y 1,5 g/L.

De acuerdo con los experimentos realizados, se analizó el efecto inhibitorio individual de cada uno de compuestos presentes en los hidrolizados de paja de trigo explotada y ozonizada en el proceso de fermentación mediante *P. stipitis*.

En el caso del ácido acético, a medida que se incrementó la concentración se produjo una disminución de la concentración de etanol en el medio y crecimiento del microorganismo, siendo el proceso inhibido totalmente para una concentración de 3,5 g/L. La presencia de furfural en el medio produjo un retardo en el consumo de azúcares con la consecuente bajada de productividad de etanol y se observó una disminución de la velocidad de crecimiento celular a medida que su concentración fue superior en el medio. La presencia de HMF no tuvo efectos destacables en el rango de concentraciones estudiado (0,1 - 0,5 g/L).

La presencia de ácido oxálico provocó un retardo en el consumo de xilosa siendo más notable su efecto a mayores concentraciones, sin embargo, no afectó al consumo de glucosa.

Finalmente, la presencia de ácido acético, furfural y HMF de forma conjunta produjo un efecto sinérgico negativo observándose un efecto inhibitor superior en el consumo de sustrato. La presencia de concentraciones elevadas de ácido acético y ácido

oxálico en el medio también provocó un efecto sinérgico negativo con fuerte inhibición en el consumo tanto de glucosa como de xilosa.



## **5.5. REFERENCIAS**

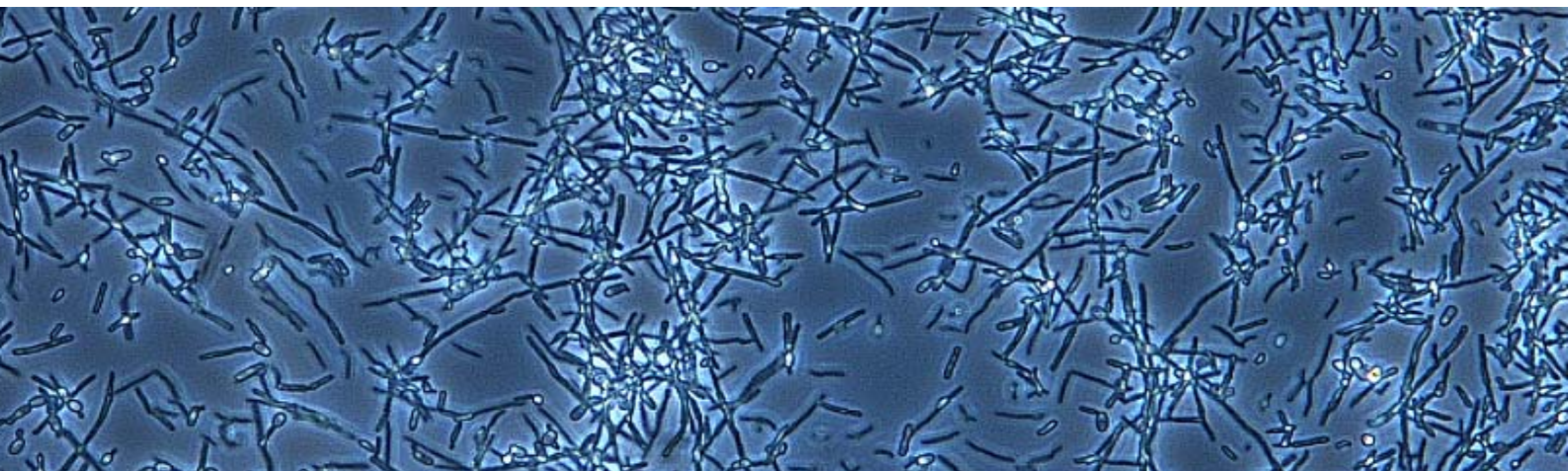
- Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G.,** 2008. "Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*." *Biotechnology Letters* 30, 1515-1524.
- Agbogbo, F.K., Wenger, K.S.,** 2006. "Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia stipitis*." *Biotechnology Letters* 28, 2065-2069.
- Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Liden, G., Gorwa-Grauslund, M.F.,** 2007. "Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82, 340-349.
- Björling, T., Lindman, B.,** 1989. "Evaluation of xylose-fermenting yeasts for ethanol production from spent sulfite liquor." *Enzyme and Microbial Technology* 11, 240-246.
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera A., Alfani.,** 2004. "Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF." *Biotechnology Progress* 20, 200-206.
- Delgenes, J.P., Moletta, R., Navarro J.M.,** 1996. "Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*." *Enzyme and Microbial Technology* 19, 220-225.
- Díaz, M.J., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., Moya, M., Castro, E.,** 2009. "Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 891-899.
- Grootjen, D.R.J., Vleesenbeek, R., Windmeijer, M.G.A., van der Lans, R.G.J.M., Luyben, K.Ch.A.M.,** 1991. "A flocculating strain of *Pichia stipitis* for the conversion of glucose/xylose mixtures." *Enzyme and Microbiology Technology* 13, 735-739.
- Klinke, H.B., Ahring, B.K., Schmidt, A.S., Thomsen, A.B.,** 2002. "Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw." *Bioresource Technology* 82, 15-26.
- Liu, Z.L., Slininger, P.J., Dien, B.S., Berhow, M.A., Kurtzman, C.P., Gorsich, S.W.,** 2004. "Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran." *Microbial Biotechnology* 8, 345-352.
- Taherzadeh, M.J., Gustafsson, L., Niklasson, C., Lidén, G.,** 2000. "Physiological effects of 5-Hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*." *Biotechnology and Bioengineering* 53, 701-708.
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Olsson, L.,** 2008. "Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains." *Biotechnology and Bioengineering* 100, 1122-1131.



## CAPÍTULO VI

# FERMENTACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO PRETRATADA:

INFLUENCIA DE LAS ETAPAS DE PRETRATAMIENTO E  
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN LA EFICIENCIA DE  
FERMENTACIÓN CON *Pichia stipitis*





## **RESUMEN**

En el presente capítulo se presentan los principales resultados del estudio de los perfiles y parámetros de fermentación de los hidrolizados de paja de trigo pretratada mediante explosión de vapor y ozonólisis. Se ha analizado la incidencia de las etapas anteriores sobre los rendimientos de obtención de etanol con respecto a los azúcares presentes en los hidrolizados y en la materia prima. Se ha observado el comportamiento del microorganismo *P. stipitis* en cuanto a velocidad de consumo de sustrato y producción de etanol, realizando un estudio comparativo entre los hidrolizados procedentes del mismo pretratamiento y entre ambos pretratamientos.

Una parte de los resultados expuestos en este capítulo han sido publicados en el siguiente artículo incluido en el Anexo I de la presente memoria:

**Bellido C., Bolado, S., Coca, M., Lucas, S., González-Benito, G., García-Cubero, M.T., 2011.** Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology* 102, 10868-10874.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.128>



## **6.1. INTRODUCCIÓN**

El aprovechamiento de todo el material procedente de las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática, junto con la fermentación de hexosas y pentosas, pueden hacer que el proceso de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica sea más atractivo económicamente (Galbe y Zacchi, 2002). El uso de una levadura como *Pichia stipitis* capaz de metabolizar tanto los azúcares de seis como de cinco carbonos presentes en la biomasa lignocelulósica (Nigam 2001; Agbogbo *et al.*, 2006, 2008), hace que la transformación biomasa-etanol sea más eficiente desde un punto de vista económico (Unrean y Nguyen, 2012).

Como se ha indicado en el capítulo anterior, algunos de los inhibidores presentes en los hidrolizados de paja de trigo explotada y ozonizada afectan al crecimiento celular de *P. stipitis* y consecuentemente a la productividad de etanol. Diferentes técnicas de detoxificación como el lavado con agua después del pretratamiento, el uso de cal o carbono activo en los hidrolizados han sido utilizados para mejorar los rendimientos de fermentación con diferentes sustratos lignocelulósicos (Kuhad *et al.*, 2010; Arslan y Eken-Saraçoğlu, 2010; Cantarella *et al.*, 2004). Estas técnicas suponen un aumento en los costes de producción debido a la utilización de equipos de lavado y filtrado, así como el uso de agua y compuestos químicos, además de la posibilidad de pérdida de sustrato azucarado. En otros casos, se ha adaptado la cepa *P. stipitis* a los compuestos tóxicos presentes para aumentar su tolerancia y de este modo poder fermentar hidrolizados sin detoxificar (Yang *et al.*, 2011). En este capítulo se ha realizado un estudio de la fermentabilidad de los hidrolizados de paja de trigo dependiendo de la fase utilizada en las etapas anteriores del proceso para observar el efecto sobre el rendimiento de la levadura *P. stipitis*.

En el capítulo se hace referencia a diferentes tipos de rendimiento, velocidad de consumo de sustrato y productividad de etanol que ya han sido definidos previamente en el Capítulo V de la presente memoria (ecs. 5.1-5.6). Además, se hace referencia a un rendimiento global de etanol con respecto al máximo teórico que podría haberse obtenido teniendo en cuenta los azúcares presentes en la materia prima (RGE) y a un

rendimiento teórico de etanol con respecto a los azúcares presentes en los hidrolizados de paja pretratada (RHE), definidos de la siguiente manera:

$$RGE = \frac{\text{etanol producido (g/100gMS)}}{0,511 \cdot \text{glucosa/xilosa presente en la paja de trigo (g/100gMS)}} \cdot 100 \quad (\text{ec. 6.1})$$

$$RHE = \frac{\text{etanol producido (g/100gMS)}}{0,511 \cdot \text{glucosa/xilosa presente en los hidrolizados (g/100gMS)}} \cdot 100 \quad (\text{ec. 6.2})$$

A continuación se muestra un esquema de los ensayos llevados a cabo:

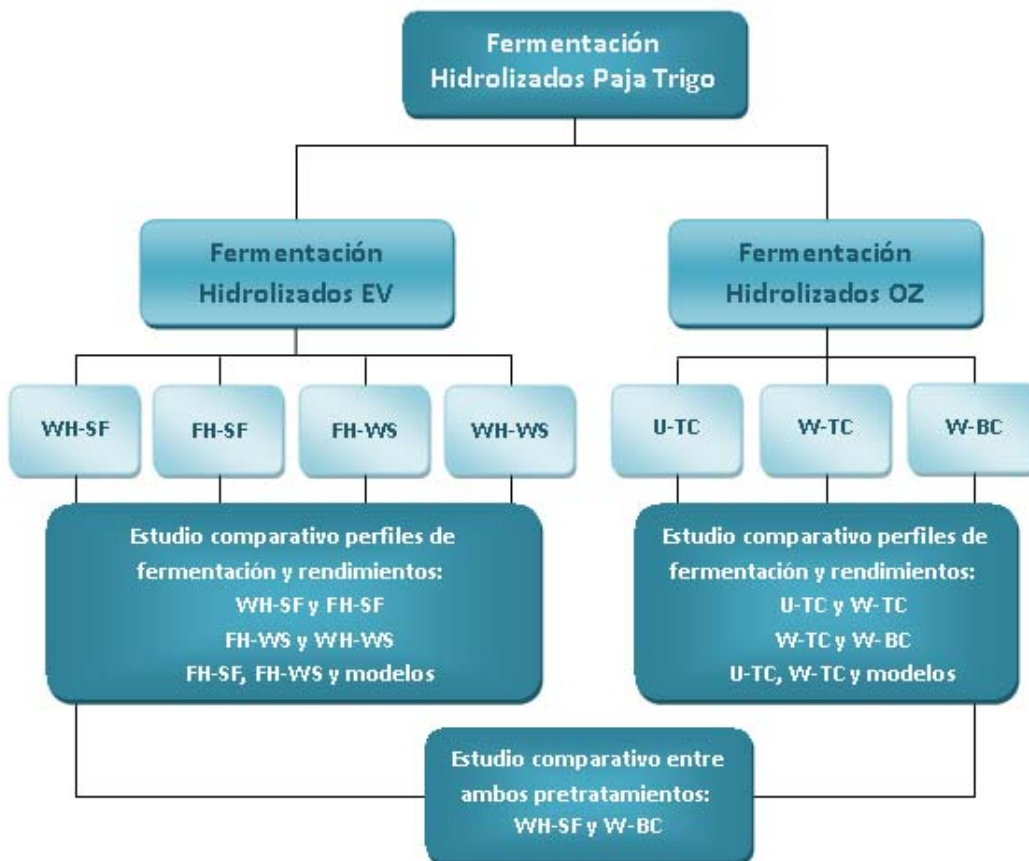


Figura 6.1. Experimentación llevada a cabo para fermentación de hidrolizados de paja de trigo pretratada

En el caso de la fermentación de los hidrolizados de paja de trigo pretratada con EV, se realizaron diferentes ensayos utilizando tanto la fase sólida como el material



completo de la EV en la etapa de hidrólisis enzimática, y tanto la fase líquida como todo el hidrolizado para los procesos de fermentación, por lo que se obtuvieron cuatro grupos de experimentos dependiendo de la fase empleada:

- Los experimentos del grupo WH-SF (whole hydrolysate – solid fraction) se corresponden con las fermentaciones de la fase sólida de la explosión de vapor y de todo el hidrolizado de la sacarificación.
- Los experimentos del grupo FH-SF (filtered hydrolysate – solid fraction) se corresponden con las fermentaciones de la fase sólida de la explosión de vapor y la fase líquida de la hidrólisis enzimática.
- Los experimentos del grupo WH-WS (whole hydrolysate – whole slurry) se corresponden con las fermentaciones de la fase sólida junto con la fase líquida procedente tanto de la explosión de vapor como de la hidrólisis enzimática.
- Los experimentos del grupo FH-WS (filtered hydrolysate – whole slurry) se corresponden con las fermentaciones de fase sólida junto con la fase líquida de la explosión de vapor y la fase líquida de la hidrólisis enzimática.

En el caso de la fermentación de paja de trigo pretratada con ozono también se realizaron diferentes ensayos dependiendo de las condiciones empleadas en las etapas anteriores. Se realizaron fermentaciones de hidrolizados de paja de trigo ozonizada sin lavar y lavada con agua después del pretratamiento; así como de la paja lavada procedente de toda la columna del equipo de OZ o de la parte inferior únicamente:

- Los experimentos del grupo U-TC (Unwashed straw – total column) se corresponden con las fermentaciones de todo el hidrolizado utilizando la paja de trigo sin lavar procedente de toda la columna del pretratamiento de OZ.
- Los experimentos del grupo W-TC (washed straw – total column) se corresponden con las fermentaciones de todo el hidrolizado utilizando la paja de trigo lavada procedente de toda la columna.
- Los experimentos del grupo W-BC (washed straw – bottom column) se corresponden con las fermentaciones de todo el hidrolizado utilizando la paja de trigo lavada procedente de la parte inferior de la columna.

En este caso todos los ensayos de fermentación fueron llevados a cabo con todo el hidrolizado procedente de la etapa de sacarificación.

Se ha realizado la comparación de los hidrolizados procedentes de un mismo pretratamiento con sus modelos correspondientes, y entre los procesos de fermentación más eficientes de los hidrolizados procedentes de la explosión de vapor y ozonólisis.

## 6.2. METODOLOGÍA

### 6.2.1 FERMENTACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE CEREAL SOMETIDA A EXPLOSIÓN DE VAPOR

Para el estudio de las fermentaciones de los hidrolizados de paja pretratada de los grupos WH-SF y WH-WS se utilizaron los mismos reactores que los utilizados para la hidrólisis enzimática (Capítulo IV) en los cuales el microorganismo *P. stipitis* se inoculó al 10% (v/v) directamente en el reactor después de un proceso de pasteurización a 80°C y 30 minutos para proveer condiciones estériles. Las condiciones del proceso fueron: 30°C de temperatura, 175 revoluciones por minuto mediante agitación mecánica y pH 5 reajustado con disoluciones de NaOH y HCl 2M. El proceso de fermentación de los grupos FH-SF y FH-WS, en los cuales se filtró el hidrolizado procedente de la etapa sacarificación, la fase líquida resultante se fermentó en recipientes de vidrio encapsulados (penicilin flasks) de 125mL utilizando incubadores orbitales en las mismas condiciones anteriormente descritas. En este caso, el medio también se sometió a un proceso de pasteurización tras el cual se inoculó al 10% (v/v). Se tomaron muestras cada 24 horas durante 120 horas y cada grupo de ensayo se realizó por duplicado.

En la tabla 6.1 se muestra la composición media inicial de azúcares y compuestos inhibidores para los cuatro grupos de experimentos.

Nombre del experimento	Concentración inicial de azúcares (g/L)		Concentración inicial de inhibidores (g/L)		
	Glucosa	Xilosa	Ácido acético	Furfural	HMF
WH-SF	23,48 ± 0,72	6,21 ± 0,35	0,52 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
FH-SF	22,64 ± 0,54	5,84 ± 0,54	0,48 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
FH-WS	23,77 ± 1,02	11,29 ± 0,36	1,52 ± 0,08	0,14 ± 0,03	0,05 ± 0,01
WH-WS	23,23 ± 0,97	11,32 ± 0,68	1,56 ± 0,07	0,16 ± 0,02	0,05 ± 0,01

Tabla 6.1. Composición media inicial de azúcares y compuestos inhibidores en los hidrolizados de paja de trigo explotada.

### 6.2.2. FERMENTACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE CEREAL SOMETIDA A TRATAMIENTO CON OZONO

El proceso de fermentación de los grupos U-TC, W-TC y W-BC se llevó a cabo en el mismo tipo de reactor y condiciones de operación que los grupos WH-SF y WH-WS.

En la tabla 6.2 se muestra la composición inicial de azúcares e inhibidores para los tres grupos de experimentos.

Nombre del experimento	Concentración inicial de azúcares (g/L)		Concentración inicial de inhibidores (g/L)	
	Glucosa	Xilosa	Ácido acético	Ácido oxálico
U-TC	19,63 ± 0,74	9,92 ± 0,48	1,55 ± 0,06	6,39 ± 0,4
W-TC	17,58 ± 0,69	7,32 ± 0,29	0,72 ± 0,11	3,63 ± 0,3
W-BC	19,32 ± 0,87	8,65 ± 0,32	0,73 ± 0,10	4,26 ± 0,05

Tabla 6.2. Composición media inicial de azúcares y compuestos inhibidores en los hidrolizados de paja de trigo ozonizada.

### **6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **6.3.1. FERMENTACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO EXPLOTADA.**

##### Influencia de la fase utilizada en el proceso de fermentación

Los experimentos WH-WS y FH-WS se llevaron a cabo utilizando el material completo de la explosión de vapor y fermentando todo el hidrolizado o la fase líquida exclusivamente. La figura 6.2a-b muestra los perfiles de concentración de glucosa, xilosa y etanol del proceso de fermentación de los hidrolizados WH-WS y FH-WS durante 168 horas. En los experimentos FH-WS, se aprecia una reducción en la velocidad de consumo de glucosa y total inhibición de consumo de xilosa debido a la presencia de compuestos tóxicos (ácido acético 1,52 g/L, furfural 0,14 g/L y HMF 0,05 g/L), repercutiendo en la productividad de etanol. Se alcanzó una concentración de etanol de 9,1 g/L correspondiente con un rendimiento sobre el teórico del 50,9% y 0,42g/g sobre el consumo de azúcares. Al utilizar todo el hidrolizado (WH-WS), se observó inhibición completa al no producirse etanol ni consumo de azúcares. Se aprecia una ligera disminución de la concentración de glucosa durante las primeras 24 horas que se correspondió con un ligero crecimiento del microorganismo en el medio. A la vista de los resultados, se puede concluir que la presencia de sólidos junto con un medio en el que están presentes compuestos tóxicos provocó un efecto sinérgico que afecta al metabolismo de la levadura *Pichia stipitis* inhibiendo el consumo de azúcares.

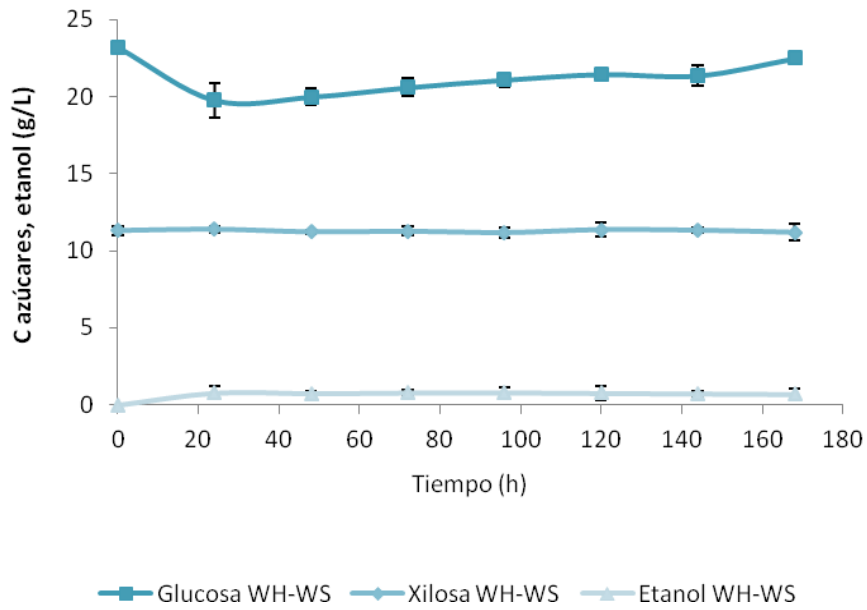


Figura 6.2a. Perfil de concentración de azúcares y etanol para el grupo WH-W.

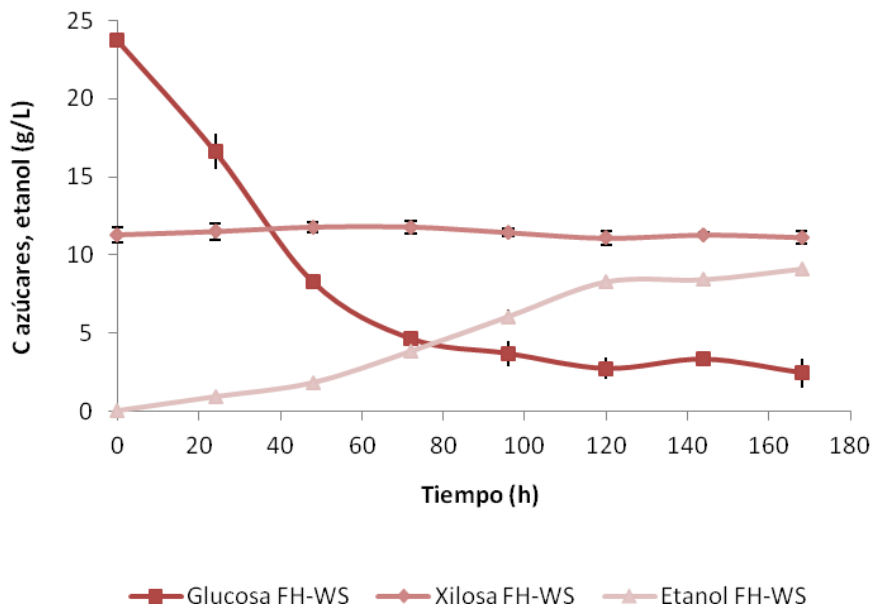


Figura 6.2a. Perfil de concentración de azúcares y etanol para el grupo FH-W.

La figura 6.3a-b muestra los perfiles de concentración de glucosa, xilosa y etanol del proceso de fermentación de los hidrolizados WH-SF y FH-SF durante 168 horas. En los hidrolizados WH-SF, *Pichia stipitis* consumió casi la totalidad de los azúcares presentes,

alcanzando una concentración media de etanol de 12,2 g/L, a partir de 23,5 g/L de glucosa y 6,2 g/L de xilosa. Como se observa en la figura, quedaron en el medio 2,5 g/L de xilosa residual que no se consumió debido a la presencia de ácido acético en una concentración de 0,5 g/L que inhibe parcialmente el consumo de xilosa como ya se había estudiado en la fermentación de medios modelo. El rendimiento de etanol sobre los azúcares consumidos fue de 0,45 g/g, con un 80,2% de rendimiento sobre el teórico, que puede considerarse relativamente alto para un microorganismo capaz de fermentar glucosa y xilosa. También se obtuvieron buenos resultados en los hidrolizados FH-SF alcanzando un 77,3% de rendimiento sobre el teórico, con una concentración máxima de etanol de 11,3 g/L y un rendimiento de 0,42 g/g sobre el consumo de azúcares (glucosa y xilosa). En este caso, la concentración de ácido acético es baja y la presencia de la fase sólida no afecta negativamente al proceso de fermentación de la levadura *Pichia stipitis*.

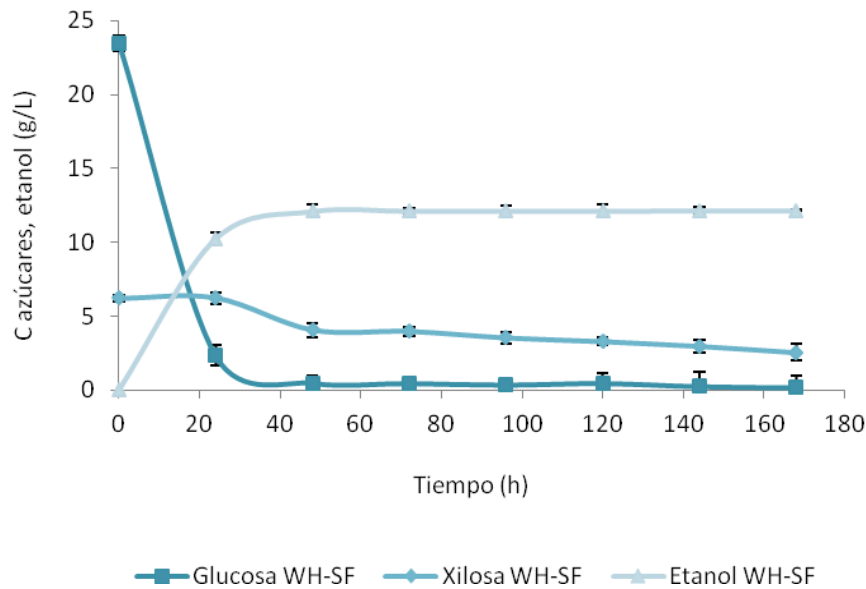


Figura 6.3a. Perfil de concentración de azúcares y etanol para el grupo WH-SF.

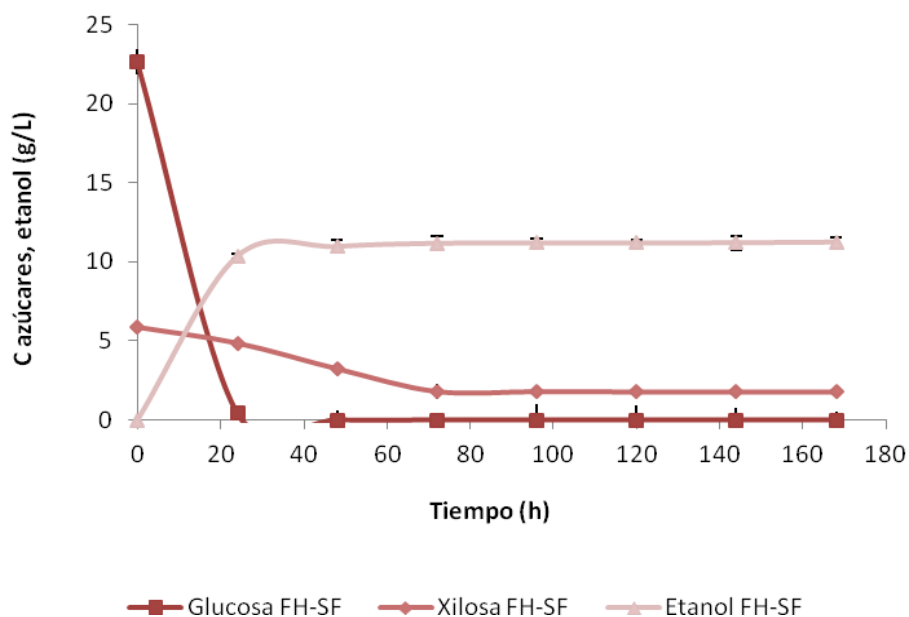


Figura 6.3b. Perfil de concentración de azúcares y etanol para el grupo FH-SF.

