



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Centro de Estudios de Postgrado*

Trabajo Fin de Máster

# PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MEZCLAS DE PENTOSAS Y HEXOSAS DE RESIDUOS AGRÍCOLAS

**Alumno/a:** Fernandes Klajn, Felipe

**Tutor:** Eulogio Castro Galiano

**Co-Tutor:** Juan Miguel Romero García

**Dpto:** Ingeniería Química, Ambiental y de los  
Materiales

**Septiembre, 2017**

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco, ante todo y todos, al Señor Jesucristo, por haberme concedido sabiduría y capacidad ante los desafíos encontrados, y por poner personas importantes que mucho contribuyeron a la realización de este trabajo.*

*Al Instituto IBERDROLA, por el apoyo financiero y por permitir ser posible la realización de este Máster.*

*A mis padres, Luiz Antônio Klajn y Lenir Fernandes Klajn, mi hermana Amanda Fernandes Klajn y mi novia, Camila Kalinski, por todo el cariño y apoyo dados en todos los momentos de esta etapa importante de mi vida.*

*Al profesor y orientador Eulogio Castro Galiano, por su enorme competencia, gran profesionalismo y disponibilidad en la resolución de dudas a lo largo del TFM y por todas las enseñanzas transmitidas durante el Máster.*

*Al co-orientador Juan Miguel Romero García por el importante apoyo en la conducción de la parte experimental, por las dudas sanadas y por el gran compañerismo en la conducción de todo el TFM.*

*A Manuel Jesús Díaz Villanueva, por su esfuerzo, dedicación y paciencia en enseñar innumerables procesos laboratoriales ligados a la biomasa y que contribuyeron enormemente a mi aprendizaje.*

*A todos los compañeros de laboratorio, José Antonio, Alfonso, Sonia, Juan Carlos, Mairan, Valeria, Sara, Bori, Irene y Luciana por todos los buenos momentos compartidos.*

*Al gran amigo formado durante el período del Máster, Juan Carlos Osorio Aravena, por las innumerables horas de estudio compartidas, por toda la ayuda prestada en los momentos más difíciles de la maestría y por todas las agradables conversaciones durante todo ese período.*

*A mi gran amigo Javivilin Montoro García, por toda su ayuda y hospitalidad prestadas en los primeros días de llegada en España, que lo hizo todo más fácil.*

*A los demás profesores, colegas y funcionarios de la Universidad de Jaén, que de alguna forma contribuyeron y participaron en esa conquista tan importante.*

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Emisiones de CO <sub>2</sub> dentro del Acuerdo de París .....	3
Figura 2. Opinión de los expertos entrevistados acerca de un escenario 100% renovable en 2050 .....	4
Figura 3. Países con política establecida para el uso obligatorio de biocarburantes .....	5
Figura 4. Plazas de empleo generadas por el sector de energías renovables .....	6
Figura 5. Los países líderes en capacidad total de generación a finales de 2016 .....	6
Figura 6. Composición de la biomasa lignocelulósica.....	8
Figura 7. Estructura de la biomasa lignocelulósica .....	8
Figura 8. Estructura química de la celulosa.....	9
Figura 9. Constitución de la celulosa .....	9
Figura 10. Estructura química general de la hemicelulosa .....	10
Figura 11. Principales compuestos precursores y sus respectivas unidades formadoras .....	11
Figura 12. Estructura química de la lignina.....	12
Figura 13. Posibles productos obtenidos a partir de biorrefinería basada en material lignocelulósico .....	15
Figura 14. Diferencia entre el sistema continuo de dos y tres fases .....	16
Figura 15. Esquema de la biomasa generada por el olivar .....	17
Figura 16. Producción derivada estimada del cultivo de una hectárea de olivar .....	18
Figura 17. Ilustración del pretratamiento del material lignocelulósico .....	21
Figura 18. Esquema del proceso <i>Organosolv</i> en escala de laboratorio .....	28
Figura 19. Actuación de las endoglucanasas .....	34
Figura 20. Transformación de la celulasa en celodextrina a través de la acción de la endoglucanasa .....	35
Figura 21. Modo de acción de las exoglucanasas .....	35
Figura 22. Producción de unidades de celobiosa por la acción de la enzima exoglucanasa .....	35
Figura 23. Modo de acción de la $\beta$ -Glucosidasa .....	36
Figura 24. Producción de dos unidades de D-glucosa a partir de la celobiosa .....	36
Figura 25. Fraccionamiento de la cadena hemicelulósica en “n” unidades de oligosacáridos de a (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-xilano .....	36
Figura 26. Formación de la $\beta$ -D-xilanopiranososa a partir de la enzima $\beta$ -xilosidasa .....	37
Figura 27. Resumen de los compuestos inhibidores producidos durante el pretratamiento .....	40
Figura 28. Compuestos que actúan como inhibidores en la hidrólisis enzimática con celulasa (a) y microorganismos fermentativos (b) .....	41

Figura 29. Resumen de las estrategias para alcanzar un mayor rendimiento fermentativo .....	48
Figura 30. Resumen de los principales agentes que inducen al estrés de la levadura y sus mecanismos de defensa .....	51
Figura 31. Ruta metabólica general de la <i>S. cerevisiae</i> para la producción de etanol a partir de la glucosa .....	53
Figura 32. Ruta metabólica de la <i>Zymomonas</i> .....	55
Figura 33. Esquema experimental de la destilación por adsorción .....	61
Figura 34. Esquema experimental de la destilación azeotrópica.....	62
Figura 35. Esquema simplificado de la destilación por membrana .....	64
Figura 36. Esquema de la metodología adoptada en el presente trabajo .....	70
Figura 37. Molino tipo Retsch, modelo SM 100, utilizado para la molienda de la poda de olivo ..	71
Figura 38. Autoclave utilizada para el proceso de extracción.....	72
Figura 39. Reactor Parr utilizado para el pretratamiento .....	73
Figura 40. pHmetro digital utilizado en los ensayos. Los recipientes rojo, verde y azul contienen solución con pH conocido, destinados a la calibración del equipo .....	74
Figura 41A. HPLC (Waters, Milford, EE.UU). .....	75
Figura 41B. HPLC Hewlett-Packard 1100 (Palo Alto, CA, EE.UU.).....	75
Figura 42. Agitador Orbital “ <i>Optic Ivymen System</i> ” .....	75
Figura 43. Equipo de fermentación .....	79
Figura 44A. Controladores DASGIP TC4SC4 (control de temperatura y agitación), DASGIP PHPO (control de pH y oxígeno disuelto) y DASGIP MP8 (control del bombeo de base).....	83
Figura 44B. DASGIP Bioblock con 4 posiciones, donde fueron realizadas las fermentaciones con aireación del <i>slurry</i> .....	83
Figura 45. Composición de los distintos licores respecto al prehidrolizado inicial. Azúcares totales: suma de glucosa, xilosa, galactosa, manosa y arabinosa .....	87
Figura 46. Producción, productividad máxima y rendimiento de etanol con los diferentes licores .....	90
Figura 47. Evolución de los distintos compuestos durante la fermentación de los licores .....	90
Figura 48. Resultado comparativo de todas las configuraciones de hidrólisis y fermentación aplicadas al sólido pretratado, en gramos de etanol producidos/100 gramos de materia prima .....	100
Figura 49. Concentración de los azúcares al largo de la PSCFS .....	104
Figura 50. Evolución en la concentración de inhibidores durante todo el proceso fermentativo .....	104
Figura 51. Comparación entre las configuraciones HSCF y PSCFS en el <i>slurry</i> . .....	105
Figura 52. Desarrollo de la fermentación del <i>slurry</i> en la PSCFS con un 5% S/L.....	107

Figura 53. Desarrollo de la fermentación del <i>slurry</i> en la PSCFS con un 8,8% S/L .....	108
Figura 54. Evolución comparativa del rendimiento de la PSCFS a 5% y 8,8% S/L .....	109
Figura 55. Evolución comparativa del rendimiento de la PSCFS a 5% con y sin aireación .....	109
Figura 56. Esquema propuesto para el aprovechamiento de la poda del olivo en la producción de etanol de segunda generación.....	110
Figura 57. Balance de materia para el esquema óptimo adoptado en la producción de etanol a partir de la poda del olivo .....	111

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas de las propiedades del bioetanol y de la gasolina .....	19
Tabla 2. Resumen de las principales condiciones de reacción y efectos de los pretratamientos alcalinos .....	25
Tabla 3. Principales ventajas y desventajas de la ozonólisis .....	27
Tabla 4. Resumen de los principales pretratamientos combinados .....	32
Tabla 5. Resumen de los principales pretratamientos .....	33
Tabla 6. Resumen de las distintas estrategias para contener los compuestos inhibidores .....	44
Tabla 7. Comparación entre el modo continuo y semicontinuo.....	50
Tabla 8. Algunas cepas de <i>S. cerevisiae</i> probadas en la producción de etanol.....	54
Tabla 9. Condiciones de extracción propuestas según diseño de experimento Box-Behnken obtenido com el software estadístico <i>Design Expert 7.0.0</i> .....	72
Tabla 10. Condiciones óptimas de pretratamiento según Martínez-Patiño et al. ....	73
Tabla 11. Resumen de las condiciones operativas, el volumen recuperado de hidrolizado, para cada método de detoxificación estudiado .....	76
Tabla 12. Ajuste de pH realizado para cada licor .....	76
Tabla 13. Componentes y concentraciones del medio MLB .....	77
Tabla 14. Componentes del medio AM1. Los elementos de 9 a 15 se denominan elementos traza y su preparación se realiza en una única solución .....	78
Tabla 15. Resumen de las etapas involucradas en cada configuración de hidrólisis y fermentación adoptada .....	82
Tabla 16. Composición de la poda de olivo antes (materia prima) y después de la extracción con NaOH 1,4% .....	85
Tabla 17. Composición del Sólido Pretratado .....	86
Tabla 18. Composición del licor obtenido en el pretratamiento. Valores entre paréntesis indican las concentraciones de azúcares obtenidas tras post-hidrólisis .....	87
Tabla 19. Producción y recuperación de glucosa y xilosa com respecto al material pretratado y a la materia prima en la etapa de HE de la configuración HFS .....	94
Tabla 20. Rendimiento en etanol en relación al teórico com respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la HFS .....	94
Tabla 21. Producción y recuperación de glucosa y xilosa com respecto al material pretratado y a la materia prima en la etapa de HE de la configuración HCFS .....	95
Tabla 22. Rendimiento en etanol en relación al teórico com respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la HCFS.....	96

Tabla 23. Rendimientos en etanol con respecto al teórico a partir de glucosa y azúcares potenciales para la configuración SFS .....	96
Tabla 24. Rendimientos en etanol con respecto al teórico a partir de glucosa y azúcares potenciales para la configuración SCFS.....	98
Tabla 25. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la PSFS .....	98
Tabla 26. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la PSCFS .....	99
Tabla 27. Producción y recuperación de glucosa y xilosa con respecto al material pretratado y a la materia prima en la etapa de HE de la configuración HCFS trabajando con <i>slurry</i> .....	101
Tabla 28. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la HCFS del <i>slurry</i> .....	102
Tabla 29. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la PSCFS del <i>slurry</i> .....	102
Tabla 30. Comparación de los rendimientos obtenidos en la literatura para la configuración PSCFS .....	103
Tabla 31. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la PSCFS del <i>slurry</i> con aireación a 5% S/L .....	106
Tabla 32. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la PSCFS del <i>slurry</i> con aireación a 8,8% S/L .....	108

KLAJN, Felipe Fernandes. Universidad de Jaén, Septiembre de 2017. **Producción de biocombustibles a partir de mezclas de pentosas y hexosas de residuos agrícolas.** Director: Eulogio Castro Galiano; Co-Director: Juan Miguel Romero García.

## RESUMEN

La poda de olivo es un residuo lignocelulósico producido anualmente, de amplia disponibilidad y bajo coste, que constituye una potencial fuente para la producción de bioproductos y combustibles renovables. Este trabajo tiene como objetivo principal proponer un esquema eficiente de operaciones para la producción de etanol de segunda generación a partir de poda del olivo.

Para ello, se utilizó un lote de materia prima pretratado mediante un procedimiento térmico con ácido diluido en condiciones previamente optimizadas ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 0,9%, 164 °C durante 10 minutos) y se evalúan distintas estrategias de detoxificación (carbón activo, hidróxido de amonio y overliming) de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento así como diferentes configuraciones de hidrólisis enzimática y fermentación (incluyendo hidrólisis y fermentación secuencial o simultánea, presacarificación o co-fermentación) del sólido pretratado de la poda de olivo. Para la hidrólisis enzimática, se empleó el complejo enzimático comercial Cellic Ctec-2 de Novozymes, mientras que en el proceso fermentativo fueron utilizados dos microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae* cepa "Ethanol Red", y *Escherichia coli* cepa SL100), estableciéndose distintas condiciones dependiendo de las configuraciones aplicadas. Antes del pretratamiento, una etapa de extracción empleando NaOH 1,4%, a 110 °C durante 30 minutos fue realizada para reducir el contenido de extractos del olivo.

El método de detoxificación que ha generado los mejores rendimientos en etanol para la fracción líquida ( $\text{NH}_4\text{OH}$  5N) conjuntamente con dos configuraciones que demostraron gran potencial fermentativo del sólido (Hidrólisis y Co-Fermentación por Separado [HCFS] y Pre-Sacarificación y Co-Fermentación Simultánea [PSCFS]) fueron empleados en la fermentación del *slurry*, con una concentración inicial de sólidos de 5%. De entre éstas, la configuración PSCFS logró un menor tiempo de fermentación con rendimientos no muy distantes de la HCFS (14,28 gramos de etanol/100 g de materia prima en 48 horas para la PSCFS frente a 16,99 gramos de etanol/100 g de materia prima a 120 horas de la HCFS), por lo que fue seleccionada para ensayos con empleo de aireación (0,1 vvm) y variación de carga inicial de sólidos (5% y 8,8% S/L). Los resultados han demostrado una disminución considerable del tiempo de proceso fermentativo, con consumo completo de los azúcares del medio en 16 horas, aunque con rendimientos menores (11,41 gramos de etanol/100 g de materia prima para 5% S/L).

En función de los resultados experimentales, se propone el empleo de  $\text{NH}_4\text{OH}$  5N como método de detoxificación por proporcionar un aumento en la eficiencia fermentativa sin degradar los azúcares del medio, y la configuración PSCFS sin aireación por resultar en buenos rendimientos en la producción de etanol con menores tiempos de fermentación, características de interés con vistas a un posible aumento en la escala del proceso.

PALABRAS-CLAVE: Aireación; Bioetanol; Detoxificación; Fermentación; Poda de Olivo; *Slurry*.

KLAJN, Felipe Fernandes. University of Jaén, September of 2017. **Biofuels' production from mixtures of pentoses and hexoses from agricultural waste.** Adviser: Eulogio Castro Galiano; Co-Adviser: Juan Miguel Romero García

## ABSTRACT

Olive tree pruning is a widely available and low cost lignocellulosic residue generated every year, being a potential source for bioproducts and renewable fuels production. In this context, this work has as main objective to propose an efficient scheme for the production of second generation ethanol from olive tree pruning.

For this purpose, a batch of pretreated raw material was used by a thermal process with diluted acid under previously optimized conditions ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,9%, 164 °C for 10 minutes) and different detoxification strategies were evaluated (activated charcoal, ammonium hydroxide and overliming) of the liquid fraction obtained after pretreatment, as well as different configurations of enzymatic hydrolysis and fermentation (including hydrolysis and sequential or simultaneous fermentation, pre-saccharification or co-fermentation) of the pretreated olive tree pruning solid. For the enzymatic hydrolysis, the commercial enzyme complex Cellic Ctec-2 of Novozymes was used, while in the fermentation process two microorganisms (*Saccharomyces cerevisiae* strain "Ethanol Red" and *Escherichia coli* strain SL100) were used, establishing different conditions depending on the settings applied. Prior to pretreatment, an extraction step using NaOH 1,4% at 110 °C for 30 minutes was performed to reduce the olive extracts content.

The detoxification method that generated the best ethanol yields for the liquid fraction ( $\text{NH}_4\text{OH}$  5N) allied with two configurations that demonstrated high fermentation potential of the solid (Separate Hydrolysis and Co-Fermentation [SHCF] and Simultaneous Pre-saccharification and Co-Fermentation [SPSCF]) were used in slurry fermentation, with an initial solids concentration of 5%. Among these, the SPSCF configuration achieved a shorter fermentation time with not very distant yields from the SHCF (14,28 grams of ethanol/100 grams of raw material in 48 hours for the SPSCF versus 16,99 grams of ethanol/100 grams of raw material at 120 hours of SHCF), being selected for tests using aeration (0,1 vvm) and initial solid load (5% and 8,8% S/L). The results have shown a considerable reduction in fermentation process time, with complete sugar consumption in 16 hours, although with lower yields (11,41 grams of ethanol/100 grams of raw material for 5% S/L).

Based on the experimental results, the use of  $\text{NH}_4\text{OH}$  5N as a detoxification method is proposed to provide an increase in fermentation efficiency without sugar degradation, and the SPSCF configuration without aeration for it reasonable yields in ethanol production, with lower fermentation times, characteristics of interest aiming a possible increase in process scale.

**KEYWORDS:** Aeration; Bioethanol; Detoxification; Fermentation; Olive tree pruning; Slurry.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Energías renovables dentro del contexto climático actual y perspectivas futuras</b> .....	<b>2</b>
<b>2. La biomasa</b> .....	<b>7</b>
2.1 Composición de la biomasa lignocelulósica .....	<b>8</b>
2.1.1 Celulosa .....	<b>9</b>
2.1.2 Hemicelulosa .....	<b>9</b>
2.1.3 Lignina .....	<b>10</b>
2.1.4 Componentes no estructurales o secundarios .....	<b>12</b>
2.2 Biorrefinerías lignocelulósicas – Una propuesta para el completo aprovechamiento del material lignocelulósico.....	<b>12</b>
2.2.1 Definición general y clasificación .....	<b>12</b>
2.2.2 Biorrefinerías lignocelulósicas.....	<b>14</b>
2.3 La biomasa del olivar.....	<b>15</b>
2.3.1 La poda del olivo .....	<b>18</b>
<b>3. El Bioetanol</b> .....	<b>18</b>
<b>4. Etapas de producción del bioetanol de segunda generación</b> .....	<b>21</b>
4.1 Pretratamiento.....	<b>21</b>
4.1.1 Tecnologías de pretratamiento.....	<b>22</b>
4.1.1.1 <i>Pretratamientos Biológicos</i> .....	<b>22</b>
4.1.1.2 <i>Pretratamientos Físicos</i> .....	<b>23</b>
4.1.1.3 <i>Pretratamientos Químicos</i> .....	<b>24</b>
4.1.1.4 <i>Pretratamientos Físico-Químicos</i> .....	<b>28</b>
4.1.1.5 <i>Pretratamientos Combinados</i> .....	<b>31</b>
<b>5. Hidrólisis de los polisacáridos</b> .....	<b>32</b>
5.1 Hidrólisis Ácida.....	<b>33</b>
5.2 Hidrólisis Enzimática .....	<b>34</b>
5.3 Hidrólisis enzimática a altas cargas de sólidos .....	<b>37</b>
5.4 Factores limitantes de la hidrólisis .....	<b>38</b>
<b>6. Generación y tratamiento de compuestos inhibidores</b> .....	<b>39</b>
6.1 Tipos de compuestos inhibidores.....	<b>40</b>
6.2 Estrategias de detoxificación.....	<b>43</b>
6.2.1 Estrategias de ingeniería y selección de la materia prima.....	<b>43</b>

6.2.2 Métodos convencionales de detoxificación.....	44
6.2.3 Esquemas de cultivo.....	46
6.2.4 Selección natural del microorganismo.....	46
6.2.5 Ingeniería evolutiva.....	46
6.2.6 Ingeniería genética y metabólica.....	47
<b>7. Fermentación alcohólica.....</b>	<b>47</b>
7.1 Fermentación a nivel industrial – La experiencia de Brasil.....	49
7.2 Principales microorganismos fermentativos.....	52
<b>8. Integración de procesos.....</b>	<b>59</b>
8.1 HFS/HCFS.....	59
8.2. SFS/SFCS.....	59
8.3 PSFS/PSCFS.....	60
<b>9. Destilación.....</b>	<b>60</b>
9.1 Destilación por adsorción.....	60
9.2 Destilación azeotrópica.....	61
9.3 Destilación por deshidratación química.....	62
9.4 Destilación por difusión.....	62
9.5 Destilación extractiva.....	63
9.6 Destilación por membrana.....	63
9.7. Destilación a vacío.....	64
<b>II. APORTACIONES CIENTÍFICAS Y AVANCES DEL PRESENTE TRABAJO.....</b>	<b>65</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
1. Objetivo general.....	68
2. Objetivos específicos.....	68
<b>IV. METODOLOGÍA.....</b>	<b>69</b>
1. Introducción a la metodología.....	70
2. Materia prima.....	71
3. Pretratamiento.....	72
4. Caracterización de las fracciones sólida y líquida.....	73
5. Detoxificación de la fracción líquida.....	75
6. Microorganismo y preparación del inóculo para las distintas configuraciones...	77
6.1 Saccharomyces cerevisiae.....	77
6.2 Escherichia coli SL100.....	77
7. Fermentación de la fracción líquida.....	78
8. Características de las configuraciones adoptadas para la fermentación del sólido.....	79

8.1 HFS – Hidrólisis y Fermentación por Separado.....	79
8.2 HCFS – Hidrólisis y Co-Fermentación por Separado.....	80
8.3 SFS – Sacarificación y Fermentación Simultáneas.....	80
8.4 SCFS – Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas.....	80
8.5 PSFS – Pre-Sacarificación y Fermentación Simultáneas.....	80
8.6 PSCFS – Pre-Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas.....	81
<b>9. Preparación y detoxificación del slurry.....</b>	<b>81</b>
9.1 Hidrólisis enzimática + fermentación del slurry.....	81
9.2 Hidrólisis enzimática + Fermentación en la mejor configuración en reactor de mayor capacidad y con aireación slurry.....	82
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
<b>1. Introducción a los resultados y discusión.....</b>	<b>85</b>
<b>2. Composición de la materia prima, licor y sólido pretratado.....</b>	<b>85</b>
<b>3. Detoxificación de los prehidrolizados.....</b>	<b>87</b>
<b>4. Fermentación de los licores.....</b>	<b>88</b>
<b>5. Fermentación del sólido pretratado utilizando las distintas configuraciones... 92</b>	<b>92</b>
5.1 Hidrólisis y Fermentación por Separado (HFS).....	92
5.2 Hidrólisis y Co-Fermentación por Separado (HCFS).....	95
5.3 Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS).....	96
5.4 Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas (SCFS).....	97
5.5 Pre-Sacarificación y Fermentación Simultáneas (PSFS).....	98
5.6 Pre-Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas (PSCFS).....	99
5.7 Resumen Comparativo de las Fermentaciones del Sólido Pretratado.....	99
<b>6. Hidrólisis enzimática y co-fermentación del slurry en las configuraciones de más elevado rendimiento en etanol.....</b>	<b>100</b>
6.1 HSCF.....	101
6.2 PSCFS.....	102
6.3 Comparación entre la HCFS y PSCFS en el rendimiento (g etanol/100g materia prima del slurry).....	105
<b>7. Hidrólisis enzimática y fermentación del slurry en la mejor configuración en distintas concentraciones de sólido y empleo de aireación.....</b>	<b>105</b>
7.1 PSCFS a 5% p/v con empleo de aireación.....	106
7.2 PSCFS a 8,8% p/v con el empleo de aireación.....	107
7.3 Comparación de la PSCFS a 5% y 8,8%.....	108
7.4 Comparación entre la PSCFS a 5% con y sin el empleo de la aireación.....	109
<b>8. Esquema propuesto y balance de materia final para la producción de etanol de segunda generación a partir de la poda de olivo dentro de las condiciones ensayadas.....</b>	<b>110</b>

<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>112</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>114</b>
<b>VIII. ANEXO .....</b>	<b>140</b>



# I. INTRODUCCIÓN

---

1. Energías renovables dentro del contexto climático actual y perspectivas futuras
2. La biomasa
  - 2.1 Composición de la biomasa lignocelulósica
    - 2.1.1 Celulosa
    - 2.1.2 Hemicelulosa
    - 2.1.3 Lignina
    - 2.1.4 Componentes no estructurales o secundarios
  - 2.2 Biorrefinerías Lignocelulósicas – Una propuesta para el completo aprovechamiento del material lignocelulósico
    - 2.2.1 Definición general y clasificación
    - 2.2.2 Biorrefinerías lignocelulósicas
  - 2.3 La biomasa del olivar
    - 2.3.1 La poda del olivo
3. El Bioetanol
4. Etapas de producción del bioetanol de segunda generación
  - 4.1 Pretratamiento
    - 4.1.1 Tecnologías de pretratamiento
      - 4.1.1.1 Pretratamientos biológicos
      - 4.1.1.2 Pretratamientos físicos
      - 4.1.1.3 Pretratamientos químicos
      - 4.1.1.4 Pretratamientos físico-químicos
      - 4.1.1.5 Pretratamientos combinados
5. Hidrólisis de los Polisacáridos
  - 5.1 Hidrólisis ácida
  - 5.2 Hidrólisis enzimática
  - 5.3 Hidrolisis enzimática a altas cargas de sólidos
  - 5.4 Factores limitantes de la hidrólisis
6. Generación y tratamiento de compuestos inhibidores
  - 6.1 Tipos de compuestos inhibidores
  - 6.2 Estrategias de detoxificación
    - 6.2.1 Estrategias de ingeniería y selección de la materia prima
    - 6.2.2 Métodos convencionales de detoxificación
    - 6.2.3 Esquemas de cultivo
    - 6.2.4 Selección natural del microorganismo
    - 6.2.5 Ingeniería evolutiva
    - 6.2.6 Ingeniería genética y metabólica
7. Fermentación alcohólica
  - 7.1 Fermentación a nivel industrial – La experiencia de Brasil
  - 7.2 Principales microorganismos fermentativos
8. Integración de procesos
  - 8.1 HFS/HCFS
  - 8.2 SFS/SFCS
  - 8.3 PSFS/PSCFS
9. Destilación
  - 9.1 Destilación por adsorción
  - 9.2 Destilación azeotrópica
  - 9.3 Destilación por deshidratación química
  - 9.4 Destilación por difusión
  - 9.5 Destilación extractiva
  - 9.6 Destilación por membrana
  - 9.7 Destilación al vacío



## **1. Energías renovables dentro del contexto climático actual y perspectivas futuras**

La energía puede ser considerada como un contribuyente fundamental al logro de los objetivos de desarrollo económico y social de todos los países. Como resultado de este hecho, hay cada vez más una mayor demanda de energía. La crisis financiera ocurrida en 2008 ha dejado muy evidente el estrecho vínculo existente entre la seguridad energética y el crecimiento económico continuo. Las energías renovables, a diferencia de las de origen fósil, no pueden agotarse y su uso libera poco o ningún CO<sub>2</sub> adicional a la atmósfera, no contribuyendo al incremento de la concentración de gases de efecto invernadero. Por lo tanto, el uso de renovables contribuye no solo para el crecimiento económico de los países, si no que ayuda a mejorar la calidad ambiental de su territorio (Michalena y Hills, 2012; IPCC, 2015; EPA, 2016).

La confirmación de que el uso desenfrenado de recursos naturales y energías fósiles planteaba una creciente amenaza de cambio climático, económico y social fue reconocido por primera vez en la Conferencia Mundial sobre el Clima, en 1979, donde los gobiernos fueron orientados a prever y prevenir posibles cambios artificiales en el clima. El primer tratado internacional para trazar objetivos específicos para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero fue el Protocolo de Kyoto, adoptado en 1997, pero entrando en vigor en 2005. Ratificado por 191 países hasta 2013, es considerado como un “hito histórico” en la lucha contra el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero, masificando las estrategias de mitigación de estos gases por parte de los países con la incorporación de fuentes de energía renovable desde el momento que entro en vigor (Şener et al., 2017; Pereda, 2017).

Todavía, a pesar de visibles avances, el Protocolo de Kyoto no fue suficiente, en la práctica, para resolver los problemas que se proponían en el ámbito ambiental, pues algunas naciones en desarrollo no estaban preparadas para asumir algunas metas ambientales, mientras algunos países desarrollados no estaban de acuerdo con la división de metas propuesta por el acuerdo. Así, hubo la necesidad de intentar elaborar un nuevo acuerdo que tuviese un modelo distinto y con objetivos más claros. A finales de 2015, fue ratificado en París por casi 200 naciones, el “Acuerdo de París para el Cambio Climático”. A diferencia del Protocolo de Kyoto, no impone una legislación a cada uno de los países que después deba ser ratificada por sus parlamentos, si no que las naciones participantes simplemente anuncian qué porcentaje de emisiones se comprometen a reducir y en qué plazo, participando también de las negociaciones posteriores (el siguiente encuentro será en 2018 y después a cada cinco años) (Calixto, 2017; Pereda et al., 2017). Todavía, no se tiene una seguridad de que el Acuerdo tendrá éxito principalmente por la salida de los EE.UU. Conforme se puede ver en la Figura 1, los EE.UU. son el segundo mayor emisor de CO<sub>2</sub>, y en la hipótesis de que todos los países cumplieren sus metas con excepción de EE.UU., la Tierra podría calentarse 0,3 grados centígrados más a finales de siglo, que sumándose a lo que ya se ha calentado (cerca de 1,1 °C), llegase próximo al límite establecido por el Acuerdo, que es no superar los 2 °C. También compromete otro de los objetivos del Acuerdo que es disminuir la emisión de gases de efecto invernadero hasta

2030 en al menos el 40% en comparación a 1990 (Pan et al., 2017; Pereda et al., 2017; Liobikiene y Butkus, 2017).

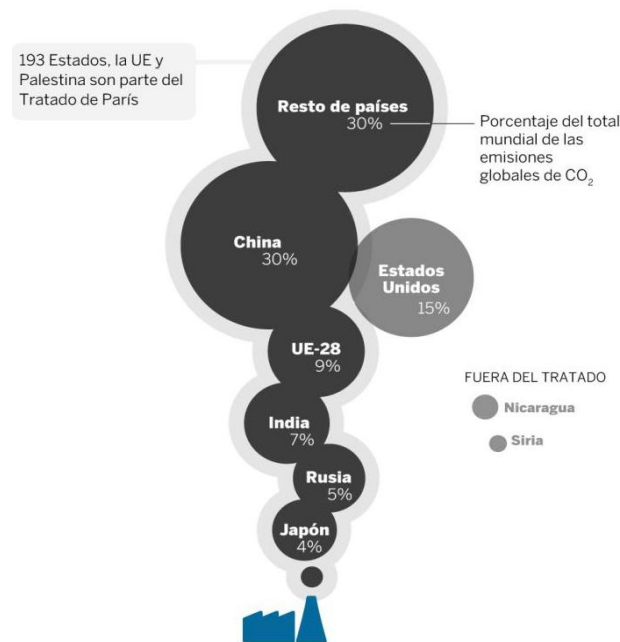
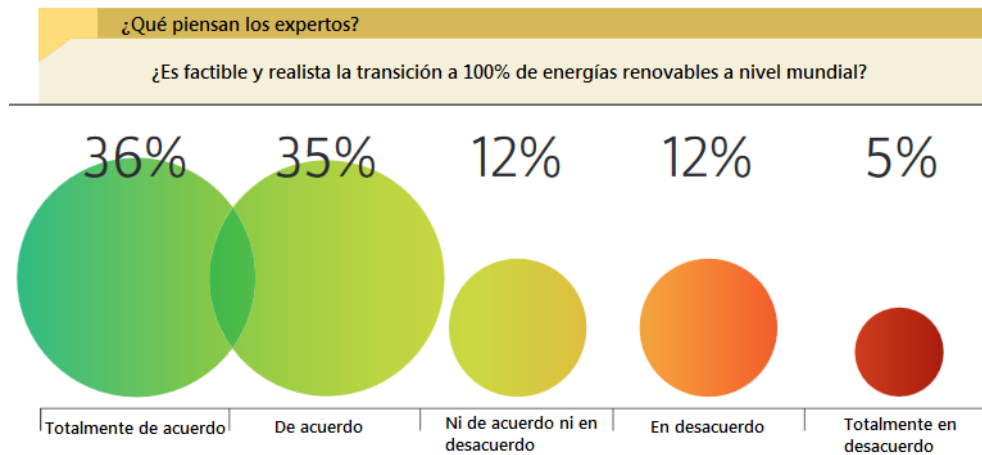


Figura 1. Emisiones de CO<sub>2</sub> dentro del Acuerdo de París. Fuente: adaptado de Pereda, 2017.

A pesar de la situación expuesta anteriormente, hay un gran optimismo en general con relación al avance de las renovables. Uno de los informes de “REN21” (REN21, 2017a) ha traído un debate acerca de una posible transición a un escenario 100% renovable a la mitad del siglo 21, entrevistando una serie de expertos del sector de renovables de todo el mundo. Como muestra la Figura 2, la mayoría de los expertos han considerado muy posible que eso se realice, mientras 17% no se mostraron de acuerdo y 12% se mantuvieron neutros. Según el informe, mientras los expertos de Oceanía, Europa y otros creen que el escenario propuesto es factible técnicamente y económicamente, los expertos de Estados Unidos y Japón no creen que esto sea viable en función principalmente de problemas ligados a tecnologías de transporte y almacenamiento. Otras barreras apuntadas por expertos de países industrializados fueron los poderosos intereses existentes creados en las industrias energéticas convencionales, falta de políticas consistentes a largo plazo y dificultad de acceso a tecnología y *know-how* por parte de algunos países. Los expertos de países en vías de desarrollo también muestran una línea de pensamiento más pesimista por motivos relacionados con una fuerte presencia de los combustibles fósiles, conflictos con los objetivos de desarrollo económico y dificultad de acceso a financiación.

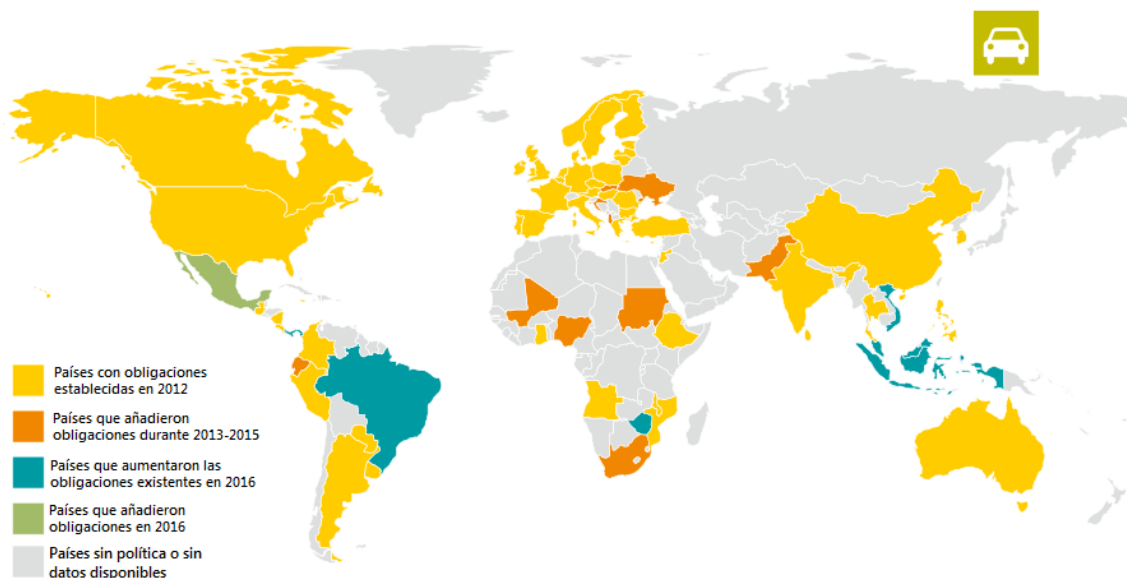


**Figura 2. Opinión de los expertos entrevistados acerca de un escenario 100% renovable en 2050.**  
Fuente: Adaptado de REN21, 2017a.

En el sector de transportes, los biocombustibles líquidos siguen siendo la principal fuente de energía renovable, proporcionando en 2016 alrededor del 4% de todo el combustible utilizado en el transporte por carretera en el mundo. Su producción ha crecido un 2% en comparación a 2015, llegando a 135 billones de litros, mucho en función de la retomada de la producción de biodiesel en Brasil, después de la disminución verificada en 2015. Brasil y Estados Unidos siguen siendo los principales productores a nivel mundial, representando cerca de 70% de todo el biocombustible producido, seguido de Alemania, Argentina, China e Indonesia. De todo el montante producido, el 72% fue etanol, 23% biodiesel y 4% de aceite vegetal tratado con hidrógeno (HVO, con siglas en inglés). Las fuertes medidas políticas sostienen el uso de las renovables en el transporte, siendo en 2016 lo que posibilitó un aumento de su producción por delante de la bajada de los precios del barril de petróleo a nivel internacional.

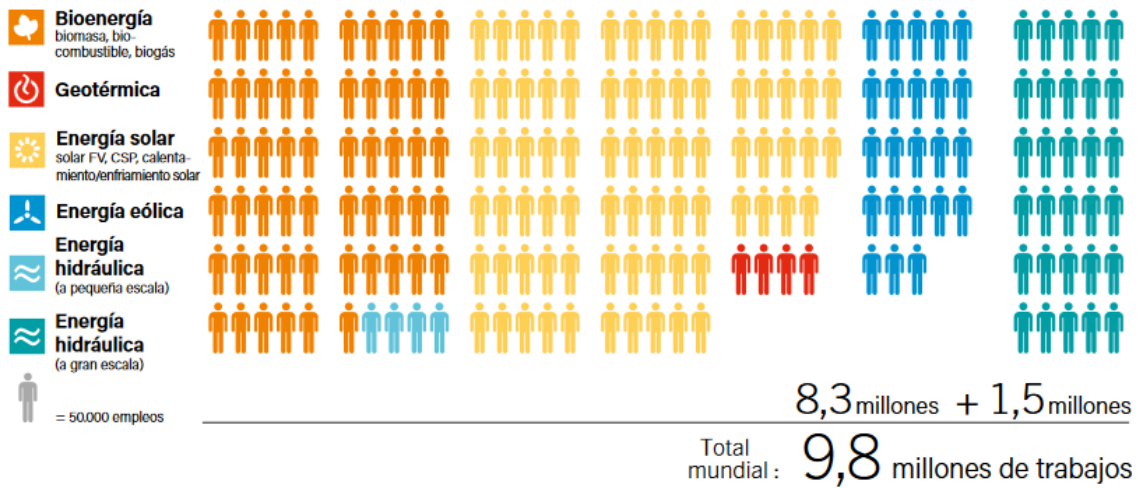
En 2016 han resurgido los debates acerca de la sostenibilidad de los biocombustibles de primera generación principalmente en Argentina, en razón de las subidas de los precios del aceite de soja en el mercado interno. En Europa, un nuevo paquete con objetivos de reducción de emisiones y uso de energías limpias propuso una reducción gradual de los biocombustibles basados en alimentos, de 7% de los biocombustibles utilizados en el transporte en 2021 al 3,8% en 2030. Todavía, las políticas favorables a los biocombustibles continúan siendo implementadas, principalmente en el sentido de incrementar las mezclas obligatorias con los combustibles fósiles. En América del Norte, los EE.UU. han expedido mandatos obligatorios para mezcla de 73 billones de litros de combustibles renovables, siendo 16,2 billones de biocombustibles avanzados (como el combustible de aviación y diésel renovable) y 1,2 billones de litros de biocombustibles lignocelulósicos. México implementó la mezcla de 5,8% de etanol a la gasolina en tres áreas metropolitanas de grandes ciudades, mientras Canadá ha decidido implementar una estandarización nacional de combustibles limpios, ya presente en la mitad de sus provincias. En Asia, Malasia incrementó el porcentaje de mezcla del biodiesel al diésel del 7% al 10%; Indonesia ha seguido la misma línea, subiendo del 5% al 20%; Tailandia ha lanzado un programa de subvenciones para probar el B20 en camiones y el B10 para uso gubernamental y militar; India ha puesto objetivos para llegar a 22,5% de etanol en la gasolina y a 15% de biodiesel al diésel con el uso de materias primas no utilizadas en la producción de alimentos, mientras Vietnam estableció el E10 (REN21, 2017b).

En América Central y del Sur, Panamá ha subido la mezcla obligatoria de etanol a E10; Argentina promulgó el B10 y E10, e hizo planes para llegar al E26 ya en 2017, además de establecer exenciones fiscales para la producción de biodiesel hasta 2017. Brasil promulgó la ley 13.263, de 24 de marzo de 2016, en la cual ha cambiado el porcentaje obligatorio de biodiesel al 8%, 9% y 10%, con la posibilidad de aumentar la mezcla al 15% en 2019 dependiendo de la realización de ensayos específicos, además de lanzar una política de Estado llamada “*RenovaBio*”, con el objetivo de trazar una estrategia conjunta para reconocer el papel estratégico de todos los tipos de biocombustibles en la matriz energética brasileña, tanto para la seguridad energética como para la mitigación de emisiones de gases de efecto invernadero (REN21, 2017b; MME, 2017; EPE, 2016). En los demás continentes, Suecia introdujo exenciones fiscales para el biodiesel y el etanol, y Zimbabue volvió al E15 después de bajar temporalmente la obligatoriedad de la mezcla para E5 debido a falta de etanol. Algunos otros países, como Bolivia, República Dominicana, Estado de Palestina y Zambia añadieron medidas de mezcla obligatoria entre 2010 y 2012 pero fueron eliminadas durante 2013-2015 (REN21, 2017b). Un mapa con el resumen de los países que poseen políticas públicas para el incentivo del uso de biocombustibles se muestra en la Figura 3.



**Figura 3. Países con política establecida para el uso obligatorio de biocarburantes.** Fuente: adaptado de REN21, 2017c.

La inversión en energía renovable y combustibles fue de por lo menos \$ 264,8 mil millones en 2016, superando las inversiones anuales de los últimos siete años, que estaban alrededor de \$ 200 mil millones. Fue el quinto año consecutivo en que la inversión en renovables ha sido el doble que en la capacidad de generación de combustibles fósiles, centrándose principalmente en las energías solar y eólica. Estas inversiones se traducen también en la generación de empleos, de modo que el sector de las renovables empleó cerca de 9,8 millones de personas en 2016, un incremento de 1,1% en comparación a 2015. La energía solar fotovoltaica y los biocombustibles fueron los que más plazas de empleo han generado, destacándose el continente Asiático que representó el 62% de los empleos, liderados principalmente por China. La Figura 4 trae con más detalles los empleos generados por cada tipo de energía renovable (REN21, 2017b).



**Figura 4. Plazas de empleo generadas por el sector de energías renovables.** Fuente: adaptado de REN21, 2017c.

A finales de 2016, los países con mayor capacidad instalada de energía eléctrica renovable del globo continuaron siendo: China, Estados Unidos, Brasil, Alemania y Canadá, teniendo China la cuarta parte de la capacidad de energía renovable del mundo, aproximadamente 564 GW. Sin incluir la energía hidroeléctrica, los países que más se destacan en términos de capacidad instalada fueron China, EE.UU. y Alemania, seguidos de Japón, India, Italia, España y Reino Unido. Otros países que se destacaron también fueron Indonesia y Turquía, líderes mundiales en nuevas instalaciones de energía geotérmica en el año de 2016; Honduras y Uruguay que produjeron el 9,8% y 22,8% de su consumo eléctrico con energía solar y eólica, respectivamente; Y Egipto, Marruecos y África del Sur, responsables de grandes aportaciones de energía renovable en el continente Africano (REN21, 2017b). La Figura 5 muestra los países punteros en capacidad eléctrica renovable instalada hasta 2016 por cada tipo de energía.

	1	2	3	4	5
<b>ELECTRICIDAD</b>					
Energía renovable (incluyendo la energía hidroeléctrica)	<b>China</b>	Estados Unidos	Brasil	Alemania	Canada
Energía renovable (sin incluir la energía hidroeléctrica)	<b>China</b>	Estados Unidos	Alemania	Japón	India
Capacidad de energía renovable per cápita (sin incluir la energía hidroeléctrica <sup>3</sup> )	<b>Islandia</b>	Dinamarca	Suecia/Alemania		Spain/Finland
Generación con bioenergía	<b>Estados Unidos</b>	China	Alemania	Brasil	Japón
Capacidad de energía geotérmica	<b>Estados Unidos</b>	Filipinas	Indonesia	New Zealand	México
Capacidad de energía hidroeléctrica <sup>4</sup>	<b>China</b>	Brasil	Estados Unidos	Canada	Federación Rusa
Generación de energía hidroeléctrica <sup>4</sup>	<b>China</b>	Brasil	Canada	Estados Unidos	Federación Rusa
Capacidad de energía solar de concentración (CSP)	<b>Spain</b>	Estados Unidos	India	Sudáfrica	Marruecos
Capacidad solar FV	<b>China</b>	Japón	Alemania	Estados Unidos	Italy
Capacidad solar FV per cápita	<b>Alemania</b>	Japón	Italy	Bélgica	Australia/Grecia
Capacidad de energía eólica	<b>China</b>	Estados Unidos	Alemania	India	España
Capacidad de energía eólica per cápita	<b>Dinamarca</b>	Suecia	Alemania	Ireland	Portugal

**Figura 5. Los países líderes en capacidad total de generación a finales de 2016.** Fuente: adaptado de REN21, 2017c.

Según el informe de REN 21 (REN21, 2017c) que trata específicamente sobre los avances mundiales en la transición energética hacia un modelo renovable, hay buenos motivos



para creer que la transición sigue por un cambio de paradigma que se aleja de un uso basado en las fuentes fósiles: la nueva capacidad de energía renovable instalada viene siendo creciente; disminución considerable en los precios relacionados a las renovables, especialmente a la solar fotovoltaica y eólica; y la escisión entre el crecimiento económico y las emisiones de gases de efecto invernadero manteniéndose de forma constante durante los tres últimos años. Sin embargo, el mismo informe señala que esto debería ocurrir a una velocidad satisfactoria para conseguir los objetivos del Acuerdo de París, principalmente en función del retraso en la presencia de renovables que los segmentos de transporte y de calentamiento y enfriamiento llevan en comparación al sector eléctrico.

## **2. La biomasa**

La biomasa es una fuente renovable, ampliamente disponible y amigable medioambientalmente (Behera et al., 2014), cuya producción anual es estimada en 10<sup>10</sup> MT (Sánchez y Cardona, 2008). Es una energía autóctona, procedente del Sol, por lo que no produce dependencia entre países por lo menos en su fase de obtención (Martín, 2008). Existen muchas definiciones de lo que es biomasa. Según el IDAE- Instituto para Diversificación y Ahorro de la Energía-, la biomasa puede ser definida como *“la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía, es decir, cualquier sustancia orgánica de origen vegetal o animal, incluyendo los materiales que resultan de su transformación natural o artificial”*. Ya la Especificación Técnica Europea CEN/TS 14588 define la biomasa como *“todo material de origen biológico excluyendo aquellos que han sido englobados en formaciones geológicas sufriendo un proceso de mineralización”*.

La biomasa puede ser clasificada como primaria, cuando hay conversión directa de la energía solar; secundaria, cuando engloba residuos agrícolas y forestales, o terciaria, cuando se trata de residuos urbanos e industriales. Estos residuos, según Gómez (1991) poseen cinco posibles destinos: fertilización y conservación de suelos, teniendo un uso agrícola, selvícola y de recuperación de terrenos; sustrato productivo, sirviendo como medio para el crecimiento de lombrices (fines agrícolas), setas y levaduras (fines alimenticios) o bacterias (fines industriales); alimentación humana; alimentación ganadera; o para la producción de energía, que es lo que va a tener un mayor enfoque.

El uso de la biomasa para fines energéticos se viene basando principalmente en el uso de la materia prima local para la producción de biocombustibles, ya que pueden complementar o sustituir por completo a los combustibles fósiles derivados del petróleo (Özdenkçi et al., 2017). Atendiendo a este presupuesto, la biomasa puede ser clasificada en oleaginosa, azucarada, amilácea o lignocelulósica. Las materias primas oleaginosas pueden ser convertidas a biodiesel a partir de la extracción de su aceite y reacción de transesterificación, produciéndose ésteres metílicos de cadena corta que poseen propiedades similares al diésel de petróleo (Thinnakorn y Tscheikuna, 2014; Tran et al., 2017). La biomasa azucarada y amilácea son generalmente empleadas en la producción de etanol de primera generación, proceso que ya tiene una maduración tecnológica y es la base del etanol producido actualmente en el mundo. La biomasa lignocelulósica, compuesta básicamente de residuos agrícolas, forestales, agroindustriales o industriales, está siendo estudiada para la conversión al etanol denominado de segunda generación, a través de un proceso bastante más complejo que lo establecido para las materias primas

azucaradas y amiláceas en función de su estructura fibrosa y difícil de hidrolizar (Raele et al., 2014).

## 2.1 Composición de la biomasa lignocelulósica

La composición y estructura de la biomasa lignocelulósica pueden ser vista de manera simplificada en las Figuras 6 y 7, respectivamente. Constituyen el mayor depósito de energía fotosintética y materia orgánica renovable, siendo la celulosa y lignina considerados los biopolímeros más abundantes en la naturaleza (NREL, 2017).

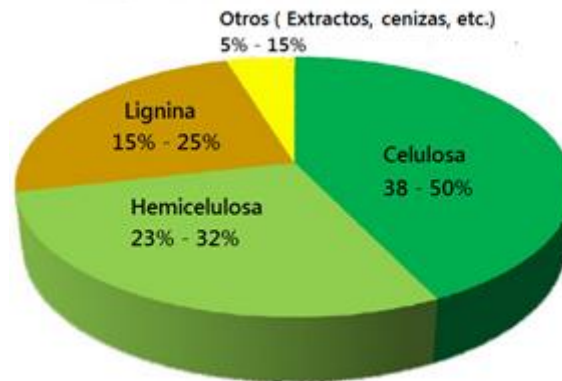


Figura 6. Composición de la biomasa lignocelulósica. Fuente: Adaptado de NREL, 2017.

Especialmente en los últimos 20 años, los avances en el área de la microbiología, ingeniería genética y biotecnología están llevando a la creación de una plataforma de productos químicos cada vez más amplios a partir de la biomasa lignocelulósica, de entre los cuales el bioetanol tiene una atención especial por su importancia en el contexto químico y energético, además de que el uso de estos tipos de materiales no interfieren con la producción de alimentos (Joshi et al., 2011; Chandel et al., 2011; Alvira et al., 2010).

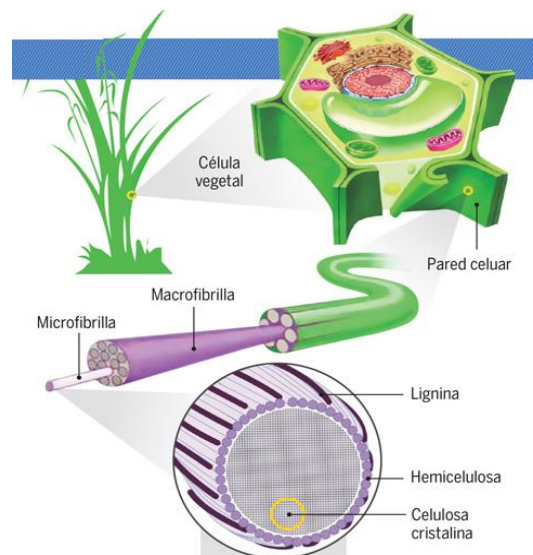


Figura 7. Estructura de la biomasa lignocelulósica. Fuente: Adaptado de Alvarado, 2017.

### 2.1.1 Celulosa

La celulosa es un biopolímero de función estructural sintetizado por las plantas constituido por unidades lineales de D-glucosa enlazadas por uniones del tipo  $\beta$ -(1,4), siendo la celobiosa, disacárido 4-O-( $\beta$ -D-glicopiranosil-D-glucopiranos) la unidad que se repite, como se pueden ver en las Figuras 8 y 9 (Romero-García et al., 2016). En función de la presencia de grupos (-OH), se crean puentes de hidrógeno que confieren estabilidad intra e intermolecular, siendo la longitud del polímero variable en función del tipo de organismo, su edad y estado metabólico momentáneo (Li et al., 2010b; Barreto, 2008).

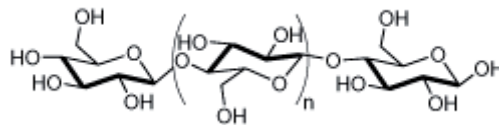


Figura 8. Estructura química de la celulosa. Fuente: Ferreira et al., 2009.

De acuerdo con Levin (1998), hay dos tipos principales de celulosa: la *cristalina* o *nativa*, marcada por un ordenamiento molecular que induce a una insolubilidad de este material en agua, disolventes orgánicos (benceno, éter, cloroformo, etanol) y en disoluciones de ácidos y álcalis diluidas; y la celulosa *modificada*, que abarca la celulosa amorfa, carboximetilcelulosa y celooligosacáridos, que en función de su mayor grado de desorganización molecular resulta soluble en agua y de fácil descomposición por parte de los diversos pretratamientos que tienen por fin la producción de bioproductos. La celulosa cristalina se torna muy soluble en presencia de ácido clorhídrico al 44% y en ácido sulfúrico al 72% (Swatloski et al., 2002; Díaz et al., 2011).

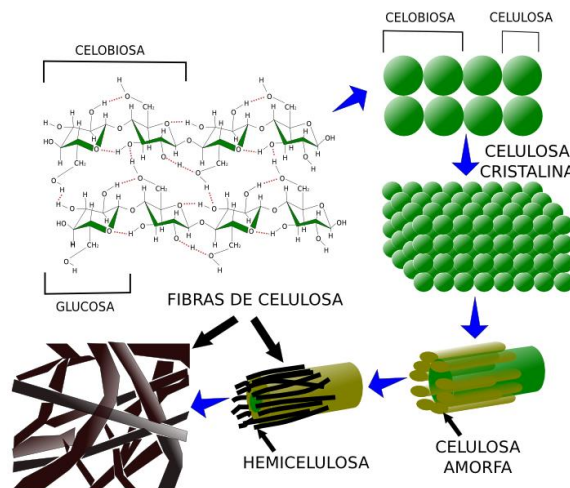
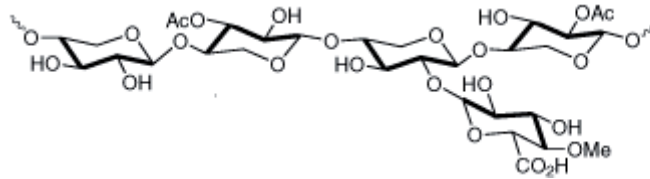


Figura 9. Constitución de la celulosa. Fuente: Nueva Génesis, 2017.

### 2.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa, por su vez, son biopolímeros heterogéneos y de cadena ramificada, constituidos de pentosas ( $\beta$ -D-xilosa,  $\alpha$ -L-arabinosa), hexosas ( $\beta$ -D-manosa,  $\beta$ -D-glucosa,  $\alpha$ -D-galactosa) y también por ácidos orgánicos ( $\alpha$ -D-glucurónico,  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturónico y ácidos  $\alpha$ -D-galacturónico) que aparecen en las paredes celulares en

forma amorfa (Girio et al., 2010). La estructura química simplificada de la hemicelulosa puede ser vista en la Figura 10.



**Figura 10. Estructura química general de la hemicelulosa.** Fuente: Ferreira et al., 2009.

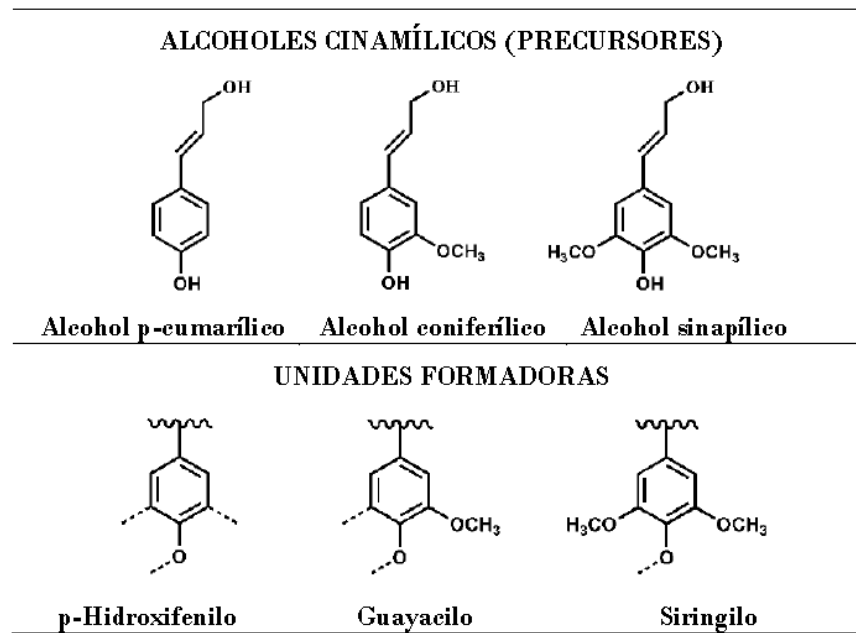
La gran mayoría de las hemicelulosas son dotadas de una cadena de azúcares plana unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 formando una especie de columna vertebral, de la cual pueden derivar pequeñas ramificaciones de azúcares. Presentan una menor longitud que la celulosa y también un menor grado de polimerización, entre 100 y 200. Son clasificadas según el tipo de azúcar dominante en la cadena principal, pudiéndose identificar tres grupos principales: xilanos, glucanos y mananos. Los xilanos representan el grupo con mayor representatividad, teniendo un esqueleto principal formado por unidades residuales de xilopiranososa mediante enlaces  $\beta$ -1,4, teniendo, según Coughlan y Hazlewood (1993), tres familias principales: xilanos de la madera de angiospermas, con 10% a 35% de xilano y grado de polimerización cerca de 200.; xilanos de la madera de coníferas, conteniendo 10% a 15% de xilano con un grado de polimerización mayor de 120; y el xilano de los pastos, con un grado de xilano variable y grado de polimerización cerca de 70.

La eliminación de la hemicelulosa durante la etapa del pretratamiento facilita la digestión de la celulosa en la etapa de hidrólisis enzimática, una vez que pueden cubrir las fibrillas de celulosa y dificultar el acceso a ella. Además, por tener una estructura más frágil, las condiciones de operación en el pretratamiento, como temperatura, presión y tiempo de retención del material, son claves para impedir la formación de productos de degradación que pueden ser potenciales inhibidores del proceso de fermentación, como el furfural e hidroximetilfurfural (Agbor et al., 2011; Palmqvist y Hahn-Hagerdal, 2000).

### 2.1.3 Lignina

La lignina es un biopolímero tridimensional sintetizado a partir de la polimerización de compuestos de fenilpropano, unidos a través de distintos tipos de enlaces que se alternan sin un orden definido, formando una matriz compleja (Santos et al., 2017; Demirbas, 2008; Romero-García et al., 2016). Siendo considerado el polímero aromático no polisacárido más abundante de la naturaleza, es insoluble, amorfo y de alto peso molecular.

El alcohol p-cumarílico, coniferílico y sinapílico son los precursores de mayor importancia en la formación de la lignina, que gracias a la acción de lacasas y peroxidasas producen radicales libres que al azar van reaccionando para formar diversos tipos de uniones, principalmente C-O o C-C, siendo predominante el enlace  $\beta$ -O-4. Estos tres precursores no presentan una proporción fija, variando conforme a la especie de la planta, tipo de tejido y localización de la lignina dentro de la pared celular. Cada uno de ellos va a generar las subunidades de la lignina, que son: el p-Hidroxifenilo, Guayacilo y Siringilo. La Figura 11 muestra cada uno de los compuestos precursores y las subunidades que los originan, mientras la Figura 12 los diversos tipos de uniones verificadas en la lignina.



**Figura 11. Principales compuestos precursores y sus respectivas unidades formadoras.** Fuente: Yuan et al., 2013.

La Figura 11, muestra que las subunidades van a variar dependiendo de la posición del grupo metoxilo de su precursor. Todavía, estos no son los únicos monómeros que dan lugar a la estructura de la lignina, estando ampliamente aceptado que otros compuestos como el coniferaldehído y los monolignoles acilados también participan de las reacciones de acoplamiento que forman la lignina (Romero-García, 2016).

En las maderas, la lignina tiene la función de proveer resistencia contra la degradación microbiana, gracias a su asociación espacial con los polisacáridos dentro de la pared celular. En respuesta al ataque de hongos patógenos o a heridas, se pueden producir fenómenos como la lignificación (aumento en el contenido de lignina). Una vez eliminada o modificada la lignina, la celulosa se encuentra más expuesta a la acción bacteriana y puede ser fácilmente degradada.