En la bibliografía se reseñan rendimientos similares que fueron obtenidos a partir de la fermentación de materiales lignocelulósicos como la cáscara de avellana, sometida a un proceso de delignificación con una disolución al 3% de NaOH cuyos hidrolizados fueron detoxificados y fermentados con *Pichia stipitis* obteniendo rendimientos de 0,449g de etanol/g azúcares (Arslan y Saraçoglu, 2010). Otros autores alcanzaron rendimientos inferiores (0,29 g/g) a partir de hidrolizados de bagazo detoxificados (Buaban *et al.*, 2010). En el caso de otras levaduras modificadas genéticamente para permitir el consumo de pentosas como *S. cerevisiae* F12, también se observó un efecto inhibitorio debido a la presencia de compuestos tóxicos típicos de los hidrolizados de paja de trigo explotada dando lugar a una fase de retardo en el crecimiento celular y consecuentemente retrasando el consumo de azúcares. Los rendimientos de etanol obtenidos experimentalmente a partir de glucosa y xilosa fueron 0,46 g/g y 0,26 g/g, respectivamente (Tomás-Pejó *et al.*, 2008).

En la figura 6.4 se muestra en forma de diagrama de barras de las concentraciones finales de glucosa, xilosa y etanol procedentes de los ensayos de fermentación de los hidrolizados FH-SF y FH-WS y sus correspondientes modelos en medio sintético. Como se



observa, *Pichia stipitis* se comportó de manera similar tanto en los hidrolizados reales como en los modelos. En el caso del grupo de ensayos FH-WS, en el que están presentes los inhibidores procedentes de la EV, la concentración y productividad de etanol fueron similares al modelo (9,1 g/L etanol y 0,46 g/g), lo que indica que probablemente no existieron otros compuestos tóxicos en concentración considerable en el líquido del pretratamiento que pudieran tener un efecto inhibitorio en el proceso de fermentación.

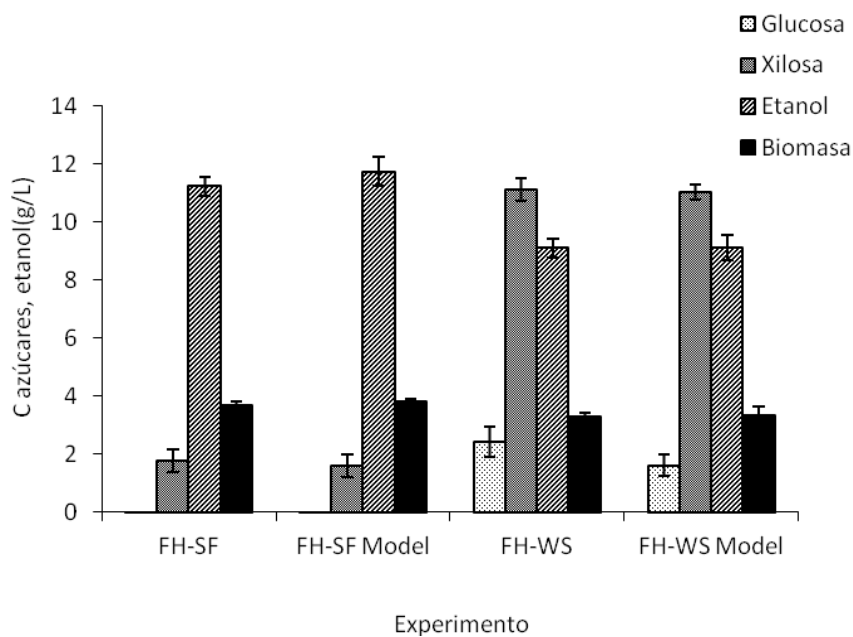


Figura 6.4. Concentraciones finales de azúcares y etanol en FH-SF, FH-WS y sus modelos.

La utilización de todo el material procedente del pretratamiento y de la hidrólisis enzimática de la paja de trigo explotada supone una limitación para *P. stipitis*, ya que no fue capaz de fermentar todos los azúcares potencialmente fermentables obtenidos en el proceso. Los inhibidores presentes en el líquido de la explosión afectaron al crecimiento celular, redujeron la velocidad de consumo de glucosa e impidieron el aprovechamiento de xilosa. Sin embargo, *P. stipitis* alcanzó altos rendimientos de producción de etanol, consumiendo tanto glucosa como xilosa, al utilizar únicamente la fase sólida procedente de la explosión de vapor. Métodos como la utilización de hidróxido de calcio o carbón activo han sido utilizados para la detoxificación de hidrolizados procedentes de biomasa lignocelulósica pretratada (Kuhad *et al.*, 2010, Arslan y Eken-Saraçoğlu, 2010, Cantarella *et al.*, 2004). El uso de levaduras adaptadas para conseguir una elevada tolerancia a

compuestos inhibidores derivados de los pretratamientos de biomasa lignocelulósica es otro método empleado para aumentar el aprovechamiento de azúcares fermentables y evitar pérdidas de material pretratado (Huang *et al.*, 2009). En el caso de la levadura *P. stipitis*, otras técnicas como el aporte limitado de oxígeno favorece la asimilación de compuestos como el ácido acético, furfural y HMF, mejorando la velocidad de consumo de azúcares, principalmente de pentosas (Agbogbo *et al.*, 2007).

Comparación de rendimientos globales de producción de etanol

Con la finalidad de adquirir una idea general de la eficiencia del proceso dependiendo de la fase empleada en la fermentación, la figura 6.5 muestra una comparación de rendimientos globales con respecto al máximo teórico de etanol que podría haberse obtenido de la fracción celulósica y hemicelulósica presentes en la materia prima, expresados en tanto por ciento (RGE). Además, se muestra los gramos de etanol por cada 100g de materia prima y el rendimiento teórico de etanol con respecto a los azúcares presentes en el hidrolizado en tanto por ciento (RHE)

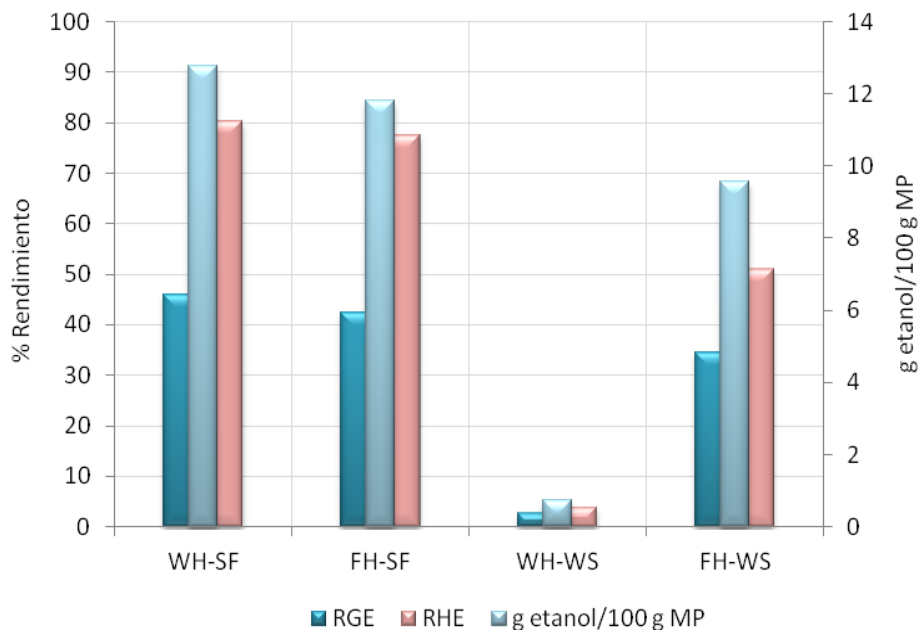


Figura 6.5. Rendimientos de obtención de etanol.

El rendimiento máximo obtenido fue de 12,8g etanol/100g MP, que se corresponde con un 80,2% sobre el máximo teórico de etanol a partir de los azúcares presentes en el hidrolizado y un 45,9% sobre todos los azúcares potencialmente fermentables en la materia prima (glucosa y xilosa). Los rendimientos globales de etanol son comparables a los obtenidos con levaduras como *K. marxianus* a partir de hidrolizados de paja de trigo pretratada con explosión de vapor, en torno a los 10-12 g etanol/100g MP (Ballesteros *et al.*, 2006).

### **6.3.2. FERMENTACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO OZONIZADA.**

#### Fermentación de paja ozonizada sin lavar

En los hidrolizados de paja procedente del pretratamiento con ozono que no fue sometida a un proceso de lavado, la presencia de ácido oxálico y ácido acético en un rango de concentraciones 5,5 - 7,5 g/L y 1,3 - 1,8 g/L, respectivamente, supuso una limitación en el proceso de fermentación.

#### Influencia de la etapa de lavado después del pretratamiento

El lavado con agua fría de paja ozonizada se realizó para eliminar compuestos tóxicos que afectaron al comportamiento de la levadura. La figura 6.6 muestra una comparación entre los perfiles de concentración de glucosa, xilosa y etanol para los grupos U-TC y W-TC.

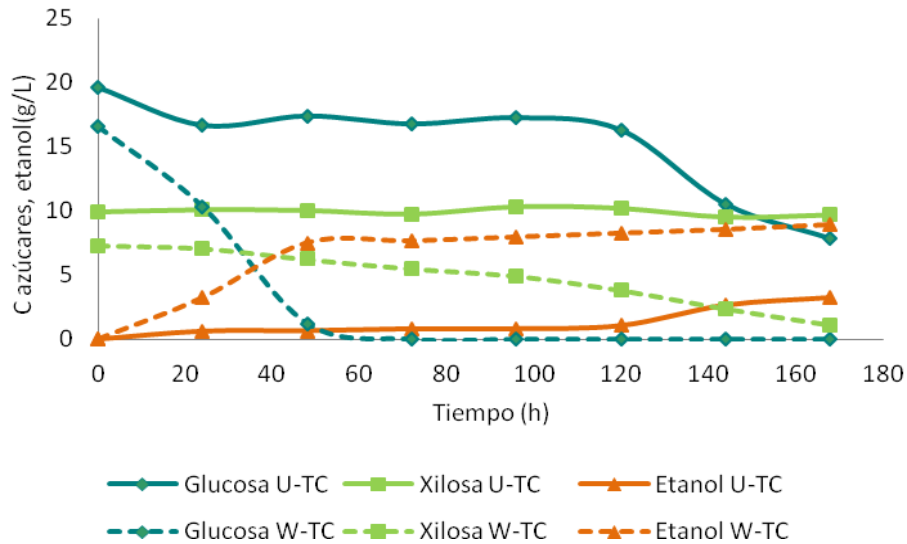


Figura 6.6. Comparación entre paja ozonizada lavada y sin lavar.

Para los hidrolizados en los cuales la paja ozonizada no había sido lavada (U-TC), la levadura experimentó una fase de retardo en el consumo de glucosa de 120 horas aproximadamente. Consecuentemente, no se observó producción de etanol de forma considerable hasta las 144 horas de proceso y la concentración de xilosa se mantuvo constante durante todo el tiempo de ensayo. El proceso de asimilación de ácido acético en el metabolismo de la levadura *P. stipitis*, junto con la presencia de elevadas cantidades de ácido oxálico fue la causa de esta amplia fase de retardo. La concentración de ácido acético disminuyó desde una concentración media inicial de 1,5 g/L hasta 0,8 g/L en un tiempo de 120 horas, momento en el cual la levadura empezó a fermentar glucosa presente en el medio con una velocidad de consumo moderada. Teniendo en cuenta los ensayos realizados con anterioridad en medio sintético, la presencia de ácido acético en concentraciones similares provocó una reducción en la velocidad de consumo de glucosa sin fase de retardo y total inhibición en el consumo de xilosa. Al añadir al medio una concentración inicial de 6,5 g/L de ácido oxálico, se produjo una fuerte inhibición en el consumo de glucosa. El hecho de que la concentración inicial de glucosa en el hidrolizado fuera inferior (19,6 g/L) que en el medio sintético (34,2 g/L) pudo ser una de las causas de su consumo a velocidad moderada al final del proceso.

### Fermentación de hidrolizados de paja ozonizada lavada: Influencia del frente de reacción en el pretratamiento

Al comparar los perfiles de fermentación de los hidrolizados de paja ozonizada lavada procedente de toda la columna y de la parte inferior (figura 6.7), se observaron diferencias en cuanto a la concentración final de etanol alcanzada, debido a la presencia de mayores concentraciones de azúcares fermentables, siendo 8,9 y 9,8 g/L, respectivamente. En trabajos anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (García- Cubero *et al.*, 2012), se puso de manifiesto que la exposición a ozono es irregular en un reactor de lecho fijo y los rendimientos de liberación de azúcares dependen de la zona donde se encuentre la paja de trigo en el reactor. El rendimiento de etanol obtenido fue 0,38 g/g, que se corresponde con un 70,2% sobre el teórico, en el caso de paja procedente de toda la columna, aumentando hasta 0,42 g/g (69,1%) cuando se empleó paja de trigo con un nivel de exposición a ozono superior. La velocidad de consumo de azúcares fue comparable en ambos casos, ya que las pendientes fueron paralelas. La velocidad de consumo de xilosa fue relativamente baja y *P. stipitis* no fue capaz de consumir toda la xilosa presente en las 168 horas de fermentación. En el grupo de ensayo W-BC se consumieron 5,1 g/L de los 8,7 g/L presentes inicialmente, mientras que en el grupo W-TC, al partir de una concentración inferior de xilosa (7,3 g/L) se consumió casi en su totalidad (1,2 g/L remanentes).

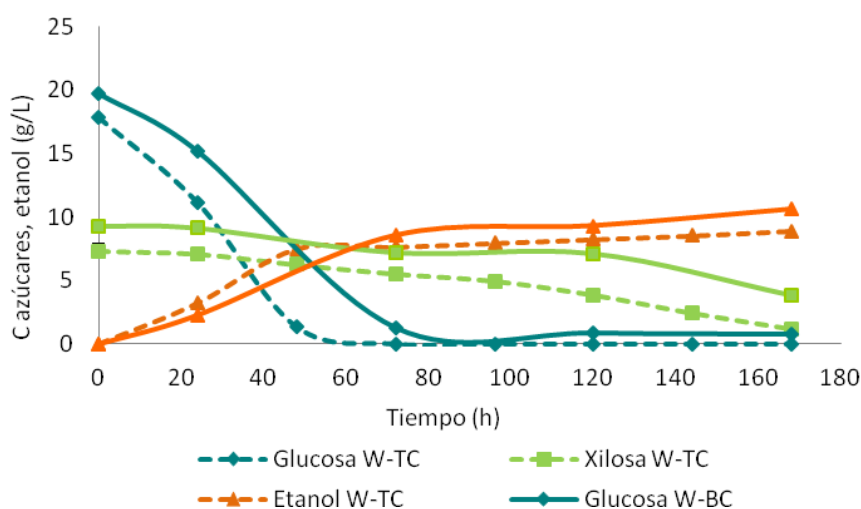


Figura 6.7. Comparación entre paja ozonizada lavada procedente de toda la columna y de la parte inferior.

Comparación de rendimientos globales de producción de etanol

Del mismo modo que en el apartado anterior, la figura 6.8 muestra los rendimientos globales de obtención de etanol con respecto a los azúcares presentes en la materia prima y los liberados en el hidrolizado de paja de trigo ozonizada (RGE y RHE). Los mejores resultados se obtuvieron en el caso de la paja de trigo procedente de la parte inferior de la columna, donde el ozono tiene mayor incidencia, alcanzando 10,6g etanol/100 g MP, lo que supuso un rendimiento del 69,1% con respecto al teórico de etanol teniendo en cuenta los azúcares presentes en el hidrolizado y un porcentaje de conversión global del 38,1%. Ligeramente inferiores fueron las concentraciones alcanzadas en el caso de la paja procedente de toda la columna, 9,6g etanol/100 g MP. En este caso, el rendimiento de conversión global disminuyó levemente hasta un 34,4% y el rendimiento teórico de etanol se mantuvo en 70,2%. En el caso de la paja no lavada, los rendimientos fueron notablemente inferiores, mostrando evidencia de la necesidad del lavado con agua después del pretratamiento con ozono para que tenga lugar la fermentación con *P. stipitis*.

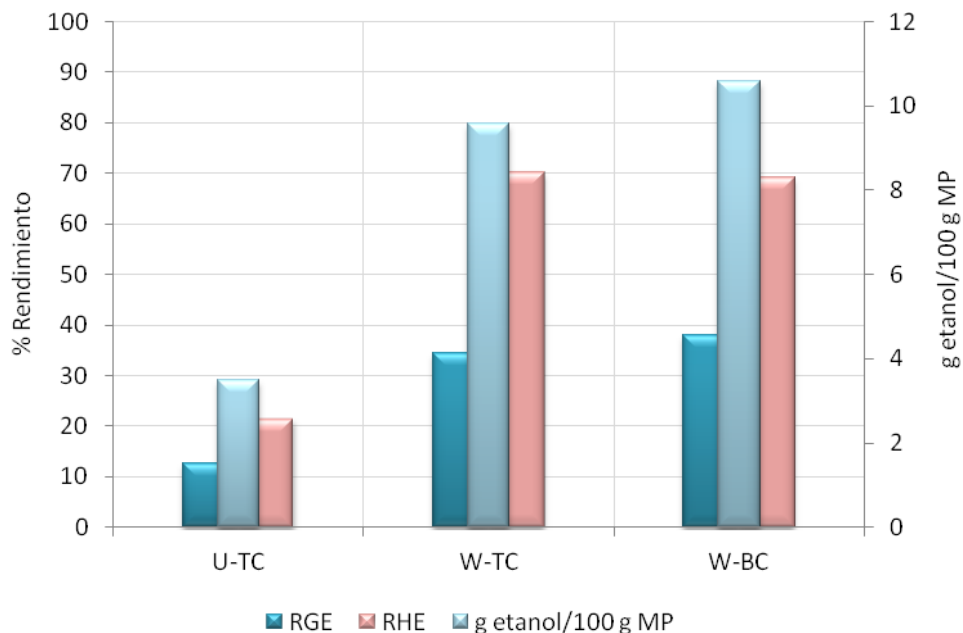


Figura 6.8. Rendimientos de obtención de etanol

### 6.3.3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE AMBOS PRETRATAMIENTOS

Los mejores resultados obtenidos para cada pretratamiento fueron los correspondientes a la fermentación de los hidrolizados WH-SF, en el caso de la EV, y de los hidrolizados W-BC, en el caso de la OZ. La tabla 6.3 muestra el coeficiente de rendimiento de etanol ( $Y_{p/s}$ ), el rendimiento de etanol sobre el teórico (RTE) y la concentración máxima de etanol lo que permite comparar la eficiencia de fermentación en ambos casos.

Ensayo	Parámetros				
	C glucosa (g/L)	C xilosa (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)	RTE (%)	$C_{m\acute{a}x}$ etanol (g/L)
W-BC (OZ)	19,32 ± 0,87	8,65 ± 0,32	0,42	69,0	9,9 (168h)
WH-SF (EV)	23,48 ± 0,72	6,21 ± 0,35	0,45	80,2	12,2 (168h)

Tabla 6.3. Comparación de parámetros de fermentación entre ambos pretratamientos.

Como se observa en la tabla, el mejor pretratamiento para la obtención de etanol resultó ser la explosión de vapor, ya que permitió obtener mejores rendimientos y concentraciones máximas de etanol, en parte porque la concentración de azúcares presentes en el medio fue superior después de la etapa de hidrólisis enzimática.

### 6.3.4. JUSTIFICACIÓN DE LA ESTRATEGIA DE OPERACIÓN

Todos los ensayos de hidrólisis y fermentación descritos en este capítulo se han realizado de manera secuencial en el mismo reactor (SHF). Esta estrategia presenta como principales ventajas que pueden alcanzarse las condiciones óptimas en cada una de las etapas y la posibilidad de reciclaje de células. La principal desventaja con respecto al proceso de hidrólisis y fermentación simultáneas (SSF) es el aumento de costes al llevar a cabo el proceso en dos pasos y la acumulación de glucosa y celobiosa inhibiendo la actividad de las celulasas (Olsson *et al.*, 2005). No obstante, el uso de condiciones óptimas de pH y temperatura en cada una de las etapas fue esencial para alcanzar buenos rendimientos de fermentación de glucosa y xilosa utilizando *P. stipitis*.

Para seleccionar la estrategia de hidrólisis y fermentación más apropiada se llevó a cabo una la comparación de los resultados obtenido operando de forma secuencial (SHF) o realizando ensayos de SSF. Se realizaron ensayos de hidrólisis y fermentación simultáneas (SSF) con una etapa de prehidrólisis inicial de 12 horas para disminuir la viscosidad del medio. La experimentación se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

- Contenido en paja de trigo: 10% (w/v); procedente de la fase sólida de ambos pretratamientos.
- Temperatura: 32°C; máxima temperatura de trabajo viable para *P. stipitis* en SSF (Rudolf *et al.*, 2007)
- pH: 5 o 6; niveles de pH estudiados para *P. stipitis* en SSF.
- Agitación: 175 rpm; agitación mecánica
- Dispositivo experimental: Tanque vidrio 250mL.
- Carga enzimática: Celulasa 16 FPU/g MS y  $\beta$ -glucosidasa 11 CBU/g MS
- Inóculo: 0,5g células/L

En la tabla 6.4 se presentan las concentraciones de glucosa y xilosa obtenidas después de 12 horas de prehidrólisis a 50°C y la concentración de etanol en un tiempo de 72 horas de SSF. Se observa una mayor actividad enzimática durante el proceso de prehidrólisis a pH 5, ya que las concentraciones de azúcares alcanzadas son mayores tanto para paja explotada como ozonizada. El proceso SSF de paja explotada a pH 6 obtuvo concentraciones mayores de etanol que a pH 5, del mismo modo que ocurrió con la paja ozonizada. Por tanto, realizando el proceso de SSF en estas condiciones, 32°C y baja carga enzimática, la liberación de azúcares no mejora de la manera esperada debido a que la temperatura empleada es demasiado baja y la actividad enzimática no es suficiente para llevar a cabo el proceso con rendimientos aceptables



Experimento	pH	Glucosa 12h (g/L)	Xilosa 12h (g/L)	Etanol 72h (g/L)
SSF_EV	5	14,0	4,6	7,2
SSF_EV	6	12,0	1,8	8,8
SSF_OZ	5	7,8	3,6	4,5
SSF_OZ	6	6,0	3,5	7,0
Experimento	pH	Glucosa 72h (g/L)	Xilosa 72h (g/L)	Etanol 168h (g/L)
SHF_EV	5	23,5	6,2	12,2
SHF_OZ	5	19,3	8,7	9,9

Tabla 6.4. Comparación de concentraciones de glucosa, xilosa y etanol entre las diferentes estrategias de operación.

A la vista de los resultados, se concluye que para ambos pretratamientos, la estrategia de sacarificación y fermentación que conduce a los mejores rendimientos de etanol es la secuencial.

#### **6.4. CONCLUSIONES**

La eficiencia de fermentación con la levadura *P. stipitis* depende de la fase utilizada después de las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática de paja pretratada con explosión de vapor. Los mejores resultados fueron obtenidos al utilizar únicamente la fracción sólida procedente del pretratamiento sin realizar una etapa de filtrado después del proceso de hidrólisis alcanzando rendimientos considerablemente altos (0,45g etanol/g azúcares consumidos). En estas condiciones, se alcanzó una concentración máxima de 12,8g etanol/100g MP, lo que supone un rendimiento de 80,2% de conversión de los azúcares presentes en el hidrolizado y un 45,9% global con respecto a la materia prima.

Al utilizar todo el material procedente del pretratamiento (EV), se produjo inhibición completa debido a la presencia de inhibidores aunque *P. stipitis* fue capaz de metabolizar glucosa cuando se utilizó únicamente la fase líquida después de la etapa de hidrólisis, ya que al eliminar el sólido del medio se favorecen los mecanismos de transferencia de materia. En las condiciones de operación descritas en el presente capítulo, la levadura *P. stipitis* no es capaz de metabolizar todos los azúcares liberados, y por tanto no se pudo aprovechar todo el material procedente de la etapa de explosión de vapor.

Al comparar resultados entre medios modelo e hidrolizados se constata que no existen otros compuestos tóxicos en concentración considerable en el líquido de la explosión de vapor que pudiera afectar al rendimiento de la levadura *P. stipitis*. El ácido acético, furfural y HMF presentes en la fase líquida obtenida después del pretratamientos afectaron al crecimiento celular, redujeron la velocidad de consumo de glucosa e impidieron la utilización de xilosa por parte la levadura *P. stipitis*.

La etapa de lavado después del pretratamiento con ozono permitió eliminar la fase de retardo en el consumo de sustrato provocada por la presencia de ácido acético y ácido oxálico, a expensas de una concentración ligeramente inferior de azúcares fermentables.

Los mejores resultados fueron obtenidos al emplear paja pretratada lavada procedente de la parte inferior de la columna alcanzando rendimientos relativamente altos (0,42g etanol/g azúcares consumidos), aunque *P. stipitis* no fue capaz de consumir toda la xilosa presente. En estas condiciones, se alcanzó una concentración máxima de 10,6g etanol/100g MP, lo que supone un rendimiento de 69,1% de conversión de los azúcares presentes en el hidrolizado y un 38,1% global con respecto a la materia prima. Aunque los rendimientos cuando se utilizó todo el material, fueron ligeramente inferiores (9,6g etanol/100g MP, 0,38 g/g), no se produjo pérdida de biomasa pretratada y se aprovechó casi la totalidad de la fracción hemicelulósica hidrolizada.

Comparando los resultados de ambos pretratamientos, la explosión de vapor ofreció concentraciones más altas de etanol, aunque en términos de aprovechamiento de material pretratado, la ozonólisis permite un uso más eficiente.

De acuerdo con los experimentos realizados, la mejor estrategia de operación cuando se utiliza *P. stipitis*, es un proceso de hidrólisis y fermentación de manera secuencial, que permite la obtención de concentraciones superiores de etanol.

## **6.5. REFERENCIAS**

**Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G.,** 2008. "Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*." *Biotechnology Letters* 30, 1515-1524.

**Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K., Jeffries, T.W.,** 2007. "The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stipitis*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136-140, 653-662.

**Agbogbo, F.K., Wenger, K.S.,** 2006. "Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia stipitis*." *Biotechnology Letters* 28, 2065-2069.

**Arslan, Y., Eken-Saraçoglu, N.,** 2010. "Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia stipitis* to ethanol." *Bioresource Technology* 101, 8664-8670.

**Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M.,** 2006. "Ethanol production from steam-explosion pretreatment wheat straw." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 6, 129-132.

**Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V., Pichyangkura, R., Rengpipat, S., Eurwilaichitr, L.,** 2010. "Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 110, 18-25.

**Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera A., Alfani.,** 2004. "Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF." *Biotechnology Progress* 20, 200-206.

**Galbe, M. Zacchi, G.,** 2002. "A review of the production of ethanol from softwood." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 59, 609-617.

**García-Cubero, M.T., Palacín, L.G., González-Benito, G., Bolado, S., Lucas, S., Coca, M.,** 2012. "An analysis of lignin removal in a fixed bed reactor by reaction of cereal straws with ozone." *Bioresource Technology* 107, 229-234.

**Huang, C.F., Lin, T.H., Guo, G.L., Hwang, W.S.,** 2009. "Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*." *Bioresource Technology* 100, 3914-3920.

**Kuhad, R.C., Gupta, R., Khasa, Y.P., Singh, A.,** 2010. "Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): Pretreatment, saccharification and fermentation." *Bioresource Technology* 101, 8348-8354.

**Nigam, J.N.,** 2001. "Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*." *Journal of Biotechnology*. 87, 17-27.

**Olsson L., Jørgensen H., Krogh K.B.R., Roca, C.,** 2005. "Bioethanol production from lignocellulosic material." En: "Polysaccharides structural diversity and functional versatility." S. Dimitriu, (Ed.), Marcel Dekker, New York, 957-993.

**Rudolf, A., Baudel, H., Zacchi, G., Hahn-Hägerdal, B., Lidén, G.,** 2007. "Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054." *Biotechnology and Bioengineering* 99, 783-790.

**Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Olsson, L.,** 2008. "Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains." *Biotechnology and Bioengineering* 100, 1122-1131.

**Unrean, P., Nguyen, N.H.A.,** 2012. "metabolic pathway análisis of *Scherrffersomyces (Pichia) stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synteshis ans flux distributions." *Applied Microbiology and Biotechnology* 94, 1387-1398.

**Yang, X., Zhang, S., Zuo, Z., Men, X., Tian, S.,** 2011. "Ethanol production from enzymatic hydrolysis of no-detoxified steam-exploded corn stalk." *Bioresource Technology* 102, 7840-7844.

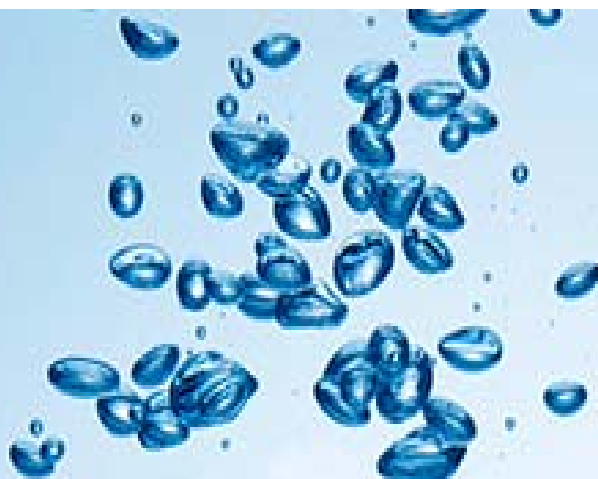


## CAPÍTULO VII

# INFLUENCIA DEL APORTE DE AIREACIÓN LIMITADA EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN:

INFLUENCIA DEL APORTE DE DIFERENTES  
VELOCIDADES DE AIREACIÓN EN LA EFICIENCIA DE  
FERMENTACIÓN CON *Pichia stipitis*

EFFECTO DEL APORTE DE OXÍGENO DURANTE LA  
FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS DE PAJA DE  
TRIGO







## RESUMEN

Se recogen los resultados más significativos del análisis de la influencia de la aireación limitada en el proceso de fermentación con *P. stipitis* con el objetivo de aumentar la velocidad de consumo de azúcares, principalmente de la fracción hemicelulósica, y consecuentemente disminuir el tiempo necesario para conseguir buenos rendimientos de etanol. Se han realizado ensayos en medios modelo para determinar el mejor nivel de aireación y posteriormente se ha estudiado el aporte de oxígeno en el proceso de fermentación de hidrolizados de paja de trigo pretratada. Se han analizado otros aspectos fundamentales como la concentración inicial de inicial de inóculo y la formación de subproductos como el xilitol.

Una parte de los resultados expuestos en este capítulo han sido publicados en el siguiente artículo incluido en el Anexo I de la presente memoria:

**Bellido C., González-Benito, G., Coca, M., Lucas, S., García-Cubero, M.T., 2013.** Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology* 133, 51-58.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.104>



## **7.1. INTRODUCCIÓN**

En la actualidad se pretende reducir el coste de producción de obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica mediante la identificación de factores clave en la mejora de los pretratamientos y de las etapas de hidrólisis y fermentación (Galbe *et al.*, 2007). La eficiencia del proceso de fermentación depende principalmente de las condiciones de operación junto con la composición en el medio (Silva *et al.*, 2012). La presencia de oxígeno en el medio se considera un parámetro crucial a tener en cuenta en el proceso de fermentación con *P. stipitis* a partir de xilosa, debido a que es el factor determinante para mantener la viabilidad celular y el balance de NADH (Agbogbo *et al.*, 2007).

*Pichia stipitis* no es capaz de producir etanol de forma eficiente en condiciones aerobias aunque haya exceso de glucosa en el medio (Fiaux *et al.*, 2003, Klinner *et al.*, 2005). Las rutas metabólicas más eficientes para la producción de etanol a partir de glucosa en condiciones anaerobias siguen la ruta fermentativa clásica en la que se producen dos moléculas de etanol y dos moléculas de dióxido de carbono por cada molécula de glucosa. La ruta metabólica más efectiva a partir de xilosa es la ruta pentosa fosfato junto con la ruta fermentativa clásica y bajo condiciones de limitación de oxígeno, se producen 1,5 moléculas de etanol y 2 moléculas de dióxido de carbono por molécula de xilosa (Unrean y Nguyen, 2012).

En la fermentación de xilosa a etanol mediante levaduras, la etapa crítica puede ser la conversión de xilosa en xilulosa que se lleva a cabo mediante dos reacciones. La primera es la reducción de xilosa a xilitol y la segunda es la oxidación de xilitol a xilulosa. La regeneración de los cofactores necesarios en dicho metabolismo es altamente dependiente de la velocidad de transferencia de oxígeno (Furlan *et al.*, 1994). La presencia de oxígeno es necesaria como aceptor de electrones debido al exceso de NADH que se produce en la conversión anaerobia de xilulosa a etanol. Algunas levaduras, como *P. stipitis*, son capaces de autorregular el desequilibrio  $NAD^+/NADH$  que se produce y no necesitan necesariamente oxígeno para producir etanol a partir de xilosa, pero la presencia de aireación limitada y controlada permite alcanzar mejores rendimientos de

etanol (Dellweg *et al.*, 1989). Durante la aireación controlada, *P. stipitis* es capaz de regular el exceso de NADH mediante enzimas reguladores que inducen una ruta metabólica eficaz de producción de etanol.

Por lo tanto, la presencia de niveles de oxígeno adecuados en la fermentación de xilosa mediante *P. stipitis* es uno de los factores a tener en cuenta para aumentar la eficiencia del proceso, y de este modo incrementar rendimientos y productividad. El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $K_{La}$ , es un parámetro importante para determinar la cantidad de oxígeno disponible en el reactor. Este parámetro depende de muchos factores, tales como la velocidad de agitación, la velocidad de aireación, la propia geometría del reactor, las propiedades del medio, así como la presión y la temperatura (García-Ochoa *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2012). A través de este parámetro  $K_{La}$  se pueden realizar comparaciones entre diferentes procesos aunque las condiciones de operación sean diferentes.

A continuación se presenta un esquema que resume la experimentación que se ha realizado en esta sección:

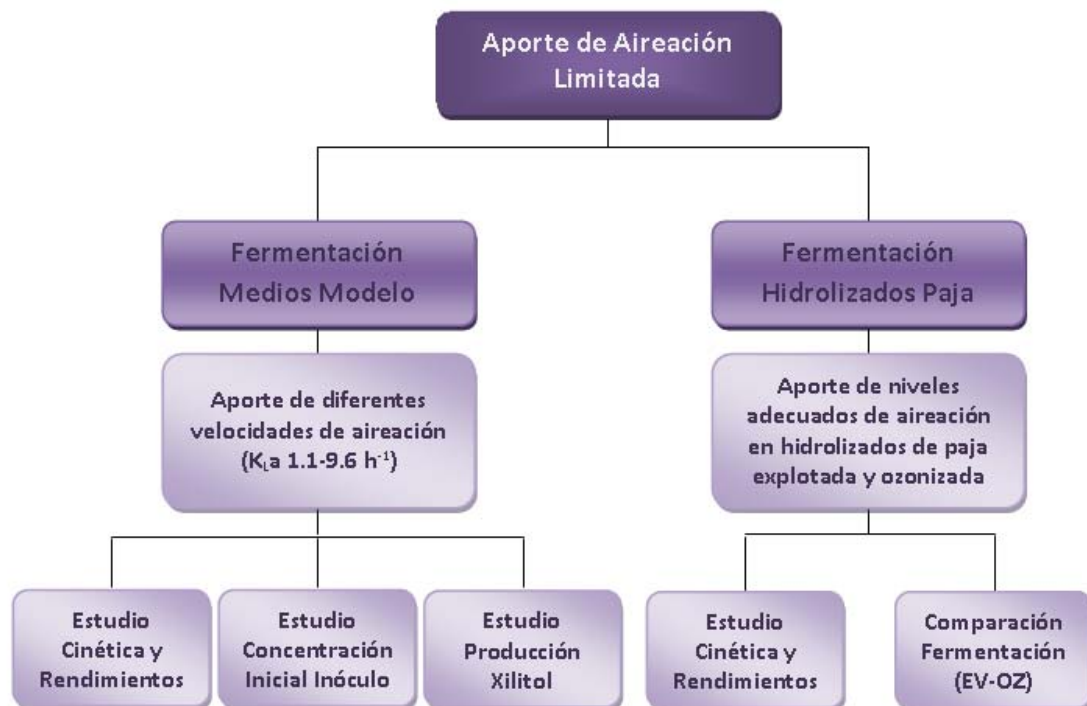


Figura 7.1. Experimentación del aporte de aireación limitada en el proceso de fermentación.

El aporte de aireación limitada se realizó en primer lugar en medios modelo, utilizando diferentes velocidades de aireación con coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno comprendidos entre 1,1 y 9,6  $\text{h}^{-1}$ , valores típicos encontrados en bibliografía (Furlan *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2012). Se realizó un estudio de la cinética y los rendimientos en cada caso y se analizó la presencia de subproductos, como el xilitol, y la influencia de la concentración inicial de inóculo. Una vez determinado el nivel posiblemente óptimo de aireación en el proceso de fermentación con *P. stipitis* se empleó aireación controlada en la fermentación de hidrolizados de paja de trigo pretratada mediante EV y OZ. Se realizó un estudio de los perfiles de concentración y el rendimiento de obtención de etanol al emplear oxígeno y finalmente, una comparación entre ambos pretratamientos.

## **7.2. METODOLOGÍA**

### **7.2.1. MEDIOS DE FERMENTACIÓN Y CONDICIONES DE OPERACIÓN**

#### **Fermentación de medios modelo con diferentes velocidades de aireación**

El medio modelo utilizado para los ensayos con diferentes velocidades de aireación se corresponde con el empleado en el Capítulo IV, compuesto por: 35 g/l de glucosa, 20 g/l de xilosa, 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 0,47 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 12,8 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,51 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,47 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y distintas concentraciones de compuestos tóxicos. Los ensayos fueron llevados a cabo en un biorreactor BIOSTAT BPlus-2L con 0,9L de medio que se inoculó con 0,1L de medio de cultivo. La temperatura (30°C), la agitación (175 rpm), el pH (5) y las diferentes velocidades de aireación se controlaron automáticamente en el reactor. El pH se controló mediante disoluciones de NaOH 2M y HCl 2M. Se tomaron muestras cada 24 horas durante 120 horas y la experimentación se llevó a cabo por duplicado.

#### **Fermentación de hidrolizados de paja de trigo pretratada empleando aireación limitada**

Los ensayos de fermentación aplicando aireación a los hidrolizados de paja de trigo pretratada con EV y OZ se llevaron a cabo en el mismo reactor en el que se realizó la hidrólisis enzimática descrita en el Capítulo IV, acoplado un difusor con entrada de aire conectado al equipo BIOSTAT BPlus-2L, que permitía controlar la velocidad de oxigenación. El microorganismo *P. stipitis* se inoculó al 10% (v/v) directamente en el reactor después de un proceso de pasteurización a 80°C y 30 minutos para proveer condiciones estériles. Las condiciones de la fermentación fueron las mismas que en casos anteriores: 30°C de temperatura, 175 revoluciones por minuto mediante agitación mecánica y pH 5 reajustado con disoluciones de NaOH y HCl 2M. Se tomaron muestras cada 24 horas durante 120 horas y la experimentación se llevó a cabo por duplicado.

### 7.2.2. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO ( $K_La$ )

Se emplearon diferentes velocidades de aireación en medios modelo y en los hidrolizados de paja de trigo con el objetivo de estudiar la influencia del aporte de oxígeno en el consumo de azúcares y la producción de etanol en los procesos de fermentación de mezclas de glucosa/xilosa por el microorganismo *Pichia stipitis*.

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $K_La$ , se determinó mediante una sonda polarográfica de medida de oxígeno (OXYFERM FDA 225) calibrada con una corriente de nitrógeno y aire para establecer el 0% y el 100% en saturación de oxígeno respectivamente. El  $K_La$  se determinó siguiendo el método estático descrito en Stanbury *et al.* (1995). En esta técnica, se hace pasar una corriente de nitrógeno a través del medio de fermentación para desplazar el oxígeno presente. Una vez que el medio se ha desoxigenado, se airea y se agita en las condiciones de operación y se mide el oxígeno disuelto utilizando la sonda polarográfica. El incremento en la concentración de oxígeno se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_La \cdot (C_L^* - C_L) \quad (\text{ec. 7.1})$$

Siguiendo este método, se trabajó con los biorreactores y los medios de fermentación descritos en los apartados anteriores con un medio de cultivo inactivo para evitar interferencias en la medida del oxígeno disuelto. Por tanto, se obtuvieron las curvas de saturación de oxígeno en el medio para cada velocidad de aireación y se calcularon los coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno representando  $\ln(C_L^* - C_L)$  con respecto al tiempo siendo dicho valor la pendiente de la curva, siendo  $C_L$  la concentración de oxígeno disuelto en el medio de fermentación y  $C_L^*$  la concentración de saturación de oxígeno. La tabla 7.1 muestra los valores de los  $K_La$  correlacionados con las velocidades de aireación utilizadas. Nótese que ambos medios, tanto los modelos como los hidrolizados de paja de trigo, se sometieron a similares coeficientes pero las velocidades de aireación fueron distintas debido a que los biorreactores son diferentes

en cuanto a morfología (tamaño, forma, difusores y agitadores). La representación gráfica del cálculo de coeficientes se encuentra en el Anexo II.

Experimento	Velocidad Aireación (L/min)	$K_L a$ ( $h^{-1}$ )
Medios Modelo	0,50	9,6
	0,25	5,9
	0,10	3,3
	0,03	1,1
Hidrolizados Paja Pretratada	0,25	10,8
	0,10	6,6
	0,05	3,8

Tabla 7.1. Correlación de velocidades de aireación con sus correspondientes coeficientes.



### **7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **7.3.1. MEDIOS MODELO**

##### **Influencia del aporte de diferentes velocidades de aireación**

En este apartado se estudió la influencia del aporte de diferentes velocidades de aireación en el proceso de fermentación con *P. stipitis*. El aporte de aireación controlada fue una variable importante que permitió reducir el tiempo de fermentación, y por tanto mejoró la productividad, obteniendo mejores rendimientos y velocidades de consumo de sustrato. El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $K_{La}$ , fue el parámetro que se utilizó para cuantificar el aporte de oxígeno al medio de fermentación. Al emplear coeficientes más elevados se obtuvieron mayores concentraciones de biomasa, mientras que la producción de etanol aumentó de manera inversa.

La figura 7.1a-b muestra los perfiles de concentración de glucosa, xilosa y etanol empleando diferentes niveles de aireación controlada. El consumo de xilosa mejoró significativamente aplicando coeficientes de 9,6, 5,9, 3,3h<sup>-1</sup> (0,50, 0,25 y 0,10L aire/min, respectivamente), lo que provocó una reducción en el tiempo de fermentación de 120 horas a 48-72 horas en dichos ensayos. Sin embargo, el aporte de oxígeno no produjo un efecto notable en el consumo de glucosa ya que para todas las velocidades de aireación estudiadas se agotó durante las primeras 24 horas. No se produjo un consumo total de xilosa empleando el coeficiente más bajo,  $K_{La} = 1,1h^{-1}$ , debido a que las condiciones en el reactor fueron prácticamente anaerobias. En este ensayo, la concentración de biomasa alcanzó un valor de 3,9 g/L y la concentración máxima de etanol fue de 22,1 g/L en un tiempo de 120 horas. Por el contrario, se produjeron grandes cantidades de biomasa, cuyo valor ascendió a 7,1 g/L de células, cuando el microorganismo se sometió a aireaciones más elevadas ( $K_{La} = 9,6h^{-1}$ ). El crecimiento de la levadura se produjo principalmente durante las primeras 24 horas, por lo que parte de la glucosa se destinó a formación de biomasa a expensas de la producción de etanol. En este experimento, la mayor parte de xilosa se consumió en 48 horas, pero la concentración máxima de etanol

que se alcanzó fue de 16,5 g/L que disminuyó con el tiempo a consecuencia de la desorción con la corriente de aire. Debido a velocidades de aireación elevadas, mayores cantidades de levadura se produjeron en el momento que comenzó el consumo de xilosa, por lo que su velocidad de consumo aumentó. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Agbogbo *et al.* (2007) que concluyeron que la velocidad de consumo de xilosa aumentaba a medida que la concentración inicial de biomasa era mayor, dando lugar a una menor selectividad en la producción de etanol.

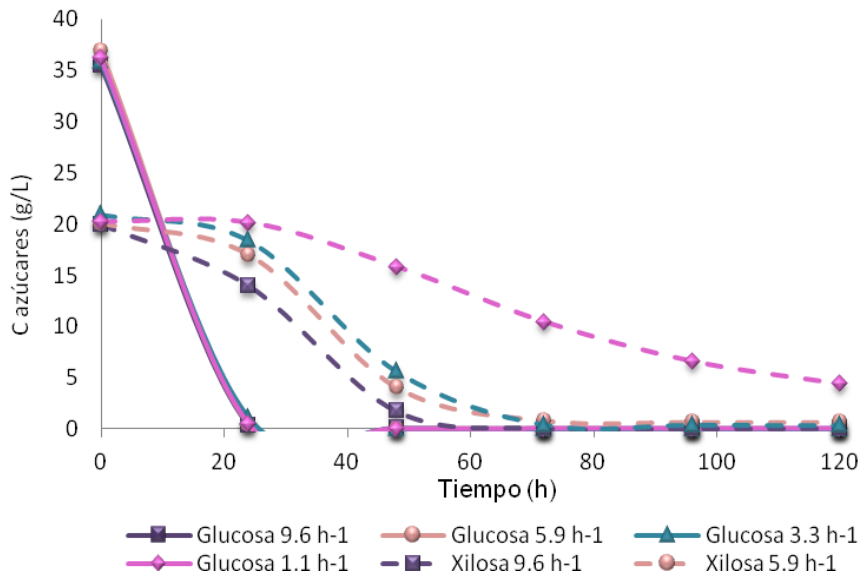


Figura 7.1a. Perfiles de concentración de glucosa y xilosa en medios modelo empleando aireación controlada

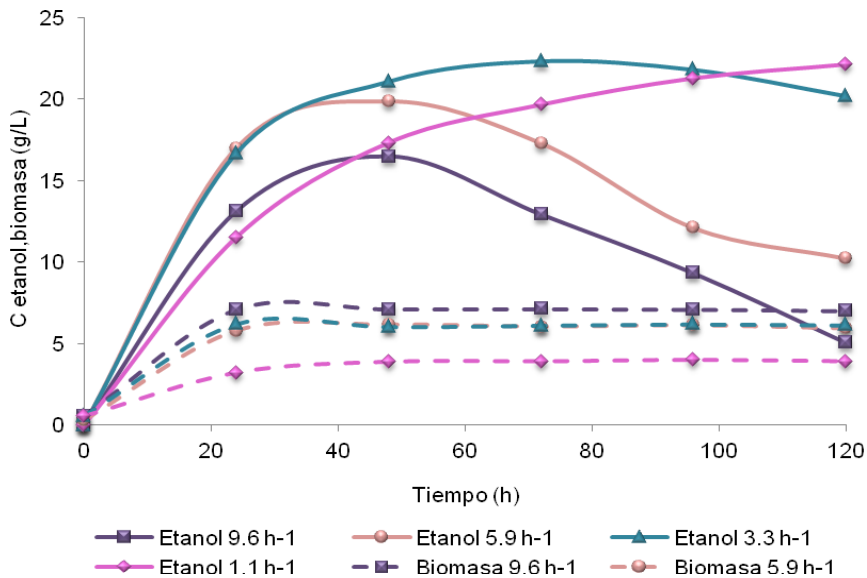


Figura 7.1b. Perfiles de concentración de etanol y biomasa en medios modelo empleando aireación controlada

En este trabajo, los mejores resultados se obtuvieron utilizando valores del coeficiente  $K_{La}$  de 5,9 y  $3,3h^{-1}$ , alcanzando concentraciones máximas de etanol de 19,9 y 22,3 g/L en 48 y 72 horas, respectivamente. En ambos ensayos se produjo un consumo total del sustrato presente y la concentración de células se estableció en 6,1 y 6,0 g/L, respectivamente. En la bibliografía se reseñan resultados similares a partir de mezclas glucosa/xilosa (15/90 g/L), en los que se obtuvieron mayores concentraciones de etanol mediante *P. stipitis* para coeficientes comprendidos entre 2,3 y  $4,9h^{-1}$  (Silva *et al.*, 2012).

El crecimiento celular, como se observa en la figura 7.1b, se produjo principalmente durante las primeras 24 horas en todos los ensayos a partir de una concentración inicial de 0,5 g/L. Por lo tanto, el crecimiento de la levadura *P. stipitis* estuvo asociado esencialmente al consumo de glucosa en el proceso de fermentación con aporte de aireación limitada. Como ya se ha estudiado con anterioridad, el microorganismo *P. stipitis* mostró un comportamiento diaúxico y no fue capaz de consumir xilosa hasta que la glucosa se agotó casi en su totalidad. En los experimentos con niveles de aireación adecuados, se produjo una mejora en el consumo de xilosa aumentando su velocidad, de tal forma que se produjo un mejor aprovechamiento del sustrato reduciendo el efecto del comportamiento diaúxico del microorganismo *P. stipitis* en mezclas glucosa/xilosa.

La figura 7.2 muestra la concentración de xilitol durante el proceso de fermentación empleando las diferentes velocidades de aireación estudiadas en este apartado. Como puede observarse, existió una relación inversa entre la formación de xilitol y el grado de aireación. Se alcanzaron valores de 2,1 g/L de xilitol utilizando el menor nivel de aireación ( $K_{La} = 1,1h^{-1}$ ) y fueron decreciendo hasta 0,7 g/L cuando la velocidad de aireación fue mayor ( $K_{La} = 9,6h^{-1}$ ), lo que significó que la concentración de xilitol se triplicó en condiciones quasianaerobias.

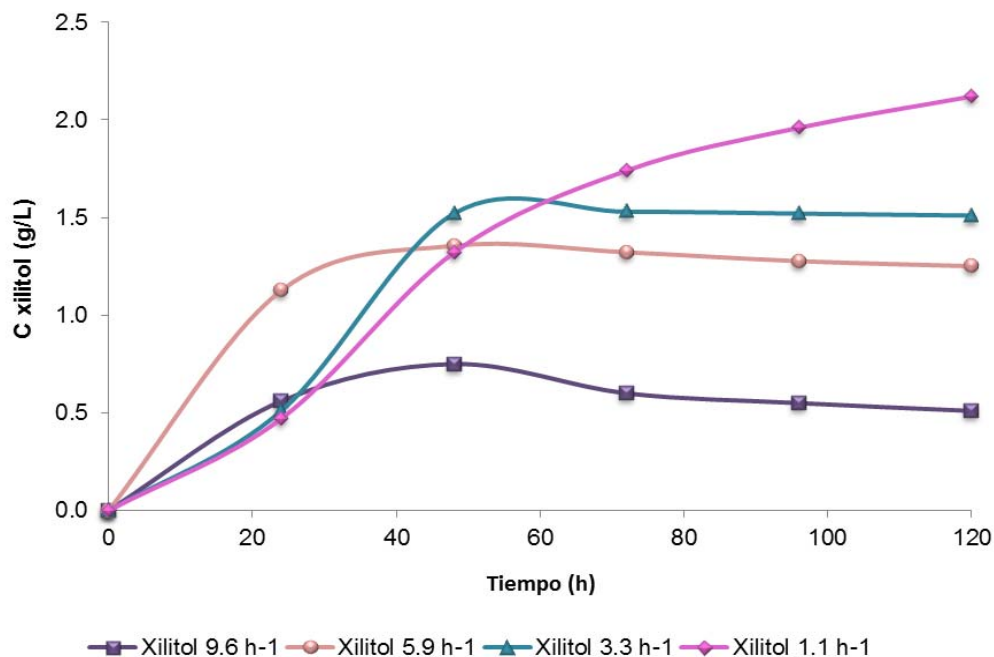


Figura 7.2. Concentración de xilitol empleando diferentes velocidades de aireación en medios modelo.

El aporte de aireación limitada fue necesario para mantener la viabilidad celular y el balance de NADH en la conversión de xilosa a etanol mediante *P. stipitis* (Agbogbo *et al.*, 2007). Algunos estudios sugieren que la levadura *P. stipitis* no necesitaba la presencia de oxígeno para fermentar glucosa o xilosa, pero el empleo de oxigenación limitada mostró buenos resultados en términos de rendimientos de etanol a partir de xilosa (Dellweg *et al.*, 1989; du Preez, 1994). Varios trabajos demostraron que niveles de aireación excesivos o muy bajos producían efectos negativos en el consumo de xilosa (Nigam, 2001; Silva *et al.*, 2012). Utilizando valores de  $K_La$  superiores a  $18,7h^{-1}$ , la producción de etanol se redujo o fue inexistente cuando se consumieron aeróbicamente glucosa y xilosa, siendo el sustrato metabolizado por la ruta oxidativa dando lugar a mayores concentraciones de biomasa (Fiaux *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2012). En términos de formación de xilitol, la microaeración favoreció la producción de etanol a expensas de la formación de dicho subproducto (Dellweg *et al.*, 1989). Algunos autores observaron una relación inversa entre la producción de etanol y la velocidad de agitación utilizando *P. tannophilus* como microorganismo encargado del proceso de fermentación (du Preez, 1994).