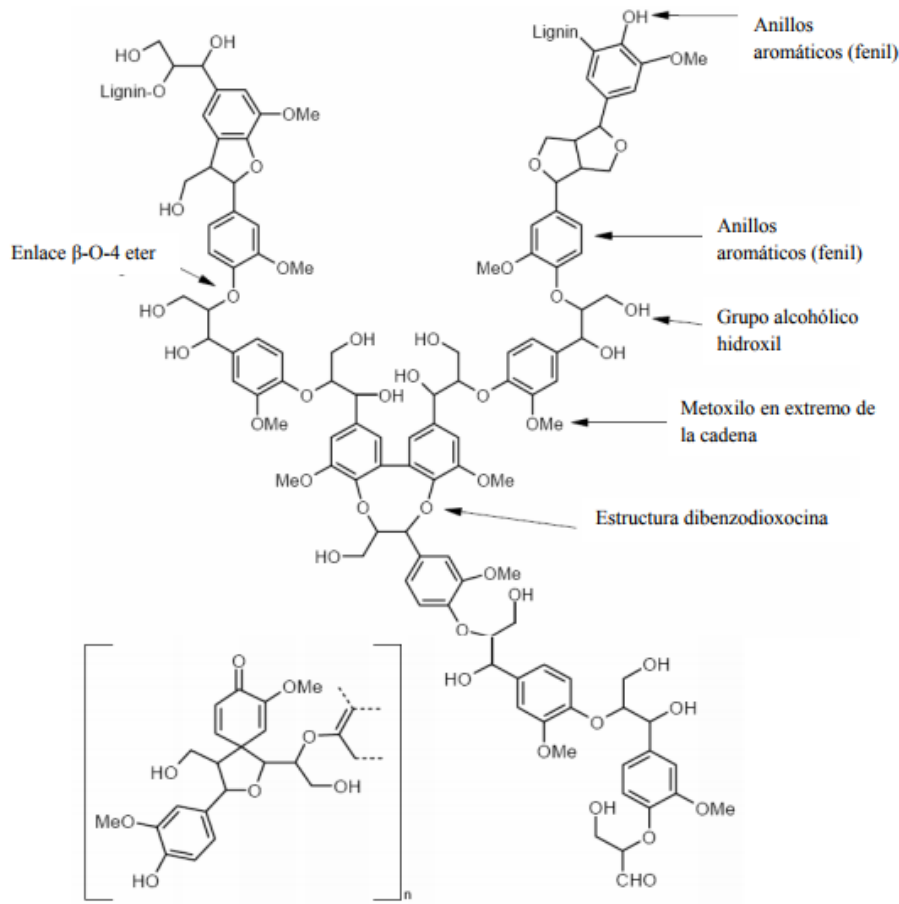


Figura 12. Estructura química de la lignina. Fuente: Bommarius y Riebel, 2004.

### 2.1.4 Componentes no estructurales o secundarios

Los componentes no estructurales son fracciones del material lignocelulósico compuesto por variadas sustancias, como grasas, gomas, resinas, entre otros, que no pertenecen a la pared celular. Son de bajo peso molecular y solubles en agua o solventes orgánicos. Esta fracción posee un interés industrial bastante significativo por la presencia de componentes antioxidantes, como la oleuropeína, flavonoides y compuestos fenólicos, pero no es atractivo dentro del contexto de la producción del bioetanol de segunda generación por el potencial inhibidor de algunos de estos compuestos (Romero-García, 2016).

## 2.2 Biorrefinerías Lignocelulósicas – Una propuesta para el completo aprovechamiento del material lignocelulósico

### 2.2.1 Definición general y clasificación

La biorrefinería forma parte de un camino hacia la sostenibilidad en todos sus ámbitos. Un camino en el que, como especie humana, necesitamos hacer frente a una transición más allá del combate contra el cambio climático y de adelantarse a una crisis por la escasez del petróleo y el alza de sus precios. Nos referimos a una transición hacia un modelo de desarrollo integral, descentralizado, basado en una gran presencia de los recursos naturales renovables y locales, y con un paradigma económico distinto, es decir, con beneficios mejor distribuidos.



Según Fahd et al. (2012), la biorrefinería se define como un “modelo integrado de actividades agrícolas y de conversión capaces de proporcionar bioenergía y biomateriales como alternativa a las refinerías basadas en energía fósil, aumentando el empleo y la renta en zonas rurales”. Por otra parte, según Demirbas (2009), es una instalación similar a la refinería de petróleo, donde la biomasa se convierte en productos químicos y energía a través de una multitud de procesos, tales como hidrólisis, pirólisis, catálisis, fermentación, gasificación y licuefacción. La Agencia Internacional de Energía (IEA, 2017) la define como “instalación donde se generan, de forma sostenible, un amplio espectro de productos de interés comercial a partir de biomasa”. La definición más actualizada, todavía, que de hecho la utiliza el Laboratorio Nacional de Energías Renovables de los Estados Unidos (NREL, por sus siglas en inglés), es la que se le atribuye a Demirbas (2010) en que se define biorrefinería como “instalación que integra procesos y equipos de conversión de biomasa para producir combustibles, electricidad y productos químicos de valor añadido a partir de biomasa”. En definitiva, se puede decir que uno de los objetivos de las biorrefinerías es contribuir a cubrir una demanda energética y a obtener productos químicos y materiales, mediante una serie de operaciones y procesos que ayudan a transformar la biomasa en un producto deseado

El término “Biorrefinería” fue establecido en los años 1990. Pero sus orígenes se remontan al año 1878, cuando el químico Alemán A. Mitscherlich empezó a producir etanol y pegamento para papel a partir del licor residual de la pulpa de sulfito. Además de etanol, los primeros procesos dentro de la biorrefinería estaban enfocados para producción de ácido láctico, 1,3-Propanediol y lisina para producción de polímeros, la mayoría de ellos a través de fermentación. Actualmente, los proyectos de biorrefinerías están enfocados en la fabricación de combustibles, solventes, productos químicos, plásticos, energía y alimento para fines humanos. Un hecho histórico importante que contribuyó para el actual desarrollo de las biorrefinerías fue la política de Chemurgy implementada en Estados Unidos en 1925. Chemurgy era una abreviación para “química proveniente del acre”, y hacía mención a la utilización de productos agrícolas (hoy en día llamados recursos renovables) en la industria química. En este período se fundó también el Consejo Nacional Agrícola Chemurgy, en el que se hacían conferencias entre industria, ciencia y agricultura. La disminución de los precios del petróleo crudo después de la segunda guerra mundial hizo que el Chemurgy dejase de existir, pero muchos de los procesos e invenciones que se consiguieron en esa época aún están vigentes (Kamm et al., 2005).

Según Clark y Deswarte (2008), en la literatura se han descrito tres tipos de biorrefinerías, las cuales conforman la clasificación conocida actualmente. Estas son las biorrefinerías Fase I (una materia prima, un proceso y un producto principal); Fase II (una materia prima, múltiples procesos y múltiples productos principales); y Fase III (múltiples materias primas, múltiples procesos y múltiples productos principales). La Fase III es el tipo de biorrefinería más avanzado. La diversidad de productos da un alto grado de flexibilidad a los cambios de las demandas del mercado y proporciona a las biorrefinerías fase III varias opciones para lograr rentabilidad y maximizar sus rendimientos. Además, el hecho de usar múltiples materias primas ayuda a asegurar la disponibilidad de éstas y, ofrece a las biorrefinerías la posibilidad de seleccionar la combinación más rentable de materias primas que estén a disposición en un lugar determinado. Actualmente, existen cuatro sistemas de biorrefinerías fase III que se encuentran en etapa de investigación y



desarrollo, que son: Biorrefinerías de materiales lignocelulósicos (usarían como materia prima biomasa lignocelulósica de “naturaleza seca”); Biorrefinerías de “planta entera” (emplearían toda la planta de cereales tales como el trigo, el maíz, etc.); Biorrefinerías verdes (toman biomasa verde de “naturaleza húmeda”, como la alfalfa, el césped, el trébol, etc.); y Biorrefinerías del concepto de “dos plataformas” (la materia prima es separada en una “plataforma de azúcares” –bioquímica- y una “plataforma de gas de síntesis - termoquímica).

### **2.2.2 Biorrefinerías Lignocelulósicas**

De entre las posibles plantas de biorrefinería que puedan trabajar a una gran escala, las que están basadas en materias primas lignocelulósicas son las que más pueden tener éxito, principalmente por la disponibilidad de la biomasa (como madera, paja, césped y residuos de papel) y por la representatividad que sus productos encuentran tanto en el mercado tradicional petroquímico como en el mercado futuro basado en los bioproductos (Valdivia et al., 2016; Kamm et al., 2005).

De hecho, en la última década, la industria lignocelulósica ha logrado enormes progresos. Al menos cuatro plantas comerciales han sido inauguradas en los últimos años, todas relacionadas a la producción de etanol celulósico: Proyecto “Liberty” por la empresa conjunta Poet-DSM; “Cellulosic Ethanol Plant”, por Dupont, en Nevada, Iowa; Industria “Abengoa Bioenergy Hybrid Kansas”, por Abengoa; y “Crescentino”, por BetaRenewables (el único en Europa) (Kumar et al., 2009a). Todos estos están en diferentes niveles de operación, ya que están en su fase de arranque actual. El éxito en este conjunto de instalaciones es crucial para el posterior despliegue comercial de la industria (Valdivia et al., 2016; Kamm et al., 2005).

En Estados Unidos, el apoyo gubernamental a la tecnología de segunda generación ha sido significativo, pero probablemente todavía no sea suficiente. Además, algunas empresas, como Abengoa, POET-DSM e IneosBio, han recibido financiación para la construcción de instalaciones comerciales. No hay duda de que este apoyo ayudó a avanzar el estado de la técnica para esta tecnología, sin embargo, se necesita más apoyo para llevar la tecnología a la madurez. Este apoyo podría obtenerse mediante la financiación directa de proyectos comerciales y mediante exenciones de créditos fiscales, primas por biocombustibles lignocelulósicos o el aumento del límite legal de mezcla. Los inversores son otra pieza necesaria que puede ayudar a llevar la industria de las biorrefinerías a un nivel maduro. Hay un conjunto de inversores privados que están dispuestos a asignar sus recursos a la tecnología verde, sostenible y económicamente viable. Para tener acceso, primero será necesario desplegar las instalaciones comerciales mencionadas. Esto reducirá el riesgo tecnológico percibido para los inversores y aumentará el número de entidades, bancos y fondos privados interesados en este mercado (Valdivia et al., 2016; Kamm et al., 2005).

De entre estos compuestos, la celulosa y la hemicelulosa poseen numerosos procesos bien desarrollados y que están en vías de mejora, pero la lignina aún sigue poco aprovechada, funcionando como combustible, aglutinante o material adhesivo. Al estar constituida por fenoles, la separación en unidades menores de hidrocarburos aromáticos traería un gran valor añadido a los productos primarios obtenidos en las biorrefinerías lignocelulósicas. Es importante considerar que aún no se ha descubierto un microorganismo capaz de

reducir la lignina al punto de obtener dichos monómeros, al contrario de lo que ocurre con las estructuras de la celulosa y hemicelulosa (Kamm et al., 2005). Una visión general de los productos potenciales que pueden ser obtenidos está en la Figura 13.

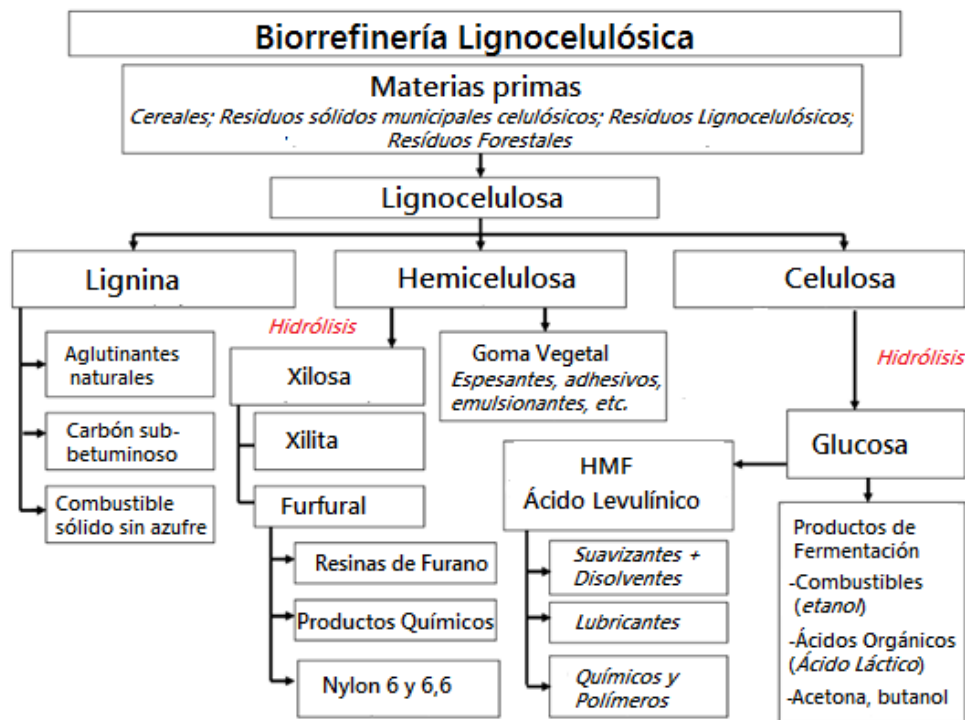


Figura 13. Posibles productos obtenidos a partir de biorrefinería basada en material lignocelulósico.  
Fuente: adaptado de Kamm et al (2005).

La producción de biocombustibles líquidos basados en materia prima lignocelulósica, principalmente el etanol, para combinar con la gasolina, es de importancia mundial para asegurar el suministro de energía mientras se reduce el uso de combustibles fósiles, apoyando el desarrollo de la tecnología rural con empleos basados en el conocimiento y mitigando las emisiones de gases de efecto invernadero (Valdivia et al., 2016; Sawatdeenarunat et al., 2015; Hu et al., 2017; Sun y Cheng, 2002). Además, el etanol puede servir como un puente para la producción de una mayor variedad de productos químicos, principalmente cuando convertido a eteno, que a su vez puede ser convertido a polietileno u otros productos de interés (Kajaste, 2014; Scown et al., 2014). La glucosa, principal azúcar para la producción de etanol, también puede ser redireccionada a la producción de otras sustancias, como butanol, ácido succínico, metano, hidrógeno, propanol, acetona (de entre otros) a través de la actividad microbiana.

Otro de los productos de mayor interés es el furfural. Este compuesto es utilizado en innumerables aplicaciones como nematicida, fungicida y lubricante, además de ser precursor de otros productos como 5-metil furfural, tetrahidrofurano y alcohol furfurílico (Raman y Gnansounou, 2015; Win, 2005).

### 2.3 La biomasa del olivar

El olivo (*Olea europea*) es un árbol de la familia de las oleáceas tradicionalmente cultivado para la producción de aceite y aceitunas de mesa. Cerca del 97% de la producción global

de aceitunas se encuentra en la cuenca mediterránea, teniendo a España como su principal productor mundial, seguido por Italia, Grecia, Turquía, Marruecos y Túnez. Posee un tronco erecto de color gris claro, hojas lanceoladas y flores muy pequeñas, reunidas en inflorescencias, pudiendo llegar hasta 15 metros de altura (Pérez, 2015; Christoforou y Fokaides, 2016; Rosúa y Pasadas, 2012).

El diagrama de flujo de explotación del olivar hasta la producción del aceite se muestra en la Figura 15. El proceso se inicia con la recolección de la aceituna, que se debe cosechar en su madurez fisiológica indicado por un color verde limón o negro, dependiendo de la variedad. El transporte hasta las almazaras o entamadoras debe ser el más rápido posible, y antes de su procesamiento se separa la materia prima que presenta signos de deterioro, pudiendo ser manual o a través de máquinas dependiendo de la producción. En las almazaras se extrae el aceite de oliva a partir de la aceituna por medios físicos, con utilización de molinos o trituradores metálicos para liberar el aceite mediante la rotura de las células, obteniéndose una pasta que se lleva a la batidora, donde se va a disminuir la viscosidad de la pasta y facilitar la formación de la fase oleosa. Se procede entonces a la separación de fases, que puede ser realizada por prensa hidráulica (ya prácticamente en desuso) o por sistemas continuos de dos o tres fases. (Pérez, 2015; Junta de Andalucía, 2010). En el sistema de tres fases se obtiene, además de la fase oleosa, una fase acuosa denominada alpechín, y otra sólida que contiene el orujo con restos de aceite y agua. Por otro lado, en el sistema de dos fases no se genera alpechín, teniendo como único co-producto el orujo con elevada humedad, además de la fase oleosa. La diferencia entre estos dos sistemas puede ser visto en la Figura 14.

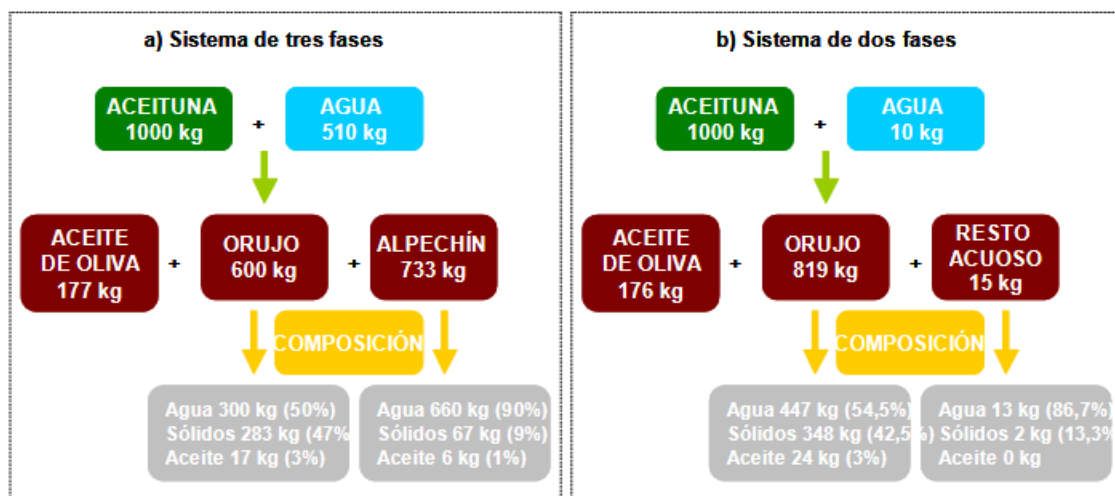


Figura 14. Diferencia entre el sistema continuo de dos y tres fases. Fuente: Junta de Andalucía (2010).

Las entamadoras se dedican al procesado de la aceituna mediante salazón o fermentación para su consumo como aceituna de mesa. Las aceitunas de mesa pueden ser clasificadas como verdes (elaborado de frutos recogidos durante el ciclo de maduración sometidos a fermentación láctica); de color cambiante (de frutos castaños o color rosa recogidos antes de su madurez completa); negras naturales (proveniente de frutos recogidos en su completa madurez, de tono oscuro); o negras oxidadas (obtenida de frutos oscurecidos artificialmente mediante oxidación). Primeramente la aceituna pasa por una solución diluida de hidróxido sódico para eliminación de su amargor, realizándose posteriormente

la fermentación en salmuera. La concentración de sal es importante pues si es más elevado que el punto óptimo puede producir el arrugado del fruto, mientras si es menor puede alterar su sabor por ocurrencia de la indeseable fermentación butírica (Junta de Andalucía, 2010).

El orujo que se obtiene de las almazaras aun contiene una cantidad de aceite, que es extraído mediante procedimientos físicos o químicos en las extractoras. El proceso físico consiste en un tambor cilíndrico que giran a gran velocidad, separando el aceite de orujo del resto de materiales. La extracción química se hace principalmente con hexano u otro disolvente orgánico, purificándose el aceite en etapas posteriores y recuperándose el hexano (Junta de Andalucía, 2010).

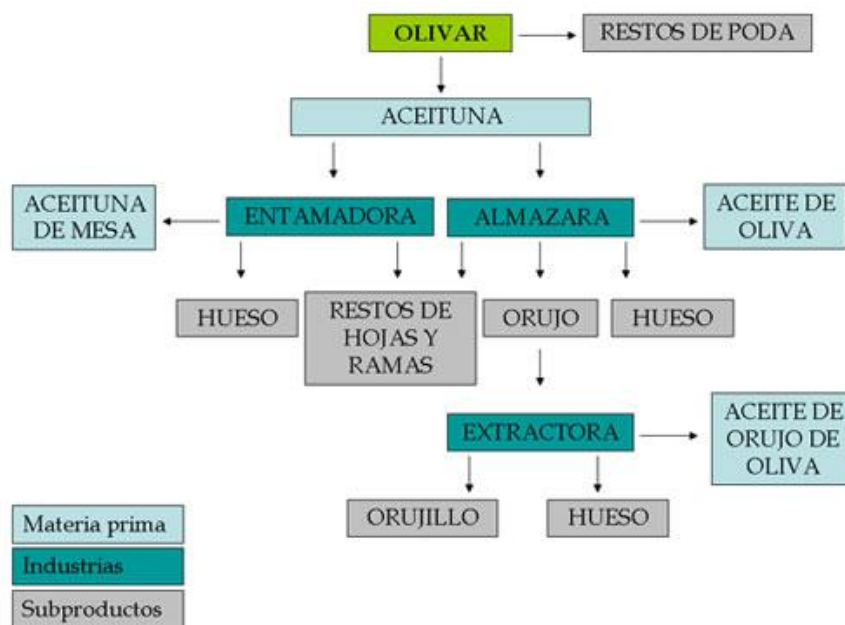


Figura 15. Esquema de la biomasa generada por el olivar. Fuente: Herrera (2012).

Además de los usos tradicionales, el olivar viene siendo progresivamente utilizado como fuente energética, en función del volumen de biomasa generado tanto en la etapa de cosecha y cuidados del cultivo como en las almazaras. Como resultado, se generan una significativa cantidad de residuos lignocelulósicos, como son: restos de hojas y ramas finas, llamadas también hojín, generadas como resultado de la limpieza de la aceituna en almazaras o entamadoras, utilizado tradicionalmente para alimentación animal y más recientemente para producción de compost y energía eléctrica; orujo o alperujo, generado en las almazaras y tradicionalmente destinado a producción del aceite de orujo, pero que también viene siendo utilizado para producción de energía eléctrica o en conjunto con el hojín y otros residuos orgánicos como compost; orujillo, subproducto de las extractoras resultado del proceso de secado y extracción del aceite de orujo, siendo generalmente autoconsumido en las propias instalaciones o destinado a cogeneración de energía con gas natural; hueso de aceituna: generado en las almazaras, entamadoras y extractoras como componente sólido del orujo, destinado principalmente para calefacción industrial o doméstica debido a su bajo contenido de cenizas y elevado poder calorífico (Romero-García, 2016; Romero-García et al., 2014; García-Maraver et al., 2012; Junta de Andalucía, 2010). Otros residuos son generados a partir de la poda de olivo, que se va a tratar

específicamente en el próximo apartado. La Figura 16 muestra un balance de materia derivado de una hectárea de olivar.

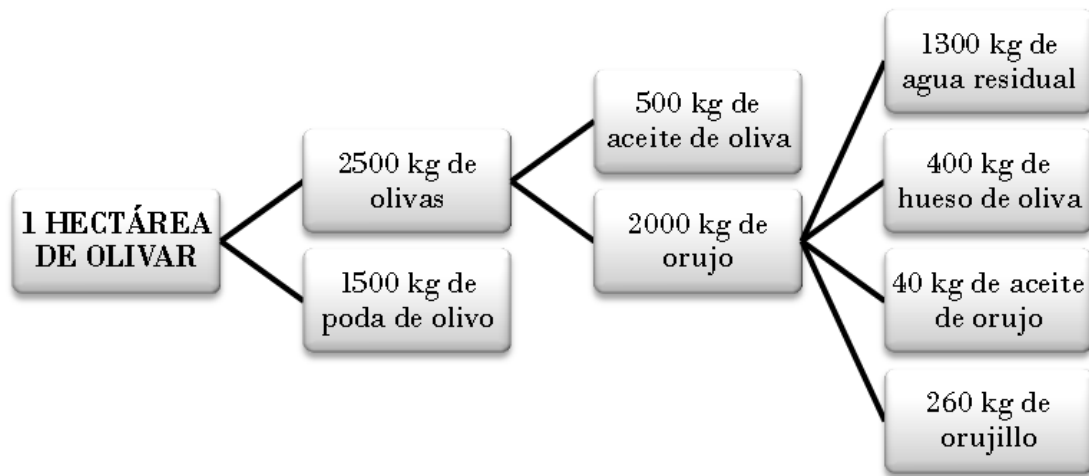


Figura 16. Producción derivada estimada del cultivo de una hectárea de olivar. Fuente: Romero-García 2016.

### 2.3.1 La poda del olivo

La poda del olivo es una operación realizada a cada dos años después de la cosecha de los frutos que también genera un importante residuo, compuesto principalmente por hojas, ramas delgadas y ramas gruesas en una proporción 1:2:1 en peso seco, aunque esta proporción puede variar en función de la edad del árbol, técnicas de cultivo y localización de la poda (Romero-García et al., 2014). Este residuo se elimina generalmente por combustión o por molienda y propagación en el campo, pudiendo provocar liberación de CO<sub>2</sub>, propagación de enfermedades y proliferación de insectos. Con el cultivo de más de 5 millones de hectáreas en toda la Unión Europea en 2014, estimándose una producción de poda de olivo de 7,5 millones de toneladas. (Martínez-Patiño et al., 2017a, FAOSTAT, 2017; Romero-García, 2016; Cara et al., 2006; Negro et al., 2014).

Químicamente, la poda de olivo está compuesta principalmente de azúcares estructurales (celulosa y hemicelulosa), lignina y extractos (cenizas y otros componentes minoritarios), en proporción de 26,1% a 36,6%, 20% a 25%, 17,9% a 27,7% y 14,1% a 31,4% (p/p) respectivamente, pudiendo variar dependiendo de una serie de factores. La poda de olivo, en función de su amplia disponibilidad y bajo coste, al ser generada cada dos años, viene siendo estudiada como fuente para la producción de bioetanol y otros bioproductos (Romero-García, 2016; Romero-García et al., 2016; Ruiz et al., 2017)

## 3. El Bioetanol

El etanol, de fórmula química C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, es un compuesto orgánico perteneciente a la clase de los alcoholes, que tienen por fórmula general R-OH, donde R es cualquier grupo alquilo y el “-OH” es el grupo funcional “hidroxilo” u “oxhidrilo”. Los alcoholes pueden obtenerse mediante tres métodos: hidratación de alquenos en medio ácido; a través del proceso oxo, conversión de alquenos en aldehídos por hidroformilación con una mezcla equimolecular de CO y H<sub>2</sub>, siendo posteriormente convertido a alcohol; y a través de la fermentación de



carbohidratos. Cuando los alcoholes tienen origen biológico, como en el proceso fermentativo, reciben el prefijo “bio”, como por ejemplo biometanol, bioetanol, biobutanol, etc. (Allinger et al., 1984).

El bioetanol es uno de los más importantes biocombustibles producidos a partir de la biomasa, siendo considerado limpio, renovable, y con la posibilidad de operación en motores con ciclo de combustión de ignición por chispa (motor Otto) a partir de dos maneras: en mezclas con la gasolina utilizándose el etanol anhidro (99,6 °GL, donde “°GL” indica grado Gay Lussac); o como combustible puro, empleándose el etanol hidratado (96 °GL). El potencial para sustituir la gasolina también se da por otras razones, como su alto octanaje (108), elevada presión de vapor y presencia del oxígeno molecular, que compensa el menor poder calorífico en comparación a la gasolina, teniendo una combustión con menor emisión de compuestos tóxicos a la atmosfera, emitiendo cerca de 80% menos CO<sub>2</sub> que los combustibles fósiles (Aditiya et al., 2016; Thangavelu et al., 2016; Manochio et al., 2017). La Tabla 1 indica las principales propiedades de la gasolina en comparación al etanol.

Parámetro	Unidad	Gasolina	Etanol
<b>Poder Calorífico Inferior</b>	kJ/litro	32.180	22.350
<b>Densidad</b>	kg/litro	0,72-0,78	0,792
<b>Octanaje RON*</b>	-	90-100	102-130
<b>Octanaje MON**</b>	-	80-92	89-96
<b>Calor latente de vaporización</b>	kJ/kg	330-400	842-930
<b>Relación aire / combustible estequiométrica</b>	-	14,5	9
<b>Presión de vapor</b>	kPa	40-65	15-17
<b>Temperatura de ignición</b>	°C	220	420
<b>Solubilidad en agua</b>	% en volumen	~ 0	100

**Tabla 1. Algunas de las propiedades del bioetanol y de la gasolina.** Fuente: adaptado de BNDES y CGEE, (2008). Datos: \*Octanaje RON (“Research Octane Number”) es una medida del número de golpeteos de la válvula de un motor patrón tipo CFR (“Cooperative Fuel Research”) cuando éste es alimentado con el combustible en estudio, simulando condiciones suaves de manejo. \*\*Octanaje MON (“Motor Octane Number”) tiene un método de medida similar al RON, pero simulando condiciones severas de uso, como la subida de una cuesta.

El etanol hidratado tiene su uso vinculado a motores fabricados o adaptados especialmente para este fin, adoptando tasas de compresión más elevadas para aprovechar el mayor octanaje del etanol y ganar eficiencia en la combustión, además de cambios en los sistemas de alimentación y modificación de materiales que estarán en contacto directo con el etanol como tanques, filtros y bombas de combustible en virtud del poder corrosivo de este biocombustible. Actualmente, la tecnología automotora para el etanol hidratado está suficientemente desarrollada para permitir condiciones de rendimiento, conductividad, arranque en frío y durabilidad similares a los motores a gasolina. El bioetanol también es utilizado en aviones agrícolas en el interior de Brasil,



siendo el principal el modelo “Ipanema”, fabricado por Embraer (BNDES y CGEE, 2008; Vanzela et al., 2017).

A partir de 2003, gracias a los avances en los sistemas electrónicos de control de mezcla e ignición, fueron lanzados en 2003 en Brasil los vehículos “Flex-fuel”, capaces de utilizar mezclas gasolina-etanol anhidro (con 20 a 25% de etanol), etanol hidratado o mezclas entre etanol hidratado y gasolina-etanol anhidro en cualquier proporción sin ningún problema en los motores, representando la mayoría de los coches en circulación en Brasil en la actualidad. En Brasil, está en desarrollo la creación del primer motor “híbrido flex” del mundo. El objetivo es hacer el motor apto para utilizar la gasolina pura (E0), la gasolina brasileña (E27), etanol hidratado (E100), el biometano y el gas natural comprimido (BNDES y CGEE, 2008; Poli-USP, 2017). Las porcentajes de etanol a la gasolina son representadas por la sigla “E”, así, E27 indica 27% de etanol anhidro a la gasolina, E0 no hay ninguna adición mientras E100 indica 100% de etanol.

Todavía, la manera más frecuente e inmediata a la utilización del etanol como combustible es su mezcla con la gasolina y utilización en motores ya en circulación, sin la necesidad de ninguna modificación. Esto representa una ventaja para países en vías de desarrollo que pueden producir etanol y son dependientes de importaciones de combustibles, y también para países industrializados que tienen un potencial limitado de producción de etanol y lo compran a otros países con mejores condiciones de producción.

Al mezclar el etanol y la gasolina, ocurre la producción de un nuevo combustible con distintas características a los originales, en razón del etanol constituirse en una sustancia pura y la gasolina ser una mistura con más de 200 distintos hidrocarburos derivados del petróleo. Algunas de las principales características de esta mezcla son explicadas enseguida:

**Octanaje:** Medida de resistencia de un combustible a la autoignición y detonación, evaluada a través de los métodos RON y MON descritos en la Tabla 1. El etanol es reconocido como un antidetonante mejorador del octanaje de la gasolina, siendo Brasil uno de los primeros países del mundo en utilizar el etanol en la gasolina para sustituir el plomo. En España todo el bioetanol es convertido en un aditivo denominado ETBE (Etil-Tercbutil Éter) para mezclarse con la gasolina, por su menor poder corrosivo, mayor poder calorífico y menor emisión de CO y partículas (Rodríguez-Antón et al., 2015; Yee et al., 2013).

**Volatilidad:** es la facilidad de un combustible líquido en vaporizarse, relacionado al arranque en frío del motor, aceleración y economía de combustible. Está relacionada con un importante parámetro denominado presión de vapor, que determina el nivel de emisiones y la posibilidad de ocurrir la formación de vapor en las líneas de alimentación del combustible, aumentando el valor de este parámetro con la adición del etanol.

**Rendimiento:** Una gasolina que contiene 10% de etanol posee un mayor calor de vaporización en comparación con la gasolina pura, haciendo que esta mezcla, a pesar de tener un poder calorífico 3,3% menor por unidad de volumen, aumente el rendimiento en 1% y 2% en comparación a la gasolina pura.

**Separación de fases:** En las mezclas etanol-gasolina la separación de fases puede ser provocada por la incorporación de un exceso de agua, que tiene una probabilidad menor de ocurrir cuanto mayor es la concentración de etanol en la gasolina, ya que tiene una mayor compatibilidad química con el agua (BNDES y CGEE, 2008).

La producción de etanol combustible en 2016 fue estimada en 99 billones de litros (unidad de EE.UU.), siendo los EE.UU. responsables del 59% y Brasil del 27% de este montante, seguidos de China, Canadá y Tailandia. China es el principal representante asiático, con una producción estimada de 3,2 billones de litros en 2016, basados un 99% en el proceso de producción a través del almidón. En Tailandia la producción llegó a 1,2 billones de litros, mientras en Canadá ha llegado a 1,7 billones de litros en 2016. En Europa, la producción ha caído cerca de un 6% debido a que su principal productor (Francia) ha sufrido una disminución en la cosecha de materia prima, pero se ha verificado aumentos significativos de la producción en Hungría (38%) y en el Reino Unido (23%) (REN21, 2017a).

## 4. Etapas de producción del bioetanol de segunda generación

### 4.1 Pretratamiento

Una de las propiedades características de la biomasa lignocelulósica es su estructura rígida, que es recalcitrante a la descomposición. En la ruta de la producción del bioetanol (y de demás productos químicos), se hace necesaria una etapa de pretratamiento, capaz de descomponer esta estructura y preparar las condiciones para que el coctel enzimático pueda actuar sobre el material. El pretratamiento es una de las etapas cruciales para hacer viable una plataforma de bioproductos a partir de la biomasa, y cuenta con aproximadamente el 40% del coste involucrado en el bioetanol producido (Sindhu et al., 2016; Gupta et al., 2010; Mosier et al., 2005; Chandra et al., 2007). Además de descomponer la estructura del material lignocelulósico, como puede ser visto en la Figura 17, un pretratamiento adecuado de acuerdo con Yang y Wyman (2008) y Gupta y Verma (2015) debe:

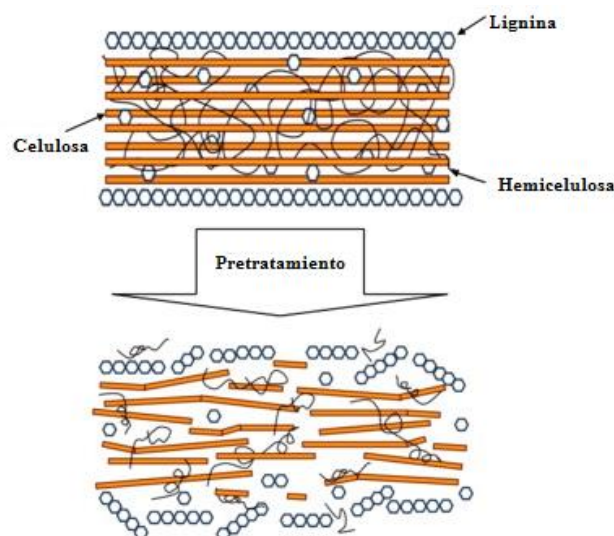


Figura 17. Ilustración del pretratamiento del material lignocelulósico. Fuente: adaptado de Mood et al. (2013).



**a) Tener un rendimiento elevado para distintos cultivos, en distintos lugares y con distintos tiempos de maduración:** idealmente, un pretratamiento debería ser efectivo para cualquier materia prima lignocelulósica, aunque lo que se reporta es una especificidad dependiendo del material a ser trabajado. Los pretratamientos básicos se muestran con una menor efectividad para maderas blandas, mientras los ácidos, pese a que funcionen con una variedad mayor de sustratos, suelen ser más costosos (Mosier et al., 2005; [13]).

**b) Baja degradación de carbohidratos:** una recuperación de azúcares fermentables provenientes de la fracción celulósica y hemicelulósica próximas del 100% es deseable.

**c) Mínima producción de compuestos inhibidores:** dependiendo de las condiciones del pretratamiento, puede ocurrir la formación de compuestos inhibidores para el microorganismo que irá actuar sobre el material posteriormente, siendo estos compuestos agrupados principalmente en ácidos débiles, compuestos fenólicos y derivados del furano.

**d) Que no se requiera una disminución previa del tamaño del material:** la reducción del tamaño del sólido es una etapa costosa con alto requerimiento energético.

**e) Que la realización del pretratamiento tenga lugar en reactores con el menor tamaño y coste posibles:** los costes del reactor deben ser bajos y capaces de aguantar unas presiones de trabajo razonables y la corrosión por el empleo de productos químicos.

**f) No genere residuos sólidos:** sería ideal que el tratamiento realizado sobre el hidrolizado generado en el pretratamiento no produjese residuos que necesiten de posterior tratamiento, para disminuir los costes del proceso.

**g) Efectivo en materias primas con bajo contenido en humedad:** la utilización de materias primas con baja humedad podría reducir el consumo de energía durante el pretratamiento.

**h) Obtención de materiales con altas concentraciones de azúcar:** juntando los procesos de hidrólisis enzimática y pretratamiento, es recomendable que la concentración de azúcares sea superior a 10% para asegurar una producción de etanol con concentración adecuada con el fin de tornar el proceso financieramente atractivo.

**i) Recuperación de la lignina:** con la idea de producir un máximo de compuestos químicos de valor añadido a partir de una materia prima y traer el concepto de biorrefinería más próximo de la realidad, la separación y recuperación de los componentes de la biomasa debe de ser la mayor posible.

**j) Bajos requerimientos de calor y energía:** para que los costes de la etapa de pretratamiento sean los menores posibles, una baja demanda de energía o una integración de procesos que permita el aprovechamiento del calor generado se hace necesario.

**k) Compatibilidad con la fermentación:** la recuperación de azúcares verificada en el pretratamiento y posterior hidrólisis enzimática debe ser compatible con la utilización de un microorganismo capaz de fermentar azúcares C5 o ambas fracciones C5 y C6.



#### 4.1.1 Tecnologías de pretratamiento

Durante las últimas décadas, una multitud de pretratamientos han sido estudiados y probados, pudiendo hacerse una clasificación según su naturaleza en biológicos, químicos, físicos, físico-químicos y combinados.

##### 4.1.1.1 Pretratamientos Biológicos

Este tipo de pretratamiento utiliza principalmente hongos blancos, marrones y de podredumbre blanca capaces de degradar lignina, hemicelulosa y una pequeña parte de celulosa. Al realizarse en condiciones suaves, tiene un consumo energético muy bajo y es ambientalmente sostenible, además de que los co-productos generados no poseen efecto inhibitorio sobre la hidrólisis enzimática (Sindhu et al., 2017; Sánchez, 2009). De entre los microorganismos estudiados y que presentaron resultados satisfactorios en el pretratamiento de materiales lignocelulósicos se encuentran: *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispota*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus*, pero la mayor eficiencia pertenece a la especie *Phanerochaete chrysosporium*, en razón de su velocidad de crecimiento y elevada habilidad en biodegradar la lignina (Chen et al., 1995; Shi et al., 2008; Itoh et al., 2003).

En el pretratamiento biológico, Wan y Li (2010) han demostrado que el contenido en humedad y tamaño de partícula del material, además del tiempo de pretratamiento y temperatura empleados en el proceso son factores que pueden afectar el rendimiento del pretratamiento. Los autores, trabajando con *Ceriporiopsis subvermispota* rebuscando la producción de etanol, observaron un rendimiento en glucosa de 66,61% después de 35 días de pretratamiento trabajando a 28°C, 75% de humedad y 5mm de tamaño de material, y una degradación de lignina de 31,59% durante 18 días de pretratamiento manteniéndose baja la pérdida de celulosa, que fue de 6% para este mismo período, contribuyendo esto en los altos rendimientos observados en la hidrólisis enzimática. Patel et al. (2007), estudiando distintos hongos y distintas materias primas, observó que determinados hongos llevan a mayores producciones de etanol dependiendo del material sobre lo cual actúan.

Todavía, mismo con muchas características atractivas, son necesarios más estudios que conduzcan, principalmente, a una disminución del tiempo del pretratamiento, reducción del espacio útil necesario y a una menor monitorización del proceso (Wyman et al., 2005).

##### 4.1.1.2 Pretratamientos Físicos

Este tipo de pretratamiento se utiliza para aumentar la superficie disponible y los tamaños de poro además de reducir la cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa. La reducción de tamaño es el principal y más estudiado pretratamiento físico, pero hay otros como distintos tipos de molienda, irradiación de rayos gamma o haz de electrones, y la extrusión, que viene siendo considerado un pretratamiento prometedor por ser capaz de promover una mejor cizalla, mezcla y transferencia de calor durante el proceso (Duque et al., 2017; Zhu et al., 2009).



**a) Trituración mecánica:** ocurre una combinación entre trituración y molienda con el objetivo de aumentar la superficie específica y densidad aparente, facilitar la hidrólisis y reducir la cristalinidad de la celulosa, a través de la acción de molinos de martillos, bolas, cuchillas, rodillos, entre otros (Azhar et al., 2017; Rastogi y Shrivastava, 2017).

**b) Radiación de alta energía:** en este pretratamiento, la biomasa es puesta en un ambiente acuoso y expuesta a radiación de alta energía, en general de 2450 MHz entre 250-1000 W, a una temperatura entre 70 a 230 °C y tiempos que pueden variar de 5 a 120 minutos (Mupondwa et al., 2017). En función de la actuación conjunta del calor y de la radiación electromagnética, puede llevar a un aumento en la porosidad y de la superficie disponible de la biomasa, además de reducir el grado de polimerización y de cristalinidad de la celulosa, facilitar la digestión de la fracción hemicelulósica y despolimerizar parcialmente la lignina (Kashaninejad y Tabil, 2011; Aguilar-Reynosa et al., 2017). Muchos tipos de biomasa ya fueron estudiados según este método, como las pajas de trigo y arroz, materiales leñosos, césped y grama. Este pretratamiento también es considerado de tipo físico-químico por algunos autores ya que la biomasa sufre tanto efectos termales como no-termales (Alvira et al., 2010).

**c) Extrusión:** este pretratamiento promueve cambios químicos y físicos en la estructura de la biomasa al someter el material a un calentamiento, cizallamiento y agitación simultáneos. En función de la velocidad y temperatura empleadas, ocurre desfibrilación y acortamiento de las fibras lignocelulósicas, aumentando la accesibilidad a los carbohidratos por parte de las enzimas. Su uso en combinación con agentes químicos, especialmente bases, es capaz de aumentar la severidad del pretratamiento, aumentando la deslignificación y los poros en el material. Además, la incorporación de enzimas al proceso es considerada como una tecnología prometedora para la producción de bioetanol (Alvira et al., 2010; Duque et al., 2017; Ravindran y Jaiswal et al., 2016; Pérez-Rodríguez et al., 2017).

#### 4.1.1.3 Pretratamientos Químicos

Los pretratamientos químicos son considerados uno de los tipos de pretratamiento más prometedores por su capacidad de reducción del grado de polimerización y de cristalinidad de la celulosa, eliminación de la lignina y hemicelulosa, y también por ya haber algunos compuestos químicos consolidados en la industria capaces de eliminar componentes de la biomasa, como en la producción del papel, que también no generan compuestos de inhibición en reacciones que no exigen aportación de calor o presión (Wei et al., 2017; Rabemanolontsoa y Saka, 2016).

**a) Pretratamiento Alcalino:** el aumento del pH provocado por la adición de bases a materiales lignocelulósicos es variable dependiendo del contenido en lignina de la biomasa. En general, son más efectivos en solubilizar la lignina que los demás componentes y provocan una menor degradación de los azúcares y generación de compuestos inhibidores que el pretratamiento ácido. Químicamente, su acción está vinculada a la saponificación de los enlaces intermoleculares que unen la lignina y parte del material lignocelulósico, siendo, de entre los pretratamientos químicos, el más efectivo en romper enlaces tipo éster entre los tres componentes principales de la biomasa



evitando la fragmentación de los polímeros hemicelulósicos y formando un mayor número de poros (Mohapatra et al., 2017; Kim et al., 2016; Zhang et al., 2017).

En general, los pretratamientos básicos son realizados a temperatura ambiente y tiempos que pueden variar de días a segundos (Alvira et al., 2010). Las principales bases utilizadas son el NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub> y el amonio. El Ca(OH)<sub>2</sub> es capaz de reducir sustancias amorfas, como la lignina, y grupos aceto de la hemicelulosa, reduciendo el impedimento estérico de las enzimas y facilitando la digestión de la celulosa. El NaOH es reportado como el más efectivo a bajas temperaturas y tiempos más largos de pretratamiento en función de ser una base más fuerte que el Ca(OH)<sub>2</sub> o amonio (Kim et al., 2016; Hoşgün et al., 2017). La Tabla 2 resume algunas de las principales características del pretratamiento básico.

**Tabla 2. Resumen de las principales condiciones de reacción y efectos de los pretratamientos alcalinos.**

Bases	Condiciones de reacción				Principales efectos		
	Cantidad de base	Temperatura (°C)	Tiempo	Carga de Sólido (%)	Hemicelulosa	Lignina	Otros
<b>NaOH</b>	0,5-10	60-180	5-60 min	10-30%	50% solubilización	60-80% deslignificación	Dificultad en recuperar el NaOH
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	1-30%	60-180	5-60 min	10-30%	20-40% solubilización	40-60% deslignificación	Fácil recuperación de la base
<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	5-30%	30-210	5-60 min	10-50%	10-50% solubilización	0-80% deslignificación	-
<b>Amonio Líquido Anhidro</b>	-	70-90	5 min	60-90%	Sin solubilización	Sin eliminación de lignina	Rápida evaporación y licuefacción de la amonio
<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b>	0,05-0,15 g Ca(OH) <sub>2</sub> /g biomasa	25-130	1h-8 semanas	5-20%	20-40% solubilización	60-80% deslignificación	Baja requisición energética

**b) Pretratamiento Ácido:** en este tipo de pretratamiento, el principal objetivo es la solubilización de la fracción hemicelulósica y facilitar el ataque enzimático a la celulosa. Pueden ser utilizados ácidos concentrados o diluidos, de modo que el diluido presenta mayores ventajas buscando la producción de etanol por reducir la formación de compuestos de inhibición, reducir costes operacionales y minimizar problemas de corrosión en equipos. El ácido concentrado tiene una mejor utilización para la producción de metano, ya que las bacterias metanogénicas consiguen una mejor adaptación en un medio que contenga compuestos como 5-HMF y furfural, principales productos de degradación de los azúcares presentes en la biomasa (Hendriks y Zeeman, 2009; Dagnino et al., 2013).



El pretratamiento con ácido diluido puede ser realizado a altas temperaturas (como 180°C) y con cortos periodos de residencia (1 a 5 minutos), o a temperaturas menores (120°C) y tiempos de retención mayores (30 a 90 minutos). Todavía, si el tiempo de reacción pasa 1 hora a 120°C, la xilosa empieza a disminuir su concentración y formar productos de degradación, según investigación realizada por Cruz et al. (2002). Los ácidos sulfúrico, fosfórico, nítrico e hidrocórico son los más estudiados, destacando el ácido sulfúrico por su bajo coste, alta reactividad, disponibilidad inmediata para fines industriales y bajas preocupaciones ambientales (Singh et al., 2015). Cara et al. (2008a) obtuvo un rendimiento en azúcares de 36,3g/100g de materia prima, que representaba 75% de todo el azúcar del material, al pretratar el olivar a 180 °C con 1% de ácido sulfúrico por 10 minutos.

Ácidos orgánicos, como el fumárico, maleico, también fueron probados como alternativas para el pretratamiento ácido en comparación con el ácido sulfúrico por Kootstra et al. (2009). Según los autores, ambos ácidos orgánicos presentaron eficiencias satisfactorias sobre la paja de trigo, teniendo el maleico mejores resultados. Además, formaron menores cantidades de furfural que el ácido sulfúrico.

El mayor inconveniente de los pretratamientos ácidos, como ya señalado anteriormente, es la formación de productos de degradación que tienen efecto negativo en las etapas posteriores de producción del bioetanol, como compuestos fenólicos, ácidos carboxílicos y furanos. La neutralización del pH para la etapa de hidrólisis y fermentación también es otro factor que debe ser llevado en consideración en la selección de este tipo de pretratamiento (Chiaramonti et al., 2012).

**c) Pretratamiento con líquidos iónicos (ILs):** Los ILs se definen como un líquido compuesto enteramente de iones que son fluidos desde bajas temperaturas hasta 100 °C. Las fuertes fuerzas electrostáticas presentes en los iones imparten una serie de características interesantes, como baja inflamabilidad, elevada estabilidad química, térmica y electroquímica. Por su baja presión de vapor y la no formación de gases tóxicos o explosivos, los ILs son también llamados solventes “verdes” (MacFarlane et al., 2014; Amarasekara, 2016).

En función de la posibilidad de regulación del anión y grupos alquilo del catión de los ILs, es posible tener un control de sus propiedades disolventes y actuar tanto en el pretratamiento como en análisis de caracterización de la biomasa. Dependiendo del tipo de solvente utilizado, la estructura de la materia prima lignocelulósica puede ser rota sin la formación de productos de degradación, pudiendo ser separada la celulosa por su solubilización gracias a la rotura de los enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares (Elgharabawy et al., 2016; Yoo et al., 2017).

Todavía, para aplicaciones a mayores escalas, la utilización de ILs requiere atención. Algunos solventes pueden presentar actividad inhibitoria para la acción de las celulasas, requiriendo su retirada del medio y aumentando el coste del proceso, ya que los métodos de recuperación aún no están completamente desarrollados. Además, son necesarias técnicas que permitan recuperar la hemicelulosa y la lignina después de la extracción de la celulosa (Alvira et al., 2010; Hayes, 2009).



**d) Ozonolisis:** El ozono es uno de los más fuertes agentes oxidantes conocidos, con un  $E^0 = 2.07 \text{ V}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Por su estructura proporciona una descompensación electrónica en el oxígeno terminal, hay una preferencia por atacar la lignina que los carbohidratos en virtud de ser un sustrato rico en electrones. En general las condiciones del pretratamiento no exigen aportación de temperatura o presión, y tampoco lleva a la producción de compuestos de inhibición para las etapas posteriores. Un importante punto a ser llevado en consideración es el elevado precio del ozono y las grandes cantidades exigidas para el pretratamiento, que puede hacer el proceso económicamente inviable (Alvira et al., 2010; Travaini et al., 2016). La Tabla 3 resume las principales características de la ozonolisis.

**Tabla 3. Principales ventajas y desventajas de la ozonólisis.** Fuente: adaptado de Travaini et al. (2016).

Ventajas	Desventajas
Baja producción de inhibidores	Altamente reactivo, inflamable, corrosivo y tóxico
Ataque selectivo en la lignina, sin afectar la celulosa y la hemicelulosa	Produce una reacción exotérmica, necesitando un sistema de refrigeración
Reacción en temperatura y presión ambientes	Necesidad de materiales capaces de resistir a la capacidad oxidativa del ozono
Subproductos de la ozonolisis son metabolizados por animales y microorganismos	Altos costes de producción del ozono en función de la energía requerida para su síntesis
No requiere aditivos químicos	
Ausencia de fase líquida	

**e) Deslignificación oxidativa:** se trata de la degradación de la lignina a través de una enzima denominada peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno. El peróxido forma radicales hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) que desestructura la materia lignocelulósica, liberando una fracción celulósica con alto potencial de degradación por parte de las enzimas. Todavía, el radical hidroxilo no es selectivo, pudiendo ocurrir pérdidas de hemicelulosa y celulosa y la formación de compuestos inhibidores (Zheng et al., 2014).

**f) Proceso Organosolvólisis:** En este proceso son utilizados solventes orgánicos, como metanol, etanol, acetona, glicerol (Ebrahimi et al., 2017), y otros más, a altas presiones y elevadas temperaturas por un determinado tiempo con la principal característica de solubilizar la lignina y proporcionar una celulosa que sea fácilmente hidrolizada por el complejo enzimático. En otras palabras, ocurre una rotura interna de los enlaces entre lignina y hemicelulosa, separando la biomasa en sus tres componentes básicos, ocurriendo primero una descomposición en fragmentos de menor peso molecular de la lignina y hemicelulosa, que son solubilizados por la disolución presente, separando la celulosa que está apta para la etapa de hidrólisis. En un segundo momento, ocurre la precipitación de la lignina en un estado más puro y de xilosa, que pueden servir para un abanico de aplicaciones industriales. Durante el proceso de organosolvólisis, es común el empleo de sustancias ácidas que actúan como catalizadores, acelerando la eliminación de la lignina

por la rotura de enlaces más débiles a la acción ácida, como son los  $\alpha$ -aril éter y arilglicerol- $\beta$ -aril éter, y reduciendo la temperatura del proceso, que pueden llegar hasta los 240 °C (Nurfahmi et al., 2016; Zhang et al., 2016). La Figura 18 muestra un posible esquema de laboratorio para la organosolvólisis.

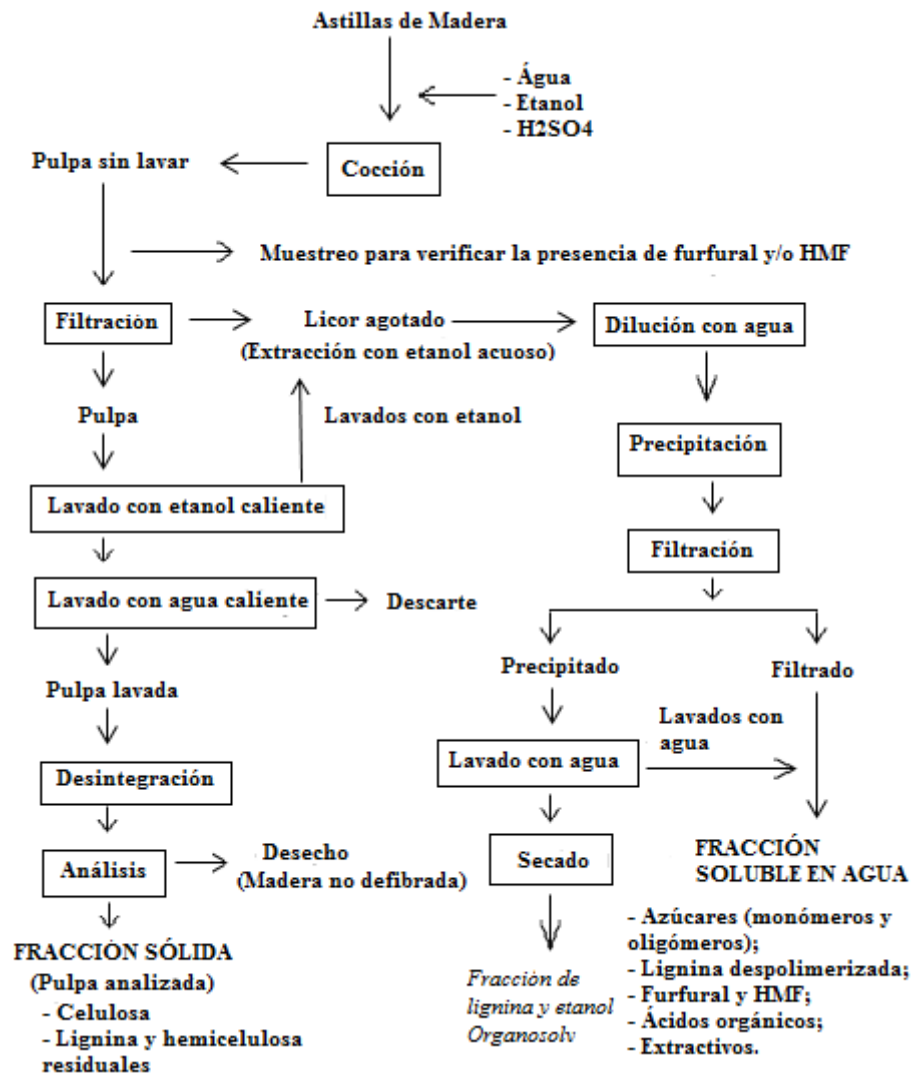


Figura 18. Esquema del proceso *Organosolv* en escala de laboratorio. Fuente: adaptado de Kumar et al. (2009a) y Pan et al. (2005b).

#### 4.1.1.4 Pretratamientos Físico-Químicos

**a) Explosión por Vapor:** la explosión por vapor es, sin duda, el pretratamiento físico-químico más ampliamente utilizado para la descomposición de la biomasa lignocelulósica. La biomasa es sometida a vapor presurizado que puede variar entre 0.69 a 4.83 MPa a temperaturas entre 160°C y 260°C, durante un período de tiempo que puede variar desde algunos segundos hasta varios minutos, seguida de una rápida despresurización. Esto produce efectos mecánicos por la rotura de la fibra lignocelulósica y también efectos químicos debido a la autohidrólisis de grupos acetilo presentes en la hemicelulosa, ya que el agua puede actuar como un ácido a altas temperaturas. Además, las condiciones empleadas pueden producir una eliminación de hemicelulosas de la fracción sólida del material, redistribución y eliminación parcial de lignina y destrucción de los enlaces



hidrógeno y reordenación de la estructura interna de la celulosa, aumentando su área superficial para el ataque enzimático (Melin et al., 2015; Cheng et al., 2015; Huang et al., 2015; Carrere et al., 2016; Seidl et al., 2016).

Los principales factores que están relacionados con la efectividad de la explosión por vapor son el tamaño de partícula, tiempo de residencia del material, temperatura y una combinación entre tiempo y temperatura denominado como factor de severidad ( $R_0$ , en las siglas en inglés), que se expresa según la Ecuación 1, donde  $t$  es el tiempo y  $T$  la temperatura. El  $R_0$  determina un máximo rendimiento en azúcares fermentables cuando está comprendido entre 3,0 y 4,5 (Alvira et al., 2010; Bhutto et al., 2017).

$$FS = t * e^{[T-100/14.75]} \quad (1)$$

Yu et al. (2012) propusieron un nuevo parámetro para indicar la severidad de la “fase explosión” ya que el  $R_0$  no lleva en cuenta este aspecto. Basados en la diferencia de entalpia del vapor ( $\Delta H_S$ ), del agua líquida ( $\Delta H_l$ ) y del material ( $\Delta H_m$ ), desarrollaron lo que viene siendo la Densidad de Potencia de Explosión (EPD, en las siglas en inglés), que expresa la Ecuación 2, donde  $t$  representa la duración de la explosión y  $V$  el volumen del reactor.

$$EPD = (\Delta H_S + \Delta H_l + \Delta H_m)/(t * V) \quad (2)$$

En comparación con las demás tecnologías, la explosión a vapor tiene un impacto ambiental significativamente menor, no requiere una inversión inicial de capital tan elevada, no utiliza productos químicos o condiciones de reacción peligrosas, puede haber una recuperación prácticamente completa de azúcares de la materia prima, producción de altos rendimientos en la hidrólisis enzimática y la viabilidad a escala industrial (Rabemanolontsoa y Saka, 2016; Chen et al., 2017).

Los principales problemas asociados al pretratamiento de explosión por vapor son la degradación parcial de hemicelulosa y la producción de compuestos tóxicos. La presencia de dichos compuestos depende de la agresividad del pretratamiento y de la materia prima utilizada. Los principales productos de inhibición generados son compuestos furánicos, principalmente furfural y 5-Hidroximetilfurfural, derivados de la degradación de pentosas y hexosas, respectivamente; ácidos débiles, como el ácido acético (originado de los grupos acetilo de la hemicelulosa), fórmico y levulínico, por la posterior degradación del furfural y 5-Hidroximetilfurfural; y compuestos fenólicos, presentes como resultado de la degradación de la lignina (Alvira et al., 2010).

**b) Agua caliente a presión o Liquid Hot Water (LHW):** en este proceso las alteraciones en la estructura de la biomasa lignocelulósica son provocadas por los iones  $H_3O^+$  generadas por la disociación del agua en estado líquido a altas temperaturas (160-240 °C) mantenida gracias a la acción de la presión. El principal objetivo es solubilizar la hemicelulosa y tornar la celulosa más accesible a la acción enzimática. En el LHW hay la formación del *slurry*, una mezcla entre fase sólida y líquida, que puede ser separada por filtración, en donde la fracción sólida es rica en celulosa y la líquida rica en azúcares hemicelulósicos. La formación de inhibidores es más baja cuando el pH se mantiene entre 4 y 7 pues en este rango los azúcares hemicelulósicos se mantienen en la forma oligomérica, minimizando la formación de monómeros (Zhuang et al., 2016; Peral et al., 2016).