La tabla 7.2 muestra los parámetros del proceso de fermentación, coeficiente de rendimiento de etanol ( $Y_{p/s}$ ), coeficiente de rendimiento de biomasa con respecto al sustrato ( $Y_{x/s}$ ), concentración máxima de etanol, productividad de etanol ( $P_e$ ) y concentración de xilosa remanente para cada valor  $K_{La}$  estudiado. Se observó una correlación directa entre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $K_{La}$ ) y el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato ( $Y_{x/s}$ ) e inversa con respecto al coeficiente de rendimiento de etanol ( $Y_{p/s}$ ). Por tanto, se favorece el crecimiento celular con velocidades de aireación elevadas al contrario que la producción de etanol. Los experimentos que se llevaron a cabo con coeficientes de  $5,9h^{-1}$  mostraron los mejores resultados con respecto a productividad de etanol ( $0,41 \text{ g/L h}$ ) en un tiempo de 48 horas, aunque una pequeña parte de la xilosa no se había consumido en ese tiempo ( $4,0 \text{ g/L}$ ) y se alcanzaron buenos rendimientos de etanol,  $0,38\text{g etanol/g azúcares}$ .

Ensayo	Parámetros				
$K_{La} (h^{-1})$	$Y_{p/s}^{**}$ (g/g)	$Y_{x/s}^*$ (g/g)	$C_{m\acute{a}x} \text{ etanol}$ (g/L)	$P_e^{**}$ (g/Lh)	Xilosa <sub>rem</sub> <sup>**</sup> (g/L)
9,6	0,31 (48h)	0,17 (24h)	$16,5 \pm 0,4$ (48h)	0,34 (48h)	$1,8 \pm 0,1$ (48h)
5,9	0,38 (48h)	0,15 (24h)	$19,9 \pm 0,6$ (48h)	0,41 (48h)	$4,0 \pm 0,2$ (48h)
3,3	0,40 (72h)	0,14 (24h)	$22,3 \pm 0,5$ (72h)	0,30 (72h)	$0,3 \pm 0,1$ (72h)
1,1	0,43 (120h)	0,07 (24h)	22,1 (120h)	0,18 (120h)	4,4 (120h)

\*Calculado en el momento que finaliza el crecimiento exponencial de la levadura

\*\*Calculado en el momento que se alcanza la concentración máxima de etanol

Tabla 7.2. Parámetros de fermentación empleando diferentes coeficientes de aireación

La figura 7.3 muestra los parámetros del proceso de fermentación ajustados a curvas polinomiales de segundo orden con la finalidad de observar su tendencia. Los experimentos realizados con coeficientes del orden de  $3,3h^{-1}$  alcanzaron las mayores concentraciones de etanol ( $22,3 \text{ g/L}$ ) con buenos rendimientos ( $0,40\text{g etanol/g azúcares}$ ) junto con el consumo total de sustrato en un tiempo de 72 horas, notablemente inferior al tiempo de fermentación sin emplear microaireación (168 horas). Teniendo en cuenta estos resultados, coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno del orden de  $3,3h^{-1}$  se tomaron como posibles valores óptimos de aireación controlada en el proceso de fermentación con *P. stipitis* a partir de mezclas glucosa/xilosa ya que supusieron una mejora considerable en la eficiencia en dicho proceso. Este valor óptimo de aireación

controlada se empleará posteriormente en los hidrolizados de paja de trigo pretratada y se analizará su efecto en el consumo de sustrato y reducción del tiempo de fermentación.

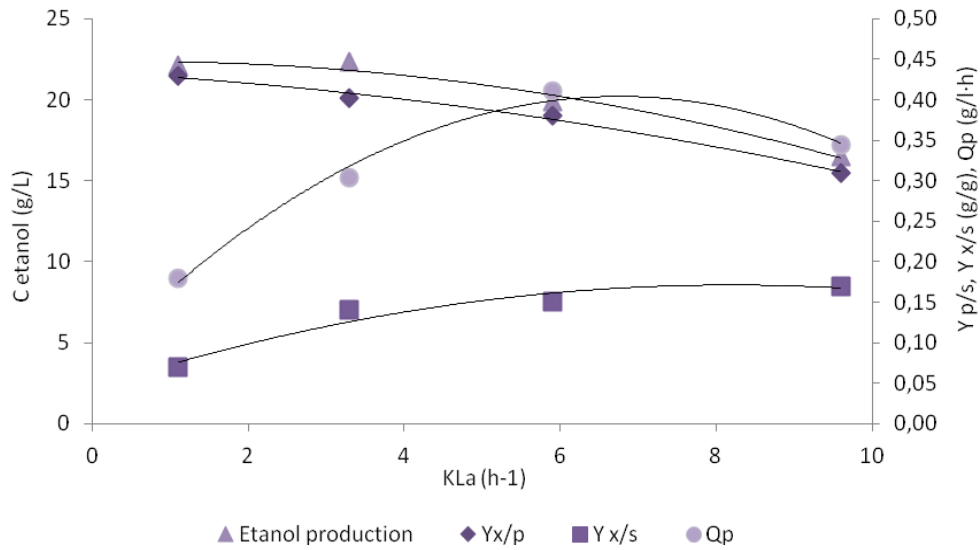


Figura 7.3. Parámetros del proceso de fermentación ajustados a curvas polinomiales.

### Influencia de la concentración inicial de inóculo y formación de xilitol

Una vez que se estableció un valor óptimo de microaireación, se realizaron diferentes ensayos a partir de diferentes concentraciones iniciales de inóculo, con el fin de analizar el consumo de sustrato y la formación de etanol y xilitol. Se emplearon 0,5, 1,0 y 2,0g células/L como concentraciones iniciales de inóculo en el proceso de fermentación con aireación limitada ( $K_{La} = 3,3h^{-1}$ ). En la figura 7.4a-b se muestra el perfil de concentraciones de glucosa, xilosa, etanol y xilitol empleando las concentraciones iniciales de inóculo estudiadas.

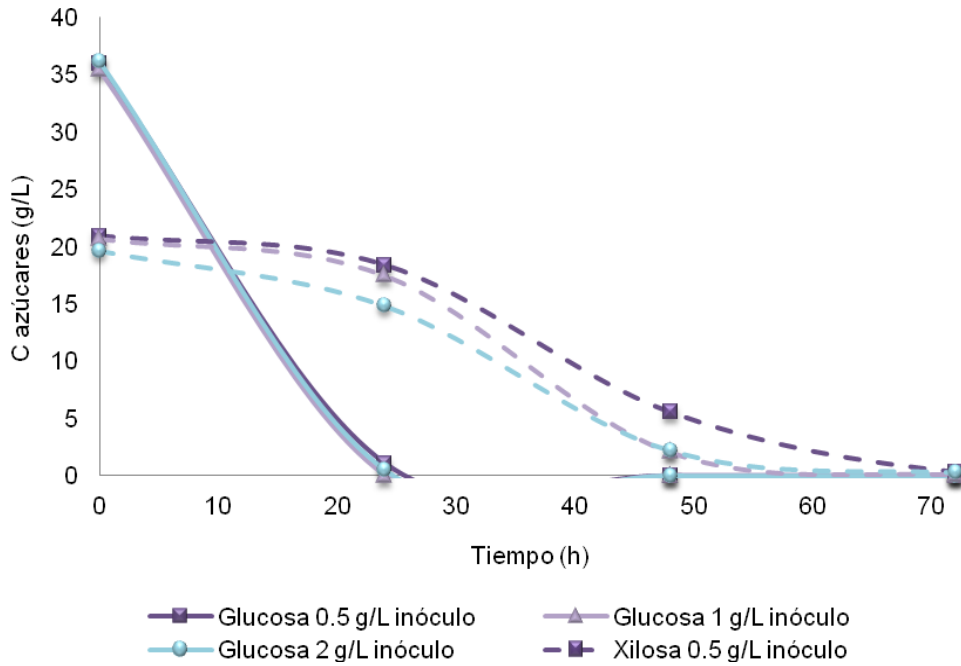


Figura 7.4a. Perfil de concentraciones de glucosa y xilosa empleando diferentes concentraciones iniciales de inóculo en medios modelo aireados.

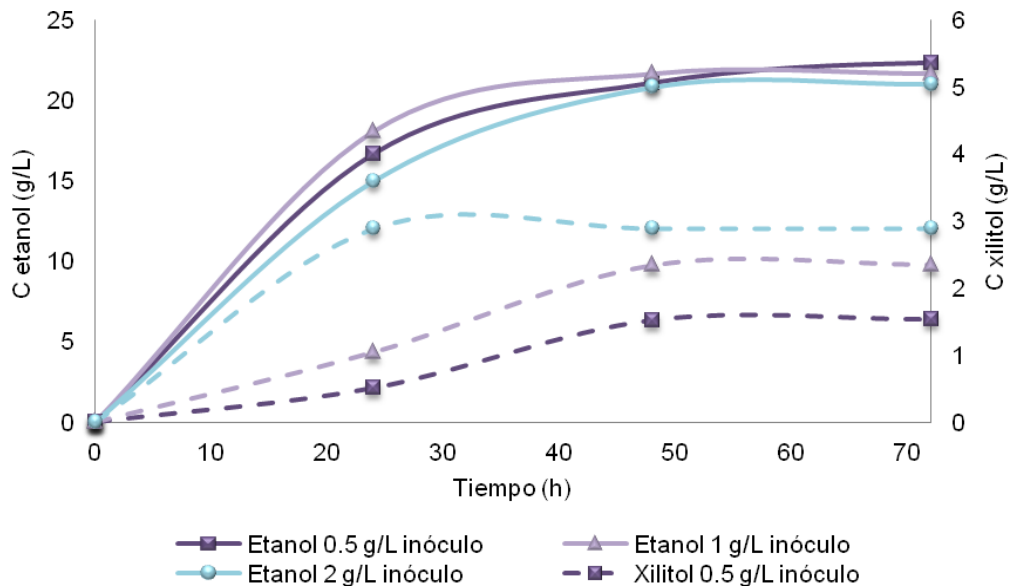


Figura 7.4b. Perfil de concentraciones de etanol y xilitol empleando diferentes concentraciones iniciales de inóculo en medios modelo aireados.

Se alcanzaron concentraciones de etanol similares en los tres casos, 22,3, 21,7 y 21,0 g/L en un tiempo de 72 horas, respectivamente. La velocidad de consumo de xilosa fue superior a medida que se incrementó la cantidad inicial de células, del mismo modo que la concentración de xilitol, que se produjo paralelamente a la formación de etanol

causando una reducción en la productividad de etanol durante las primeras 24 horas de 0,75 g/L·h, empleando una concentración inicial de biomasa de 1,0 g/L, a 0,62 g/L·h con 2,0g células/L. Por tanto, el xilitol se originó en mayor medida, y a expensas de la producción de etanol, cuanto mayor fue la ratio entre biomasa y sustrato disponible. En los casos estudiados, la concentración de xilitol aumentó de 1,5 g/L (0,5g inóculo/L) a 2,9 g/L (2,0g inóculo/L). Empleando concentraciones iniciales de 0,5g biomasa/L en el proceso de fermentación con aireación limitada, se amortiguó la producción de xilitol, por lo que la selectividad de producción de etanol aumentó, dando lugar a un mejor aprovechamiento del sustrato disponible. Por tanto, y con el objetivo de prevenir la formación de xilitol, se estableció un valor de 0,5 g/L para la concentración inicial de células en el medio de fermentación sometido a aireación controlada.

### 7.3.2. HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO PRETRATADA

#### Influencia del aporte de diferentes velocidades de aireación en los hidrolizados de paja de trigo ozonizada

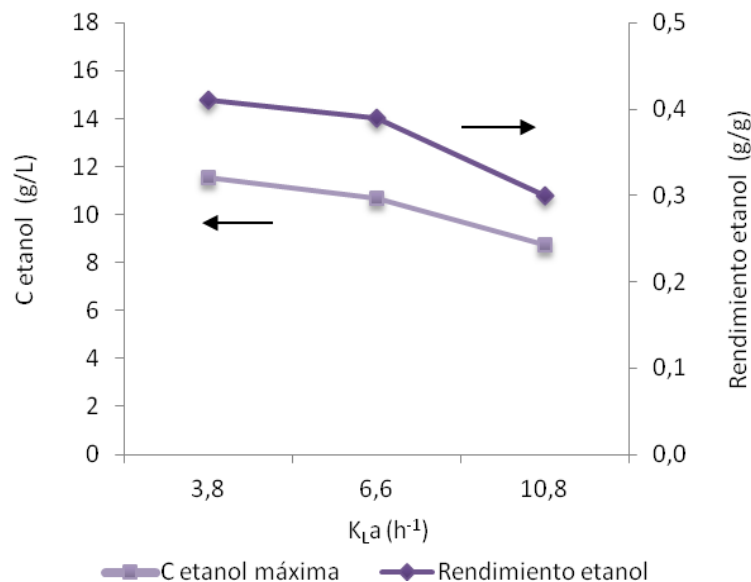
Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se ha establecido que un buen nivel de aireación controlada permite mejorar el consumo de azúcares, principalmente xilosa, disminuyendo el tiempo de fermentación y que es una variable importante para obtener buenos rendimientos de etanol. Con el objetivo de evaluar en una primera etapa, el efecto del aporte de aireación controlada en los hidrolizados de paja de trigo pretratada, el comportamiento de la levadura *P. stipitis* fue analizado en el proceso de fermentación de los hidrolizados de paja de trigo ozonizada (W-BC). Como ya se ha estudiado en capítulos anteriores, el pretratamiento de paja de trigo mediante ozonólisis es un método eficaz que permite mejorar la etapa de hidrólisis enzimática para aumentar la cantidad de azúcares fermentables (García-Cubero *et al.*, 2012). El ozono es capaz de degradar la lignina y solubilizar ligeramente la fracción hemicelulósica (García-Cubero *et al.*, 2009).

Después del pretratamiento mediante ozono y la etapa de hidrólisis enzimática de paja de trigo se obtuvo una concentración de azúcares fermentables de 30g/100g MS



(27,7 g/L). En capítulos anteriores se hace referencia a los compuestos inhibidores que aparecieron a consecuencia de dicho pretratamiento, ácido oxálico y ácido acético, cuyo efecto ha sido ampliamente estudiado en el Capítulo V de la presente memoria. Se emplearon diferentes velocidades de aireación controlada en los hidrolizados de paja de trigo ozonizada con el objetivo de estudiar su efecto en la velocidad de consumo de azúcares y en los rendimientos de etanol. Algunos estudios han destacado la sensibilidad de la levadura *P. stipitis* con respecto a la cantidad de oxígeno disuelta en el medio (Lin *et al.*, 2012; Klinner *et al.*, 2005).

A la vista de los resultados obtenidos con el medio modelo en el apartado anterior, se emplearon coeficientes similares en los hidrolizados de paja de trigo pretratada (3,8, 6,6 y 10,8h<sup>-1</sup>). La figura 7.5 muestra la concentración máxima de etanol alcanzada y los rendimientos obtenidos para cada uno de los coeficientes estudiados. A medida que se incrementó el coeficiente de transferencia de oxígeno, la velocidad de consumo de sustrato fue mayor pero la producción de etanol decreció. Lin *et al.*, (2012) observaron el mismo efecto en hidrolizados de paja de arroz sometidos a diferentes velocidades de aireación.



7.5. Concentración máxima y rendimientos de etanol para cada uno de los coeficientes  $K_L a$  en hidrolizados de paja de trigo ozonizada.

El máximo rendimiento de etanol, 0,41g etanol/g azúcares, se obtuvo empleando un coeficiente de transferencia de oxígeno de 3,8h<sup>-1</sup>. La figura 7.6 muestra una

comparación de los perfiles de concentración de glucosa, xilosa y etanol durante el proceso de fermentación de hidrolizados de paja de trigo ozonizada sin aireación controlada y aportando oxígeno al medio ( $K_{La} = 3,8h^{-1}$ ). Al emplear aireación controlada, se produjo un aumento en la velocidad de consumo de glucosa y se permitió el consumo de xilosa en 120 horas de fermentación produciéndose el agotamiento casi total de ambos sustratos en 96 horas. Este hecho supuso una considerable mejora con respecto a hidrolizados no aireados, donde fueron necesarias 168 horas de proceso para el consumo de los azúcares presentes en los hidrolizados. La presencia de oxígeno mejoró de forma notable las velocidades de consumo de glucosa y xilosa, que supuso un factor importante para amortiguar el efecto de los inhibidores presentes en los hidrolizados de paja de trigo ozonizada que retardaron la asimilación de sustrato. Otros autores han hecho referencia a esa baja velocidad de consumo de xilosa mediante *P. stipitis* (Buaban *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011). Con base en los resultados, se pudo constatar que la aireación redujo la fase de retardo en el consumo de glucosa y xilosa, principalmente, en el proceso de fermentación de etanol en los hidrolizados de paja de trigo ozonizada mediante *P. stipitis*.

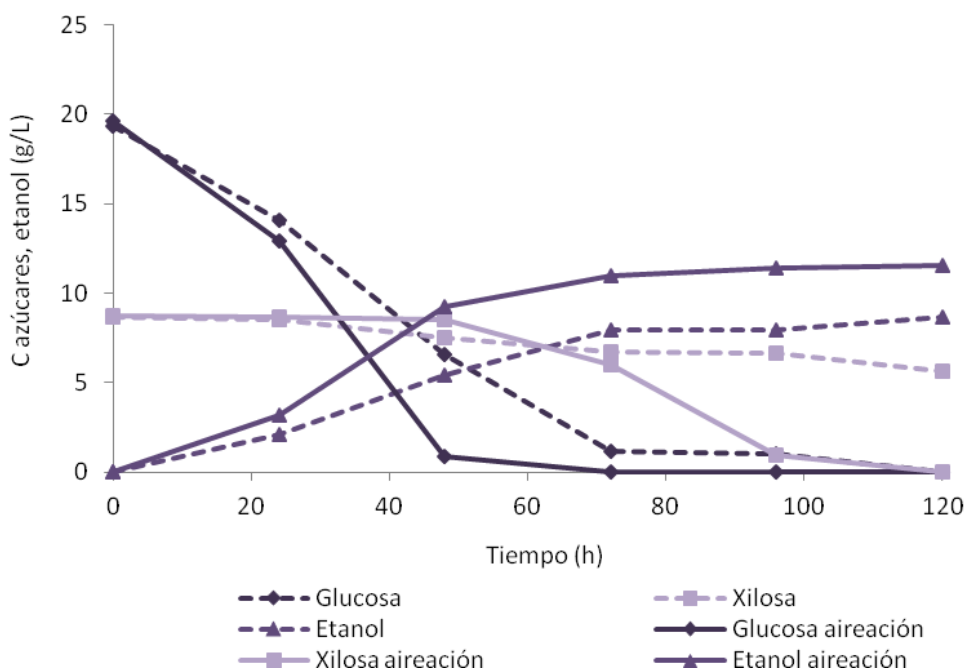


Figura 7.6. Comparación fermentación hidrolizados de paja ozonizada (hidrolizados W-BC) con y sin aireación limitada.

Al emplear un coeficiente óptimo de transferencia de oxígeno en el hidrolizado, la concentración máxima de etanol se incrementó de 8,7 g/L a 12,4 g/L en un tiempo de 120 horas, siendo 9,9 g/L la concentración alcanzada en un tiempo de 168 horas sin aporte de oxígeno (dato no representado). La formación de xilitol alcanzó un valor de 0,7 g/L, que se corresponde con los resultados obtenidos en las fermentaciones en medios modelo. En este estudio, se alcanzó un rendimiento de etanol de 0,41 g/g que se encuentra dentro del rango encontrado en la bibliografía a partir de diferentes materias primas lignocelulósicas con diferentes cepas de la levadura *P. stipitis* (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008; Díaz *et al.*, 2009). Chandel *et al.* (2011) obtuvieron resultados similares a partir de hidrolizados de *S. spontaneum* alcanzando 11,2 g/L de etanol y un rendimiento de 0,36 g etanol/g azúcar consumido. Zhu *et al.* (2011) obtuvieron 22,1 g/L de etanol y 0,39 g etanol/g azúcar consumido empleando prehidrolizados de rastrojo de maíz detoxificados.

En este trabajo, el empleo de aireación controlada en hidrolizados de paja de trigo ozonizada supuso un incremento del 29,1% en la producción de etanol y una reducción del 42,9% en el tiempo de fermentación.

#### Aporte de aireación controlada en los hidrolizados de paja de trigo sometida a explosión de vapor

A la vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se empleó aireación controlada en niveles óptimos para los hidrolizados de paja de trigo sometida a explosión de vapor. Por tanto, se hicieron ensayos con un coeficiente de transferencia de oxígeno de  $3,8\text{h}^{-1}$  y se compararon los resultados obtenidos con los hidrolizados en los cuales no se aplicó aireación controlada. Se aplicó aireación controlada a los hidrolizados de paja de trigo de los grupos WH-SF y FH-WS.

La figura 7.7 muestra los perfiles de concentración de glucosa, xilosa y etanol durante el transcurso de fermentación ofreciendo una comparativa del proceso añadiendo oxígeno a los hidrolizados del grupo WH-SF. En el capítulo VI del presente estudio, se observó que la fermentación del hidrolizado procedente de la fracción sólida de la EV ofrecía los mejores resultados, con un rendimiento de etanol de 0,45 g etanol/g

azúcar consumido y 12,2 g/L etanol, aunque se observaba que la velocidad de consumo de xilosa era bastante baja. Al aplicar aireación controlada, se obtuvo una concentración máxima de etanol similar, 12,7 g/L, y un rendimiento de 0,45 g/g, en menor tiempo. Del mismo modo que en el caso de la paja sometida a ozonólisis, se produjo una reducción del tiempo de fermentación de 168 a 96 horas para el agotamiento casi total de ambos sustratos. Sin embargo, el consumo de glucosa no experimentó una mejora en este sentido, ya que la velocidad de consumo era bastante elevada en los hidrolizados no aireados.

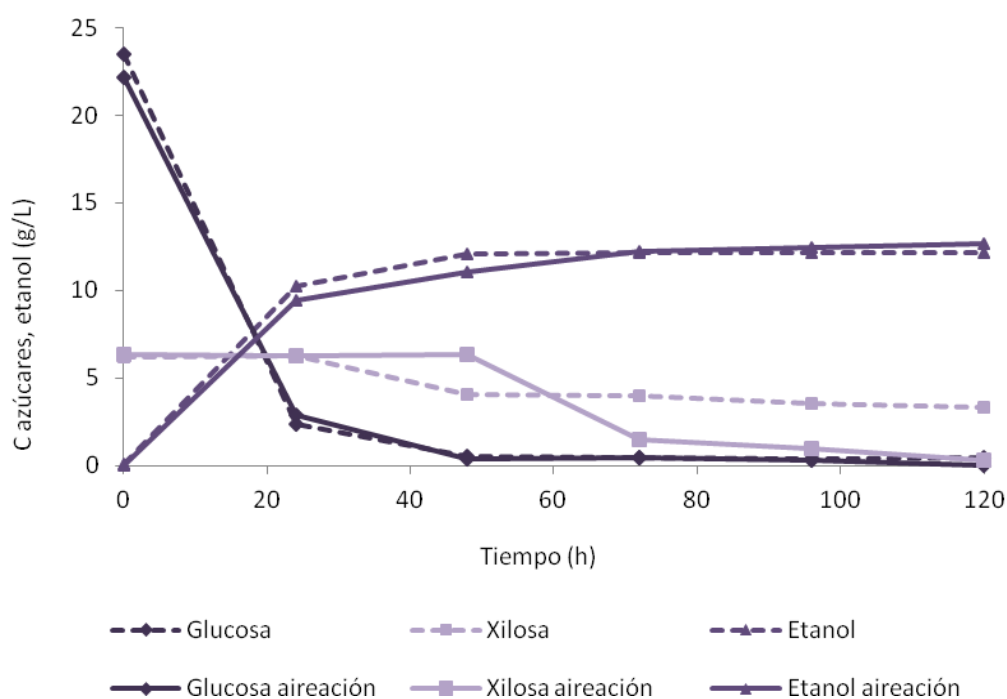


Figura 7.7. Comparación fermentación hidrolizados de paja pretratada con explosión de vapor (hidrolizados WH-SF) con y sin aireación limitada.

En empleo de microaireación en el proceso de fermentación de los hidrolizados FH-WS permitió el aprovechamiento de xilosa, que no podía sintetizarse probablemente debido a la presencia de compuestos potencialmente tóxicos. En este caso, se mejoró la velocidad de consumo de glucosa y la levadura *P. stipitis* fue capaz de asimilar ambos sustratos en 120 horas de proceso como se observa en la figura 7.8. Se alcanzaron concentraciones máximas de etanol superiores al caso anterior, 15,0 g/L, debido a que la disponibilidad de sustrato fue mayor, y el rendimiento de etanol fue similar, 0,43 g/g. Por

tanto, se puede afirmar que la aireación controlada aumentó la eficiencia del proceso de obtención de bioetanol mediante *P. stipitis* a partir de paja de trigo pretratada, reduciendo el tiempo de operación y mejorando el aprovechamiento de los azúcares fermentables en los hidrolizados.

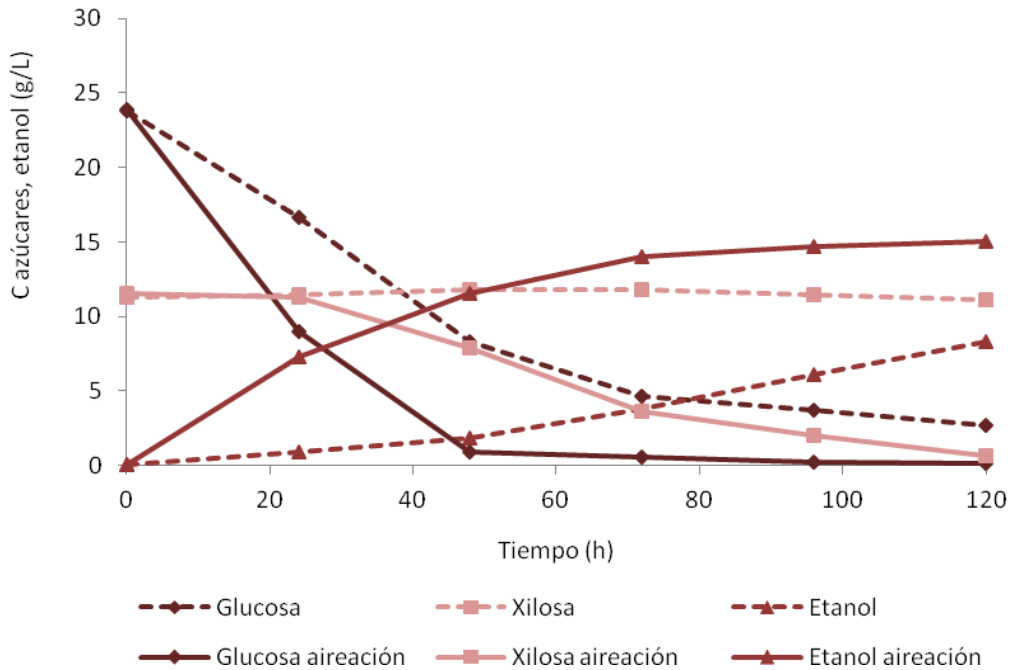


Figura 7.7. Comparación fermentación hidrolizados de paja pretratada con explosión de vapor (hidrolizados FH-WS) con y sin aireación limitada.