Como principales ventajas, el LHW no requiere la adición de catalizador, los costes del reactor no son elevados, y presenta una elevada recuperación de pentosas con baja formación de compuestos indeseables. En contrapartida, la demanda de agua y energía es elevada y aún no se encuentra disponible a escala comercial (Alvira et al., 2010).

**c) Proceso AFEX:** el proceso AFEX (del inglés *Ammonia Fiber Explosion*, o explosión por vapor con amonio) utiliza como reactivo disoluciones o soluciones concentradas de amoníaco para tratar la biomasa a temperaturas moderadas (90-100 °C) por un período entre 30 a 60 minutos seguido de una ligera descompresión, haciendo con que la biomasa se expanda. Otras condiciones típicas del proceso son el contenido en humedad entre 60-80% y proporción de amonio y biomasa seca de 1:1 (Kim et al., 2011; Merrettig-Brunns y Sayder, 2016).

Para producir efectos, el amoníaco penetra en la pared celular hasta el lumen y la laminilla media. Conjuntamente con el agua, una serie de reacciones hidrolíticas rompen distintos enlaces tipo éster como p-cumaratos, ferulados y diferulados, entre la lignina y hemicelulosa, solubilizando y eliminando oligómeros de hemicelulosa y otros componentes presentes en la pared celular externa. Al final del pretratamiento, la descompresión expansiva del amoníaco provoca la formación de grandes poros en la laminilla central y en las paredes externas de las células secundarias, facilitando el acceso al material (Chundawat et al., 2011).

Los principales factores que intervienen en este pretratamiento son la temperatura, carga de agua, tiempo y presión. Una de las características que diferencian el proceso AFEX es que la biomasa pretratada es fácilmente hidrolizable y fermentable sin necesidad de detoxificación o suplementación de nutrientes externos. Además, no provoca degradación de azúcares y cerca del 97% del amoníaco se puede recuperar y ser reutilizado para posteriores pretratamientos, lo que es bastante atractivo. Todavía, hay algunos obstáculos que aún necesitan ser estudiados, como las grandes cantidades de amonio necesarias para el pretratamiento, que llevan a preocupaciones ambientales, y necesidad de pruebas a nivel industrial (Zabed et al., 2017; Jahnavi et al., 2017).

**d) Oxidación Húmeda:** es un método de pretratamiento que utiliza aire u oxígeno como catalizadores, teniendo como principales condiciones tiempo entre 10 y 15 minutos, presiones de 0,5 a 5 MPa y temperaturas entre 125 a 315 °C con el objetivo de hacer que el proceso sea exotérmico y se reduzcan aportaciones de energía. La solubilización de las hemicelulosas y lignina y el aumento en la facilidad de digestión de la celulosa en las etapas posteriores, son los principales efectos de la oxidación húmeda conseguidos gracias a procesos hidrolíticos y reacciones oxidativas formadas en las condiciones ya citadas.

En general, no ocurre una formación considerable de productos tóxicos para las etapas siguientes de producción de etanol, siendo formados principalmente por ácidos carboxílicos derivados de la degradación de compuestos fenólicos, furfural y HMF, estando estos dos últimos presentes en menores concentraciones que en la explosión por vapor o LHW. La adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al proceso reduce aún más la formación de productos inhibidores y aumenta el rendimiento de recuperación de celulosa y azúcares hemicelulósicos. Los principales impases relacionados con esta tecnología están



relacionados al alto coste del oxígeno y requerimiento de altas presiones y temperaturas (Alvira et al., 2010; Zabed et al., 2017; Arvaniti et al., 2012).

**e) Explosión con CO<sub>2</sub>:** este método se basa en la utilización de CO<sub>2</sub> supercrítico, siendo capaz de remover la lignina y aumentar la digestibilidad del sustrato que puede ser aún más efectivo con la adición de algunos solventes como el etanol. Las moléculas de CO<sub>2</sub> son comparables en tamaño a las moléculas de agua y amonio y pueden penetrar en los poros del material lignocelulósico, facilitando la disrupción de la hemicelulosa y celulosa a través de la inyección de presión al medio, aumentando el área disponible para la hidrólisis enzimática (Carneiro y Timko, 2016).

Como principales ventajas del proceso, se pueden citar la baja degradación de azúcares, su no-toxicidad y no-inflamabilidad y fácil recuperación al final del proceso. Ya el principal desafío se centra en los altos costes de los equipos (Zabed et al., 2017).

#### 4.1.1.5 Pretratamientos Combinados

Estos pretratamientos buscan agregar dos o más tipos de pretratamientos abarcados anteriormente con el fin de producir una mayor efectividad en la descomposición de la biomasa al sobreponer las desventajas uno del otro. De acuerdo con Hendriks y Zeeman (2009), los principales pretratamientos combinados pueden ser:

**a) Tratamiento térmico en combinación con el pretratamiento ácido:** se trata de la adición de un ácido externo a un pretratamiento que tiene como característica principal las altas temperaturas, como explosión por vapor o LHW. A pesar de no tener un mecanismo esclarecido, el ácido puede traer ventajas como una solubilización más eficaz de la hemicelulosa, disminución de la temperatura del proceso y facilitación de la posterior hidrólisis enzimática del material; o también puede provocar una reorientación de la celulosa pasando a ser más cristalina, o incluso la producción de compuestos inhibidores al proceso de fermentación, siendo esto básicamente dependiente de su concentración, tiempo y temperaturas empleadas en el proceso.

**b) Tratamiento térmico en combinación con el pretratamiento básico:** este método trata de la adición de una base a pretratamientos característicamente térmicos, siendo el Ca(OH)<sub>2</sub> la base más utilizada por razón de sus bajos costes y posible recuperación en la forma de carbonato de calcio a través de la reacción con el CO<sub>2</sub>. En este pretratamiento combinado, se suelen alcanzar temperaturas entre 100 a 150°C y utilizar aproximadamente 0,1 gramos de Ca(OH)<sub>2</sub> por cada gramo de sustrato. Según Kaar y Hotzapple (2000) la combinación del calor y una base es capaz de tornar biomasa con bajo contenido en lignina más susceptibles a la digestión y facilitar la etapa de hidrólisis, siendo esta efectividad explicada por la apertura total de la “válvula de acetilo” y parcial de la “válvula de lignina”, que es capaz de desestructurar más fácilmente el material lignocelulósico. Todavía, este pretratamiento aún no se ha mostrado eficaz para biomasa con alto contenido en lignina.

**c) Tratamiento térmico en combinación con el pretratamiento básico y oxidativo:** para resolver el problema de las biomasa con alto contenido en lignina, este pretratamiento triple ha resultado efectivo en facilitar la digestión de la biomasa por las enzimas hasta 13 veces más comparado con una biomasa sin recibir ningún pretratamiento. Además,



algunos estudios fueron capaces de recuperar hasta 21% del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , mejorando el rendimiento del proceso.

**d) Ultrasonido en combinación con pretratamiento básico:** reportado apenas recientemente (a partir de 2014), la idea es unir la capacidad de rompimiento de los enlaces éter de la lignina y hemicelulosa, facilitando su eliminación, por parte del pretratamiento básico, y la cavitación y transmisión acústica en la biomasa de las ondas ultrasónicas, que reduce el tamaño de partícula y mejora la velocidad de sacarificación enzimática (Soontornchaiboon et al., 2016; Sindhu et al., 2017).

Un resumen de los principales pretratamientos combinados puede ser visualizado en la Tabla 4.

**Tabla 4. Resumen de los principales pretratamientos combinados.** Fuente: adaptado de Hendriks y Zeeman, (2009).

Pretratamiento Combinado	Aumento del área superficial	Reducción cristalinidad celulosa	Solubilización de la hemicelulosa	HMF/ Furfural	Alteración de la estructura de la lignina
Térmico + Ácido	+	ND	+	+	+
Térmico + Alcalino	+	ND	-	-	+
Térmico + Oxidativo	+	ND	-	-	+
Térmico + Alcalino + Oxidativo	+	ND	-	-	+

Nota: +: indica una actuación efectiva;  
- : indica que no posee efecto;  
ND: no determinado.

Un resumen sobre las ventajas y desventajas más importantes de los principales pretratamientos se muestra en la Tabla 5.

## 5. Hidrólisis De Los Polisacáridos

El proceso de hidrólisis es necesario para la conversión de los carbohidratos en forma polimérica, como el almidón, la celulosa y la hemicelulosa, en azúcares fermentables, ya que los microorganismos utilizados no son capaces de utilizar como sustrato carbohidratos en su forma más compleja (Liu et al., 2016).

La hemicelulosa y la celulosa necesitan pasar por un proceso de conversión a azúcares fermentables a través de un proceso denominado hidrólisis. En general, son producidas dos distintas corrientes después del proceso de pretratamiento: una sólida, que contiene principalmente lignina y celulosa; y una líquida, que contiene principalmente los azúcares de la hemicelulosa. Esta corriente líquida puede ser compuesta de azúcares ya monoméricos, listos para el proceso fermentativo, o necesitar todavía de un proceso de hidrólisis si las condiciones de pretratamiento no fueron capaces de producir una completa despolimerización. Por otro lado, la fracción de celulosa no se convierte en azúcares más simples y necesita ser sometida al proceso de hidrólisis (Zabed et al., 2017).

En general, la hidrólisis puede ser realizada a través de una ruta enzimática o con el uso de compuestos ácidos, que serán descritas en seguida.



**Tabla 5. Resumen de los principales pretratamientos.** Fuente: adaptado de Kumar et al. (2009b)

Pretratamiento	Ventajas	Limitaciones y desventajas
<b>Mecánico</b>	Reduce la cristalinidad de la celulosa	Alto consumo energético
<b>Explosión por vapor</b>	- Buena relación coste-beneficio; - Transformación de la lignina	- Separación incompleta de la fracción lignina-carbohidrato; - Ineficiente para materias primas con alto contenido en lignina; - Generación de compuestos inhibidores para la fermentación; - Degradación de parte de las pentosas.
<b>AFEX</b>	- Aumento del área disponible; - No produce compuestos inhibidores para los microorganismos fermentadores; - Eliminación de lignina y hemicelulosa.	No es eficiente para materias-primas con alto contenido en lignina
<b>Explosión por CO<sub>2</sub></b>	- Aumento del área disponible; - Buena relación coste/beneficio; - No produce compuestos inhibidores para los microorganismos fermentativos	No modifica la estructura de la lignina ni de la hemicelulosa
<b>Ozonólisis</b>	- Reduce el contenido de lignina; - No produce compuestos inhibidores.	- Altos costes involucrados; - Largas cantidades de ozono requeridas.
<b>Ácidos</b>	- Altera la estructura de la lignina; - Hidroliza la hemicelulosa a azúcares más simples.	- Formación de compuestos inhibidores; - Altos costes involucrados; - Corrosión de equipos.
<b>Básicos</b>	Eliminación de la hemicelulosa y lignina; - Aumento del área superficial.	- Formación de sales que se incorporan en la materia prima; - Extensos tiempos de contacto.
<b>Organosolvente</b>	Hidroliza la lignina y las hemicelulosas.	Necesidad de eliminación del solvente del reactor y altos costes para recuperarlo;
<b>Biológico</b>	- Degradación de la lignina y hemicelulosa; - Baja demanda energética.	- Largos tiempos de residencia; - Necesidad de amplios espacios y monitorización frecuente.

## 5.1 Hidrólisis Ácida

Tratamiento químico mediante el uso de catalizadores ácidos que conviertan las largas cadenas de polisacáridos en monómeros utilizables por los microorganismos fermentadores. Se puede realizar de dos formas, con ácido diluido o con ácido concentrado. El principal ácido utilizado es el sulfúrico, aunque el ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico y el trifluoroacético también han sido probados con buenos resultados.

El uso del ácido diluido está enfocado en la hidrólisis de la hemicelulosa, ya que ésta posee una estructura más amorfa que la celulosa. Todavía, a través de un proceso realizado en dos etapas es posible la hidrólisis de ambos polímeros. La primera etapa se realizaría a bajas temperaturas actuando sobre la hemicelulosa, mientras en la etapa siguiente se elevaría la temperatura entre 230 °C y 240 °C para la producción de glucosa a partir de la celulosa. En los procesos realizados con ácido diluido, la concentración del ácido está entre 0,5 y 1,5% generalmente (Keshav et al., 2016; Jiang et al., 2015).

El ácido concentrado por su vez puede realizar la conversión de la celulosa y la hemicelulosa a la vez, realizándose a temperaturas menores pero a mayores tiempos de reacción, con la concentración del agente ácido variando del 41% a 100%. A pesar de ofrecer una rápida y eficaz conversión a azúcares monoméricos a bajas temperaturas de operación, tiene como principales inconvenientes la producción de compuestos de inhibición a la fermentación y exigencia de equipos que soporten la corrosión (Wijaya et al., 2014).

## 5.2 Hidrólisis Enzimática

Las enzimas son capaces de hidrolizar tanto la celulosa cuanto la hemicelulosa en azúcares fermentables a través del complejo enzimático de celulasas y hemicelulasas (o xilanasas), respectivamente. Las condiciones de esta hidrólisis se realizan en condiciones más suaves, con temperaturas entre 45 y 50 °C, y no presentan problemas de corrosión a los equipos. Además, no ocurren problemas de degradación de azúcares ni tampoco generación de compuestos tóxicos o inhibidores (Zabed et al., 2017).

Las celulasas son un complejo enzimático compuesto típicamente por endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasa. Las fibras de celulosa son primeramente escindidas por la endoglucanasa, que libera pequeños fragmentos compuestos de extremos reductores y no-reductores, que por su vez son atacados por las exoglucanasas. Éstas, al interactuar con estos extremos, liberan un conjunto de oligosacáridos denominados celobiosa, que es transformada en glucosa a través de la acción de la  $\beta$ -glucosidasa, siendo esta enzima la limitante de la velocidad de la hidrólisis (Singhania et al., 2013).

Un esquema ilustrativo de la transformación de la celulosa en glucosa a través de la acción de las celulasas puede ser visto desde las Figuras 19 hasta la 24. La endoglucanasa inicia la hidrólisis de la región amorfa de la celulosa uniendo el enlace  $\beta$ -1,4 de la celulosa con “n” moléculas de agua, formando “n” moléculas de celodextrina, como puede ser visto en las Figuras 19 y 20.

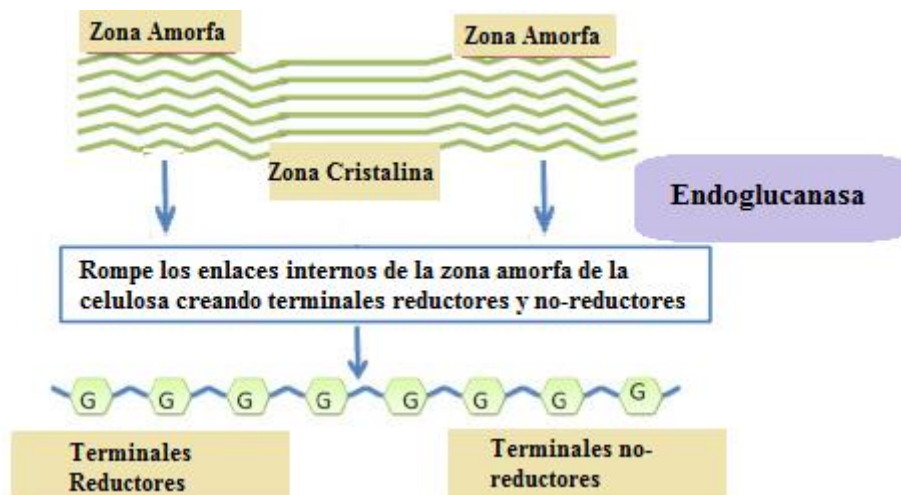


Figura 19. Actuación de las endoglucanasas. Fuente: Gupta y Verma, 2015.

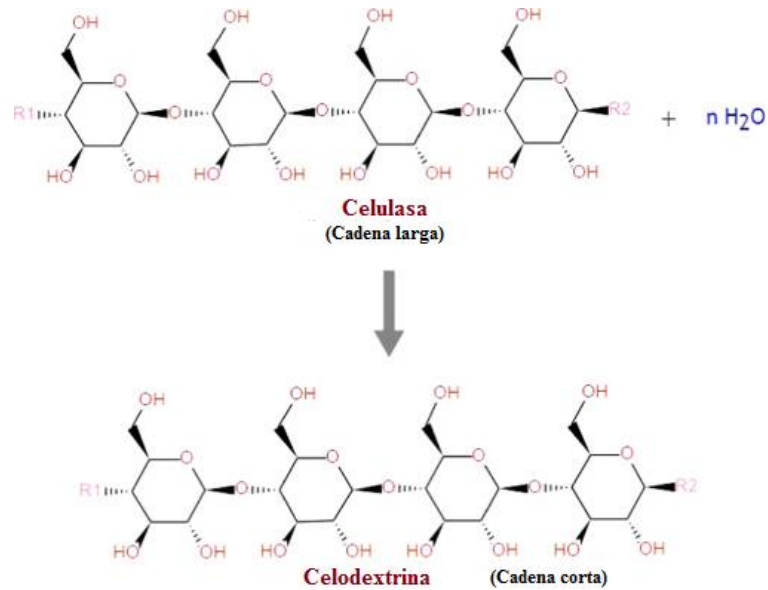


Figura 20. Transformación de la celulosa en celodextrina a través de la acción de la endoglucanasa.  
Fuente: Aditiya et al. (2016).

En esta transformación, ocurren la formación de extremos reductores y no reductores en los cuales actúa la exoglucanasa, que a través de 1,4-β-D glucano celobiohidrolasa transforma la celodextrina reductora y no-reductora en dos unidades de celobiosa, conforme muestran las Figuras 21 y 22.

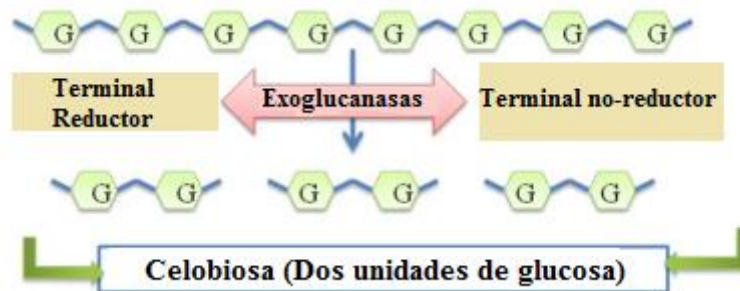


Figura 21. Modo de acción de las exoglucanases. Fuente: Gupta y Verma, 2015.



Figura 22. Producción de unidades de celobiosa por la acción de la enzima exoglucanasa. Fuente: adaptado de Aditiya et al. (2016).

Como el azúcar a ser procesado por los microorganismos fermentativos tiene que estar en una forma más simple, la β-glucosidasa ataca la celobiosa y produce glucosas como monómeros de azúcar, conforme ilustran las Figuras 23 y 24.

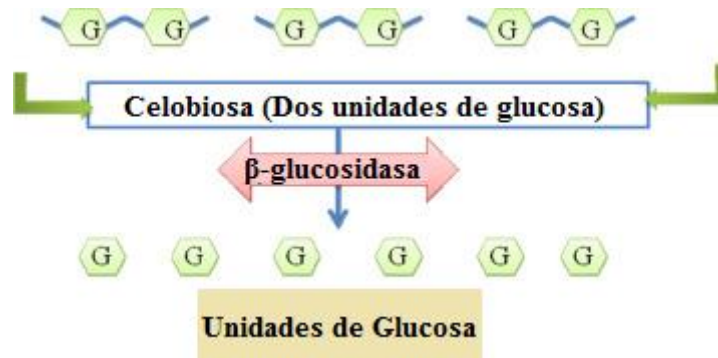


Figura 23. Modo de acción de la  $\beta$ -Glucosidasa. Fuente: Gupta y Verma, 2015.

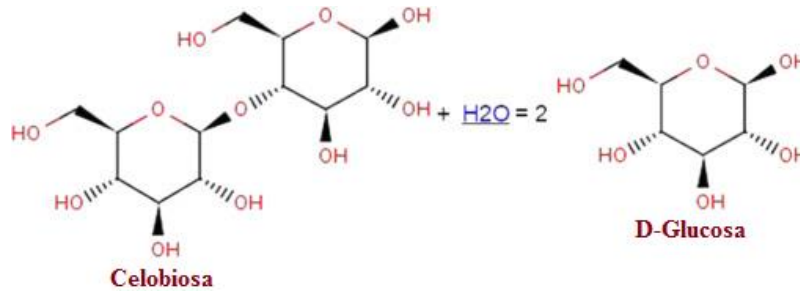


Figura 24. Producción de dos unidades de D-glucosa a partir de la celobiosa. Fuente: adaptado de Aditiya et al. (2016).

Las enzimas que actúan sobre la estructura de la hemicelulosa son más complejas que las celulasas, pero son más específicas en modo de acción. El principal componente de la hemicelulosa es el xilano, un polisacárido compuesto de unidades repetidas de xilosa, que, dependiendo del tipo de material, puede representar hasta el 35% de la hemicelulosa. Las xilanasas son el conjunto enzimático que lleva a cabo las transformaciones de la cadena principal del xilano, siendo constituida por la endo- $\beta$ -1,4-xilanasas y  $\beta$ -xilosidasas. La endo- $\beta$ -1,4-xilanasas es la que realiza el primer ataque, transformando el xilano en cadenas más cortas denominadas oligosacáridos de xilano, como es mostrado en la Figura 25.

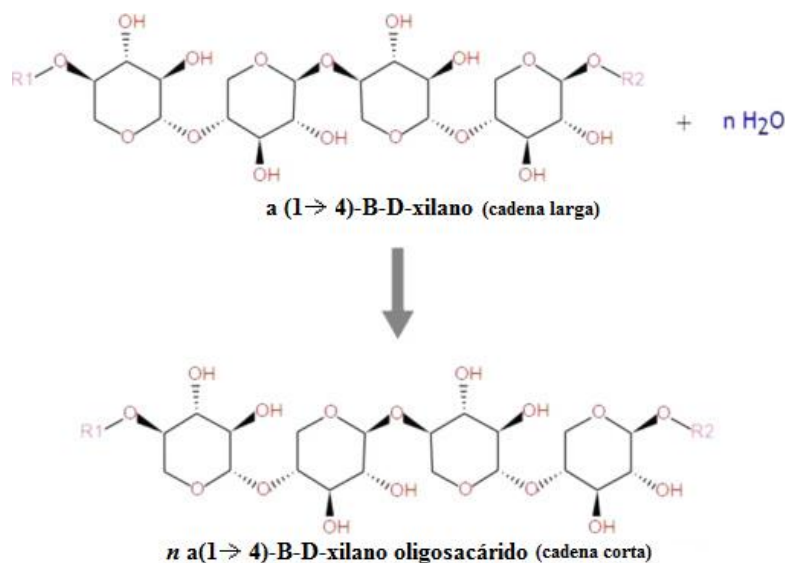


Figura 25. Fraccionamiento de la cadena hemicelulósica en "n" unidades de oligosacáridos de  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-xilano. Fuente: adaptado de Aditiya et al. (2016).

La secuencia del proceso ocurre con la enzima  $\beta$ -xilosidasa, responsable por la conversión de los oligosacáridos de xilano en unidades de B-D-xilanopiranosas, como está representada en la Figura 26. Hay también otro conjunto de enzimas responsable por actuar sobre las cadenas exteriores del xilano, denominadas enzimas xilanolíticas accesorias. Estas incluyen la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -glucuronidasa y la acetilxilan esterasa (Zabed et al., 2017; Aditiya et al., 2016).

Es importante decir que la presencia de lignina en el medio hidrolítico produce una menor calidad en la hidrólisis enzimática, una vez que es resistente al ataque de las celulasas y tiende a precipitar en presencia de proteína. Por lo tanto, su eliminación debe ser máxima para permitir un ataque más eficaz sobre la celulosa (Lu et al., 2002).

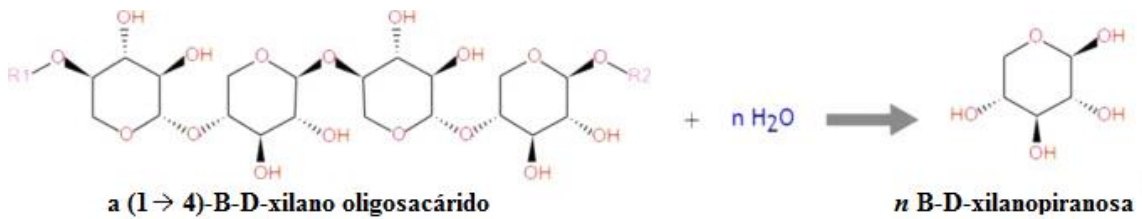


Figura 26. Formación de la  $\beta$ -D-xilanopiranosas a partir de la enzima  $\beta$ -xilosidasa. Fuente: adaptado de Aditiya et al. (2016).

Otro aspecto muy importante a destacar es que una posible unión enzimática que trabaje de forma sinérgica en ambos polímeros a la vez no se torna posible en función de los productos derivados de la hidrólisis de la hemicelulosa, incluyendo xilosa, oligosacáridos de xilosa, galactosa y manosa, actúan como fuertes inhibidores de las celulasas. Así, es preferible optar por un tratamiento por separado, de modo que conocer la composición de la materia prima es crucial para definir la mejor ruta hasta la producción del bioetanol (Aditiya et al., 2016).

### 5.3 Hidrolisis enzimática a altas cargas de sólidos

Un enfoque más reciente buscando traer una mayor rentabilidad económica a la cadena del bioetanol de segunda generación es la conducción de la hidrólisis enzimática operada a altas cargas de sólido, que tiene como principal característica una mayor conversión a azúcares y mayor producción de etanol. Para ser considerado un proceso a altas cargas de sólido, la presencia de agua libre en el medio debe ser nula o muy baja, o tener presente una carga de sólido mayor o igual a 15% p/p (Hodge et al., 2009).

Para que el proceso de destilación sea económicamente viable, la concentración de etanol en el medio debe ser igual o superior a 4% p/p, que es conseguida cuando la concentración de glucosa es de al menos 8% p/p, que a la vez es conseguida con una carga lignocelulósica mayor o igual al 20% p/p. Este raciocinio solo lleva en cuenta la conversión de la celulosa, de manera que esta cantidad inicial de sólidos es menor cuando el aprovechamiento de los azúcares hemicelulósicos es llevado a cabo, notándose la importancia de un proceso que sea capaz de trabajar con ambos polímeros (Modenbach y Nokes, 2013; Larsen et al., 2008).

Una de las principales ventajas en la utilización de altas cargas de sólidos es el menor tiempo de hidrólisis dada la mayor carga enzimática presente, una vez que se tarda



aproximadamente 72 horas en los procesos que operan a cargas normales para alcanzar una concentración de azúcares viable. Otras potenciales ventajas estarían en la reducción del número de reactores que podría por consecuencia bajar la demanda energética como un todo, y la menor requisición de agua que viene a reducir problemas relacionados a eliminación de desechos (Modenbach y Nokes, 2013; Banerjee et al., 2010).

Todavía, hay muchos problemas relacionados con el uso de esta tecnología. En la práctica, no ocurre una relación lineal entre el aumento en la carga del sólido y un aumento en el rendimiento del proceso, por muchas razones aún no totalmente explicadas por la comunidad científica. Este fenómeno fue acuñado por Kristensen et al. (2009) como “efecto de sólidos”, y algunas teorías apuntan por el contenido en agua e inhibición por producto, por ejemplo. Además, a pesar de la reducción de los costes en la producción de enzimas, esto sigue siendo un factor limitante ya que aún representa una de las etapas más caras en el proceso de producción del bioetanol de segunda generación.

#### 5.4 Factores limitantes de la hidrólisis

El pretratamiento es una etapa crítica para tener una disponibilidad de azúcares que puedan ser procesados por el conjunto enzimático, como glucanos y xilanos, teniendo, tanto la etapa de pretratamiento como la de hidrólisis, una relación muy estrecha (Kumar et al., 2009a; Alvira et al., 2010).

Hay dos principales grupos de factores que pueden interferir en la hidrólisis enzimática, que son los relacionados con la enzima y los relacionados con el sustrato. Los derivados de la enzima están relacionados con la importancia del desarrollo de celulasas, hemicelulasas y otros co-factores capaces de procesar los componentes lignocelulósicos proveniente de ambas fracciones líquida y sólida del pretratamiento, mientras el relacionado al sustrato está directamente conectado al pretratamiento adoptado, siendo los principales (Alvira et al., 2010):

**a) Índice de Cristalinidad de la celulosa:** La cristalinidad, en un polímero como la celulosa, se refiere al grado de empaquetamiento de moléculas para producir una disposición atómica ordenada. El índice de cristalinidad puede ser calculado a partir de la ecuación (Lucyszyn et al., 2016):

$$\text{Índice de Cristalinidad (\%)} = \left( \frac{\text{Área Cristalina}}{(\text{Área Cristalina} + \text{Área amorfa})} \right) * 100$$

Se ha demostrado, en algunos casos, que determinados pretratamientos pueden por un lado facilitar la disposición de las fracciones del material lignocelulósico, pero pueden por otro aumentar el índice de cristalinidad de la fracción celulósica en razón de la retirada apenas de la región amorfa de la celulosa, como puede ocurrir con la explosión por vapor. Pretratamientos básicos, por su lado, parecen reducir este índice en la mayoría de los casos (Kumar et al., 2009a).

**b) Grado de polimerización de la celulosa (DP):** es el número de unidades de anhidro glucopiranosas presentes en la cadena de la celulosa, de manera que la ruptura de los enlaces glicosídicos provoca una reducción del DP. Conjuntamente con el índice de



cristalinidad, son considerados factores clave para determinar la velocidad de la hidrólisis a partir de sustratos celulósicos (Chang y Holtzapfle, 2000).

La reducción del DP dentro de la hidrólisis enzimática ocurre primeramente con las endoglucanasas, que actúan a través de roturas al azar en la cadena glucosídica, produciendo glucosa, celobiosa y celotriosa, llegando todavía a un nivel de constancia en el DP relacionado a un aumento de la cristalinidad de la celulosa por esta enzima no actuar de manera significativa sobre la celulosa cristalina (Barreto, 2008; Mansfield et al., 1999).

**c) Volumen de poros:** uno de los principales objetivos del pretratamiento es aumentar el área disponible para que el complejo enzimático pueda actuar sobre la celulosa, siendo este uno de los principales factores que influencia el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

**d) Presencia de Lignina:** la lignina actúa como una barrera física dificultando el acceso al material celulósico por parte de las enzimas, reduciendo el rendimiento de la hidrólisis. Dependiendo del pretratamiento utilizado, puede ocurrir una reagrupación o repolimerización de la lignina, o incluso la rotura de los enlaces lignina-carbohidratos (Laureano-Pérez et al., 2005).

En algunos casos, la presencia de lignina puede inhibir la acción del complejo enzimático al provocar un enlazamiento entre su estructura y las celulasas, en donde las enzimas xilanolíticas y la beta-glucosidasa se ven menos afectadas. La adición de compuestos como proteínas, polietilenglicol, tween, entre otros, han sido estudiados y parecen resultar efectivos contra este fenómeno (Esteghlalian et al., 2001; Pan et al., 2005a; Borjesson et al., 2007; Berlin et al., 2006).

**e) Contenido en Hemicelulosa:** la eliminación de la hemicelulosa aumenta el tamaño de los poros y facilita la hidrólisis de la celulosa.

**f) Espesor de la pared celular:** algunas materias primas presentan una barrera cerosa que, incluso cuando sometido a proceso de molienda, impiden la penetración de enzimas y de líquidos debido a su naturaleza.

## **6. Generación y tratamiento de compuestos inhibidores**

La descomposición del material lignocelulósico para la obtención de los principales componentes biomásicos a través de pretratamientos hidrotérmicos y la formación de oligosacáridos a través de procesos de hidrólisis ácida inducen a la producción de algunos componentes que pueden afectar negativamente el proceso fermentativo o incluso la hidrólisis cuando realizada a través de enzimas. Estos componentes, llamados inhibidores, necesitan ser eliminados parcial o totalmente del material hidrolizado, a través de procesos de detoxificación. La naturaleza y la concentración de los inhibidores van a depender de la materia prima, tipo de pretratamiento, empleo o no de catalizadores ácidos y condiciones del proceso (Romero-García, 2016). La Figura 27 trae un esquema de la generación de los inhibidores.

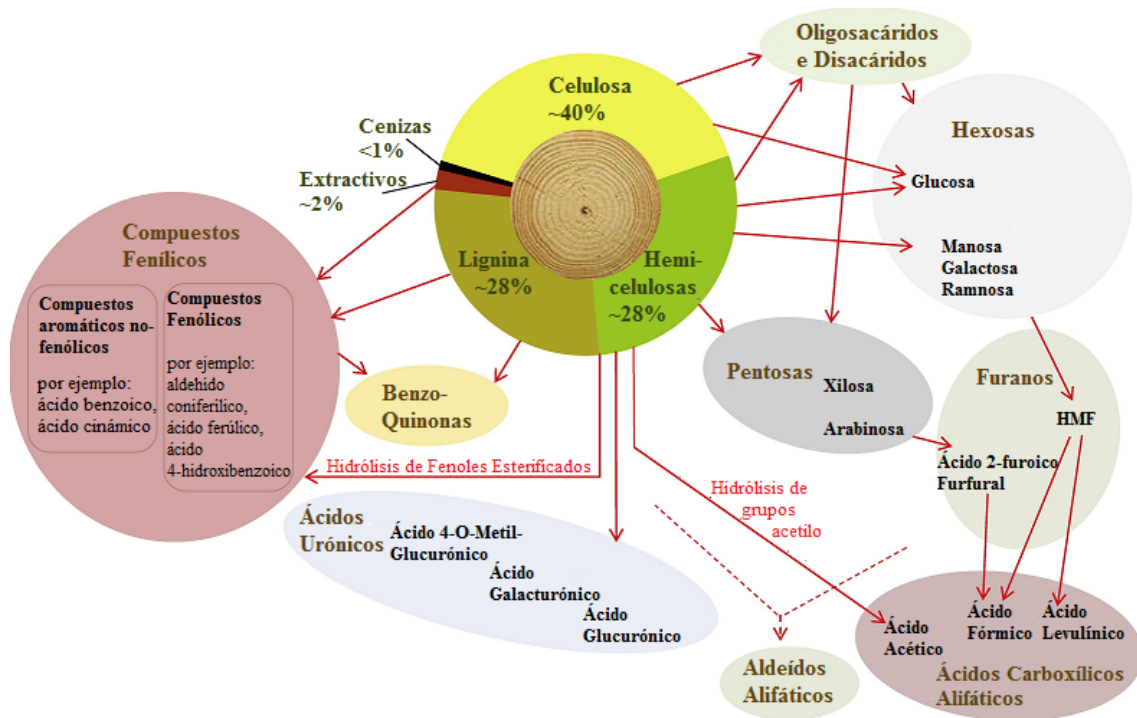


Figura 27. Resumen de los compuestos inhibidores producidos durante el pretratamiento. Fuente: adaptado de Jonsson y Martín (2016).

## 6.1 Tipos de compuestos inhibidores

De acuerdo con Ko et al. (2015a), los compuestos inhibidores presentes en el *slurry* generado en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica pueden ser clasificados en cinco categorías, que serán revisadas en seguida: lignina, compuestos fenólicos solubles, aldehídos de furano, azúcares y ácidos débiles. Canilha et al. (2012) también agrega un grupo más de compuestos inhibidores relativos a los metales desprendidos de la corrosión del equipamiento, como cromo, cobre, hierro y el níquel, y Jonson et al. (2013) citan elementos inorgánicos como otra categoría importante. La Figura 28 ilustra cuales son, de entre estos, los principales inhibidores de las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación.

**a) Lignina:** después de la realización de pretratamientos hidrotérmicos como LHW, explosión por vapor o el empleo de ácidos diluidos, es común que la lignina permanezca en la fracción sólida del material, incluso presentando un aumento de su presencia conforme más severo sea el pretratamiento. Esta lignina puede provocar la formación de barreras físicas y de enlaces llamados *no-productivos* con las celulasas que impiden que la hidrólisis enzimática ocurra de manera satisfactoria. La intensidad de estos enlaces puede variar conforme el tipo y severidad del pretratamiento y de acuerdo con la materia prima empleada, siendo en general más fuertes en las maderas blandas que maderas duras o residuos agrícolas. Eso puede ser explicado por la estructura más condensada e hidrófoba de la lignina de las maderas blandas, que da lugar a interacciones más consistentes con la celulosa e induce una mayor inhibición a la hidrólisis enzimática (Ko et al., 2015a; y Ko et al., 2015b).

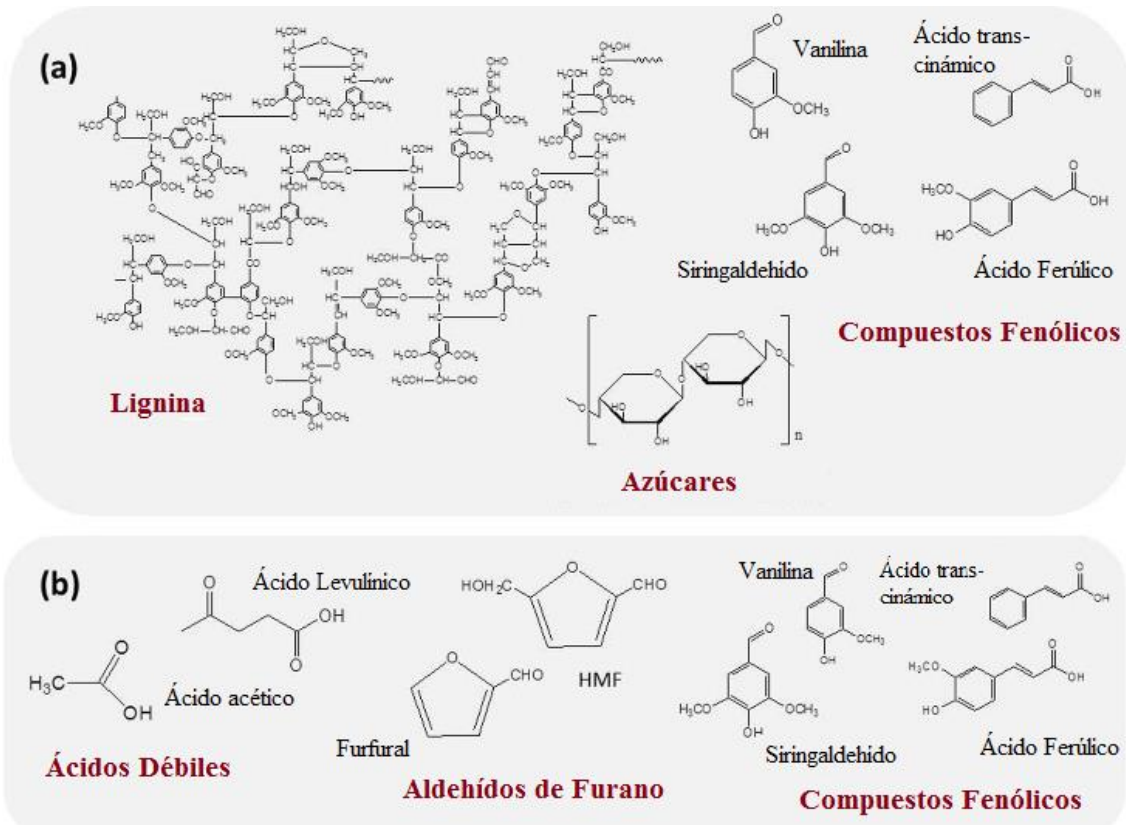


Figura 28. Compuestos que actúan como inhibidores en la hidrólisis enzimática con celulosa (a) y microorganismos fermentativos (b). Fuente: adaptado de Ko et al. (2015a).

**b) Compuestos Fenólicos Solubles:** Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, siendo importantes, determinantes de su la calidad nutricional y sensorial (Monasterio et al., 2013). Mismo en concentraciones a nivel micromolar, los compuestos fenólicos solubles presentan problemas de inhibición muy significativos para las celulasas. Tejirian y Xu (2011) reportaron una reducción en la hidrólisis enzimática en 70% con la presencia de 10mM (1,8 g/L) de siringaldehído. Kim et al. (2011), al trabajar con concentraciones enzimáticas de 1 a 25 mg de enzima por gramos de glucano, obtuvo una reducción en la mitad del rendimiento de la hidrólisis con una concentración de 1,3 g/L de compuestos fenólicos.

Además de inducir una inhibición de la actividad enzimática casi instantánea, los compuestos fenólicos también desactivan la celulasa a medida que pueden precipitar junto con ella, siendo esta precipitación directamente proporcional al tiempo de exposición entre los fenoles y las enzimas. Otros factores importantes que pueden contribuir para la inhibición o precipitación son el tipo de enzima y la fuente microbiana que la haya generado, así como los tipos de compuestos fenólicos presentes. Mientras el ácido gálico y *p*-cumárico desactivaron entre 50 y 70% de la  $\beta$ -glucosidasa producida por *Trichoderma reesei*, la misma enzima producida por *Aspergillus niger* exhibió una pérdida menor que 20% en su actividad enzimática (Ko et al., 2015a).

Los compuestos fenólicos no sólo son tóxicos para las celulasas, sino también para los microorganismos fermentativos por provocar la rotura de la membrana celular. Compuestos fenólicos de bajo peso molecular, como siringaldehído, vanilina, ácido síringico y aldehído coniferílico son fuertes inhibidores de la fermentación en



concentraciones muy bajas. Por ejemplo, concentraciones por debajo de 0,2 g/L de aldehído coniferílico fueron capaces de inhibir el crecimiento y la producción de etanol a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (Ko et al., 2015a).

**c) Azúcares:** Durante la hidrólisis enzimática, la acumulación de glucosa y celobiosa es capaz de inhibir la celulasa a través de la unión con el sitio activo de la misma, resultando en un efecto negativo la liberación de monómeros de azúcar soluble y oligómeros durante el pretratamiento sobre la actividad enzimática.

**d) Furano aldehídos:** El furfural y HMF son los únicos compuestos de este grupo encontrados en concentraciones relativamente significativa en el hidrolizado. Son resultado de la degradación de pentosas y hexosas, respectivamente, cuando son sometidas a condiciones de pretratamiento severas. El furfural inhibe la actividad de varias enzimas importantes en el metabolismo del carbono en concentraciones por encima de 1,5 g L<sup>-1</sup>, como la aldolasa, hexoquinasa, fosfofructoquinasa, trifosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, siendo bastante severo en dificultar el mecanismo de crecimiento celular microbiano. Como una manera de contrarrestar este problema, el microorganismo fermentador puede convertir el furfural a productos menos tóxicos, como ácido 2-furoico y alcohol furfurílico. Alguno microorganismos, como *Scheffersomyces stipittis* no son afectadas por el furfural cuando en concentraciones por debajo de 1 g L<sup>-1</sup> (Taherzadeh y Karimi, 2007; Pereira et al., 2013).

El HMF no es tan tóxico como el furfural para el microorganismo fermentativo, teniendo un poder de acción bastante menor sobre las enzimas del metabolismo del carbono. Todavía, persiste por más tiempo en el medio fermentativo por tener una tasa de conversión cerca de 4 veces más lenta que el furfural, teniendo un efecto más prolongado sobre el microorganismo (Palmqvist y Hahn-Hagerdal, 2000).

Los furano aldehídos son conocidos por afectar de manera negativa a la fermentación, pero no tienen un efecto significativo sobre la hidrólisis enzimática. Estos compuestos actúan en la inhibición del crecimiento celular y consecuente en la producción de etanol, reduciendo la actividad enzimática y biológica del microorganismo al provocar daños en su estructura celular (Mussato y Roberto, 2004; Kundu et al., 2015).

**e) Ácidos débiles:** El ácido fórmico y levulínico formados a partir de la degradación del HMF y furfural, y el ácido acético, formado de la degradación de los grupos acetilo de la hemicelulosa, son los principales representantes de este grupo de inhibidores. Tienen amplia influencia sobre el proceso fermentativo, pero una baja acción sobre la actividad de las celulasas. Son responsables de inhibir el crecimiento de la célula microbiana al inducir un aumento en la acidez del citosol por la entrada de ácidos, resultando en un agotamiento del mecanismo microbiano al intentar expulsar los protones H<sup>+</sup> para mantener el equilibrio de pH, llevando a la muerte celular cuando las concentraciones de ácido son demasiada elevadas. Para la *Saccharomyces cerevisiae* concentraciones mayores que 100 mM son ya capaces de provocar efectos, siendo el orden de toxicidad ácido acético > ácido levulínico > ácido fórmico (Pereira et al., 2013; Jonson et al., 2013).

**f) Compuestos Inorgánicos:** Iones inorgánicos provenientes en los hidrolizados derivados del tipo de biomasa, adición de productos químicos o posiblemente de la corrosión de los equipos empleados en el pretratamiento, pueden provocar tanto un incremento en la



producción de etanol en concentraciones moderadas o una inhibición del mismo. El incremento se daría a través de un aumento del ATP debido al aumento del transporte sobre la membrana plasmática, que sería producido juntamente con el etanol a expensas de la formación de biomasa, mientras la inhibición sería resultado de un aumento excesivo en la presión osmótica. Un estudio conducido con *Saccharomyces cerevisiae* ha revelado que la inhibición decrece de acuerdo a la siguiente orden:  $\text{CaCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  >  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  >  $\text{MgCl}_2$  >  $\text{MgSO}_4$  >  $\text{KCl}$  (Jonson et al., 2013).

Otra categoría de compuestos no citados por su pequeña presencia en las biomásas en general, pero que también poseen cierta importancia en los procesos de inhibición son los extractos. Este grupo es diverso, compuesto de terpenos, grasas, ceras y compuestos fenólicos y confieren a la planta propiedades como color, olor, protección contra parásitos. Su cantidad y composición varían mucho dependiendo de la especie, estación del año y localización de la planta. Algunos residuos, como la poda de olivo, pueden tener una gran cantidad de extractos en función de la presencia de hojas, haciendo que produzca reacciones de condensación con la lignina insoluble en ácido y reduzca la eficiencia de la hidrólisis enzimática por esta fracción precipitada conjuntamente con la celulosa (Ballesteros et al., 2011; Romero-García et al., 2016). Otras materias primas, como el eucalipto y el roble contienen cantidades elevadas de taninos hidrolizables que pueden generar ácido gálico y pirogalol, compuestos fenólicos capaces de inhibir el crecimiento microbiano (Pereira et al., 2013). La extracción de estos compuestos se hace principalmente con agua y etanol, que arrastran no solamente los extractos, sino también azúcares no-estructurales, pudiendo llegar al 12,4% de glucosa en la paja de triticale (Tamaki y Mazza, 2010) o hasta el 31% en la poda de olivo (Romero et al., 2008; Cara et al., 2007).

## 6.2 Estrategias de detoxificación

Considerando que distintos hidrolizados lignocelulósicos poseen distintos tipos de compuestos inhibidores y que los microorganismos pueden exhibir un comportamiento variable dependiendo del tipo de inhibidor presente en el medio, distintas estrategias pueden ser adoptadas para minimizar la generación de estos compuestos. Un resumen de las principales estrategias aparece en la Tabla 6, y es discutido en seguida.

### 6.2.1 Estrategias de Ingeniería y selección de la materia prima

Esta línea metodológica relaciona básicamente dos acciones: la búsqueda por materiales que contengan una baja recalcitrancia, como el *Miscanthus* o la paja de trigo, o aplicar ingeniería para producir esta baja recalcitrancia cambiando la estructura de la biomasa lignocelulósica, con el objetivo de proceder a tratamientos más suaves y minimizar la producción de compuestos de inhibición. Materiales que naturalmente poseen esta característica llevarían a la producción de elevadas cantidades de ácido acético, por lo que la ingeniería en nuevas plantas debe atentar para la reducción de los grupos acetilo. Además, mirando el concepto de biorrefinería basada en una plataforma de productos derivados del azúcar, es interesante aplicar estas estrategias a cultivos de corta rotación por la rápida renovación en la cantidad de biomasa (Chiamonti et al., 2012; Jonsson y Martín, 2016; Larsen et al., 2012).



**Tabla 6. Resumen de las distintas estrategias para contener los compuestos inhibidores.** Fuente: adaptado de Jonsson y Martín (2016).

<b>Estrategia</b>	<b>Principal Enfoque</b>	<b>Consideraciones generales</b>
<b>Estrategias de Ingeniería y selección de la materia prima</b>	Uso de materias primas que presenten menor recalcitrancia y menor generación de inhibidores en el pretratamiento	Deseable que sea aplicable a varias materias primas, con preferencia a cultivos de rotación corta
<b>Métodos Convencionales de Detoxificación</b>	Adición de compuestos químicos, uso de métodos físicos o biológicos	Eficaces, pero pueden exigir etapas adicionales
<b>Esquemas de Cultivo</b>	Unión de las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación	Afecta la productividad y rendimiento final del proceso
<b>Selección natural del microorganismo</b>	Detección de cepas microbianas de ambientes naturales o industriales	Selección con base en el rendimiento del producto
<b>Ingeniería Evolutiva</b>	Adaptación evolutiva con base en el uso de inhibidores específicos y hidrolizados lignocelulósicos	Variaciones en las condiciones de pretratamiento o en la materia prima pueden modificar las concentraciones y tipos de inhibidores presentes
<b>Ingeniería Genética y Metabólica</b>	Resistencia a fenoles, furfural y ácidos carboxílicos a través de ingeniería genética	Proceso basado en el uso de microorganismos genéticamente modificados

### 6.2.2 Métodos Convencionales de Detoxificación

Los métodos convencionales de detoxificación son una de las técnicas más utilizadas para atacar el problema de los compuestos inhibidores. Pueden ser clasificados en físicos, físico-químicos y biológicos.

**a) Métodos de detoxificación físicos:** se resumen en la evaporación a vacío y en el uso de membranas. En la evaporación a vacío se reducen componentes volátiles como el ácido acético, vanilina y furfural, teniendo el inconveniente de aumentar la concentración de sustancias no volátiles (extractos y derivados de la lignina), como extractos, que tendrán sus efectos acentuados. El uso de membranas lleva incorporado determinados grupos funcionales en sus poros, siendo capaces de retener metabolitos tóxicos como ácido levulínico, fórmico y acético, furfural y HMF. La tecnología de membranas también tiene la ventaja de no generar co-productos, no requerir la utilización de aditivos químicos en la mayoría de los casos y tener una fácil operación y adaptación a nivel industrial (Canilha et al., 2012; Nguyen et al., 2011).

**b) Métodos de detoxificación químicos:** Los principales métodos de detoxificación química son la resina de intercambio iónico, neutralización, *overliming*, uso de carbón activo y extracción con solventes orgánicos.

El uso de resinas de intercambio iónico se demuestra como uno de los procesos de detoxificación más eficientes, actuando en la eliminación de inhibidores derivados de la lignina, ácido acético y furfural. Su principal ventaja es que puede ser reutilizado sin



afectar su eficiencia de eliminación. Las resinas poliméricas son una de las principales representantes de este grupo, teniendo estabilidad química y mecánica, con alta capacidad de retención principalmente de compuestos fenólicos y HMF, pudiendo ser regenerada en condiciones suaves que no exigen aportación elevada de energía (Yu y Christopher, 2017). Las desventajas del uso de las resinas se resumen a los largos tiempos de proceso por la lenta difusión en los poros, dificultad en trabajar a nivel industrial y pérdidas de azúcares fermentables durante la purificación del medio (Canilha et al., 2012).

En la neutralización, ocurre un ajuste del pH a condiciones cercanas de la fermentación, con la precipitación de compuestos fenólicos y furfural. Los principales compuestos químicos utilizados son el  $\text{Ca(OH)}_2$  y  $\text{NaOH}$ . El inconveniente de la formación de precipitados es que se exige una nueva etapa al proceso en el sentido de quitarlos del medio fermentativo, ya que puede producir problemas en la fermentación (Cardona et al., 2010).

En el proceso de *overliming* (Martínez et al., 2000), ocurre una subida del pH entre 9 y 10 con el uso de  $\text{Ca(OH)}_2$  o  $\text{NaOH}$  con un reajuste de pH cercano del proceso fermentativo con el uso de ácidos como el  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . El efecto producido por una subida alta en el pH es, además de la precipitación de inhibidores, una inestabilidad en estos compuestos, haciendo con que la producción de etanol tenga un mayor rendimiento. Yuan y Wen (2017), trabajando con bambú, obtuvieron una recuperación de 98,8% del total de azúcares celulósicos y lignocelulósicos y la obtención de 290,4 kg de etanol por tonelada de materia prima después de someter el hidrolizado a *overliming* con  $\text{Ca(OH)}_2$  hasta pH 10. El ajuste a pH 10 también fue reportado por Palmqvist y Hahn-Hagerdal (2000) como la razón por la reducción de las cetonas de Hibbert en un 22% y disminución de furfural y HMF en un 20%, además de apuntar resultados muy interesantes con la adición de sulfito de sodio como reducción del tiempo de fermentación y rápido consumo de azúcares hemicelulósicos. Todavía, el *overliming* no es capaz de remover el ácido acético y puede presentar el inconveniente de convertir azúcares en compuestos no fermentables debido a reacciones de degradación (Keikhosro et al., 2006; Carvalho et al., 2005).

El uso de carbón activado es considerado un método de bajo coste y que no proporciona cambios significativos en los niveles de azúcares fermentables. La eficiencia en la eliminación de compuestos inhibidores, depende del pH, temperatura, tiempo de contacto y la concentración del carbón activo utilizado. El pH influye en la adsorción de ácidos orgánicos (fenoles o ácidos carboxílicos) y bases orgánicas, que son mejor adsorbidos en sus formas no-ionizadas, o sea, en soluciones ácidas y básicas, respectivamente. El tiempo de contacto debe ser suficiente para que cada partícula de carbón activado pueda promover un equilibrio con la sustancia adsorbida, ya que progresivamente la superficie del carbón activo es bloqueada pasando a no tener más poder de acción independientemente si hay un incremento en el tiempo de permanencia (Mussato y Roberto, 2004). Con respecto a la temperatura, hay una mayor tasa de adsorción cuando se aumenta la temperatura. Ya con respecto a la concentración, existe un límite entre la eficiencia en la adsorción de compuestos inhibidores y la reducción de azúcares. Un trabajo que ilustra este aspecto muy bien es el de Silva et al. (1998), que al tratar un hidrolizado de caña de azúcar con carbón activo variando en una concentración del 1% al 30% p/p, observó una reducción de 94% en los compuestos fenólicos y pérdidas de 0,47% en azúcares fermentables al utilizar 1% p/p de carbón activo, pero una pérdida de 31,3%



en azúcares al subir la concentración del carbón al 30% p/p. Pequeños incrementos, de acuerdo con el trabajo de Vallejos et al. (2016), que también ha detoxificado bagazo de caña de azúcar con carbón activo, pero en proporción del 1 al 3% p/p, no ha provocado una reducción en los azúcares fermentables, aumentando solamente la adsorción de compuestos tóxicos a la fermentación.

Las extracciones con solvente orgánico son capaces de eliminar compuestos como ácido acético y varios compuestos fenólicos, además de aumentar la tasa de consumo de azúcares por parte de las enzimas. Mateo et al. (2013) probaron la utilización de acetato de etilo, cloroformo y n-hexano como método de detoxificación de poda de olivo, reportando como el más efectivo el acetato de etilo con una reducción en 50% de los compuestos fenólicos y 57% en el total de furanos.

**c) Métodos de Detoxificación Biológicos:** este método de detoxificación utiliza enzimas o microorganismos que actúa en el hidrolizado, pudiéndose utilizar el mismo recipiente en que se va a procesar la fermentación. De entre las enzimas, la lacasa y peroxidasa, derivadas de hongos de pudrición blanca, se han encontrado de entre las más eficaces, eliminando compuestos fenólicos a través de polimerización oxidativa a expensa de oxígeno molecular. Ya de entre microorganismos, existen levaduras, hongos y bacterias que pueden, además de detoxificar el medio, ayudar en la degradación de lignina, formando un sustrato que pueden ser fácilmente hidrolizados a azúcares en tiempos cortos y condiciones suaves (Canilha et al., 2012).

### 6.2.3 Esquemas de Cultivo

Los problemas de inhibición de las celulasas por un exceso de producción de azúcares monoméricos puede ser reducido con la implementación conjunta de la etapa de hidrólisis enzimática y fermentación, teniendo dos configuraciones principales: la SFS (Sacarificación y Fermentación Simultáneas) o SCFS (Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas), en las que hay el consumo de azúcares a la misma medida en que se van produciendo, y el BPC (Bioproceso Consolidado), en el que el microorganismo que realiza la fermentación también es capaz de producir enzimas hidrolíticas (Ko et al., 2015a).

### 6.2.4 Selección natural del microorganismo

La selección de microorganismos de ambientes naturales o industriales resistentes a compuestos inhibidores también es una de las estrategias para mejorar el rendimiento del proceso fermentativo. Un estudio hecho por Wimalasena et al. (2014) identificó algunas cepas de *Saccharomyces uvarum*, como la de sigla UWOPS99-807.1.1, resistente al ácido fórmico y levulínico, y otras de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces paradoxus* resistentes a furfural, aisladas de hábitats naturales. Un factor importante es que la capacidad natural del microorganismo tiene que estar aliada a una elevada productividad para que sea posible establecer el proceso a nivel industrial (Ko et al., 2015a).

### 6.2.5 Ingeniería Evolutiva

La enorme complejidad vista en los sistemas celulares impide que la ingeniería metabólica se utilice con frecuencia, ya que es necesario un conocimiento molecular o funcional sólido para su aplicabilidad. En cambio, la ingeniería evolutiva sigue el principio de “ingeniería”



de la naturaleza mediante la variación y selección natural, ofreciendo atractivas ventajas científicas para el desarrollo de procesos siempre que un fenotipo deseado sea susceptible de selección directa o indirecta. Además del desarrollo de la cepa mediante mutación aleatoria y selección directa en placas, también hace parte de la ingeniería evolutiva la recombinación y evolución continua de grandes poblaciones a lo largo de muchas generaciones. Dos distintas aplicaciones de la ingeniería evolutiva, una como componente integral en la ingeniería metabólica de cepas con fenotipos mejorados, y otra para transferir los fenotipos deseados a otros huéspedes, se encuentran como grandes herramientas en la investigación actual y futura en el desarrollo de nuevas cepas (Sauer, 2001). Ejemplos recientes de esta herramienta para el uso de microorganismos tolerantes a los inhibidores del proceso fermentativo son los estudios conducidos por Smith et al. (2014) y Almario et al. (2013), que trabajaron con rastrojo de maíz y paja de triticale, respectivamente.

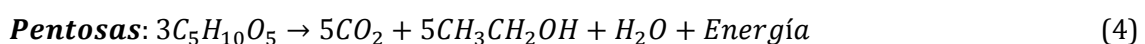
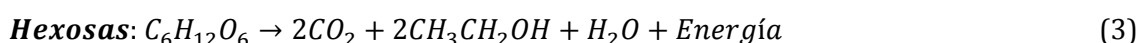
### 6.2.6 Ingeniería Genética y Metabólica

La ingeniería metabólica utiliza la información del análisis multi-ómico para buscar posibles manipulaciones de ingeniería metabólica, de manera que con los rápidos avances tecnológicos en esta área se puede lograr un análisis más completo de los componentes intracelulares y sus interacciones, pudiéndose identificar genes importantes implicados en la tolerancia de los inhibidores (Zhao et al., 2016). Algunos ejemplos son la resistencia mejorada de *Escherichia coli* a furfural (Wang et al., 2013), mejora de la *Saccharomyces cerevisiae* al furfural, llevando a mejores producciones de etanol (Hasunuma et al., 2014), y aumento de la resistencia al ácido acético y fórmico mediante aumento de la actividad de las enzimas transaldolasa y formiato deshidrogenasa en la *Saccharomyces cerevisiae* (Sanda et al., 2011).

Un esquema que resume las estrategias para alcanzar un mayor rendimiento en la fermentación es mostrado en la Figura 29.

## 7. Fermentación Alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso de producción de energía en condiciones anaerobias realizada por una serie de microorganismos, que termina por generar alcohol y CO<sub>2</sub> a partir de monosacáridos y disacáridos. Las materias primas utilizadas para este fin comprenden fuentes de sacarosa, como caña de azúcar y remolacha, fuentes de almidón como maíz, y materiales lignocelulósicos, como madera y restos agrícolas. Las fuentes de sacarosa y de almidón poseen básicamente hexosas, mientras las fuentes lignocelulósicas poseen además de hexosas, las pentosas. Las ecuaciones 3 y 4 muestran una reacción química global de la conversión de ambos tipos de azúcares a etanol (Zabed et al., 2017).