### Comparación EV-OZ

La tabla 7.3 muestra el coeficiente de rendimiento de etanol ( $Y_{p/s}$ ), el rendimiento de etanol sobre el teórico (RTE) y la concentración máxima de etanol en los procesos de fermentación sometidos a aireación controlada anteriormente expuestos y sus homólogos sin aplicar oxigenación. En todos los casos se produjo una mejora al introducir oxígeno controlado en el medio, pero el avance más notable se observó en la fermentación de los hidrolizados FH-WS, donde se aumentó el rendimiento de etanol sobre el teórico en un 32%.

Ensayo	Parámetros		
	$Y_{p/s}$ (g/g)	RTE (%)	$C_{\text{máx}}$ etanol (g/L)
W-BC (OZ)	0,42	69,0	9,9 (168h)
WH-SF (EV)	0,45	80,2	12,2 (168h)
FH-WS (EV)	0,42	50,9	9,1 (168h)
W-BC <sub>aireación</sub> (OZ)	0,41	79,7	11,6 (120h)
WH-SF <sub>aireación</sub> (EV)	0,45	86,9	12,7 (120h)
FH-WS <sub>aireación</sub> (EV)	0,43	82,9	15,0 (120h)

Tabla 7.3. Comparación de parámetros de fermentación entre hidrolizados aireados y no aireados.

Para ambos pretratamientos, la aireación controlada permitió el aprovechamiento de la xilosa presente en el medio que la levadura *P. stipitis* no pudo consumir sin aporte de oxígeno. Los rendimientos de etanol son ligeramente superiores en el caso de fermentación de hidrolizados de paja de trigo sometida a EV, aunque en ambos casos se encuentran en un rango elevado de conversión de azúcares (0,41 - 0,45g etanol/g azúcares consumidos). La concentración máxima de etanol también es superior en el caso de la EV, debido principalmente a la presencia de concentraciones superiores de azúcares fermentables en los hidrolizados. En ambos casos se redujo considerablemente el tiempo de fermentación (42,9%).

#### **7.4. CONCLUSIONES**

El empleo de aireación limitada en el proceso de fermentación con *P. stipitis* a partir de un sustrato modelo mixto (glucosa/xilosa) dio lugar a un mejor aprovechamiento de los azúcares disponibles mejorando la productividad de etanol.

Los mejores resultados de fermentación de medios modelo se obtuvieron al emplear un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de  $3,3\text{h}^{-1}$ . En este caso, se obtuvieron elevados rendimientos de etanol (0,40 g/g) en un tiempo considerablemente inferior (72h) si se compara con los ensayos realizados sin microaireación (168h).

El incremento de la concentración inicial de inóculo en medios con aireación limitada condujo a cantidades superiores de xilitol a expensas de la producción de etanol durante las primeras horas del proceso de fermentación. Por tanto, se estableció una concentración inicial de células de 0,5 g/L, para la fermentación de sustratos mixtos sometidos a microaireación mediante *P. stipitis*.

El empleo de aireación controlada ( $K_{La} = 3,8\text{h}^{-1}$ ) en la fermentación de hidrolizados de paja de trigo ozonizada provocó una reducción de la fase de retardo en el consumo de azúcares, xilosa principalmente, y mejoró su utilización, lo que se tradujo en mayores concentraciones de etanol y un aumento de la productividad. Se produjo un aumento del 29,1% en la producción de etanol asociado a un 42,9% de reducción en el tiempo de fermentación, con respecto a los ensayos sin microaireación.

El empleo de aireación limitada en condiciones óptimas en los hidrolizados de paja de trigo sometida a explosión de vapor permitió aprovechar la fracción hemicelulósica procedente de la fase líquida del pretratamiento. De este modo, se obtuvieron 15,0 g/L de etanol y el rendimiento teórico aumentó un 32% con respecto a la fermentación de hidrolizados no aireados. Al utilizar únicamente la fracción sólida, se produjeron mejoras en la productividad de etanol, alcanzando rendimientos y concentraciones similares de

etanol en comparación con la fermentación de hidrolizados en los que no se adicionó oxígeno (0,45 g/g, 12,2 g/L).



## **7.5. REFERENCIAS**

**Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G.,** 2008. "Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*." *Biotechnology Letters* 30, 1515-1524.

**Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K., Jeffries, T.W.,** 2007. "The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stipitis*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136-140, 653-662.

**Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V., Pichyangkura, R., Rengpipat, S., Eurwilaichitr, L.,** 2010. "Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 110, 18-25.

**Chandel A.K., Singh, O.V., Venkateswar, R., Chandrasekhar, G., Narasu, M.L.,** 2011. "Bioconversion of novel substrate *Saccharum spontaneum*, a weedy material, into ethanol by *Pichia stipitis* NCIM3498." *Bioresource Technology* 102, 1709-1714.

**Dellweg, H., Rizzi, M., Klein, C.,** 1989. "Controlled limited aeration and metabolic regulation during the production of ethanol from D-xylose by *Pichia stipitis*." *Journal of Biotechnology* 12, 111-122.

**Díaz, M.J., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., Moya, M., Castro, E.,** 2009. "Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 891-899.

**Du Preez, J.C.,** 1994. "Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts." *Enzyme and Microbial Technology* 16, 944-956.

**Fiaux, J., Petek, Z., Sonderegger, M., Wüthrich, K., Szyperski, T., Sauer, U.,** 2003. "Metabolic-flux profiling of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*." *Eucariotic Cell* 2, 170-180.

**Furlan, S.A., Bouilloud, P., de Castro, H.F.,** 1994. "Influence of oxygen on ethanol and xilitol production by xylose fermenting yeasts." *Process Biochemistry* 29, 657-662.

**Galbe, M., Sassner, P., Zacchi, G.,** 2007. "Process engineering economics of bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 3003-3327.

**García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacochea, I., Coca, M., Bolado, S.,** 2009. "Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw." *Bioresource Technology* 100, 1608-1613.

**García-Cubero, M.T., Palacín, L.G., González-Benito, G., Bolado, S., Lucas, S., Coca, M.,** 2012. "An analysis of lignin removal in a fixed bed reactor by reaction of cereal straws with ozone." *Bioresource Technology* 107, 229-234.

**García-Ochoa, F., Gómez, E., Santos, V.E.,** 2000. "Oxygen transfer and uptakes rates during xanthan gum production." *Enzyme and Microbial Technology* 27, 680-690.

**Klinner, U., Fluthgraf, S., Freese, S., Passoth, V.,** 2005. "Aerobic induction for respire-fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 247-253.

**Lin, T., Huang, C., Guo, G., Hwang, W., Huang, S.,** 2012. "Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*." *Bioresource Technology* 116, 314-319.

**Nigam, J.N.,** 2001. "Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*." *Journal of Biotechnology*. 87, 17-27.

**Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K.,** 2012. "Bioethanol production from agricultural wastes: An overview." *Renewable Energy* 37, 19-27.

**Silva, J.P., Mussatto, S.I., Roberto, I.C., Teixeira, J.A.,** 2012. "Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*." *Renewable Energy* 37, 259-265.

**Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J.,** 1995. "Principles of fermentation technology." Butterworth-Heinemann., Oxford, Reino Unido.

**Unrean, P., Nguyen, N.H.A.,** 2012. "metabolic pathway análisis of *Scherrffersomyces (Pichia) stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synteshis ans flux distributions." *Applied Microbiology and Biotechnology* 94, 1387-1398.

**Zhu, J., Yong, Q., Xu, Y., Yu, S.,** 2011. "Detoxification of corn stover prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776." *Bioresource Technology* 102, 1663-1668.

## CAPÍTULO VIII

# CONCLUSIONES GENERALES





En el presente trabajo, se ha llevado a cabo el estudio del proceso de obtención de Bioetanol de segunda generación utilizando paja de trigo como materia prima. Se han analizado de forma individualizada las etapas implicadas en el proceso, que corresponden a: pretratamiento del material lignocelulósico, subsiguiente hidrólisis enzimática, y fermentación final del sacarificado utilizando la levadura *Pichia stipitis* capaz de metabolizar tanto los hexa como los penta carbohidratos.

Las principales conclusiones obtenidas, para cada una de las etapas son:

Etapas de Pretratamiento:

1. Se han utilizado explosión de vapor y ozonólisis como métodos de pretratamiento, mostrándose ambos efectivos, al alterar la estructura de la materia prima y facilitar su digestibilidad, favoreciendo la etapa posterior de hidrólisis enzimática.
2. El efecto principal de la explosión de vapor es la solubilización parcial de la porción hemicelulósica de la paja de trigo. Este pretratamiento conduce a la formación de dos fracciones:
  - fracción sólida, conteniendo mayoritariamente celulosa y lignina
  - fracción líquida, con presencia de hemicelulosa solubilizada (principalmente en forma de xilosa) y compuestos de degradación como son ácido acético, furfural y 5-hidroximetil furfural (HMF)
3. El efecto del pretratamiento con ozono es la solubilización de la lignina, provocando una desestructuración del material lignocelulósico. Se genera únicamente una fase sólida, que presenta además compuestos de degradación como ácido acético y ácido oxálico.

## Etapa de Hidrólisis Enzimática:

4. El proceso de sacarificación se lleva a cabo con una mezcla comercial de enzimas, celulasas y  $\beta$ -glucosidasas. La digestibilidad de la celulosa es ligeramente superior en el caso de paja de trigo explotada, con un porcentaje de hidrólisis entre 70 y 74%, encontrándose entre 55-63% en el caso de paja de trigo ozonizada. El porcentaje de hidrólisis de hemicelulosa es superior en el caso de paja de trigo ozonizada (52%).
5. La presencia de compuestos inhibidores procedentes de los pretratamientos de la materia prima, tanto mediante explosión de vapor o mediante ozonolisis, no afecta a la actividad de las enzimas empleadas en este estudio.

## Etapa de Fermentación:

6. *Pichia stipitis* es capaz de fermentar hidrolizados de paja de trigo explotada y ozonizada, presentando un comportamiento diaúxico en presencia de sustrato mixto, consumiendo de forma preferencial glucosa y posteriormente xilosa.
7. El proceso secuencial de sacarificación y fermentación (SHF) se establece como estrategia de operación, frente al proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), debido a que proporciona mejores rendimientos en etanol.
8. En el proceso de fermentación de hidrolizados de paja de trigo sometida a explosión de vapor, los mejores rendimientos en etanol se obtienen utilizando únicamente la fracción sólida del pretratamiento (0,45g etanol/g azúcares consumidos, 80,2% sobre el teórico).
9. Con respecto al efecto de los compuestos de degradación formados en la explosión de vapor sobre el proceso de fermentación, el ácido acético provoca inhibición del crecimiento celular y de la producción de etanol, el furfural causa retardo en el consumo de glucosa y xilosa, y el HMF no tiene efectos significativos

en el rango de concentraciones estudiado. La presencia de los tres compuestos de forma conjunta tiene un efecto sinérgico negativo, disminuyendo el rendimiento.

10. En el proceso de fermentación de hidrolizados de paja de trigo ozonizada, los mejores rendimientos de etanol se obtienen utilizando el material sometido a una mayor exposición a ozono, correspondiente a la zona inferior del reactor de lecho fijo utilizado.
11. Con respecto a los compuestos tóxicos formados en el pretratamiento con ozono, el ácido oxálico conduce a una fuerte inhibición, siendo necesaria una detoxificación mediante lavado para reducir dicho efecto. Además se produce un efecto sinérgico negativo de los ácidos acético y oxálico cuando están presentes de forma conjunta en el medio.
12. El empleo de aireación limitada en el proceso de fermentación (medios modelo) provoca un aumento tanto en la velocidad de consumo de xilosa, como en la productividad y rendimiento en etanol, con una apreciable reducción del tiempo de fermentación. Además, la producción de xilitol aumenta a medida que el nivel de aireación disminuye, y para un nivel fijado de micro aireación, su producción aumenta cuanto mayor es la concentración inicial de inóculo.
13. El uso de aireación limitada en la fermentación de los hidrolizados de paja de trigo explotada permite utilizar prácticamente todos los carbohidratos, produciéndose un aumento del 32% en el rendimiento de etanol con respecto al proceso sin aireación limitada.
14. La micro aireación en la fermentación en los hidrolizados de paja de trigo ozonizada permite aprovechar totalmente los azúcares presentes, aumentando un 29% la producción de etanol.

Como conclusión final del trabajo puede decirse que el proceso utilizado en la obtención de bioetanol de segunda generación a partir de material lignocelulósico (paja

de trigo), según la secuencia pretratamiento (explosión de vapor / ozonolisis) y sacarificación y fermentación separadas (SHF) ha resultado satisfactorio, conduciendo a rendimientos en etanol sobre el teórico de 86,9% y 79,7 % y productividades de etanol en 120 horas de 0,11 g/L·h y 0,10 g/L·h para el material explotado y ozonizado respectivamente.



# **ANEXOS**



**ANEXO I**





## Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*

Carolina Bellido, Silvia Bolado, Mónica Coca, Susana Lucas, Gerardo González-Benito, María Teresa García-Cubero\*

Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Valladolid, Dr. Mergelina s/n, 47011 Valladolid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 June 2011

Received in revised form 29 August 2011

Accepted 30 August 2011

Available online 10 September 2011

#### Keywords:

Ethanol

*Pichia stipitis*

Fermentation

Inhibitory effect

Wheat straw

### ABSTRACT

The inhibitory effect of the main inhibitors (acetic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural) formed during steam explosion of wheat straw was studied through ethanol fermentations of model substrates and hydrolysates from wheat straw by *Pichia stipitis*. Experimental results showed that an increase in acetic acid concentration led to a reduction in ethanol productivity and complete inhibition was observed at 3.5 g/L. Furfural produced a delay on sugar consumption rates with increasing concentration and HMF did not exert a significant effect. Fermentations of the whole slurry from steam exploded wheat straw were completely inhibited by a synergistic effect due to the presence of 1.5 g/L acetic acid, 0.15 g/L furfural and 0.05 g/L HMF together with solid fraction. When using only the solid fraction from steam explosion, hydrolysates presented 0.5 g/L of acetic acid, whose fermentations have submitted promising results, providing an ethanol yield of 0.45 g ethanol/g sugars and the final ethanol concentration reached was 12.2 g/L (10.9 g ethanol/100 g DM).

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Lignocellulosic materials are a promising alternative energy to fossil resources because they are the most abundant natural renewable organic material that exists on earth and there are concerns over CO<sub>2</sub> emissions from fossil fuels (Prasad et al., 2007).

Conversion process of lignocellulosic biomass to ethanol can be divided into five unit operations (Merino and Cherry, 2007). (1) Size reduction to increase surface area and uniformity, (2) pretreatment to disrupt lignin and hemicellulose, reduce cellulose crystallinity and increase the porosity of the biomass, (3) enzymatic hydrolysis to convert sugar polymers to monomeric sugars, (4) fermentation to produce ethanol from those monomeric sugars and (5) ethanol recovery using distillation or other separation technologies.

Lignocellulose is a matrix of cross-linked polysaccharide networks, mainly cellulose and hemicellulose, which are tightly bound to lignin (Zaldivar et al., 2001). The efficient use of the sugar content of lignocellulosic biomass is the key for the economic feasibility of ethanol production. This implies that in addition to the glucose obtained from the cellulosic portion, all sugars released from the hemicellulose fraction, such as xylose and non-structural sugars, which may represent a significant percentage of the fermentable sugars, should be fermented (Díaz et al., 2009). Hence, the total

ethanol production can be increased using an efficient xylose-fermenting yeast that can convert both hexose and pentose sugars (Nigam, 2001). Among the xylose-fermenting yeasts, *Pichia stipitis* has shown the most promising results for industrial application, because it ferments xylose with a high ethanol yield and it is also able to ferment glucose. Besides, *P. stipitis* does not require vitamin addition for xylose fermentation and it is capable to ferment a wide range of sugars, including cellobiose (Agbogbo and Wenger, 2006).

On the other hand, some of the compounds formed during pretreatment of lignocellulosic biomass such as sugar decomposition products and lignin degradation products may have a potential inhibitory effect on the fermentation process. Inhibitory compounds in lignocellulosic hydrolysates comprise aliphatic acids (i.e. acetic, formic and levulinic acid), furaldehydes (i.e. furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF)), aromatic compounds (i.e. phenolics) and extractives (Martín and Jönsson, 2003). The number and identity of these toxic compounds varies with the type of the raw material and pretreatment conditions. An extensive study about the effects of each pretreatment has been done recently (Hendriks and Zeeman, 2009). In this study, steam explosion, a leading pretreatment for wheat straw biomass, was used as a delignification and hemicellulose solubilization method (Tomás-Pejó et al., 2008).

The main objective of this work is to analyze the influence of inhibitors formed during steam explosion of lignocellulosic biomass on ethanol fermentation by *P. stipitis*. This study is focused on three inhibitors: acetic acid, 2-furaldehyde (furfural) and

\* Corresponding author. Tel.: +34 983 42 32 37; fax: +34 983 42 36 16.

E-mail address: [maite@iq.uva.es](mailto:maite@iq.uva.es) (M.T. García-Cubero).

5-hydroxymethylfurfural (HMF) in a concentration range of (0.5–3.5 g/L), (0.5–2 g/L) and (0.1–0.5 g/L), respectively. Three different approaches were used: first, the inhibitory effect of acetic acid, furfural and HMF in a model substrate medium, was studied. Then, the fermentation of wheat straw hydrolysates was analyzed. Finally, the effect of steam explosion liquid addition and the influence of the presence of solid fraction during the fermentation process were also studied.

## 2. Methods

### 2.1. Microorganism and media

*P. stipitis* DSM 3651 was obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. The yeast was maintained on YEPX agar plates at 4 °C in a refrigeration chamber containing 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L xylose and 20 g/L agar. The inoculum medium was prepared as follows: a solution of 10 g/L yeast extract and 20 g/L peptone was sterilized at 120 °C for 20 min in an autoclave. Carbon source, 20 g/L xylose was then added after being sterilized (0.20 µm Sterile Filters, Ministart Sartorius) and *P. stipitis* was supplemented from YEPX agar plates. Inoculum was grown aerobically on a rotatory shaker (WY-200, Comecta, S.A.) at 175 rpm and 30 °C for 24 h. Yeast initial concentration was 0.5 g/L in all experimental runs.

### 2.2. Fermentation with model substrate media

When inhibitor effect was studied individually, model fermentation medium was composed of 35 g/L glucose, 20 g/L xylose, 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 0.47 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12.8 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.51 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.47 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. This medium was adjusted to pH 5 with a buffer composed of two solutions (mL/L fermentation medium): 250 mL succinic acid 0.2 M and 267 mL NaOH 0.2 M. The medium was autoclaved at 120 °C for 20 min, and sugars were added after being filtered (0.20 µm Sterile Filters, Ministart Sartorius).

Fermentation experiments were carried out in sterile 125 mL serum bottles with cap and needle to remove CO<sub>2</sub> in a rotatory shaker at 30 °C and 175 rpm for 168 h. Experiments were performed with no oxygen supply, but they were not strictly anaerobic because there was air before closing serum bottles. Each serum bottle was filled with 25 mL of fermentation inoculated with 10% (v/v) growth culture.

Inhibitor compounds (acetic acid, furfural and HMF) were added either separately to study their individual effect using typical inhibitors concentrations for wheat straw hydrolysates according to the literature (Delgenes et al., 1996; Díaz et al., 2009) or as a mixture to simulate similar sugars and inhibitors concentration of wheat

straw hydrolysates. A fermentation experiment without inhibitors was also carried out as a control. Fermentation process was monitored for 7 days by taking samples at 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h for analyses. Table 1 summarizes the initial sugars and inhibitors concentration for fermentations performed with model solutions. All the experiments were carried out in triplicate and the average data are shown.

### 2.3. Wheat straw hydrolysates

#### 2.3.1. Raw material

Wheat straw used in experiments was provided by the Institute of Technological Agriculture of Castilla y León. Wheat straw was milled using a laboratory sieve mill into small particles of 20 mm prior to steam explosion pretreatment. Raw material was kept in an oven at 45 °C until use. Wheat straw had the following composition (% dry weight): cellulose, as glucose, 32.4; hemicellulose, as xylose, 19.1; acid lignin, 21.3; ash, 6.4; moisture, 6.9.

#### 2.3.2. Wheat straw pretreatment and saccharification

Steam explosion was used as a delignification and hemicelluloses release method. Pretreatment assays were carried out in a 5 L stainless steel batch reactor equipped with a quick-opening valve and a controller for residence time and temperature. Wheat straw was exploded at 210 °C for 10 min. After pretreatment, the slurry was recovered and residual solid was separated by filtration. Liquid fraction was stored in a refrigeration chamber. Depending on the experiment, the whole slurry or just the solid fraction was used.

After steam explosion, enzymatic hydrolysis was performed using a mixture of cellulase (NS50013) and β-glucosidase (NS50010), 0.11 g/g cellulose and 0.05 g/g cellulose were added, respectively. Enzymes were kindly donated by Novozymes (Denmark). Hydrolysis was carried out at 50 °C for 72 h in a 250 mL stirred tank at 175 rpm with mechanical agitation (Heidolph RZR 2020). When solid fraction was used for experiments, pretreated material was suspended in 0.05 M citrate buffer (pH 5.0) with a solid content of 10% (w/v), while the whole slurry at the same solid loading was supplemented with a concentrated 0.5 M citrate buffer to avoid sugars dilution. Depending on the experiment, the whole hydrolysate or just the liquid fraction (separated by vacuum filtration) were used for fermentation process.

### 2.4. Fermentation of wheat straw hydrolysates

Experimental runs can be firstly divided into two groups of experiments after steam explosion. In order to analyze the influence of the addition of steam explosion liquid, two sets of experiments were carried out either with the whole slurry (WS) or just with the solid fraction (SF). In addition, to study the influence of solid fraction

**Table 1**  
Initial sugars and inhibitors concentrations for synthetic fermentations.

Experiment	Initial sugars concentration (g/L)		Inhibitor concentration (g/L)		
	Glucose	Xylose	Acetic acid	Furfural	HMF
Control	36.5	21.0	0	0	0
HAc2.5	35.1	20.5	2.5	0	0
HAc1.5	35.0	20.5	1.5	0	0
HAc0.5	35.0	20.1	0.5	0	0
F2	35.8	20.2	0	2	0
F1	35.1	21.4	0	1	0
F0.5	34.8	21.3	0	0.5	0
HMF0.5	37.0	20.5	0	0	0.5
HMF0.1	36.7	20.2	0	0	0.1
Model FH-SF	22.3	5.8	0.5	0	0
Model FH-WS	21.4	11.1	1.5	0.15	0.05

**Table 2**  
Initial composition of wheat straw hydrolysates for fermentation process.

Fermentation experiment	Initial sugars concentration (g/L)		Inhibitor concentration (g/L)		
	Glucose	Xylose	Acetic acid	Furfural	HMF
FH-WS	23.77	11.29	1.52	0.14	0.05
FH-SF	22.64	5.84	0.48	0	0
WH-WS	23.23	11.32	1.56	0.16	0.05
WH-SF	23.48	6.21	0.52	0	0

in fermentations, a second level of experiments were made after enzymatic hydrolysis step, using either the whole hydrolysate after enzymatic hydrolysis (WH) or the filtered hydrolysate (FH). By way of summary, four sets of experiments were performed: (1) WH-SF and (2) WH-WS experiments, where the whole hydrolysate was used after enzymatic hydrolysis and the solid fraction or the whole slurry was taken after steam explosion, respectively; and (3) FH-SF and (4) FH-WS experiments, where the filtered hydrolysate was used after enzymatic hydrolysis and the solid fraction or the whole slurry from steam explosion was utilized, respectively.

For WH-SF and WH-WS experiments, substrate from enzymatic hydrolysis was directly inoculated with 10% (v/v) growth culture. Fermentations were carried out in a stirred tank at 30 °C and 175 rpm for 168 h. The medium was pasteurized prior fermentation process maintaining a temperature of 80 °C for 30 min. For FH-SF and FH-WS experiments, solid fraction was separated by vacuum filtration. Liquid portion was fermented under similar conditions as model media experiments. Fermentation process was monitored for 7 days and samples were taking at 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 h for analyses. Table 2 summarizes the concentration of inhibitors and fermentable sugars found in wheat straw hydrolysates after hydrolysis step. In all set of experiments, there was not sugar supplementation as it has been used by other researchers (Martín et al., 2006; Söderström et al., 2004). All the experiments were carried out in triplicate and the average data are shown.

## 2.5. Analytical methods

Sugar concentrations, inhibitor concentrations and ethanol production were determined by HPLC. The detector was based on the refractive index measurement. An Aminex HPX-87H column was used, enabling quantification of glucose, xylose, acetic acid, furfural, HMF and ethanol. Operational conditions were 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as mobile phase, at a flow rate of 0.6 mL/min and 60 °C. All the samples were centrifuged at 5000 rpm for 5 min and filtered before being analyzed. Cellular growth was determined by measuring optical density of cells (Hitachi U-2000) at 600 nm and correlated with dry weight. All the analyses were performed in duplicate.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Effect of inhibitors on model media fermentations

Effect of the main inhibitors produced during lignocellulosic biomass pretreatment has been studied in fermentation process. Acetic acid, furfural and HMF are three of the major inhibitors which appear in cereal straw hydrolysates in different concentrations depending on pretreatment and enzymatic hydrolysis conditions (temperature, retention time, biomass load, enzyme ratio...). The influence of such inhibitors on *P. stipitis* performance has been studied in terms of biomass growth, sugars uptake, ethanol yield and productivities. Inhibitors were added either separately or as a mixture using different initial concentrations.

#### 3.1.1. Acetic acid

Concerning the individual effect of acetic acid, it was observed that inhibition increased with acetic acid concentration and media containing 3.5 g/L of acetic acid inhibited completely both growth and ethanol production. Ethanol theoretical yield, which is defined as the percentage of the total amount of ethanol that could be produced from all sugars available, decreased when acetic acid was present in the medium from 76.5% corresponding to the control to 0% in HAC3.5, 36.4% in HAC2.5, 61.8% in HAC1.5 and 63.8% in HAC0.5. Fig. 1(a–c) show fermentation profiles for sugars consumption (glucose and xylose), ethanol production and biomass growth. In control experiment, after 24 h, glucose was completely exhausted and xylose was gradually consumed in 168 h after glucose depletion. As it can be seen in Fig. 1(a), xylose consumption was much more affected than glucose consumption and the effect was higher when acetic acid concentration increases. Cellular growth and ethanol production were considerably affected when concentration increased to 2.5 g/L. Ethanol concentration obtained in HAC2.5, HAC1.5 and HAC0.5 experiments were lower than that reached in the control, 10.4 g/L, 17.5 g/L, 18.0 g/L and 22.8 g/L, respectively. In the control, maximum ethanol productivity was 0.61 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> after 24 h of experiment, when all glucose was consumed. This value decreased to 0.14 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> at the end of the assay (168 h), when all xylose was depleted. In HAC1.5 and HAC0.5, it can be observed the same effect but productivities were smaller, 0.15 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (24 h) and 0.10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (168 h) and 0.57 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (24 h) and 0.11 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (168 h), respectively.

Ethanol yields, which are defined as the ratio between ethanol production and sugars consumption, were slightly higher than those obtained in the control. Despite of producing a lower ethanol concentration because of cellular growth inhibition, ethanol was produced with lower sugars uptake that caused an increase in that ratio. Ethanol yield in the control was 0.39 g ethanol/g sugars (168 h), while in HAC2.5, HAC1.5 and HAC0.5 experiments were 0.44 g ethanol/g sugars, 0.44 g ethanol/g sugars and 0.39 g ethanol/g sugars (168 h), respectively. Björling and Lindman (1989) reported complete inhibition of ethanol production by *P. stipitis* in synthetic medium containing 3.9 g/L acetic acid at pH 4, while Díaz et al. (2009) observed cellular growth in fermentations by *P. stipitis* on 20 g/L glucose and 15 g/L xylose synthetic medium with 6 g/L of acetic acid, but as far as ethanol yields are concerned, also reported an increase with acetic concentration in fermentations performed with 3 and 6 g/L of acetic acid.