Muchos microorganismos pueden ser empleados en la fermentación alcohólica. Independientemente del tipo, algunas características son importantes a la hora de definir la selección de un buen microorganismo fermentador, tales como: buen crecimiento en un medio de cultivo simples y barato; rendimiento en etanol por encima del 90% teórico;

tolerancia a compuestos inhibidores; soporte a concentraciones de etanol mayores de 40 g/L; y productividad en etanol por encima de 1 g/L/h (Zabed et al., 2017).

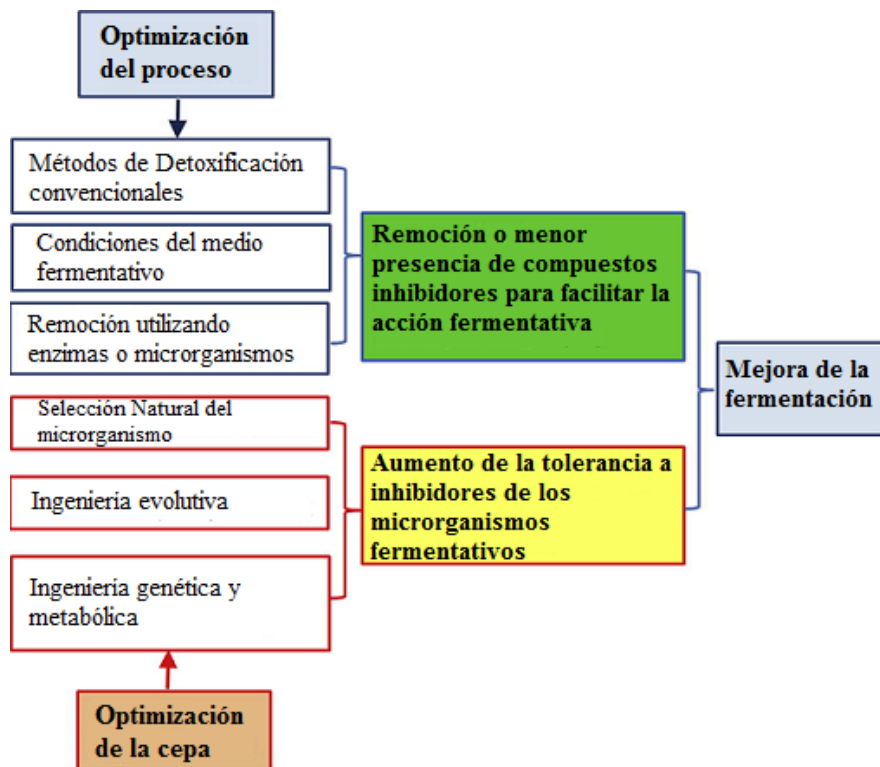


Figura 29. Resumen de las estrategias para alcanzar un mayor rendimiento fermentativo. Fuente: Zhao et al., (2016).

Durante la fermentación de las hexosas, son producidos, según rendimiento teórico máximo, 51,1 kg de etanol a cada 100 kg de glucosa. Este rendimiento no se atinge pues 1% de los azúcares son destinados al crecimiento celular y 4% son convertidos a otros bioproductos como glicerol, ácido succínico, ácido málico, aceite de fusel, ácido acético y otros productos minoritarios. Por esta razón, el máximo rendimiento en la producción de etanol es del 92 a 93% (Zabed et al., 2017; Lopes et al., 2016; Della-Bianca et al., 2013).

La fermentación puede realizarse de manera continua, discontinua (*batch*, en inglés) o semicontinua (*fed-batch*, en inglés). La selección del tipo apropiado va a depender de las propiedades cinéticas del microorganismo, tipo de sustrato y rentabilidad económica del proceso (Oliveira et al., 2016).

El modo de fermentación discontinuo se lleva a cabo en un sistema de cultivo cerrado, en el cual ocurre la suplementación de nutrientes e inoculación de la levadura o bacteria antes de iniciar la fermentación. En la etapa inicial hay una breve adaptación al medio, seguida de un crecimiento exponencial, llegando a una fase estacionaria a medida que los nutrientes se agotan. Con excepción de la adición de ácidos o bases para corregir el pH, no hay la adición de ninguna otra sustancia, siendo este modo considerado la configuración más simples de fermentación (Zabed et al., 2017; Balat, 2011).

El sistema semicontinuo, por otro lado, combina los métodos continuo y discontinuo al tener una alimentación continua del sustrato u otras sustancias sin la eliminación del caldo fermentado, siendo ampliamente utilizado para la producción de etanol a escala



comercial. Las células microbianas crecen a una baja concentración de sustrato durante todo el período de fermentación, produciendo etanol en un ritmo creciente. Ofrece algunas ventajas frente a las demás configuraciones como una mayor producción de etanol, células más viables y con mayores tiempos de vida, menor tiempo de fermentación y menor toxicidad, siendo capaz de mantener la temperatura, pH y nivel de oxígeno disuelto a través de una retroalimentación controlada (Phukoetphim et al., 2017; Mears et al., 2017).

La fermentación continua opera a través de una alimentación secuencial de sustrato, medio de cultivo y nutrientes y la eliminación de los productos del recipiente de fermentación continuamente. Se realiza básicamente en dos tipos de reactores, denominados tanque agitado o reactor de flujo de pistón. Proporciona una alta productividad en etanol, pero su operación es más compleja que las demás configuraciones (Skupin, 2017).

### 7.1 Fermentación a nivel industrial - La experiencia de Brasil

El estudio de relatos sobre la implementación a escala industrial de un determinado proceso es de una importancia muy significativa, pues se muestran reales posibilidades de los problemas que pueden ocurrir y ayudar en la implementación de un proceso mejorado. En el caso del etanol, es posible que los impases vividos con el proceso fermentativo en la primera generación puedan afectar el desarrollo de la tecnología de segunda generación, siendo esencial tenerlos en cuenta. Brasil es uno de los países mundialmente reconocidos por su vanguardia en la producción de biocombustibles y es visto como ejemplo de implantación de este tipo de tecnología. El etanol empezó a ser producido a mayor escala a razón del programa gubernamental denominado "Proalcool", lanzado en 1975 como respuesta a la crisis del sector petrolífero de los años 70. Inicialmente el etanol era producido apenas como aditivo a la gasolina, pasando en 1979 a abastecer coches especialmente diseñados para rodar con el combustible, que llegaron a representar el 95% de la flota de vehículos ligeros producidos en Brasil. Una combinación de factores ligados a la caída de los precios del petróleo, aumento del precio del azúcar en el mercado internacional y reducción de subsidios, todavía, produjo una importante contracción en la demanda de automóviles a base de etanol. La recuperación del sector vino principalmente con el desarrollo de la tecnología *flex-fuel* en los automóviles, que pueden rodar con etanol 100% hidratado o distintas mezclas con la gasolina teniendo un sensor electrónico que detecta el porcentaje de la mezcla y ajusta la combustión. A finales de 2016, la tecnología *flex-fuel* representaba 70% de la flota de vehículos ligeros, con 25 millones de coches y 4 millones de motocicletas (NOVACANA, 2017; BNDES y CGEE, 2008). Junto con los EE.UU., representan 85% de todo el etanol producido en el mundo, algo en torno a 94 billones de litros por año (Bertrand et al., 2016).

Las destilerías brasileñas tienen como base el proceso fermentativo de Melle-Boinot, que tiene como principal característica la centrifugación del vino para recuperación de las células de levadura, que después de tratamiento con ácido sulfúrico diluido (pH entre 2 a 2,5) para eliminación de bacterias, vuelven a los tanques de fermentación (que tienen capacidad entre 250 a 3000 litros) para un nuevo ciclo fermentativo mientras el vino se destila. Eso hace con que las fermentaciones sean rápidas (entre 6 a 12 horas) aunque la concentración de etanol resultante no sea tan elevada (7-12% v/v). Como principal co-producto se tiene la vinaza, compuesto rico en sales (principalmente potasio) que se



utiliza para fertirrigar la caña de azúcar, reduciendo los costes en importaciones de fertilizantes químicos (Lopes et al., 2016; Pazuch et al., 2017; Basso et al., 2008).

Con respecto a la configuración fermentativa, cerca de 83% de las destilerías brasileñas trabajan en el modo semicontínuo y el restante en el modo continuo. A pesar de necesitar una mayor inversión inicial, las de tipo semicontinuo han demostrado mejores rendimientos fermentativos, según Godoy et al. (2008). Estos mismos autores han conducido un estudio de 8 años consecutivos con 62 destilerías brasileñas comparando las de tipo semicontinuo y continuo, llegando a las conclusiones presentadas en la Tabla 7, destacando el mejor rendimiento de las de tipo semicontinuo.

**Tabla 7. Comparación entre el modo continuo y semicontinuo con base en la realidad industrial.**  
Fuente: adaptado de Godoy et al. (2008).

Características	2008Unidad	Modo continuo	Modo Semicontinuo
Rendimiento fermentativo	%	87-89,5	88,9-90,5
Contaminación bacteriana	Bastones de bacterias/ml	3,8-9,9·10 <sup>7</sup>	2-3,9·10 <sup>7</sup>
Consumo de ácido sulfúrico	g/L etanol	8-14	6-7
Consumo de antibiótico	mg/L etanol	5,7-13	3,8-8
Consumo de antiespumante	mg/L etanol	0,47-0,75	0,45-0,70

Las destilerías en Brasil no funcionan durante todo el año. En función de la necesidad de moler la caña de azúcar en el momento de la recolección, hay interrupciones debido a lluvias, mantenimientos preventivos y la propia recolección, teniendo una media de 200 a 240 días de funcionamiento. En este periodo, se realizan cerca de 400 ciclos de fermentación, y como hay un reciclaje de la levadura a cada nuevo ciclo es común haber una alta carga de estrés sobre este microorganismo, resumidos en la Figura 30. Los factores fuera de la levadura representan los agentes que inducen al estrés y los de dentro son los mecanismos de defensa de la levadura. Los motivos que llevan al estrés varían de una destilería a otra, pudiendo ocurrir incluso diferencias en una misma destilería dependiendo de la época de cosecha.

La presencia de levaduras salvajes es común dado el gran volumen con que se trabaja a nivel industrial, así como bacterias y otros tipos de hongos. Las bacterias productoras de ácido láctico son las principales contaminantes de la fermentación alcohólica, dividiéndose en dos grupos principales: homo y heterofermentativas (Basso et al., 2014). El primer grupo se caracteriza por la producción de lactato a partir de la glucosa, mientras las demás pueden producir lactato, acetato, etanol y también manitol. Por su importancia, muchas industrias incorporaron el análisis de estos componentes en su control de calidad a través de cromatografía líquida de alta eficiencia, siendo variables del rendimiento del proceso fermentativo. En las destilerías brasileñas también fueron encontrados otras especies pertenecientes al género *Saccharomyces* además de otros géneros como *Dekkera*, *Schizosaccharomyces* y *Candida*. La eliminación de estos géneros "no *Saccharomyces*" se

hace con tratamiento ácido conforme a lo dicho anteriormente y adición de productos antimicrobianos frente al uso de antibióticos, ya que el uso de estos últimos no es bueno para las destilerías que producen levadura seca inactiva para alimentación animal. El uso de productos antimicrobianos tuvo gran impulso en 2007, teniendo como destaques el dióxido de cloro y derivados de ácidos del lúpulo (Lopes et al., 2016; Basso et al., 2008; Meneghin et al., 2008; Borges et al., 2015).



**Figura 30. Resumen de los principales agentes que inducen al estrés de la levadura y sus mecanismos de defensa.** Fuente: Lopes et al. (2016).

La contaminación bacteriana proviene principalmente de las partículas de suelo, que puede cargar un billón de células bacterianas a cada gramo, y por la contaminación de insectos, de entre los cuales se destaca el barrenador. Los tallos de caña de azúcar perforados por este insecto acumulan ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, que son inhibidores del proceso fermentativo. Un efecto bastante común de la contaminación es la floculación de levaduras, que ocurre cuando se atinge una razón bacteria: levadura de 4,8:1 (Alcarde, 2001; Yokoya y Oliva-Neto, 1991). Contaminaciones por bacterias malolácticas y de la especie *Acetobacter indonesiensis* ya fueron documentadas en las destilerías brasileñas. Las bacterias malolácticas son capaces de convertir el ácido málico, presente en el mosto derivado de la caña de azúcar y que es también producido por las levaduras, en ácido láctico, reduciendo el pH del medio; mientras las de la especie *Acetobacter indonesiensis* consiguen reducir el glicerol del medio fermentativo. Ambos casos produjeron sobrestimaciones en el rendimiento fermentativo basado en el análisis de co-productos (Lopes et al., 2016).

Para combatir la contaminación y demás factores del estrés, la levadura cuenta con mecanismos de defensa. El ácido succínico juntamente con el etanol tiene un efecto antibacteriano; el glicerol funciona como un regulador que ayuda a soportar los choques osmóticos; la trehalosa es un disacárido que forma parte de la membrana celular que ayuda a tolerar altos niveles de etanol, deshidrataciones y otros factores de estrés, y junto con el glucógeno también sirve como azúcar de reserva (Lopes et al., 2016).



Recientemente, nuevas tecnologías vienen siendo puestas en marcha para tornar las destilerías aún más competitivas dentro de la cadena de la agroindustria brasileña. Un nuevo proceso fermentativo a partir del maíz reutilizando las células de levadura que serían desechadas de la destilería, integrando los procesos a partir de la materia prima sacarina y del almidón, promete traer una revolución a las destilerías convencionales. Teniendo una fermentación más rápida (34 a 36 horas) que las industrias en EE.UU (45 a 60 horas), esta tecnología desvía menos azúcar para la multiplicación de levaduras y producción de biomasa celular, permite el uso del mismo sistema de destilación utilizado para la caña de azúcar, extiende el período de producción anual para 345 días al año, reduce las inversiones iniciales y permite compartir personal técnico y laboratorios. Llamadas “plantas flex” de maíz y caña de azúcar, son económicamente viables en regiones con oferta de maíz y alta demanda de DDGS (Lopes et al., 2016; Junior et al., 2015; Amorim et al., 2011). Actualmente hay una planta flex en funcionamiento localizada en Campos de Júlio - Mato Grosso, que en la cosecha 2016/2017 pretende ampliar la producción y generar 64 mil m<sup>3</sup> de etanol (Piracicaba Engenharia, 2017). En Brasil también hay dos industrias de etanol de segunda generación – una en el estado de Alagoas y otra en Sao Paulo – generadas a partir de incentivo gubernamental (Scaramuzzo, 2015).

## 7.2 Principales microorganismos fermentativos

De entre los principales microorganismos etanologénicos conocidos, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* tienen reconocida capacidad para procesar azúcares con seis átomos de carbono, pero no consiguen utilizar la xilosa como fuente productora de etanol. Algunas especies que naturalmente consiguen utilizar las pentosas son las del género *Pichia* y *Candida*, no tienen una productividad tan elevada, siendo por lo menos cinco veces menor que la *S. cerevisiae*, además de necesitar oxígeno en cantidades reguladas y poseer sensibilidad a los inhibidores. Aunque se hayan realizado mejoras significativas en los microorganismos para la fermentación eficiente de las pentosas, esto sigue siendo uno de las mayores dificultades en la concretización de la tecnología de segunda generación (Arora, 2015). Algunas consideraciones sobre estos y otros microorganismos serán realizadas en los apartados que siguen, bien como un breve abordaje sobre los avances de la ingeniería genética hecha en cada microorganismo.

### a) *Saccharomyces cerevisiae*

El género *Saccharomyces* (*Saccharomyces* spp.) es naturalmente tolerante al estrés osmótico, a altas concentraciones de etanol y a condiciones anaerobias, lo que la hace adecuada para la fermentación alcohólica a escala industrial. Este género comprende cerca de siete especies (*S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevi*, *S. arboricolus* y *S. uvarum*) de entre las cuales se destaca la *S. cerevisiae* (Wimalasena et al. 2014; Brown et al., 2013; Reis et al., 2013). Esta levadura, de uso bastante conocido en los procesos biotecnológicos, posee una gran capacidad en la conversión de azúcares a alcohol asociada a una elevada resistencia al etanol y no es peligrosa en su manoseo, características atractivas para uso industrial (Zabed et al., 2017; Snoek et al., 2016).

La ruta metabólica utilizada por la *S. cerevisiae* para la producción de etanol a partir de la glucosa es la Embden-Meyerhof-Parnas, mostrada en la Figura 31. Denominada glucólisis, este proceso ocurre en el citoplasma celular donde ocurre la formación de dos moléculas

de piruvato a partir del procesamiento enzimático de cada molécula de glucosa. En ausencia de oxígeno, cada molécula de piruvato produce una molécula de etanol y otra de  $\text{CO}_2$ , generando globalmente 2 ATPs que es utilizado por la levadura para la biosíntesis de macromoléculas esenciales a su crecimiento.

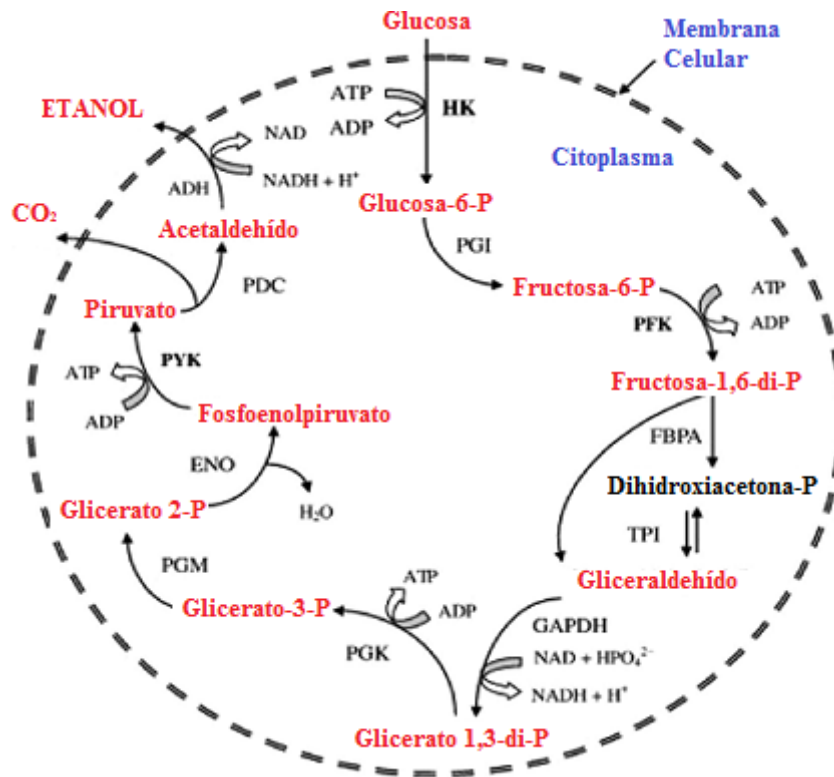


Figura 31. Ruta metabólica general de la *S. cerevisiae* para la producción de etanol a partir de la glucosa. Fuente: adaptado de Zabed et al., (2017). Datos: El "P" indica Fosfato; HK: Hexoquinasa; PGI: Glucosa-6-fosfato isomerasa; PFK: Fosfofructoquinasa; FBPA: Fructosa-bifosfato aldolasa; TPI: Triosa fosfato isomerasa; GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; PGK: Fosfoglicerato quinasa; PGM: Fosfoglucomutasa; ENO: Enolasa; PYK: Piruvato quinasa; PDC: Piruvato descarboxilasa; ADH: Alcohol deshidrogenasa.

Muchos tipos de *S. cerevisiae* encontradas en el medio ambiente o producidas en laboratorio han sido utilizadas en la producción de bioetanol, de modo que la Tabla 8 trae algunas de las principales cepas probadas. Destaca la cepa salvaje *S. cerevisiae* KL17, capaz de tener una concentración de 96,9 g/L etanol con una productividad de 3,46g/L/h, resultados estos atribuidos a su capacidad de fermentar glucosa y galactosa de manera simultánea (Azhar et al., 2017).

### a.1) *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificada

Naturalmente, la *S. cerevisiae* es incapaz de utilizar la xilosa en la producción de etanol, pero de acuerdo con Kuhad et al. (2011), es capaz de metabolizar un isómero de xilosa, la xilulosa, siendo este hecho aprovechado por la ingeniería recombinante para creación de cepas capaces de fermentar la xilosa. También según este mismo autor, Ho et al. (1998) fueron los primeros a crear con éxito una *S. cerevisiae* recombinante con la habilidad de fermentar xilosa y glucosa simultáneamente, a través de la transformación de un gen de la propia *S. cerevisiae* y de genes traídos de la *P.stipitis*. La sobreexpresión del gen XKS de la *S. cerevisiae* también viene siendo analizada y con buenos resultados tanto en el consumo de



xilosa como en la producción de etanol. Brat et al. (2009) también lograron con éxito incrementar el metabolismo de la xilosa al clonar trozos del gen que expresa la enzima xilosa isomerasa de la bacteria anaerobia *Clostridium phytofermentans*.

**Tabla 8. Algunas cepas de *S. cerevisiae* probadas en la producción de etanol.** Fuente: adaptado de Azhar et al. (2017).

Cepa	Origen	Sustrato	Concentración de Azúcares (g/L)	Condiciones de la fermentación	Concentración en etanol	Productividad en Etanol (g/L/h)
<i>S. cerevisiae</i> RL-11	Laboratorio	Café molido	195	30°C, 200 rpm, 48 h	11,7	0,49
<i>S. cerevisiae</i> MTCC173	Laboratorio	Rastrojo de sorgo	200	30°C, 120 rpm, 96 h	68	0,94
<i>S. cerevisiae</i> KL17	Salvaje	Galactosa y glucosa	500	30°C, 200 rpm, 28 h	96,9	3,46
<i>S. cerevisiae</i> CHY1011	Salvaje	Almidón de mandioca	195	32 °C, 120 rpm, 66 h	89,1	1,35

Una cepa denominada GS1.11-26 ha sido desarrollada de un tipo de *S. cerevisiae* industrial bastante robusta y de altos rendimientos en etanol denominada "Ethanol Red", y de ella han sido desarrolladas otras tres cepas, llamadas GSF335, GSF767 y GSE16. Estas tres cepas consiguieron fermentar 37 g/L de D-xilosa y 36 g/L de D-glucosa en 32 horas, además de producir 23% más etanol que el tipo "Ethanol Red", siendo consideradas aptas para la aplicación a escala industrial (Jahnavi et al., 2017).

La fusión de protoplastos es una de las técnicas utilizadas para mejorar el uso de xilosa por la *S. cerevisiae*. En esta técnica hay un intercambio genético entre organismos a través de la fusión de los protoplastos en presencia de un agente fusógeno como el polietilenglicol. Heluane et al. (1993) fueron capaces de aumentar la capacidad de utilización de pentosas por parte de la *S. cerevisiae* al transferiren con éxito genes de utilización de xilosa de la *P. tannophilus*.

### **b) *Zymomonas mobilis***

Otro microorganismo bastante utilizado en las fermentaciones alcohólicas a partir de hexosas es la bacteria gram-negativa *Zymomonas mobilis*. Este microorganismo posee muchas características deseables para la producción de etanol desde un punto de vista industrial, como elevada productividad específica en un único producto, elevada tolerancia al etanol, amplio rango de pH en que se mantiene productiva (de 3,5 a 7,5) y es considerada segura (Yang et al., 2016). Además, es un microorganismo anaeróbico facultativo, lo que reducen los costes de producción de un control avanzado de aireación en el proceso fermentativo a mayores escalas, y se ha demostrado la capacidad de reemplazar el agua dulce por el agua del mar en el medio de cultivo, pudiendo mitigar algunos desafíos ambientales en la expansión de producción de etanol a partir de su uso (Gonçalves et al., 2011). También se ha demostrado recientemente que la *Z. mobilis* puede utilizar el N<sub>2</sub> como fuente de nitrógeno en el lugar del NH<sub>4</sub>, y que la fijación de este

nitrógeno ha aumentado el rendimiento en etanol operando a bajas cargas de sólido, lo que podría reducir los costes de producción del etanol celulósico en millones de dólares anualmente (Kremer et al., 2015).

Comparativamente a la *Saccharomyces cerevisiae*, posee un mayor rendimiento y productividad en etanol por tener una alta superficie celular específica y consecuentemente consumir más glucosa, al paso que es bastante tolerante a él, además de utilizar una fracción muy pequeña del carbono para convertir en uso propio (cerca de 2%). Todavía no es capaz de sustituir de inmediato a la tradicional levadura en función de ser muy restricto con respecto a los sustratos en que se desarrolla, además de no presentar un crecimiento satisfactorio en el medio fermentativo por metabolizar la glucosa a través de la ruta Entner-Doudoroff (Figura 32), en que hay la producción de solo una molécula de ATP por cada molécula de glucosa.

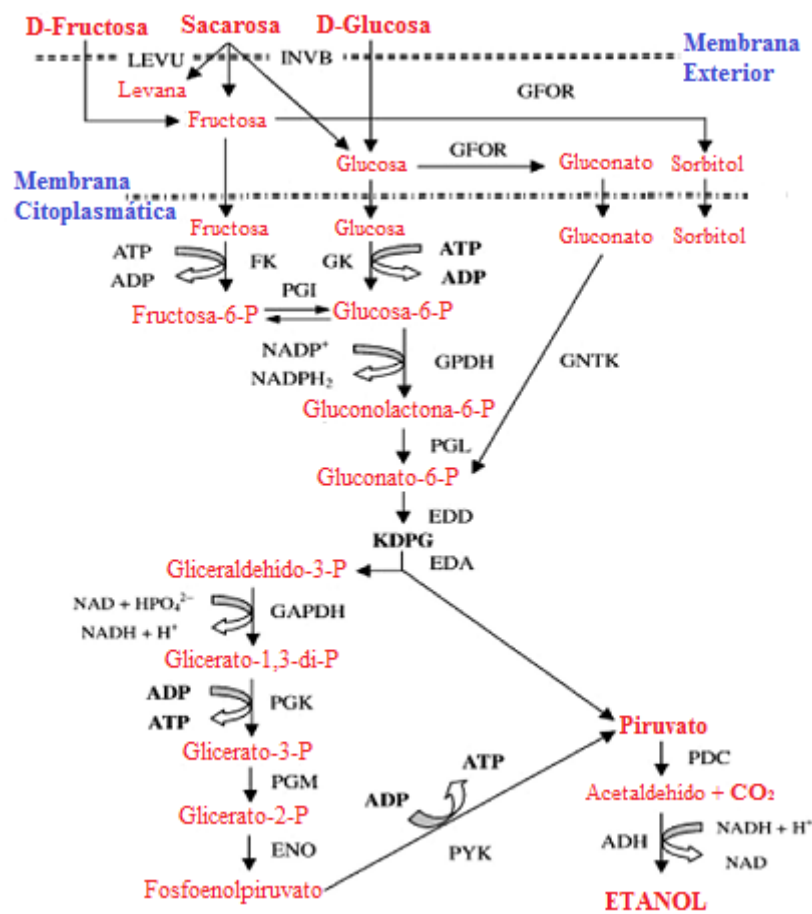


Figura 32. Ruta metabólica de la *Zymomonas*. Fuente: adaptado de Zabed et al. (2017). Datos: LEVU: levansacarasa; INV: invertasa; GFOR: oxidorreductasa glucosa-fructosa; FK: fructoquinasa; GK: glucoquinasa; GPDH: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; PGL: fosfogluconolactonasa; EDD: 6-fosfogluconato deshidratasa; KDPG: 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato; EDA: 2-ceto-3-desoxigluconato-aldolasa; GNTK: gluconato quinasa; PGI: Glucosa-6-fosfato isomerasa; GAPDH: Glicerato-1,3-di-P deshidrogenasa; PGK: Fosfoglicerato quinasa; PGM: Fosfoglucomutasa; ENO: Enolasa; PYK: Piruvato quinasa; PDC: Piruvato descarboxilasa; ADH: Alcohol deshidrogenasa.

### b.1) *Zymomonas mobilis* genéticamente modificada

La primera cepa genéticamente modificada para mejorar la producción de etanol de la *Z. mobilis* a partir de las pentosas fue mostrada en 1995, a través de la incorporación de genes provenientes de la *E. coli*. Desde entonces, muchas modificaciones han sido hechas



para mejorar la productividad en etanol a partir del uso de xilosa y arabinosa, o del uso conjunto de glucosa, xilosa y arabinosa (Yang et al., 2016; Dunn y Rao, 2014; Dunn y Rao, 2015; Chou et al., 2015). Wang et al. (2016) desarrollaron una nueva cepa de *Z. mobilis*, incorporándole genes para mejorar el aprovechamiento de xilosa, aumentar la biosíntesis de lisina, metionina y ácidos grasos libres para incrementar la tolerancia a etanol, y progresar una mayor tolerancia a estrés por acción de ácidos y calor. Denominada TMY-HFPX, fue capaz de producir etanol en concentraciones de glucosa variando de 136 g/L a 295 g/L sin la adición de vitaminas o aminoácidos externos, con un rendimiento teórico de etanol en 90%.

Chen et al. (2016) han utilizado una cepa de *Z. mobilis* modificada para la producción de etanol, obteniendo 230 g/L de azúcares monoméricos después de hidrólisis enzimática realizada con altas cargas de sólidos a través del proceso de Desacetilación y Refinación Mecánica (DMR, siglas en inglés), explicado en detalles por Chen et al. (2014). En la fermentación, sin utilizar ninguna técnica de detoxificación o concentración de azúcares, obtuvieron 86 g/L de etanol en 22 horas de proceso, cerca de 10,7% v/v en etanol, una concentración nunca antes observada trabajándose con rastrojo de maíz siguiendo estas condiciones según los autores del estudio.

### **c) *Pachysolen tannophilus***

La levadura *Pachysolen tannophilus* fue una de las primeras identificadas con gran potencial para convertir la xilosa a etanol (Romero et al., 2007; Saleh et al., 2014)

#### **c.1) *Pachysolen tannophilus* genéticamente modificada.**

Una cepa identificada como *Pachysolen tannophilus*1771 fue desarrollada y probada para fermentar mezclas de glucosa y xilosa. De acuerdo con Zhao et al. (2008), en presencia de ambos azúcares, hubo primero el consumo de glucosa y un posterior periodo de adaptación para entonces empezar a consumir la xilosa, teniendo en este sistema una tasa de consumo de 1,28 g/L/h de glucosa y 0,34 g/L/h de xilosa. Fueron probados también fermentaciones en presencia del azúcar puro, obteniéndose una concentración en etanol de 6,9 g/L para la glucosa después de 12 horas de fermentación y 2,7 g/L para la xilosa después de 48 horas de fermentación, mostrándose la necesidad de técnicas como mutación para mejorar la capacidad de fermentación de la xilosa.