#### 3.1.2. Furfural

Regarding inhibitory effect of furfural, *P. stipitis* was inhibited by its presence, but the inhibition was not as strong that caused by acetic acid. In this case, the effect was the delay of sugars consumption and consequently a decrease on ethanol productivity during the first 24 h increasing with concentration. Theoretical yield reached similar values about 73.4%, 74.5% and 75.4% (F2, F1 and F0.5, respectively) compared to 76.5% corresponding to the control. Fermentation profiles for sugars concentration, ethanol production and biomass growth are depicted in Fig. 2(a–c). Glucose consumption and cellular growth reached the same value as in the control after 96 h for all experiments when furfural was added,

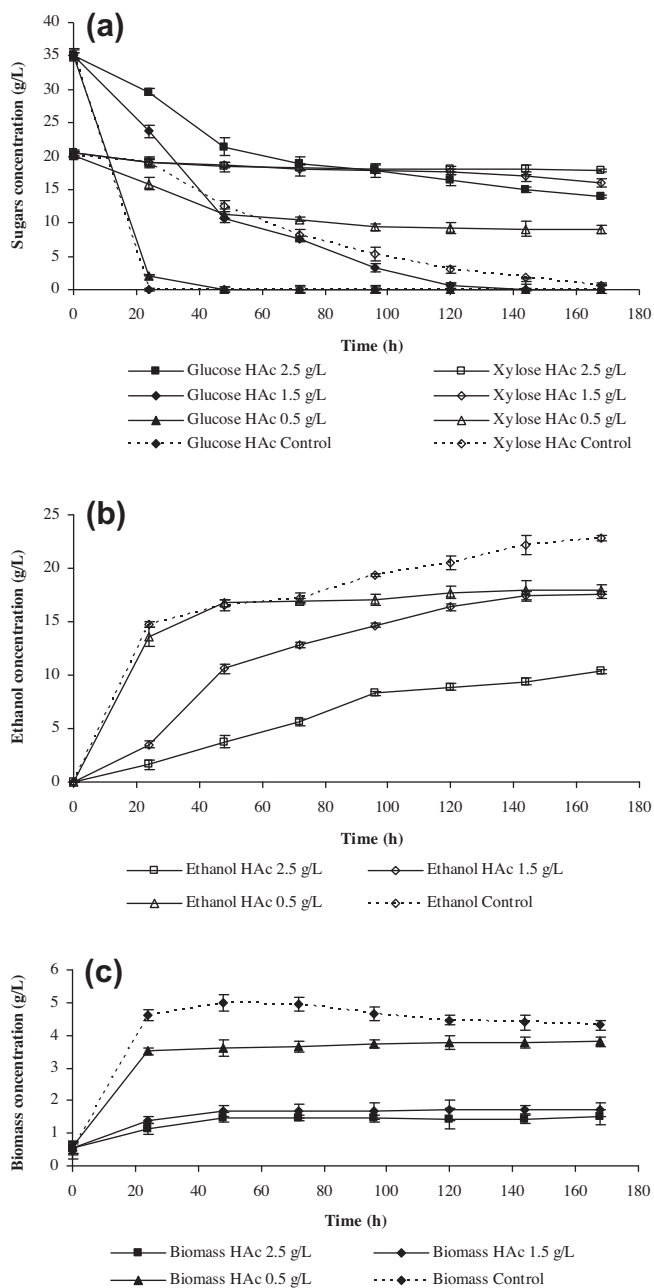


Fig. 1. (a–c) Fermentation profiles with acetic acid as inhibitor.

which means a decrease in sugar uptake rates. Inhibition of xylose consumption only was produced when furfural concentration reached 2 g/L. Ethanol concentrations in F2, F1 and F0.5 experiments were similar to that reached in the control, 21.0 g/L, 21.6 g/L, 21.6 g/L and 22.8 g/L, respectively. Thus, the inhibitory effect of furfural is observed in terms of ethanol production rate and this effect increased with furfural concentration. Productivities decreased compared to the control, but the effect was more attenuated. In F1 experiment, ethanol productivity decreased to the half value of the control,  $0.34 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  after 24 h. Values of 0.24 and  $0.50 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  at 24 h were obtained for F2 and F0.5 experiments, respectively. Similar ethanol productivity, about  $0.11 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  was observed at the end of the experiments with furfural as inhibitor, value close to  $0.14 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  obtained in the control. Cellular growth was slightly affected by the presence of furfural

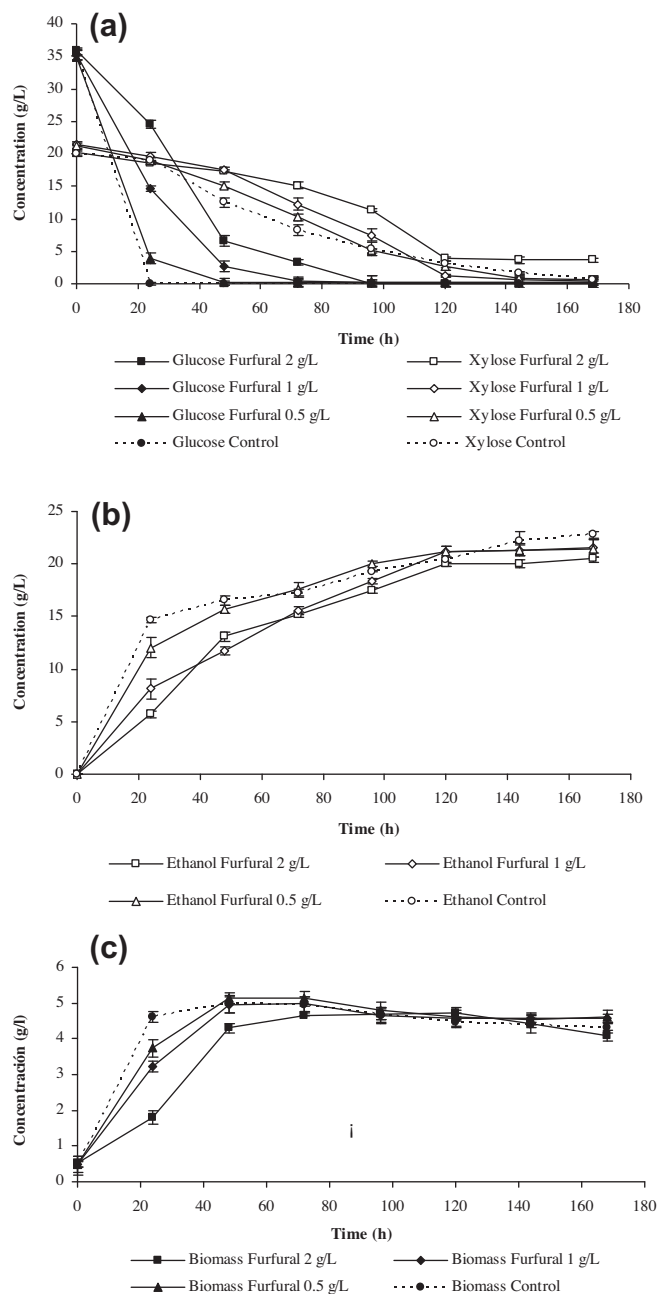


Fig. 2. (a–c) Fermentation profiles with furfural as inhibitor.

as it can be seen in Fig. 3(c). Ethanol yield in the control was 0.39 g ethanol/g sugars, very similar to F2, F1 and F0.5 experiments, 0.40, 0.39 and 0.39 g ethanol/g sugars (168 h), respectively. Palmqvist et al. (1999) did not observe any inhibitory effect in fermentations by *Candida shehatae* in furfural concentrations up to 2 g/L. Díaz et al. (2009) reported a decrease in ethanol productivity in fermentations carried out with 2 g/L of furfural and no sugar consumption in experiments performed with 4 g/L furfural in fermentations with *P. stipitis* at initial sugar concentrations of 20 g glucose/L and 15 g xylose/L.

At the end of the experiments, no furfural and HMF were found, which means that the microorganism assimilated these compounds before growth and ethanol production as it has been reported by other researchers (Tomás-Pejó et al., 2008; Liu et al., 2004; Taherzadeh et al., 2000). Furfuryl alcohol was not analyzed, but it should have been present as a product of fermentative



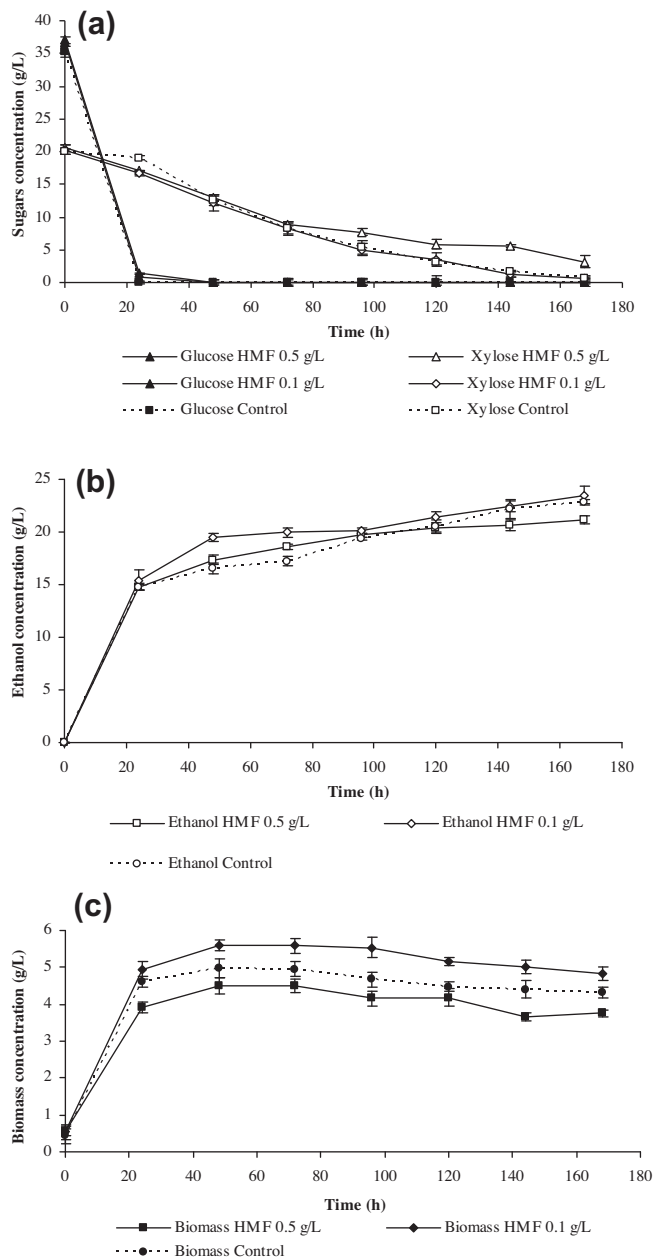


Fig. 3. (a–c) Fermentation profiles with HMF as inhibitor.

metabolism of furfural (Delgenes et al., 1996). It could explain why higher furfural concentrations extended the lag phase due to cells needed more time to synthesize enzymes for furfural removal.

### 3.1.3. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)

Regarding HMF, xylose consumption was inhibited by the presence of 0.5 g/L HMF in the fermentation media, but the effect was not noteworthy compared to furfural and acetic acid. Ethanol theoretical yields were 75.1% and 82.5%, which were slightly higher than that reached in the control for HMF0.1 assay. Fermentation profiles are depicted in Fig. 3(a–c). As it can be seen, glucose consumption is not affected by presence of HMF and ethanol concentrations reached similar values in all the experiments. When HMF was added in a concentration of 0.1 g/L had a positive effect, cellular growth was slightly higher compared to the control. At the end of the fermentation process, ethanol yields were similar to the control, obtaining 0.38 and 0.42 g ethanol/g sugars for HMF0.5 and HMF0.1 experiments, respectively. Fermentation profiles were

rather similar between control and HMF0.1 experiment, even ethanol concentration was higher, 24.0 g/L, only xylose consumption was slightly affected because there was not a total depletion when HMF concentration increased from 0.1 to 0.5 g/L. Delgenes et al. (1996) reported an inhibition effect when HMF was higher than 1 g/L.

Regarding to other microorganisms, Delgenes et al. (1996) reported the effect of inhibitory compounds on xylose fermentation by *P. stipitis*, *C. shehatae*, *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *C. shehatae* showed a good tolerance to acetic acid, but cell growth and ethanol production were almost completely inhibited when furfural appeared in a concentration of 2 g/L. In contrast to *Z. mobilis*, which showed a good tolerance to acetic acid, furfural and HMF, *S. cerevisiae* was significantly inhibited by these compounds. The toxicity problem of furfural could be overcome by operating with high cell density in continuous fermentation with cell recycle, as a way to minimize the lag phase (Cantarella et al., 2004).

### 3.1.4. Effect of ternary mixture of acetic acid, furfural and HMF

In order to study the behavior of *P. stipitis* when the three main inhibitors are present in fermentation media and to compare results between wheat straw hydrolysates and synthetic media, two set of experiments were performed: (1) fermentation of model solutions similar to FH-SF hydrolysate containing 0.5 g/L of acetic acid, and (2) fermentation of model solutions similar to FH-WS hydrolysate containing 1.5 g/L of acetic acid, 0.15 g/L of furfural and 0.05 g/L of HMF. The presence of the three inhibitors had an effect on sugar consumption, causing a complete inhibition of xylose utilization and consuming glucose at a lower rate in comparison to the control experiment. In the same way as experiments performed with inhibitors added separately, ethanol yield was greater than in the control, 0.46 g ethanol/g sugars (168 h). The process which represented FH-SF hydrolysate led to similar results to HAC0.5 experiment, because the difference was only the initial concentration of total sugars. These data provided the basis for comparison with wheat straw hydrolysates, as explained in the following section.

### 3.2. Fermentation of wheat straw hydrolysates. Influence of presence of solid fraction and steam explosion liquid addition in fermentation experiments

Two set of experimental runs were performed with wheat straw hydrolysates using either the whole hydrolysate from enzymatic hydrolysis (WH-SF and WH-WS experiments) or the filtered hydrolysate after this step (FH-SF and FH-WS experiments). Table 2 shows the initial composition of media regarding sugars and inhibitors formed in the pretreatment step. Initial xylose concentration was higher when the whole slurry from steam explosion was enzymatically hydrolyzed because the steam explosion liquid contains the pentose sugars released during the pretreatment. On the other hand, only acetic acid was present when the solid fraction was used for enzymatic hydrolysis (FH-SF and WH-SF experiments), but furfural and HMF appeared when steam explosion liquid was added (FH-WS and WH-WS experiments).

In the first group of assays, the whole hydrolysate from enzymatic hydrolysis was utilized for fermentations. Fig. 4 illustrates fermentation profiles for these experiments. Experiment WH-SF offered an ethanol yield of 0.45 g/g and a theoretical ethanol yield of 80.2% with a maximum ethanol concentration of 12.2 g/L (10.9 g ethanol/100 g DM), whereas experiment WH-WS showed a complete inhibition of *P. stipitis* growth and no ethanol was obtained. This result could be due to the synergic effect of the three inhibitors together with the presence of the solid fraction because these two situations separately did not produce absolute inhibition of

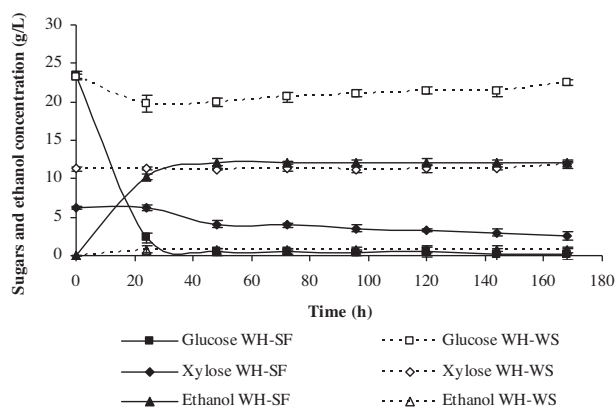


Fig. 4. Fermentation profiles of wheat straw hydrolysates using the whole hydrolysate from enzymatic hydrolysis.

fermentation process by *P. stipitis*. Effect of inhibitors as a ternary mixture was studied in FH-WS Model experiments when cellular growth was allowed and consequently ethanol was produced although the productivity was lower compared to the control. From WH-SF experiments, it can be concluded that the presence of the solid fraction in the fermentation process seems to show a good effect in ethanol production when steam explosion liquid was not added, obtaining the highest fermentation efficiency among the rest of the experiments. This effect could be caused by the release of sugars that still remained in the lignocellulosic biomass due to the presence of enzymes in the solid from the previous saccharification step.

Arslan and Eken-Saraçoglu (2010) obtained a maximum ethanol concentration of 16.8 g/L in fermentations with *P. stipitis* of hydrolysates prepared from hazelnut shells delignified with 3% NaOH at room temperature and detoxified with overliming and charcoal. They achieved an ethanol yield of 0.449 g/g from these hydrolysates containing 50 g/L of total reducing sugars, when xylose was externally added (32.9 g/L). Buaban et al. (2010) attained an ethanol concentration of 8.4 g/L, corresponding to a conversion yield of 0.29 g ethanol/g available sugars from undetoxified pretreated bagasse hydrolysate. In this case, pretreatment consisted of size reduction by ball milling for 2 h prior separate enzymatic hydrolysis and fermentation at pH 5.5, 30 °C for 24 h. Cho et al. (2011) obtained similar results with a hexose sugar-based ethanol yield between 0.42 and 0.46 g/g from acid hydrolysates based on the construction and demolition wood waste using *P. stipitis*. Regarding to other yeasts, Tomás-Pejó et al. (2008) reported inhibitory compounds such as acids (acetic, formic, coumaric and ferulic acid), aldehydes (furfural, HMF) and phenolic compounds (vanillin, syringaldehyde) affected the fermentation performance of F12 strain (engineerically modified *S. cerevisiae* to allow xylose consumption) on a steam-exploded wheat straw prehydrolysate (filtered fraction from steam explosion), resulting in a lag phase in cell growth and the sugar consumption was delayed.

On the second group of assays, fermentations were carried out using only the filtered portion from enzymatic hydrolysis (FH-SF and FH-WS experiments). Experiment FH-SF offered an ethanol yield of 0.42 g/g and a theoretical yield of 77.3% with a maximum ethanol concentration of 11.3 g/L (10.1 g ethanol/100 g DM). Ethanol concentration and theoretical yield were lower in FH-WS fermentation, 9.1 g/L (8.2 g ethanol/100 g DM) and 50.9%, respectively. As it can be observed in Fig. 5, xylose was not consumed in this experiment due to the presence of the three inhibitors. As previously stated, model fermentations of filtered hydrolysates were performed in order to compare fermentation profiles and *P. stipitis* performance between synthetic solutions and wheat straw hydrolysates at analogous initial sugars and inhibitors con-

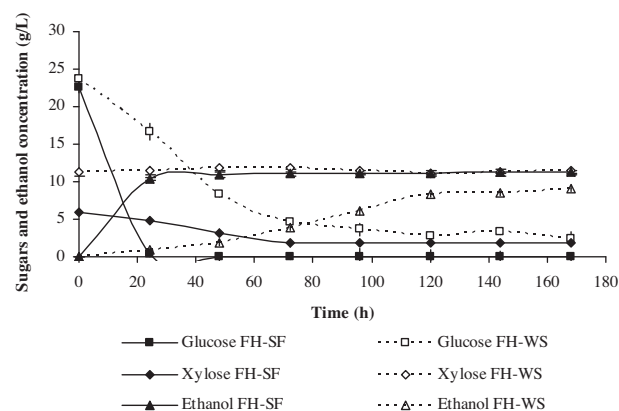


Fig. 5. Fermentation profiles of wheat straw hydrolysates using the filtered hydrolysate from enzymatic hydrolysis.

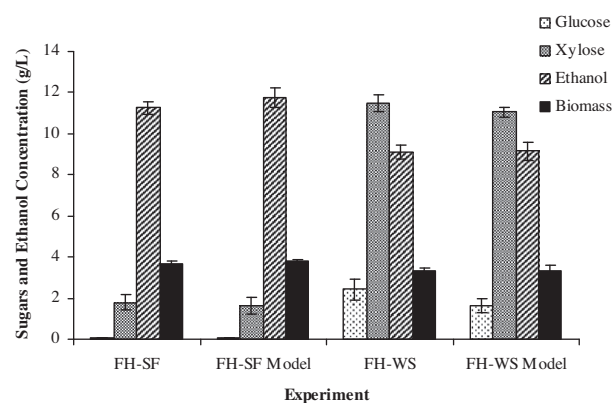


Fig. 6. Comparison of sugars and ethanol final concentration between wheat straw hydrolysates and model media.

centration. A comparison between sugars and ethanol concentrations obtained in filtered hydrolysates (FH-SF and FH-WS) and synthetic solutions (FH-SF Model and FH-WS Model) at the end of the fermentation process is shown in Fig. 6. In FH-WS experiment, acetic acid, furfural and HMF are present due to the addition of steam explosion liquid without solid fraction in the assay. Ethanol concentration and productivity reached were similar compared to the model (FH-WS Model), thus indicates there was not other compounds in a considerable proportion that can inhibit the fermentation process in the steam explosion liquid. When the three inhibitors were present together with solid fraction, inhibition was complete in terms of cellular growth and ethanol production, thus *P. stipitis* can not perform the fermentation process when whole slurry from steam explosion is used. This effect could be solved by detoxification, as overliming or activated charcoal (Kuhad et al., 2010; Arslan and Eken-Saraçoglu, 2010; Cantarella et al., 2004). When the filtered portion from enzymatic hydrolysis was used, there was ethanol production and cellular growth was slightly affected whereas xylose consumption was not consumed. Best results referring to ethanol productivity and cellular growth correspond to WH-SF experiment, when only solid fraction from steam explosion was used and *P. stipitis* fermented the whole enzymatic hydrolysate.

#### 4. Conclusions

Regarding inhibitors studied, acetic acid reduced ethanol productivity with increasing concentration and inhibited completely

the fermentation process at 3.5 g/L. Furfural produced a delay on sugar consumption rates with increasing concentration and HMF did not have a significant effect at the concentration range studied. Wheat straw hydrolysates, containing only the solid portion from steam explosion pretreatment and the whole enzymatic hydrolysate (WH-SF experiment), led to promising results using *P. stipitis*, providing an ethanol yield of 0.45 g/g and a final ethanol concentration of 12.2 g/L (10.9 g ethanol/100 g DM). When whole slurry from steam explosion was used, there was a complete inhibition in terms of cellular growth and ethanol production due to the presence of the three main inhibitors together with solid fraction. Future work will be focused on detoxification methods in order to use the whole hydrolysate and optimize the use of xylose.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support to the Ministerio de Ciencia e Innovación (CTQ2006-15217), the Instituto Tecnológico de Castilla y León (VA-15-C2-1) and the Junta de Castilla y León (GRE-233) for its contribution to the development of the project.

## References

- Agbogbo, F.K., Wenger, K.S., 2006. Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* 28, 2065–2069.
- Arslan, Y., Eken-Saraçoğlu, N., 2010. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia stipitis* to ethanol. *Bioresour. Technol.* 101, 8664–8670.
- Björling, T., Lindman, B., 1989. Evaluation of xylose-fermenting yeasts for ethanol production from spent sulfite liquor. *Enzyme Microb. Technol.* 11 (4), 240–246.
- Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V., Pichyangkura, R., Rengpipat, S., Eurwilaichitr, L., 2010. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *J. Biosci. Bioeng.* 110 (1), 18–25.
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., Alfani, 2004. Effect of inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. *Biotechnol. Prog.* 20, 200–206.
- Cho, D.H., Shin, S.-J., Bae, Y., Park, C., Kim, Y.H., 2011. Ethanol production from acid hydrolysates based on the construction and demolition wood waste using *Pichia stipitis*. *Bioresour. Technol.* 102, 4439–4443.
- Delgenes, J.P., Moletta, R., Navarro, J.M., 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 220–225.
- Díaz, M.J., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., Moya, M., Castro, E., 2009. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 891–899.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Khasa, Y.P., Singh, A., 2010. Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): pretreatment, saccharification and fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 8348–8354.
- Liu, Z.L., Slininger, P.J., Dien, B.S., Berhow, M.A., Kurtzman, C.P., Gorsich, S.W., 2004. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 8, 345–352.
- Martín, C., Jönsson, L.J., 2003. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Enzyme Microbiol. Technol.* 32, 386–395.
- Martín, C., González, Y., Fernández, T., Thomsen, A.B., 2006. Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugar-cane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 1669–1677.
- Merino, S., Cherry, J., 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 108, 95–120.
- Nigam, J.N., 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J. Biotechnol.* 87, 17–27.
- Palmqvist, E., Almeida, J.S., Hahn-Hägerdal, B., 1999. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 447–454.
- Prasad, N., Singh, A., Joshi, H.C., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour. Conserv. Recycl.* 50, 1–39.
- Söderström, J., Galbe, M., Zacchi, G., 2004. Effect of washing in yield in one- and two-step steam pretreatment of softwood for production of ethanol. *Biotechnol. Prog.* 20, 744–749.
- Taherzadeh, M.J., Gustafsson, L., Niklasson, C., Lidén, G., 2000. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 701–708.
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Olsson, L., 2008. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 1122–1131.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson, L., 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 17–34.





# Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*



Carolina Bellido, Gerardo González-Benito, Mónica Coca, Susana Lucas, María Teresa García-Cubero \*

Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Valladolid, Dr. Mergelina s/n, 47011 Valladolid, Spain

## HIGHLIGHTS

- ▶ Aeration increased the efficiency of ethanol production by *Pichia stipitis*.
- ▶ An adequate level of aeration led to better xylose utilization on model substrates.
- ▶ Ozonized wheat straw hydrolysates were effectively fermented by *Pichia stipitis*.
- ▶ Oxygen supply in ozonized hydrolysates reduced fermentation time.
- ▶ Aeration increased ethanol production in ozonized wheat straw hydrolysates.

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 1 August 2012  
 Received in revised form 15 January 2013  
 Accepted 17 January 2013  
 Available online 29 January 2013

### Keywords:

Aeration  
 Bioethanol  
 Ozone pretreatment  
*Pichia stipitis*  
 Wheat straw

## ABSTRACT

The influence of aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* was studied in wheat straw hydrolysates subjected to ozone pretreatment for the first time. In a first stage, different aeration rates ranging from 0.03 to 0.50 L air/min, which corresponds to a volumetric oxygen transfer coefficient from 1.1 to 9.6 h<sup>-1</sup>, were applied to model glucose/xylose substrates. The most promising value was found to be 3.3 h<sup>-1</sup> (0.1 L air/min) leading to better xylose utilization, an ethanol yield of 0.40 g ethanol/g sugars and complete depletion of sugars at 72 h. In a second stage, the effect of aeration was analyzed in ozonized wheat straw hydrolysates. Sugars were completely depleted at 96 h and ethanol yield reached a value of 0.41 g ethanol/g sugars. The addition of controlled oxygen ( $K_L a = 3.8 \text{ h}^{-1}$ ) enhances the efficiency of the process causing an increase of 29.1% in ethanol production and a considerable reduction of 42.9% in fermentation time as compared to non-aerated hydrolysates.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The progressive replacement of fossil fuels by renewable energies is becoming an important target which has to be attained. The Directive 2009/28/EC on the promotion of the use of biofuels increases the share of renewable energies in the transport sector to a minimum of 10% by 2020, specially focused on sustainable bio-fuel generation with Greenhouse Gases (GHG) benefits. The transportation sector is responsible for 60% of the world oil consumption and, in GHG emissions, accounts for more than 70% of global carbon monoxide and 19% of global carbon dioxide. In addition to environmental issues, the increasing dependency on oil imports and the subsequent rise in prices are the main concerns behind the need to find an economically competitive and readily available alternative fuel (Balat, 2011; Gnansounou, 2010).

Bioethanol from lignocellulosic biomass is an attractive substitute which reduces both consumption of crude oil and environmental pollution (Singh et al., 2010). Nowadays, it is blended with gasoline without any adaptation to cars' engines in concentrations of 5% bioethanol under the European Union quality standard EN 228 (Balat, 2011). Efforts are being made to reduce the production costs of lignocellulosic ethanol by identifying key drivers as the improvement of biomass pretreatments or the enhancement of saccharification and fermentation steps (Galbe et al., 2007).

In this study, wheat straw has been selected as a raw material since it is one of the most abundant and cheap feedstocks for bioethanol production in the area of Castilla y León (Spain). Wheat straw is also one of the four agro-wastes most plentiful worldwide and it is one of the most favorable feedstocks used for bioethanol production due to its availability (Sarkar et al., 2012).

The pretreatment of lignocellulosic materials is one of the most challenging steps in the whole process and the search for effective methods to reduce biomass lignin content is an important issue. In this research, ozone treatment has been used as a delignification

\* Corresponding author. Tel.: +34 983 42 32 37; fax: +34 983 42 36 16.  
 E-mail addresses: [maite@iq.uva.es](mailto:maite@iq.uva.es), [mtgcubero@gmail.com](mailto:mtgcubero@gmail.com) (M.T. García-Cubero).

method, owing to the fact that it is a promising alternative to enhance the production of fermentable sugars in the hydrolysis step from wheat straw (García-Cubero et al., 2009). Enzymatic hydrolysis is the most extensively used saccharification method obtaining good yields when wheat straw is subjected to steam explosion and ozone treatment (Ballesteros et al., 2006; García-Cubero et al., 2012). After the hydrolysis step, the challenge is focused on the microorganism responsible for carrying out the conversion of fermentable sugars to bioethanol. *Pichia stipitis* has shown promising results in a previous work (Bellido et al., 2011) as one of the fermentative yeasts which is able to degrade both hexoses and pentoses. The efficiency of a fermentation process depends strongly on operational conditions in addition to the medium composition (Silva et al., 2012). Considering such issues, oxygen present in the medium is considered a crucial factor involved in sugar fermentation by yeasts, since it is the key determining the balance between growth and product formation (du Preez, 1994).

The aim of this work is to study the influence of limited aeration on the fermentation process by *P. stipitis* with the purpose of increasing the sugars consumption rate, mainly hemicelluloses, and consequently decreasing the time needed to attain good ethanol productivities and yields in ozonized wheat straw hydrolysates. Different aeration rates have been studied on model substrate media, finding the best level and applying these results to pretreated wheat straw hydrolysates. Furthermore, the effects of initial inoculum concentration and by-product formation have also been analyzed.

## 2. Methods

### 2.1. Microorganism and inoculum

*P. stipitis* DSM 3651 was maintained on agar plates at 4 °C to be used in the experiments. For inoculum preparation, cells in the maintenance medium were transferred to 125 mL Erlenmeyer flasks containing 150 mL of inoculum medium composed by 10 g/L yeast extract and 20 g/L peptone, sterilized at 120 °C for 20 min in an autoclave, and 20 g/L sterilized xylose filter (0.20 mm Sterile Filters, Ministart Sartorius). The flasks were incubated aerobically on a rotatory shaker (WY-200, Comecta, S.A.) at 30 °C, 175 rpm for 24 h and the inoculum was transferred to the reactor in a concentration range of 0.5–2 g/L depending on the experiment.

### 2.2. Model medium

In order to obtain optimal aeration conditions, fermentations were carried out in the model medium with different aeration. The medium was composed of 35 g/L glucose, 20 g/L xylose, 10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 0.47 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 12.8 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.51 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 0.47 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

#### 2.2.1. Addition of inhibitors from ozone pretreatment

Inhibitors from ozone pretreatment were added to model medium to analyze the effect of oxalic acid and the mixture of oxalic/acetic acid on *P. stipitis* sugars consumption and ethanol production. Oxalic acid was added either separately or as a mixture with acetic acid to simulate similar inhibitors concentration of wheat straw hydrolysates. Simulating unwashed and washed hydrolysates from ozone pretreatment, the initial inhibitors concentration was 6.5/1.5 g/L oxalic/acetic acid and 4.0/0.6 g/L oxalic/acetic acid, respectively. Initial oxalic acid concentration of 4.0 g/L was added to study its individual effect.

### 2.3. Wheat straw hydrolysates

#### 2.3.1. Raw material

Wheat straw was used in the experiments and was acquired from an agricultural area close to Valladolid, Castilla y León, Spain. Raw material was sieved in a laboratory scale mill to obtain particle sizes about 1–1.5 cm and kept in an oven at 37 °C. The characterization of the wheat straw was done following analytical methods described in a previous work (García-Cubero et al., 2009). The composition of the wheat straw was (% w/w): moisture,  $6.0 \pm 0.1$ ; cellulose, as glucose,  $35.2 \pm 2.0$ ; hemicellulose, as xylose,  $22.1 \pm 1.2$ ; acid insoluble lignin,  $18.8 \pm 3.2$ ; acid soluble lignin,  $3.3 \pm 0.4$ ; ash,  $7.5 \pm 0.3$ .

#### 2.3.2. Ozone pretreatment

The wheat straw was subjected to a pretreatment with ozone in a laboratory fixed bed reactor consisting of a glass column (50 cm height, 2.7 cm diameter) filled with 45–50 g of wheat straw and hydrated to 40% moisture. According to previous studies (García-Cubero et al., 2009), optimal conditions were used for ozonolysis: 2 h of pretreatment time, 60 L/h air flow rate and 2.7% ozone concentration in the gas phase, which means an ozone consumption of about 0.12 g  $\text{O}_3$ /g DM.

Ozone was produced in an ozonator (Sander 301) with air flow rate and electrical power supply control. The iodometric method (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1995) was used as an ozone measurement technique.

During the ozone pretreatment, oxalic acid is produced and acts as an inhibitor for further fermentations. Then, the pretreated wheat straw was washed with cold water (0.1 L/g DM) to reduce the amount of oxalic acid and was kept in an oven at 37 °C.

#### 2.3.3. Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis of ozonized wheat straw was performed in a 250 mL stirred tank containing 10% (w/w) of dry solid load. Optimal conditions for enzymatic hydrolysis were set in previous findings (Bellido et al., 2011): 175 rpm mechanical agitation, 50 °C, pH 5 and 72 h of reaction time. Enzymes were kindly donated by Novozymes (Denmark) and a mixture of cellulose (NS50013) and  $\beta$ -glucosidase, 0.11 g/g cellulose and 0.05 g/g cellulose respectively, was added. The composition of the hydrolysate was (g/100 g DM): glucose,  $20.53 \pm 1.52$ ; xylose,  $9.22 \pm 0.95$ ; oxalic acid,  $4.14 \pm 0.12$ ; acetic acid,  $0.98 \pm 0.25$ . After hydrolysis, samples were withdrawn, centrifuged, filtered (0.22 mm) and stored for analyses.

### 2.4. Fermentation

#### 2.4.1. Model medium

**2.4.1.1. Model fermentation with addition of ozone inhibitors.** In order to study the effect of ozone pretreatment inhibitors, oxalic and acetic acid, model fermentations were carried out in sterile 125 mL serum bottles with cap and needle to remove  $\text{CO}_2$  in a rotatory shaker at 30 °C and 175 rpm for 168 h. Fermentation broth consisted of 25 mL of model medium priorly described adjusted to pH 5 with 2 M NaOH and 2 M HCl solutions, inoculated with 10% (v/v) cells. Samples were taken every 24 h and all the experiments were done in duplicate.

**2.4.1.2. Model fermentation with different aeration rates.** Experiments were performed in a BIOSTAT Bplus 2 L bioreactor containing 0.9 L of fermentation medium inoculated with 0.1 L of culture medium. Fermentation runs were maintained at 30 °C, 175 rpm for 120 h and pH 5, which was controlled by automatic addition of 2 M NaOH and aeration was adjusted to the desired values. Samples were taken each 24 h over 168 h and stored for analyses. The

ethanol yield was calculated as the ratio of ethanol produced to sugars consumed. Ethanol productivity was obtained as the ratio of ethanol concentration to fermentation time. All experiments were carried out in duplicate.

#### 2.4.2. Wheat straw hydrolysates

The effect of aeration during the fermentation process by *P. stipitis* was studied in ozonized wheat straw hydrolysates. Fermentation runs were carried out in the same experimental setup as enzymatic hydrolysis experiments after a pasteurization process maintaining the hydrolysates at 80 °C for 30 min. Afterwards, the temperature was set at 30 °C and substrates were directly inoculated with 10% (v/v) cells. The pH was adjusted to 5 by the addition of 2 M NaOH and the process was monitored over 120 h, taking samples every 24 h. Fermentation parameters were calculated in the same way as above. All the experiments were conducted in duplicate.

#### 2.5. Aeration and $K_La$ determination

Different aeration rates were applied to the fermentation experiments with model medium in order to study the influence of oxygen addition on sugar consumption and ethanol production by *P. stipitis*. The volumetric oxygen transfer coefficient,  $K_La$ , was determined using a polarographic oxygen sensor calibrated with nitrogen and air sparging to set zero and 100%, respectively. The determination of the  $K_La$  values was done following the static method of gassing out. In this technique, the oxygen concentration of the fermentation broth is lowered by gassing the liquid out with nitrogen gas, replacing free oxygen. The deoxygenated liquid is then aerated and agitated and the increase in dissolved oxygen is measured using the sensor. The increase in dissolved oxygen concentration is described by this equation:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_La \cdot (C_L^* - C_L) \quad (1)$$

In order to obtain such curves, the bioreactor was filled with fermentation medium and dead microorganisms to simulate oxygen transfer conditions with cells in the solution. For each aeration rate,  $K_La$  values were calculated plotting  $\ln(C_L^* - C_L)$  versus time as the slope of the resulting curve, where  $C_L$  is the concentration of dissolved oxygen in the fermentation broth and  $C_L^*$  is the saturated dissolved oxygen concentration (Standbury et al., 1995). The same procedure was followed to determine  $K_La$  values in ozonized wheat straw hydrolysates. Different tests were carried out to study the influence of oxygen supply in *P. stipitis* behavior using hydrolysates from ozone pretreatment.

The  $K_La$  values used in fermentation of model substrates were 9.6 h<sup>-1</sup> (0.50 L air/min), 5.9 h<sup>-1</sup> (0.25 L air/min), 3.3 h<sup>-1</sup> (0.10 L air/min) and 1.1 h<sup>-1</sup> (0.03 L air/min). In the case of ozonized wheat straw hydrolysates the  $K_La$  values were 10.8 h<sup>-1</sup> (0.25 L air/min), 6.6 h<sup>-1</sup> (0.10 L air/min) and 3.8 h<sup>-1</sup> (0.05 L air/min). Both systems were subjected to similar  $K_La$  values, but aeration rates applied to obtain such coefficients were different since medium and reactor morphology (shape, volume, stirrer) are not comparable.

#### 2.6. Analytical methods

Cellular growth was estimated by measuring the optical density of cells at 600 nm, which was correlated to a dry weight curve. Glucose, xylose, ethanol, xylitol, acetic acid and oxalic acid were determined by high performance liquid chromatography with a detector based on the refractive index measurement and an Aminex HPX-87H column. Operational conditions were 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the mobile phase, at a flow rate of 0.6 mL/min at 60 °C. Samples were di-

luted, centrifuged at 5000 rpm for 5 min and filtered prior to HPLC analyses.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Model fermentation

##### 3.1.1. Influence of oxalic and acetic acid on ethanol fermentation by *P. stipitis*

Model fermentation runs were carried out to test the effect of inhibitors formed during ozone pretreatment on ethanol fermentation by *P. stipitis*. Fermentation parameters were calculated when different amounts of oxalic acid were added either separately or mixed with acetic acid. Experiments with higher oxalic and acetic concentration, simulating unwashed hydrolysates from ozone pretreatment, led to a strong inhibition of *P. stipitis* with approximately 90% of sugars remained and consequently a very low ethanol concentration. In the case of 4.0/0.6 g/L oxalic/acetic acid runs, a lower inhibitors concentration allowed ethanol fermentation with acceptable yields of 0.37 g/g, although slight inhibition appeared in ethanol yield and cell growth. Thus, cold water wash is an effective detoxification method for ozone pretreatment using *P. stipitis* as a fermentative microorganism. Experiments with oxalic acid were also done to analyze the effect of this inhibitor compound separately. When 4 g/L of oxalic acid was added to fermentation medium, ethanol yields (0.38 g/g) and sugars uptake were slightly better than experiments performed with acetic acid in low concentrations, nevertheless yields were marginally lower than control experiments (data not shown).

##### 3.1.2. Influence of different aeration rates

The effect of aeration on glucose and xylose consumption by *P. stipitis* was studied because it is an important variable to reduce total fermentation time and leads to a better use of sugars, mainly xylose. By and large, higher  $K_La$  values resulted in higher cell growth, whereas ethanol production was favored by lower aeration rates.

Sugars consumption and ethanol production during the fermentation course at different aeration rates are depicted in Fig. 1a and b. As can be seen, the assays revealed that  $K_La$  values of 9.6, 5.9 and 3.3 (0.50 L air/min, 0.25 L air/min and 0.10 L air/min, respectively) led to a better use of xylose, reducing fermentation time from 120 h, when aeration was almost negligible ( $K_La = 1.1$ ), to 48–72 h, which is an interesting behavior of xylose conversion by *P. stipitis*. Glucose was not strongly affected by the aeration rates studied being consumed during the first 24 h in all experiments. When the lowest aeration rate was applied, there were nearly anaerobic conditions in the reactor, xylose was not completely used during the fermentation process, biomass reached a value of 3.9 g/L and ethanol concentration achieved its maximum value of 22.1 g/L at 120 h. On the contrary, a high amount of biomass was produced when *P. stipitis* was subjected to a volumetric oxygen transfer coefficient of 9.6, obtaining 7.1 g/L cells, which implies that, in the first 24 h, glucose was destined for biomass growth leading to a lower ethanol production. In this experiment, most of the xylose was consumed after 48 h, but the maximum ethanol concentration was only 16.5 g/L as a consequence of the higher air supply rate and the amount of ethanol decreased with time due to ethanol stripping by air. These results agree with Agbogbo et al. (2007), who concluded that xylose uptake rate was high when the initial cell concentrations were high, leading to lower ethanol selectivity. In this work, as a consequence of high aeration, higher biomass is produced when xylose consumption starts and uptake rate increases. The best results were obtained using  $K_La$  values of 5.9 and 3.3 h<sup>-1</sup>, reaching 19.9 g/L and 22.3 g/L of ethanol at 48 and

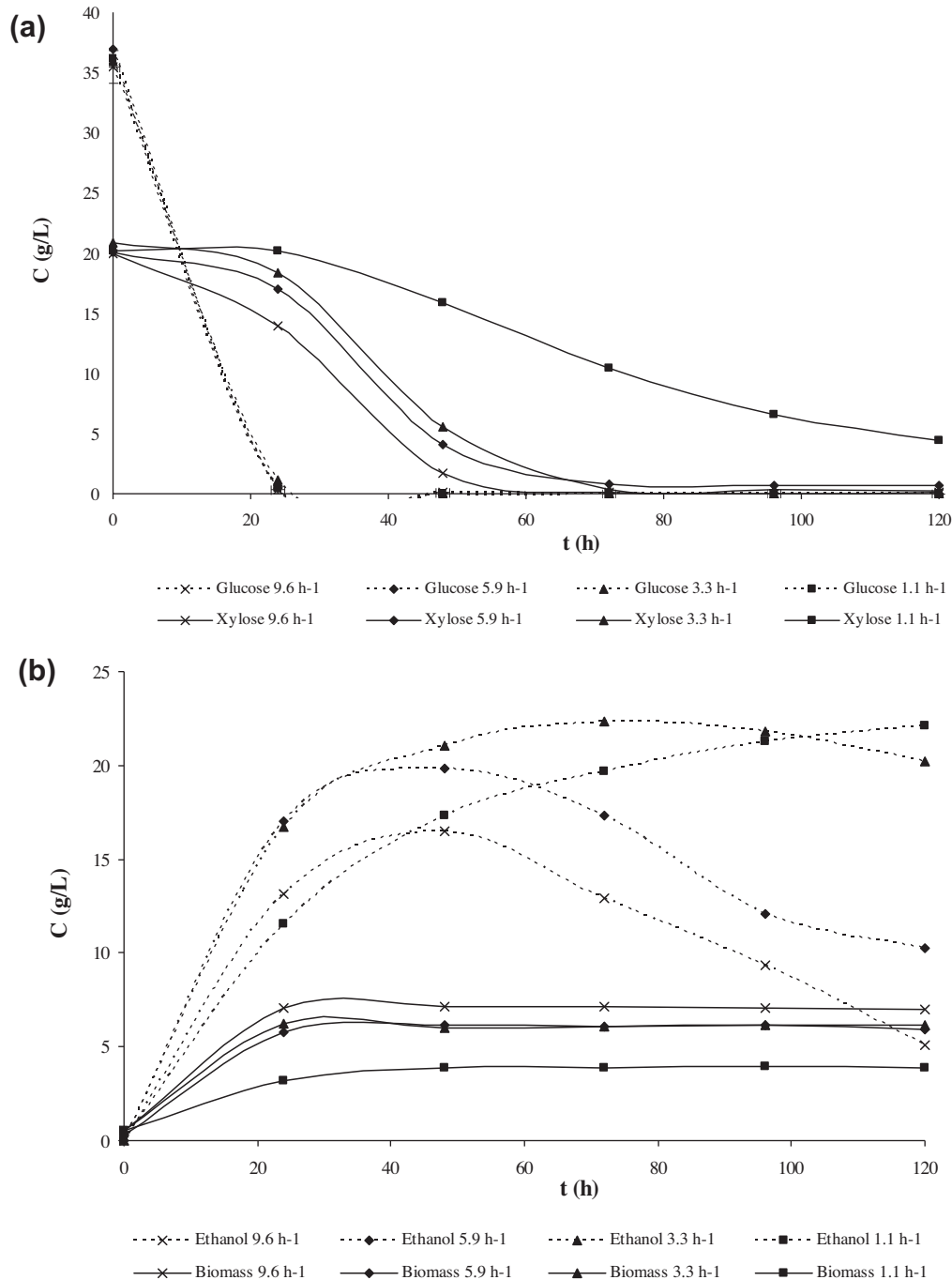


Fig. 1. (a and b) Sugars consumption, ethanol production and biomass growth during the fermentation process under different aeration rates.

72 h, respectively. The assays show sugars exhaustion, remaining less than 2% of the total sugars at this time and achieving a biomass concentration of 6.1 and 6.0 g/L, respectively. These results are in accordance with Silva et al. (2012) who obtained the highest ethanol production by *P. stipitis* from glucose/xylose (15/90 g/L) mixture fermentation medium using  $K_La$  values of between 2.3 and 4.9 h<sup>-1</sup>. Lin et al. (2012) also reported that sugar consumption rate increased gradually with aeration rates and ethanol yields resulted in lower values when hydrolysates from rice straw were used as a substrate for ethanol fermentation by *P. stipitis*.

Xylitol was monitored during the process at the different aeration rates and the results are depicted in Fig. 2. There is an inverse relationship between xylitol formation and the degree of aeration,

reaching 2.1 g/L when 0.03 L/min air was applied to the medium and this value decreased to 0.7 g/L when the highest value of aeration was used, implying triple xylitol concentration at quasi-anaerobic conditions. Cell growth, with an initial concentration of 0.5 g/L biomass, was allowed during the first 24 h in all experiments, which means that it is only related to glucose consumption. As can be observed, *P. stipitis* shows a diauxic behavior and it is not able to utilize xylose until the glucose is almost exhausted. Grootjen et al. (1991) studied the inhibition of xylose uptake by glucose causing the sequential substrate utilization. They observed that xylose conversion is inhibited when glucose concentration is higher than 2.3 g/L and stated that specific xylose uptake rate under extremely oxygen-limited conditions equals the anaerobic xylose up-



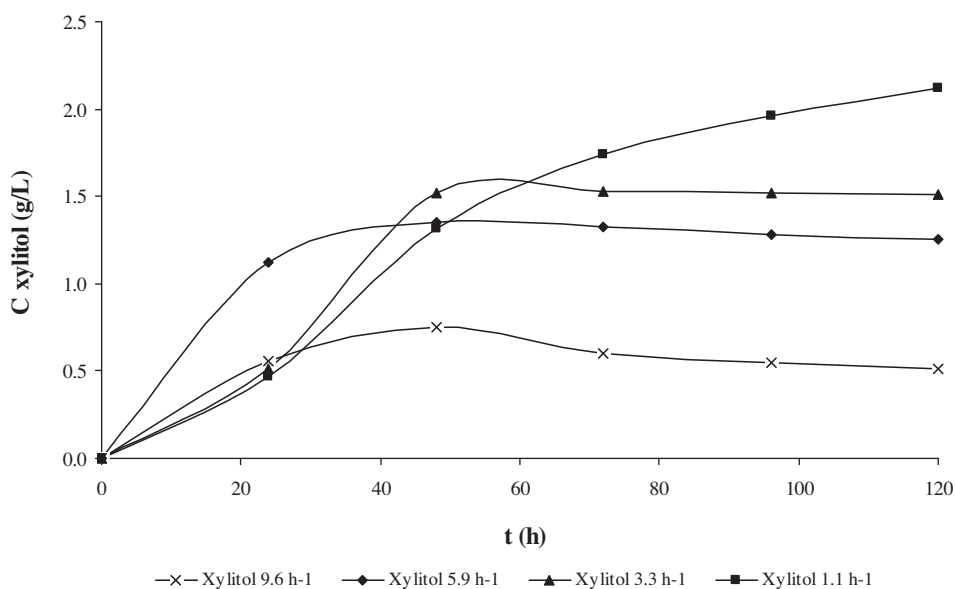


Fig. 2. Xylitol formation through the fermentation course at different aeration rates.

take rate. In all experiments of this work xylose consumption starts after glucose is almost exhausted, what verify the diauxic performance of *Pichia stipitis* to glucose/xylose substrates. An adequate aeration level allows *Pichia stipitis* to ferment xylose more rapidly and implies a better use of both sugars, reducing the effect of diauxic behavior.

In order to maintain cell viability and NADH balance, limited aeration is required for the conversion of xylose to ethanol by *P. stipitis* (Agbogbo et al., 2007). Some studies suggest that *P. stipitis* does not need oxygen for glucose or xylose fermentation, but controlled limited aeration has shown good results in terms of ethanol yields for D-xylose degradation (Dellweg et al., 1989; du Preez et al., 1984). As aeration is the most important environmental factor in xylose fermentation by yeasts (Silva et al., 2010; du Preez, 1994), several studies have been made at different oxygen uptake rates, producing negative effects in xylose consumption when aeration rates were too low or excessive (Nigam, 2001; Silva et al., 2012). Some studies suggested that ethanol production is reduced or inexistent when glucose and xylose are consumed aerobically by yeasts, with higher  $K_La$  values than  $18.7 \text{ h}^{-1}$ , metabolizing sugars by the oxidative pathway resulting in higher biomass production (Fiaux et al., 2003; Silva et al., 2012). Dellweg et al. (1989) stated that microaeration improved ethanol production by *P. stipitis* at the expense of xylitol formation, while du Preez et al. (1984) observed a relationship between xylitol production and agitation speed when *P. tannophilus* was used as a fermentative microorganism.

Table 1 shows the fermentation parameters for each  $K_La$  value.  $Y_{p/s}$ , defined as ethanol yield, is calculated as the ratio of ethanol

produced to sugars uptake;  $Y_{x/s}$ , defined as biomass yield, is calculated as the ratio of biomass generated to sugars consumption and  $Q_p$ , defined as ethanol productivity, is calculated as the ratio of ethanol produced to fermentation time. Note there is a direct correlation between  $K_La$  and  $Y_{x/s}$  and this relationship is inverse for  $Y_{p/s}$ . Cell growth is favored when aeration rates are higher, which is the opposite behavior for ethanol production. Regarding ethanol productivity, experiments using a  $K_La$  value of  $5.9 \text{ h}^{-1}$  show the best results at 48 h, but some xylose remained at this time and the ethanol yield was  $0.38 \text{ g ethanol/g sugars}$ . Fig. 3 depicts the fermentation parameters in all experiments adjusting data to second order polynomials in order to observe the tendency of ethanol yield, biomass yield, maximum ethanol concentration and ethanol productivity. The experiment with a  $K_La$  of  $3.3 \text{ h}^{-1}$  appeared as the optimal value for ethanol production by *P. stipitis* using microaeration. In this assay, the best results for maximum ethanol concentration ( $22.3 \text{ g/L}$ ) and ethanol yield ( $0.40 \text{ g ethanol/g sugars}$ ) were attained, which are higher than values reached using  $0.25 \text{ L/min}$  aeration rate. Adding complete depletion of sugars at 72 h, the bio-ethanol fermentation process is greatly improved using these microaeration conditions. The optimal value will be applied to wheat straw hydrolysates to observe the effect of limited aeration in sugars consumption and fermentation time.

### 3.1.3. Influence of different initial inoculum concentrations on the fermentation process

Once the optimal value of microaeration for the fermentation process by *P. stipitis* was set, different initial inoculum concentrations were added to analyze the influence of this parameter on car-

Table 1  
Fermentation parameters during fermentation course by *Pichia stipitis* at different  $K_La$  values.

Assay	Parameters				
$K_La$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$Y_{p/s}$ (g/g)*	$Y_{x/s}$ (g/g)**	Maximum ethanol production (g/L)	$Q_p$ (g/L h)**	Xylose remaining (g/L)**
9.6	0.31 (48 h)	0.17 (24 h)	16.49 (48 h)	0.34 (48 h)	1.75 (48 h)
5.9	0.38 (48 h)	0.15 (24 h)	19.86 (48 h)	0.41 (48 h)	4.04 (48 h)
3.3	0.40 (72 h)	0.14 (24 h)	22.33 (72 h)	0.30 (72 h)	0.33 (72 h)
1.1	0.43 (120 h)	0.07 (24 h)	22.12 (120 h)	0.18 (120 h)	4.39 (120 h)

\* Calculated when exponential growth was finished.

\*\* Calculated when maximum ethanol concentration was achieved.

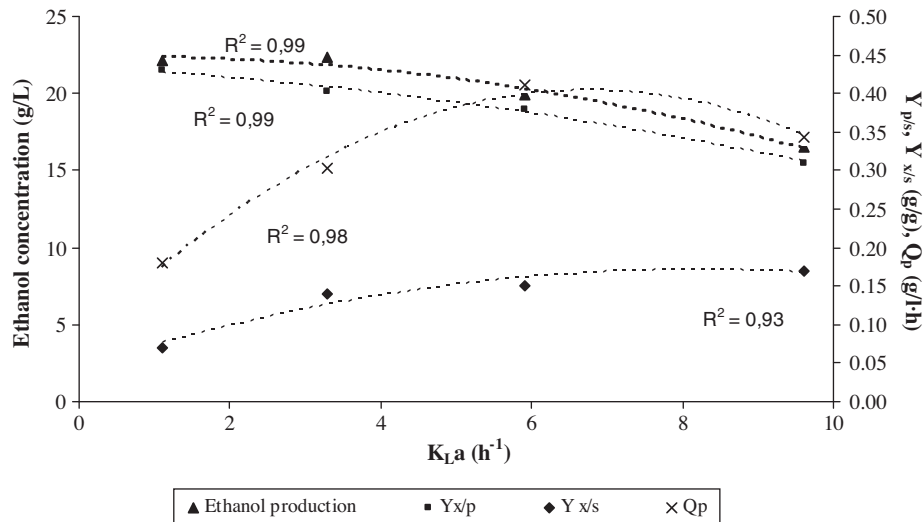


Fig. 3. Fermentation parameters obtained at each  $K_L a$  value adjusted to second order polynomials.

bon source utilization and by-product formation. Initial inoculum concentration of 0.5, 1.0 and 2 g/L were added. Ethanol concentration reached similar values of 22.3, 21.7 and 21.0 g/L at 72 h, respectively. The lag phase in xylose consumption was reduced with increasing concentration of biomass at initial time. The xylitol production rate also increased with cell concentration and was produced parallel to ethanol, which caused a reduction in ethanol productivity during the first 24 h from 0.75 g/L h when 1 g/L cells were added to 0.62 g/L h when the inoculum was doubled. Xylitol is produced in a greater extent, and at the expenses of ethanol production, when the biomass per sugars available proportion is higher, as can be seen in the case of 2 g/l initial inoculum concentration. This effect was softened when the biomass concentration was 0.5 g/L, xylitol formation was reduced and ethanol production was less affected, leading to a better use of sugars and thus avoiding by-product formation. In the cases studied, the xylitol concentration varies from 1.5 to 2.9 g/L with increasing inoculum concentration. Therefore, preventing xylitol formation, 0.5 g/l cells is an adequate value in the fermentation process by *P. stipitis*.

### 3.2. Aeration in ozonized wheat straw hydrolysates

#### 3.2.1. Influence of different $K_L a$ values in ozonized wheat straw hydrolysates

According to previous results, aeration is found to be an important factor to improve consumption of sugars, mainly xylose, decreasing fermentation time, establishing as a significant variable to attain higher ethanol productivities. In order to evaluate, in a first stage, the effects of aeration on lignocellulosic hydrolysates, the behavior of *P. stipitis* has been tested in ozonized wheat straw fermentations. Ozonolysis has been proved to be an efficient pretreatment for cereal straw, improving the enzymatic hydrolysis step and leading to an increase in the production of fermentable sugars (García-Cubero et al., 2012). Ozone is a powerful oxidant which degrades lignin and slightly solubilizes the hemicellulose fraction (García-Cubero et al., 2009). As it has been explained in the prior paragraph, after ozonolysis, a cold water wash was used as a detoxification method, which is an easier procedure than other techniques investigated for different pretreatments of lignocellulosic biomass involving the addition of chemicals (Arslan and Eken-Saraçoglu, 2010; Zhu et al., 2011).

About 30 g/100 g DM (27.7 g/L) of reducing sugars were obtained after enzymatic hydrolysis of ozonized wheat straw. The

presence of oxalic and acetic acid in the hydrolysates causes inhibition of biomass growth and ethanol production rate. The inhibition effect of acetic acid separately and as a mixture with furfural and hydroxymethylfurfural on ethanol fermentation by *P. stipitis* has been intensively studied in a previous work (Bellido et al., 2011). The inhibition effect of oxalic and acetic acid has been discussed in the previous paragraph. Taking into consideration these results, *P. stipitis* was able to ferment ozonated wheat straw hydrolysates after washing the ozonated wheat straw with cold water (0.1 L water/g ozonated DM).

With the purpose of studying the effect of aeration rates in ozonized wheat straw hydrolysates, ethanol yields and xylose uptake were studied applying different  $K_L a$  to the fermentation broth. Several works have stated the sensitiveness of *P. stipitis* to the concentration of dissolved oxygen in ethanol fermentation from xylose (Lin et al., 2012; Klinner et al., 2005).

In view of the results obtained in model experiments, similar  $K_L a$  values were applied (3.8, 6.6 and 10.8  $h^{-1}$ ). Ethanol yields and maximum ethanol concentration are depicted in Fig. 4. Comparing to model experiments, higher ethanol yields were also obtained at lower aeration rates. When high values of  $K_L a$  were applied, sugars consumption was higher but it was not lead to an increase of ethanol attained. These results are in accordance to Lin et al. (2012) who obtained similar results when rice straw hydrolysates were subjected to different aeration rates.

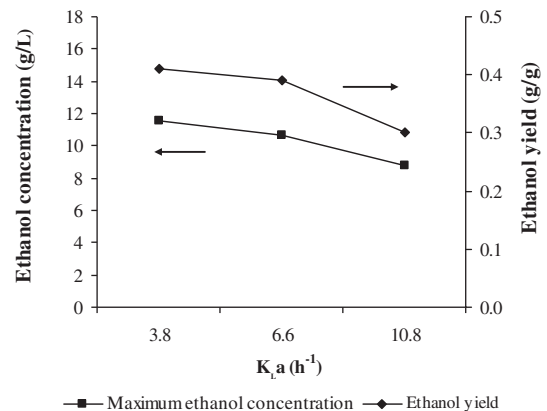


Fig. 4. Ethanol yields and maximum ethanol concentration obtained in ozonized wheat straw hydrolysates using different aeration rates.

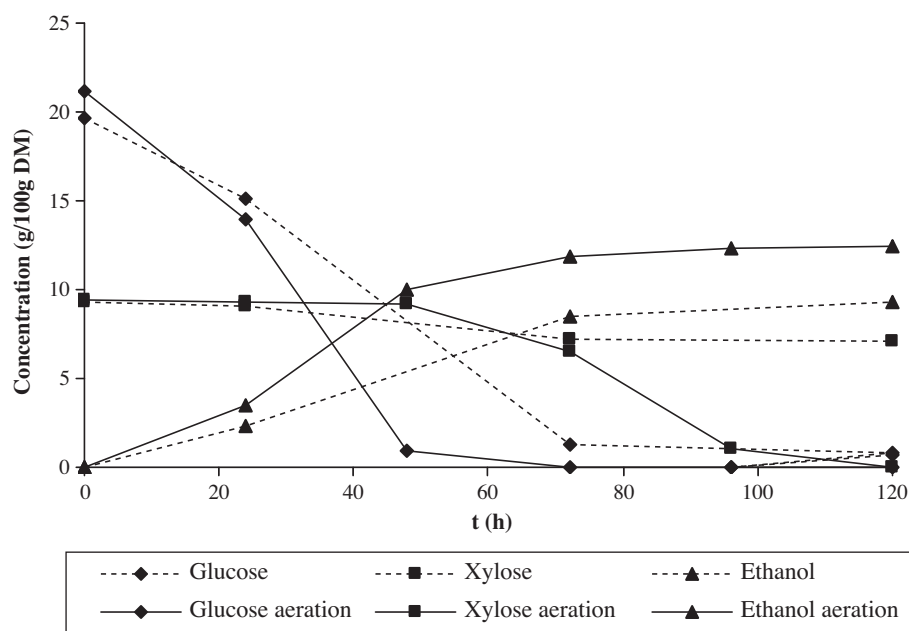


Fig. 5. Comparison of fermentation process by *Pichia stipitis* on aerated and non-aerated ozonized wheat straw hydrolysates.

The maximum ethanol yield of 0.41 g ethanol/g sugars was achieved applying a  $K_L\alpha$  of  $3.8 \text{ h}^{-1}$ . Fig. 5 displays a comparison between the fermentation courses of ozonized wheat straw hydrolysates without aeration and applying a  $K_L\alpha$  of  $3.8 \text{ h}^{-1}$ . Ethanol and sugars concentration are referred to grams of sugars or ethanol per 100 g of dry matter (DM) of pretreated straw. Regarding consumption of sugars, when microaeration was applied, the lag phase in glucose utilization due to the presence of inhibitors was considerably reduced. In case of xylose, complete depletion was observed at 96 h and the carbon source was not entirely consumed at the end of the process (120 h) when no aeration was allowed; complete exhaustion was produced at 168 h (data not shown). The slow xylose consumption by *P. stipitis* has been noticed by other researchers (Buaban et al., 2010; Sarkar et al., 2012; Díaz et al., 2009; Zhu et al., 2011). Regarding the results, microaeration reduces the lag phase on consumption of sugars by *P. stipitis* from ozonized wheat straw hydrolysates. Maximum ethanol concentrations increased from 9.3 g/100 g DM (8.7 g/L) to 12.4 g/100 g DM (11.6 g/L) with limited aeration. Xylitol formation reached a value of 0.7 g/L, which is in accordance with model fermentations. In this case, an ethanol yield of 0.41 g/g was attained, which is in accordance with yields reported from a variety of pretreated biomass using different strains of *P. stipitis* (Agbobo and Coward-Kelly, 2008; Díaz et al., 2009). Chandel et al. (2011) obtained similar results from detoxified *S. spontaneum* reaching 11.2 g/L ethanol and 0.36 g ethanol/g sugars consumed. Zhu et al. (2011) attained 21.8 g/L ethanol and 0.39 g ethanol/g sugar consumed working with *P. stipitis* fermenting a detoxified corn stover prehydrolysate by trialkylamine extraction.

In this study, aeration of ozonized wheat straw hydrolysates implies an increase of 29.1% in ethanol production and a reduction of 42.9% in fermentation time by *P. stipitis*.

#### 4. Conclusions

Limited aeration improves ethanol fermentation by *P. stipitis*, resulting in a better use of sugars available. An aeration rate with a volumetric oxygen transfer coefficient of  $3.3 \text{ h}^{-1}$ , is found to be an adequate level to enhance the efficiency of the process. On

model substrates, fermentation time is significantly reduced and good ethanol yields are reached with complete depletion of glucose and xylose. Oxygen supply ( $K_L\alpha = 3.8 \text{ h}^{-1}$ ) in ozonized wheat straw hydrolysates involves achieving maximum ethanol concentration in a lower time than non-aerated hydrolysates, increasing ethanol production by 29.1% and improving xylose metabolism.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support to the Ministerio de Ciencia e Innovación (CTQ2006-15217), the Instituto Tecnológico de Castilla y León (VA-15-C2-1) and the Junta de Castilla y León (GRE-233) for its contribution to the development of the project.

#### References

- Agbobo, F.K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K., Jeffries, T.W., 2007. The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136–140, 653–662.
- Agbobo, F.K., Coward-Kelly, G., 2008. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters* 30, 1515–1524.
- Arslan, Y., Eken-Saraçoglu, N., 2010. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia stipitis* to ethanol. *Bioresource Technology* 101, 8664–8670.
- Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management* 52, 858–875.
- Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Cabañas, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreatment wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 6, 129–132.
- Bellido, C., Bolado, S., Coca, M., Lucas, S., González-Benito, G., García-Cubero, M.T., 2011. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology* 102, 10868–10874.
- Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V., Pichyangkura, R., Rengpipat, S., Eurwilaichitr, L., 2010. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110, 18–25.
- Chandel, A.K., Singh, O.V., Venkateswar, R., Chandrasekhar, G., Narasu, M.L., 2011. Bioconversion of novel substrate *Saccharum spontaneum*, a weedy material, into ethanol by *Pichia stipitis* NCIM3498. *Bioresource Technology* 102, 1709–1714.
- Dellweg, H., Rizzi, M., Klein, C., 1989. Controlled limited aeration and metabolic regulation during the production of ethanol from D-xylose by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology* 12, 111–122.

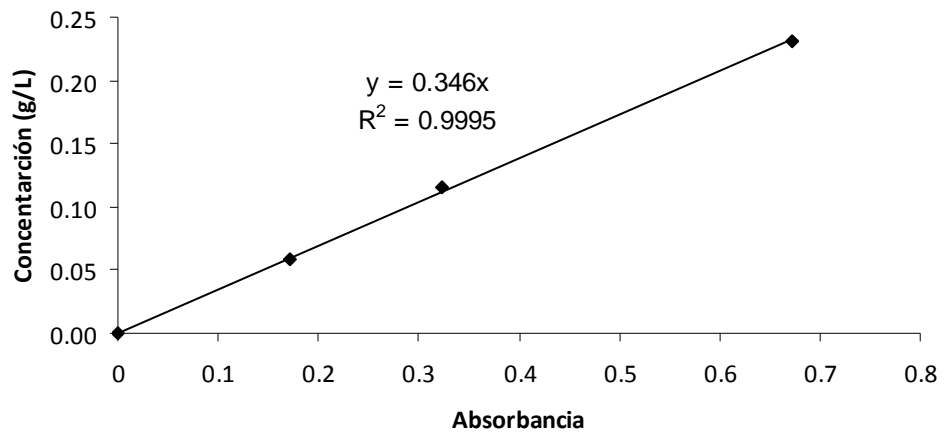
- Díaz, M.J., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., Moya, M., Castro, E., 2009. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 891–899.
- du Preez, J.C., Prior, B.A., Monteiro, A.M.T., 1984. The effect of aeration on xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pachysolen tannophilus*. A comparative study. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19, 261–266.
- du Preez, J.C., 1994. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology* 16, 944–956.
- Fiaux, J., Çakar, Z.P., Sonderegger, M., Wüthrich, K., Szyperski, T., Sauer, U., 2003. Metabolic-flux profiling of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Eukaryot Cell* 2, 170–180.
- Galbe, M., Sassner, P., Zacchi, G., 2007. Process engineering economics of bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 108, 3003–3327.
- García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Indacochea, I., Coca, M., Bolado, S., 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology* 100, 1608–1613.
- García-Cubero, M.T., Palacín, L.G., González-Benito, G., Bolado, S., Lucas, S., Coca, M., 2012. An analysis of lignin removal in a fixed bed reactor by reaction of cereal straws with ozone. *Bioresource Technology* 107, 229–234.
- Gnansounou, E., 2010. Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: current situation and perspectives. *Bioresource Technology* 101, 4842–4850.
- Grootjen, D.R.J., van der Lans, R.G.J.M., Luyben, K.Ch.A.M., 1991. Conversion of glucose/xylose mixtures by *Pichia stipitis* under oxygen-limited conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 13, 648–654.
- Klinner, U., Fluthgraf, S., Freese, S., Passoth, V., 2005. Aerobic induction for respiratory growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 247–253.
- Lin, T., Huang, C., Guo, G., Hwang, W., Huang, S., 2012. Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology* 116, 314–319.
- Nigam, J.N., 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology* 87, 17–27.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy* 37, 19–27.
- Silva, J.P., Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2010. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162, 1306–1315.
- Silva, J.P., Mussatto, S.I., Roberto, I.C., Teixeira, J.A., 2012. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renewable Energy* 37, 259–265.
- Singh, A., Pant, D., Korres, N.E., Nizami, A., Prasad, S., Murphy, J.D., 2010. Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: challenges and perspectives. *Bioresource Technology* 101, 5003–5012.
- Standbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., 1995. *Principles of Fermentation Technology*. Butterworth-Heinemann.
- Zhu, J., Yong, Q., Xu, Y., Yu, S., 2011. Detoxification of corn stover prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. *Bioresource Technology* 102, 1663–1668.

**ANEXO II**



## 1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MICROORGANISMOS

### CORRELACIÓN PESO SECO-ABSORBANCIA



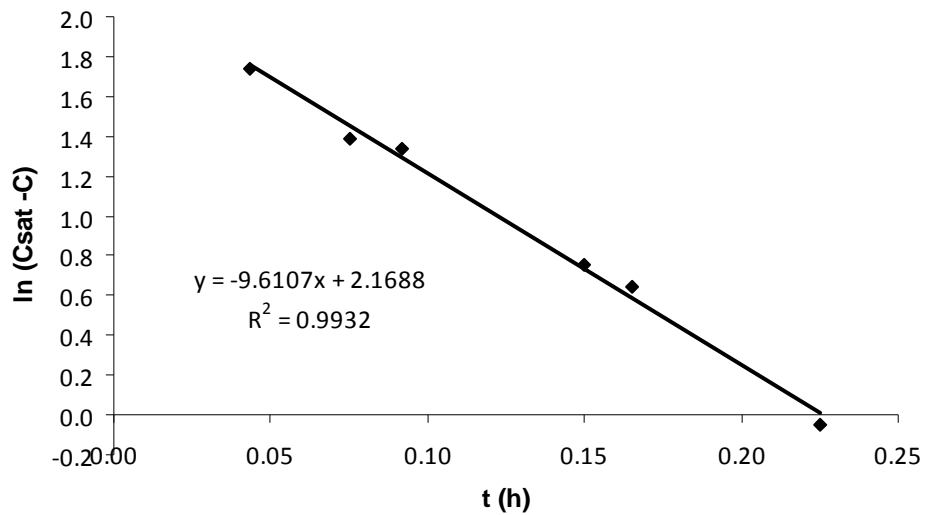
## 2. CÁLCULO DE LOS COEFICIENTES VOLUMÉTRICOS DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

### MEDIOS MODELO

Velocidad de aireación 0,5 L/min aire.

C sat = 7,6 mg/L

t (h)	C (mg/L)	% O2	ln(Cs <sub>sat</sub> -C)
0.043	1.90	25.0	1.740466
0.075	3.61	47.5	1.383791
0.092	3.80	50.0	1.335001
0.150	5.47	72.0	0.755183
0.165	5.70	75.0	0.641854
0.225	6.65	87.5	-0.051293
0.300	7.60	100.0	

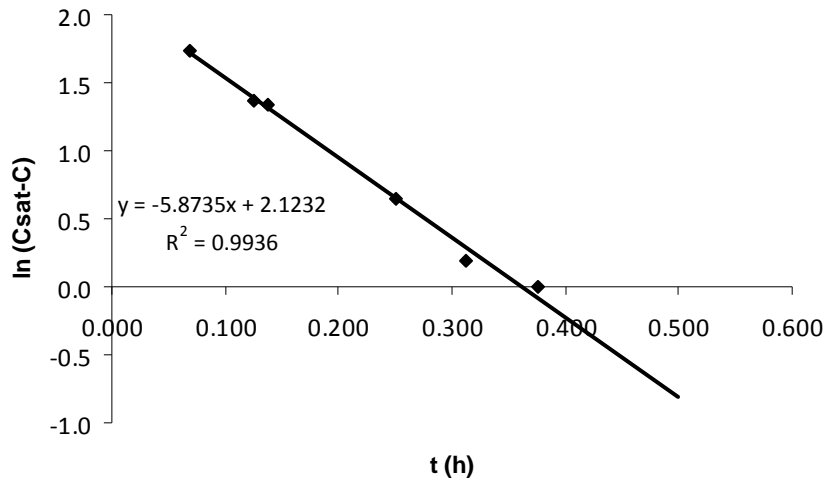


Velocidad de aireación 0,25 L/min aire.

C sat = 7,6 mg/L

t (h)	C (mg/L)	% O2	ln(Cs <sub>sat</sub> -C)
0.069	1.90	25.0	1.74046617
0.125	3.65	48.0	1.37422178
0.138	3.80	50.0	1.33500107
0.250	5.70	75.0	0.64185389
0.313	6.38	84.0	0.19556678
0.375	6.99	92.0	eliminado
0.500	7.60	100.0	

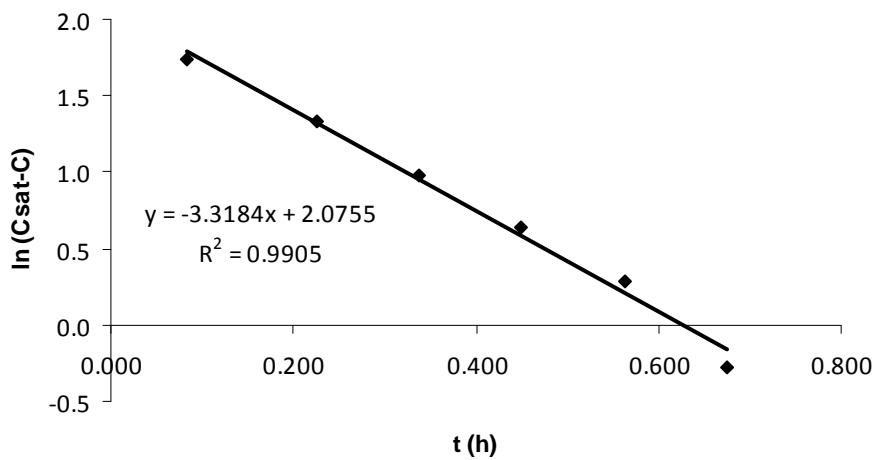




Velocidad de aireación 0,10 L/min aire.

$C_{sat} = 7,6 \text{ mg/L}$

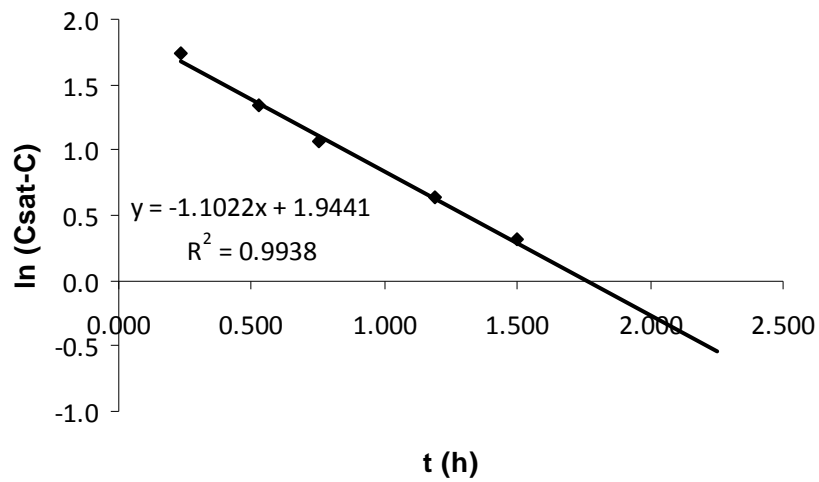
t (h)	C (mg/L)	% O2	$\ln(C_{sat}-C)$
0.084	1.90	25.0	1.74046617
0.225	3.80	50.0	1.33500107
0.338	4.94	65.0	0.97832612
0.450	5.70	75.0	0.64185389
0.563	6.27	82.5	0.28517894
0.675	6.84	90.0	-0.27443685
0.900	7.60	100.0	-0.74046617



**Velocidad de aireación 0,03 L/min aire.**

C sat = 7,6 mg/L

t (h)	C (mg/L)	% O2	ln(Cs <sub>sat</sub> -C)
0.234	1.90	25.0	1.74046617
0.525	3.80	50.0	1.33500107
0.750	4.71	62.0	1.06056422
1.191	5.70	75.0	0.64185389
1.500	6.23	82.0	0.31334982
2.250	6.84	90.0	
3.000	7.60	100.0	

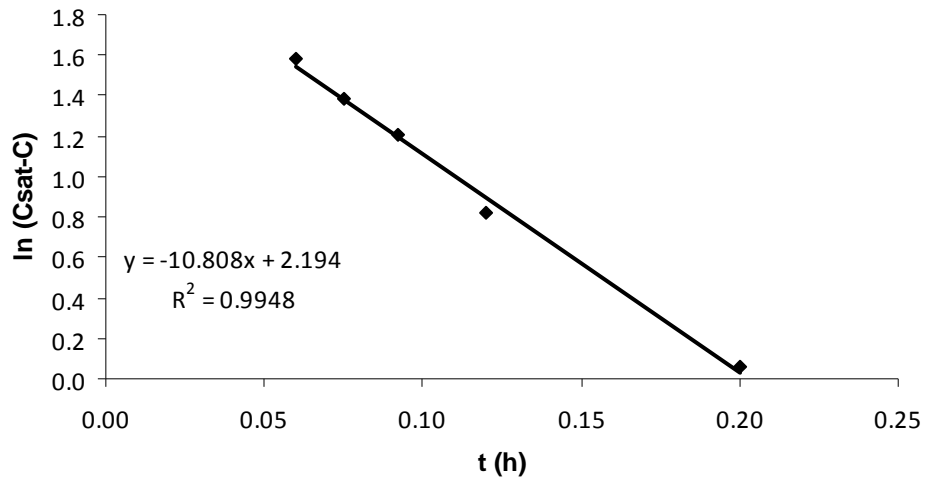


### HIDROLIZADOS DE PAJA DE TRIGO

**Velocidad de aireación 0,25 L/min aire.**

C sat = 7,6 mg/L

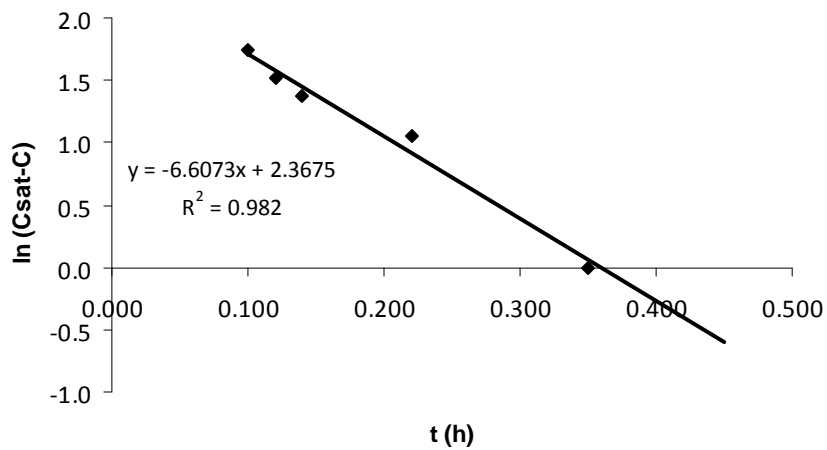
t (h)	C (mg/L)	% O2	ln(Cs <sub>sat</sub> -C)
0.060	1.52	20.0	1.805005
0.075	3.61	47.5	1.383791
0.092	4.26	56.0	1.207168
0.120	5.47	72.0	0.755183
0.200	6.38	84.0	0.195567
0.250	7.60	100.0	



**Velocidad de aireación 0,10 L/min aire.**

$C_{sat} = 7,6 \text{ mg/L}$

t (h)	C (mg/L)	% O <sub>2</sub>	ln(C <sub>sat</sub> -C)
0.069	1.90	25.0	1.74046617
0.100	3.72	49.0	1.35480369
0.150	4.10	54.0	1.25161946
0.200	4.71	62.0	1.06056422
0.300	6.99	92.0	eliminado
0.450	7.60	100.0	



Velocidad de aireación 0,05 L/min aire.

C sat = 7,6 mg/L

t (h)	C (mg/L)	% O2	ln(Cs <sub>sat</sub> -C)
0.069	1.90	25.0	1.74046617
0.100	3.72	49.0	1.35480369
0.150	4.10	54.0	1.25161946
0.200	4.71	62.0	1.06056422
0.300	6.99	92.0	eliminado
0.450	7.60	100.0	