### **d) *Pichia stipitis***

La *Pichia* es un género de levaduras de la familia *Saccharomycetaceae*, teniendo células esféricas, elípticas u oblongas, todas acuminadas, y que ha sido ampliamente utilizada para la fermentación de pentosas (Arora, 2015). Según Wang et al. (2017), la *P. stipitis* es sensible a la acción de los compuestos fenólicos, que ataca las membranas celulares provocando daños irreversibles, de modo que su eliminación fue capaz de incrementar la producción de etanol entorno al doble. Yucel y Aksu (2015) utilizaron medios sintéticos rico en xilosa y un hidrolizado de pulpa de remolacha azucarera para verificar la producción de etanol a partir de la *P. stipitis* NRRL Y-7124. Los medios sintéticos tenían una concentración variable entre 10 y 75 g/L de xilosa, en donde relataron una productividad máxima de 0,494 g/L/h después de 75 horas, sin ninguna especie de inhibición por sustrato. El hidrolizado sufrió distintos procesos de detoxificación, con



eliminación principalmente de compuestos fenólicos y furánicos, teniendo una productividad entre 0,119 y 0,286 g/L/h en etanol a partir de una concentración de azúcares de 48,2 g/L. Se verificó también una alta tasa de crecimiento, que ayudó a incrementar la producción de etanol.

#### **d.1) *Pichia genéticamente modificada***

Una cepa de *Pichia kudriavzevii* ha sido transformada para expresar un gen del *Aspergillus aculeatus*, siendo sometida a configuración tipo SFS con fermentación a 40°C y convirtiendo una concentración de 100 g/L de celulosa microcristalina en 29 g/L en 72 horas (Kitagawa et al., 2010).

#### **e) *Kluyveromyces marxianus***

El género *Kluyveromyces* está compuesto de levaduras ascomicéticas pertenecientes a la familia *Saccharomycetaceae*. Es capaz de utilizar una amplia variedad de sustratos de azúcar, como arabinosa, galactosa, manosa y xilosa, para la producción de etanol a altas temperaturas (Arora, 2015). Las especies de *Kluyveromyces* han sido consideradas como las más utilizadas en la producción de etanol a partir de suero de queso, con interesantes características para su uso a nivel industrial, como tolerancia a elevadas temperaturas, alta tasa de crecimiento y gran capacidad metabólica (Lane y Morrissey, 2010). Además, como posee una habilidad natural para asimilar tanto pentosas como hexosas, viene siendo observada como potencial sustituta de la *S. cerevisiae* para la producción de etanol de segunda generación (Signori et al., 2014). Un factor que pesa en contra de su uso es el poco conocimiento genético acerca de su metabolismo, que recientemente viene siendo estudiado y que cada vez más tiene el potencial de recibir modificaciones como las que se realiza con los demás microorganismos (Dasgupta et al., 2017).

Das et al. (2016) ha utilizado un suero de queso conteniendo una concentración inicial de lactosa de 150 g/L, iniciando una fermentación a 35 °C y pH 4,5 con la cepa *K. marxianus* NCIM3217. La producción de etanol fue de 43,71 g/L con la lactosa siendo totalmente consumida en 72 horas, siendo considerada satisfactoria y apuntada como una buena solución para los problemas causados por este residuo.

#### **f) *Candida shehatae***

El género *Candida* comprende levaduras unicelulares, teniendo formas ovales, elipsoidales o fuertemente alargadas, con el tamaño dependiendo de las condiciones en que se encuentra el cultivo. Son típicamente aeróbicos, pudiendo o no producir etanol con el empleo de aeración al mismo tiempo que aumentan rápidamente su biomasa. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 30 °C y el pH entre 4 y 6 (Kieliszek et al., 2017).

Tanimura et al. (2012) aislaron una cepa denominada ATY839, que después de un análisis filogenético se descubrió que pertenecía a la especie *Candida shehatae*. Esta cepa fue capaz de demostrar una mayor producción de etanol en comparación a las cepas de control (*S. cerevisiae* NBRC0224, *Pichia stipitis* NBRC10063 y *Candida shehatae* ATCC22984), con un rendimiento máximo teórico de 71,6% después de 24 horas de fermentación.



Yuvadatkun y Boonmee (2016) han trabajado con la cepa *C shehatae* TISTR5843 a concentraciones entre 20 g/l y 80 g/L de glucosa y xilosa y también en la presencia de hidrolizado de paja de arroz. Se ha verificado que la glucosa es consumida antes de la xilosa, produciendo 7,99 g/L de etanol a partir de 20 g/L de azúcares y 27,82 g/L utilizando 80 g/L de azúcares, produciéndose también como co-productos principales el xilitol y el glicerol. Al utilizar el hidrolizado, se verificó que no hubo el consumo total de la xilosa. Este material, que contenía 34,75 g/L de glucosa y 21,29 g/L de xilosa, dio una producción de 19,37 g/L de etanol (productividad de 0,20 g/L/h).

### **f.1) *Candida shehatae* genéticamente modificada**

Li et al. (2008) modificaron una cepa de *Candida shehatae* para, inicialmente, tornarse tolerante a altas concentraciones de bioetanol. En seguida, se hizo una mutagénesis con radiación UV y se fusionaron protoplastos de la *Candida shehatae* con protoplastos de la *S. cerevisiae*, originando una nueva cepa F6, que resultó ser 28% más efectiva en la producción de etanol que la cepa original de *Candida shehatae*, produciendo 18,75 g/L de etanol a partir de 50 g/L de xilosa.

### **g) *Escherichia coli* genéticamente modificada**

La *Escherichia coli* es una de las bacterias más estudiadas y utilizadas en el mundo, siendo uno de los microorganismos que tiene descifrado su mapa genético. Para la producción de etanol, un gran desarrollo en ingeniería genética viene siendo hecho por la equipe del Dr. Lonnie Ingram, de la Universidad de Florida, en EE.UU. Inicialmente trabajaron para modificar la actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa combinando genes de la *Zymomonas mobilis*, creando la cepa ATC 11303. Esta sufrió mutaciones para aumentar el nivel de producción de etanol, creándose la cepa KO4. A través de la supresión del gen que codifica la generación de ácido succínico, uno de los principales co-productos generados por la *E.coli*, se formó una nueva cepa, denominada KO11, que era capaz de convertir la glucosa y xilosa a etanol próximos a valores del 100% teórico. Para mejorar aún más la producción de etanol a partir de pentosas, esta cepa ha sufrido nuevas mutaciones, donde 2 nuevas cepas, la SL28 y SL40, fueron seleccionadas por producir 20% más etanol tanto con pentosas cuanto con hexosas. A pesar de los grandes avances, nuevas investigaciones continuaron siendo hechas para aproximar cada vez más la *E. coli* de un posible uso a escala industrial (Kuhad et al., 2011).

Geddes et al. (2011) utilizó una cepa de *E. coli* denominada MM160, derivada de la LY180. Como resultado de 2 años de práctica de subcultivo (siembra de material ya establecido in-vitro), 461 transferencias de material genético y 2000 generaciones. La nueva cepa fue capaz de resistir con una mayor efectividad al furfural, 5-HMF y acetato producidos durante el pretratamiento. Además, fue capaz de producir 0.21 g de etanol por gramo de bagazo de caña de azúcar después de 122 horas de fermentación.

Nieves et al. (2011) utilizó la *E. coli* MM170, derivada de la cepa MM160, que es capaz de producir etanol como producto primario de la fermentación. La nueva cepa posee genes derivados de la *Zymomonas mobilis* relacionados a la expresión de la enzima piruvato descarboxilasa y de dos tipos de alcohol deshidrogenasa, además de la supresión de genes ligados a distintos caminos fermentativos. Esta nueva cepa fue capaz de producir entre 0.25 a 0.27 gramos de etanol por cada gramo de bagazo de caña de azúcar en 80 litros de



medio de fermentación, incluso disminuyendo el tiempo de fermentación con la suplementación de aire.

Geddes et al. (2013) trabajaron con una evolución de la cepa MM170, denominada de *E. coli* SL100. Esta nueva cepa fue seleccionada a partir de diversos cultivos en un medio preparado con 50% de hidrolizado y la otra mitad de AM1, y también lleva incorporados algunos genes de la *Zymomonas mobilis* conjuntamente con la anulación de algunos propios genes que actúan en competición con la ruta fermentativa. Los rendimientos alcanzaron entre 0.27 a 0.28 g de etanol por gramo de bagazo de caña de azúcar.

## 8. Integración de Procesos

Dependiendo de la manera en que se son realizadas la hidrólisis y la fermentación, se pueden distinguir siete configuraciones de procesos, en el presente trabajo se utilizarán las seis primeras: Hidrólisis y Fermentación por Separado (HFS) con la posibilidad de utilizar una fermentación conjunta de pentosas y hexosas, donde el proceso pasa a denominarse Hidrólisis y Co-Fermentación por Separado (HCFS); realizar la hidrólisis y la fermentación en un mismo reactor, proceso llamado de Sacarificación y Fermentación Simultaneas (SFS) con la misma posibilidad del anterior, en donde se tiene la Sacarificación y Co-Fermentación Simultaneas (SCFS); realización de una pre-sacarificación con tiempo reducido e incorporación del microorganismo fermentador en el mismo reactor, denominado Pre-Sacarificación y Fermentación Simultánea (PSFS), también con la variante co-fermentativa, en proceso llamado de Pre-Sacarificación y Co-Fermentación Simultánea (PSCFS); y por fin el Bioproceso Consolidado (BPC), en que la producción de enzimas, hidrólisis enzimática y co-fermentación es realizada por un único microorganismos.

### 8.1 HFS/HCFS

El proceso de Hidrólisis y Fermentación por Separado se realiza en dos etapas, siendo primero la biomasa lignocelulósica pretratada degradándose en unidades monoméricas a través de enzimas, seguido de la fermentación de estos azúcares a etanol. Una de las principales ventajas de este proceso es que las dos etapas se realizan en sus respectivas condiciones óptimas. Sin embargo, el principal inconveniente es la acumulación de azúcares que pueden inhibir las enzimas, que afecta en última instancia al rendimiento de etanol (Jambo et al. (2016); Vohra et al., 2014).

### 8.2 SFS/SFCS

En la Sacarificación y Fermentación Simultáneo, la liberación de los azúcares monoméricos y su consumo hacia la producción de etanol ocurren en el mismo reactor. Esta configuración elimina el problema de inhibición de las enzimas por acumulación de azúcares, es más económico por reducir el número de equipos y la presencia de etanol en el caldo reduce las posibilidades de contaminación. La principal desventaja es que enzimas y microorganismos fermentadores en general no trabajan en sus condiciones óptimas, una vez que la hidrólisis enzimática funciona mejor alrededor de los 50 °C mientras la fermentación entre 28 y 37°C. Dos posibles soluciones para este problema serian bajar la temperatura óptima de las enzimas a través de Ingeniería de Proteínas o utilización de cepas termotolerantes, siendo más viable actualmente la utilización de microorganismos



que puedan trabajar a temperaturas próximas de la hidrólisis. Una típica SFS tarda de 3 a 6 días (Rastogi y Shrivastava, 2017; Jahnvi et al., 2017; Maity, 2015).

La Sacarificación y Co-Fermentación se orienta a la asimilación de todos los azúcares anteriormente liberados durante el pretratamiento y la hidrólisis enzimática, pudiendo ser llevado a cabo a través de un conjunto de microorganismos capaces de fermentar hexosas y pentosas separadamente, o un único microorganismo capaz de fermentar ambos azúcares. Ventajas como bajo coste, menor tiempo de operación, menor riesgo de contaminación, menos efectos inhibitorios y eliminación del problema de crecimiento desigual en el medio hacen con que la tecnología de un solo microorganismo esté en creciente investigación (Rastogi y Shrivastava, 2017).

### **8.3 PSFS/PSCFS**

Una variación de los procesos de SSF/SSCF es la realización de una etapa de prehidrólisis o pre-sacarificación, denominada de Pre-Sacarificación y Fermentación Simultánea o Sacarificación y Fermentación Semi-Simultánea. En esta configuración hay una rápida etapa de licuefacción del medio, ofreciendo condiciones más adecuadas para la fermentación y permitiendo mayores rendimientos de etanol. Generalmente se realiza cuando hay altas cargas de sólido (Fang et al., 2017). La PSFS es considerada un proceso entre la SFS y HSF, y se espera que tenga una mayor productividad y rendimiento en comparación a la SFS y HSF, desde que se seleccione un tiempo de prehidrolización adecuado (Shen y Agblevor, 2010).

## **9. Destilación**

Después de pasar por el proceso de fermentación, es necesario purificar el líquido obtenido con vistas a la producción de etanol combustible. En la destilación, se utiliza una diferencia existente en el punto de ebullición de los componentes de la mezcla para la separación de cada uno. Muchas técnicas se han desarrollado para traer un mejor rendimiento al proceso y pueden ser, según Kumar et al. (2010):

### **9.1 Destilación por adsorción**

El método de destilación por adsorción está basado en la utilización de un tamiz molecular que separa el etanol de la mezcla con agua de acuerdo con el tamaño de sus aberturas. Así, un tamiz de 3 Å de diámetro es capaz de separar esta mezcla, una vez que las moléculas de agua tienen 2,5 Å y las de etanol 4 Å de diámetro (Kupiec et al., 2014). La capacidad de adsorción de las moléculas blanco a través de los tamices moleculares está directamente relacionada a la presión y temperatura: las moléculas de agua son adsorbidas a bajas temperaturas y altas presiones y se regeneran con estas condiciones al revés (Loy et al., 2015). Varios materiales vienen siendo probados para este fin, desde orgánicos como el almidón hasta inorgánicos como zeolitas, siendo determinante la forma, longitud y estructura química de sus nanoporos (Taheri et al., 2017).

Para el proceso, son necesarios dos tamices moleculares. En la columna de alimentación de la mezcla agua-etanol se pone uno, que va adsorbiendo las moléculas de agua ininterrumpidamente a medida que la corriente de esta mezcla sigue fluyendo, hasta que alcanza su máxima capacidad de adsorción. Una vez lleno, a través de un sistema de

automatización o válvula de control, se reemplaza por un nuevo tamiz mientras el otro pasa por el sistema regenerativo, siguiendo así el proceso (Kumar et al., 2010). Un esquema de este método puede ser visto en la Figura 33.

Uno de los principales desafíos en la destilación por adsorción es la regeneración de los tamices. Aunque los tamices inorgánicos sean reutilizables, son necesarias altas temperaturas (próximo a 288 °C) y largos periodos de tiempo (entre 2 a 4 horas) para que las moléculas de agua adsorbidas sean eliminadas, proyectándose un elevado consumo energético en la cadena productiva del bioetanol (Kumar et al., 2010).

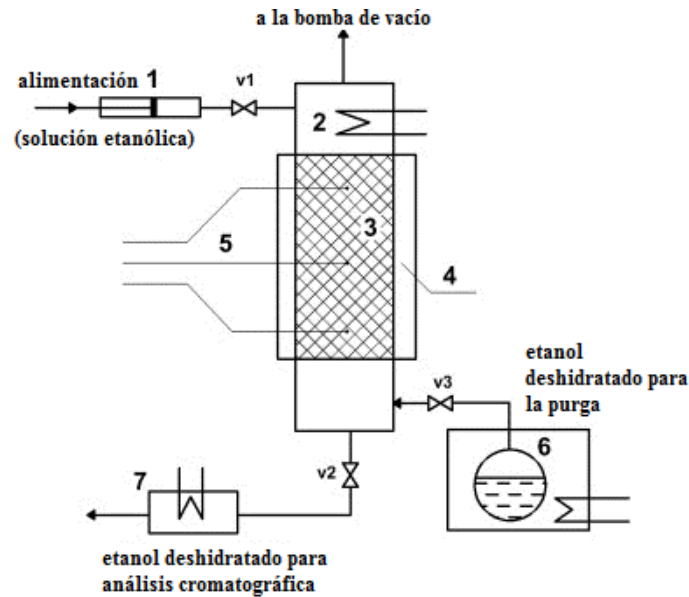


Figura 33. Esquema experimental de la destilación por adsorción. 1 - bomba; 2: vaporizador; 3 - tamiz para adsorción; 4 - Camisa calentadora; 5 - Termopares; 6 - Recipiente para el etanol purgado; 7 - Condensador. Fuente: adaptado de Kupiec et al. (2014).

## 9.2 Destilación azeotrópica

A través de este sistema de destilación, se añade un tercer componente a la mezcla binaria que va a formar un azeótropo de bajo punto de ebullición con uno de los componentes, permitiendo la separación del producto deseable (Chien et al., 2017; Avilés-Martínez et al., 2015). El nuevo azeótropo puede salir por la parte superior, donde se llama azeótropo de mínimo, o en la parte inferior, donde se llama azeótropo de máximo, mientras el producto de interés sale por el extremo opuesto de la columna. La adición de una segunda columna es necesaria para recuperar el agente utilizado para el arrastre.

Una ilustración de este proceso es ilustrada por la Figura 34. La mezcla entre agua, etanol y el componente de arrastre sale por la parte superior de la columna, mientras el etanol anhidro producido sale por la parte inferior. La mezcla es enfriada, condensada y enviada a un decantador, en lo cual ocurrirá la formación de una fase líquida y otra orgánica. La primera es enviada a la columna de recuperación para que se quite el agua por la parte inferior, de modo que la solución alcohólica es enviada nuevamente para la columna azeotrópica. La fase orgánica, compuesta del componente de arrastre, también vuelta a la columna azeotrópica para reiniciar el proceso (Aditiya et al., 2016).

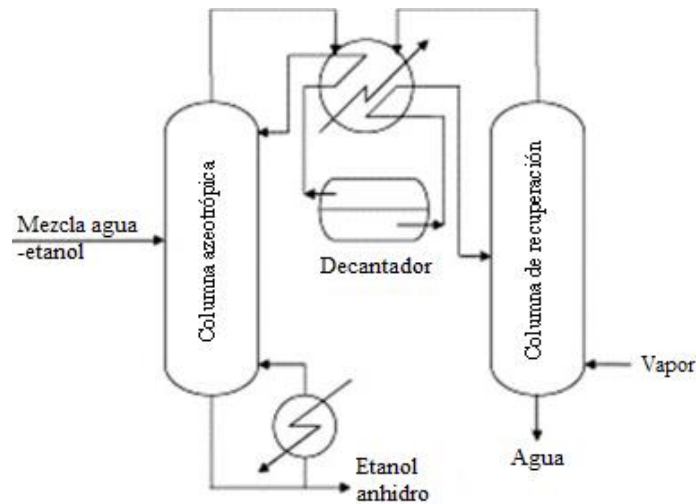


Figura 34. Esquema experimental de la destilación azeotrópica. Fuente: adaptado de Aditiya et al. (2016).

Algunas variantes de este proceso son la, que son la destilación azeotrópica heterogénea (HAD, con siglas en inglés) y la destilación de pared divisoria (DWC, con siglas en inglés). La HAD es aplicada a un sistema en lo cual coexiste un vapor con dos fases líquidas, utilizándose en general dos columnas. La primera sirve para la separación del producto y la segunda para recuperación del arrastre. En el caso de la mezcla etanol-agua, algunos estudios sugieren la utilización de una o dos columnas por más cuando se utiliza el benceno como arrastre. El DWC consiste en una columna de destilación que contiene una pared divisoria vertical en la sección central, y viene siendo tratada como una de las mejores opciones para ahorrar tanto energía cuanto capital, ya con realización de pruebas a nivel comercial (Le et al., 2015; Tabari y Ahmad, 2015).

### 9.3 Destilación por Deshidratación Química

En este proceso, bastante convencional para la producción de etanol anhidro, se hace uso de sustancias químicas altamente higroscópicas que atraen fuertemente las moléculas de agua y la separan del medio, obteniendo un compuesto con contenido en humedad extremadamente bajo. Uno de los compuestos más utilizados es la cal viva, en una proporción de 1:4,2 de agua: cal, donde ocurre la formación de óxido de calcio insoluble, dejando el etanol en la parte superior de la columna. Es posible un proceso de reciclaje para la utilización nuevamente de la cal, pero posee el inconveniente de demandar grandes cantidades de energía (Aditiya et al., 2016; Karimi et al., 2016).

### 9.4 Destilación por difusión

Citado por primera vez por Fullarton y Schlunder (1986), consiste en la evaporación de una mezcla debajo de su punto de ebullición que fluye hacia un canal que contiene un gas inerte, que actuará como un filtro permitiendo el pasaje de los componentes que tienen una difusión más rápida. En el caso de la mezcla agua-etanol, es el agua quien tiene la preferencia para pasar.

La eficacia de la destilación por difusión está relacionada a las diferencias de fricción del agua + inerte y alcohol + inerte en la fase vapor, de modo que esta diferencia es mayor cuanto más aumenta la masa molar del componente inerte. Así, gases como el CO<sub>2</sub> y Xe son



más eficaces que el nitrógeno, helio o el aire, que son más ligeros. También es relevante la opción por un material que reproduzca una difusión anti-Knudsen en sus poros, haciendo con que las partículas no colidan con la superficie interna proporcionando una separación más eficiente (Krishna, 2017).

### **9.5 Destilación Extractiva**

La destilación extractiva es generalmente empleada en la separación de una mezcla azeotrópica binaria u otras mezclas con punto de ebullición próximo, con la volatilidad relativa de componentes ligeros y pesados por debajo de 1,1 (Errico et al., 2013; Liang et al., 2014). En este proceso, se adiciona un nuevo disolvente que induce una mayor volatilidad relativa de los componentes ligeros y pesados del medio sin la formación de un nuevo azeótropo, con los componentes ligeros situándose en la parte superior de la columna extractiva y los componentes pesados juntamente con el disolvente van para el fondo, separándose fácilmente mediante una columna de recuperación de disolvente. La selección de este disolvente debe ser realizada bajo criterios que tengan como principal objetivo la reducción del consumo energético y de disolventes. Los principales disolventes estudiados para este fin son glicoles, gasolina, glicerol y más recientemente líquidos iónicos (Zhu et al., 2016; Tsanas et al., 2014; Verma y Banerjee, 2010.; Zhao et al., 2017).

### **9.6 Destilación por membrana**

En este proceso, se utiliza una membrana hidrófoba microporosa que permite el pasaje de una fase vapor al mismo tiempo que impide el pasaje de una fase líquida y todos sus componentes disueltos, que se quedan retenidos en la membrana. Típicamente, polímeros orgánicos son utilizados como membrana, aunque metales y cerámicas también se aplican para este fin. Este tipo de destilación tiene una mayor utilidad en el tratamiento de aguas residuales, procesamiento de lácteos, separación de componentes volátiles y desalación de agua del mar, obteniendo mucho progreso en los últimos 10 años permitiendo su uso a escala industrial (Eykens et al., 2017; Wang y Chung, 2015; Sanmartino et al., 2017).

El funcionamiento simplificado de la destilación por membrana puede ser visto en la Figura 35. Una diferencia de presión de vapor es creada sobre la membrana a partir de la diferencia de temperatura creada por una solución caliente que alimenta el sistema, típicamente a 80°C, y otra solución de permeado en frío. Ocurre entonces la evaporación del líquido de alimentación en el poro de la membrana (1), que induce a la difusión de las moléculas de vapor a través de la membrana (2), ocurriendo la condensación (3) en el lado permeado. Dependiendo del tamaño de los poros de la membrana, la trayectoria libre media de las moléculas y la presencia de aire en los poros se pueden producir diferentes regímenes de difusión, como el de Knudsen, Poiseuille o difusión molecular. Vale destacar que este sistema acepta la utilización de energías renovables para el ahorro de calor, como la energía solar y térmica, además de producir un producto de elevada pureza (Eykens et al., 2017; Luo y Lior, 2017).

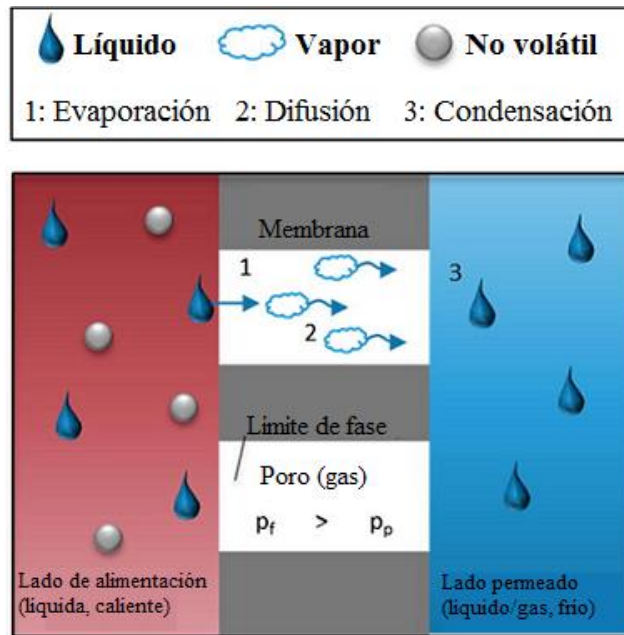


Figura 35. Esquema simplificado de la destilación por membrana. Fuente: adaptado de Eykens et al., (2017).

### 9.7 Destilación a vacío

En la destilación a vacío, la bajada de presión hace aumentar la concentración de etanol en la mezcla etanol-agua, haciendo que la mezcla pueda separarse por procesos de destilación convencional. Exige dos columnas, una que realice la operación en vacío y la otra que realice el proceso convencional, no siendo muy práctico desde el punto de vista industrial (Kamzon et al., 2016).



## II. Aportaciones científicas y avances del presente trabajo

---



Aunque muchas investigaciones se hayan dedicado a la obtención de etanol de segunda generación con la poda de olivo, este trabajo se diferencia por aportar algunas novedades en esta área:

- Uso del Hidróxido de Amonio y Carbón Activo como detoxificantes del material pretratado proveniente de la poda de olivo: el carbón activo es un material muy empleado como detoxificante de materiales pretratados de diversas materias primas, pero no han sido encontrados registros de su utilización en la poda de olivo. El hidróxido de amonio, por su parte, ha sido muy poco utilizado como sustancia detoxificante en el proceso de producción del etanol de segunda generación, siendo uno de los métodos de disminución de inhibidores utilizados por el presente trabajo sobre la poda de olivo.

- Utilización de nuevas configuraciones en la fermentación de la fracción sólida de la poda de olivo: hasta ahora en la bibliografía consultada, apenas tres configuraciones incluyendo las etapas de hidrólisis enzimática y fermentación habían sido probadas utilizando la fracción sólida de la poda de olivo: Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS), Hidrólisis y Fermentación por Separado (HFS) y Pre-Sacarificación y Fermentación Simultánea (PSFS). Este trabajo, además de estas tres anteriores, es pionero en probar otras tres configuraciones (Sacarificación y Co-Fermentación Simultánea [SCFS], Hidrólisis y Co-Fermentación por Separado [HCFS] y Pre-Sacarificación y Co-Fermentación Simultánea [PSCFS]) y hacer un estudio comparativo entre ellas.

- Empleo de microorganismos recombinantes sobre el slurry de la poda de olivo: el uso de un microorganismo recombinante como la *Escherichia coli* SL100 capaz de fermentar conjuntamente pentosas y hexosas del material hidrolizado sin la necesidad de separarlo en distintas fracciones es una novedad cuando se habla de la poda de olivo como materia prima. En la mayor parte de la bibliografía se hace una separación entre el líquido y el sólido que sale del pretratamiento y los trata separadamente, o utilizan co-cultivos con el objetivo de metabolizar pentosas y hexosas empleando más de un microorganismo.

- Empleo de aireación en el slurry proveniente de la poda de olivo: la inyección de aire sobre el medio fermentativo viene siendo reportado en la bibliografía como un acelerador de la fermentación y un factor de incremento en los rendimientos en bioetanol. Este tipo de operación no ha sido objeto de estudio con la biomasa del olivar, siendo investigado por el presente trabajo.



## III. Objetivos

---

1. Objetivo general
2. Objetivos específicos



## 1. Objetivo general

Proponer un esquema eficiente de producción de etanol a partir de poda de olivo.

Para ello, se compararán distintas estrategias de detoxificación para la fracción líquida y distintas configuraciones de proceso para la fracción sólida provenientes del pretratamiento combinado térmico-ácido, seleccionando las mejores condiciones para la fermentación del *slurry*.

## 2. Objetivos específicos

- Determinar la composición de la materia prima y del sólido y líquido obtenidos después del empleo de pretratamiento combinado térmico-ácido.
- Emplear distintas metodologías de detoxificación (carbón activo, *overliming* e hidróxido de amonio) sobre la fracción líquida, evaluando su eficiencia sobre los compuestos de inhibición y degradación de azúcares.
- Investigar distintas configuraciones entre hidrólisis enzimática y fermentación (SFS, SCFS, HFS, HCFS, PSFS, PSCFS) sobre la fracción sólida.
- Evaluar el rendimiento de los procesos fermentativos en ambas fracciones, a través del empleo de dos microorganismos con distintas características metabólicas: *Saccharomyces cerevisiae* "Ethanol Red" y *Escherichia coli* SL100.
- Seleccionar, teniendo en cuenta criterios técnicos (rendimiento del proceso, productividad en etanol, etc.) y demás características que sean interesantes para un incremento de la escala del proceso (tiempo de fermentación, tasa de consumo de azúcares, inhibición de los agentes fermentadores, etc.), el mejor método de detoxificación y mejores configuraciones fermentativas del sólido para realizar ensayos sobre el *slurry*.
- Estudiar el efecto de la variación en la carga de sólidos iniciales y la inyección de aire en el sistema fermentativo.
- Proponer un esquema óptimo de producción de etanol de segunda generación a partir de la poda de olivo dentro de las condiciones ensayadas.



## IV. Metodología

---

1. Introducción a la metodología
2. Materia prima
3. Pretratamiento
4. Caracterización de las fracciones sólida y líquida pretratadas
5. Detoxificación de la fracción líquida
6. Microorganismo y preparación del inóculo para las distintas configuraciones
  - 6.1 *Saccharomyces cerevisiae*
  - 6.2 *Escherichia coli* SL 100
7. Fermentación de la fracción líquida
8. Características de las configuraciones adoptadas para la fermentación del sólido
  - 8.1 HFS – Hidrólisis y Fermentación por Separado
  - 8.2 HCFS – Hidrólisis y Co-Fermentación por Separado
  - 8.3 SFS – Sacarificación y Fermentación Simultáneas
  - 8.4 SCFS – Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas
  - 8.5 PSFS – Pre-Sacarificación y Fermentación Simultáneas
  - 8.6 PSCFS – Pre-Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas
9. Preparación y Detoxificación del slurry
  - 9.1 Hidrólisis Enzimática + Fermentación del slurry
  - 9.2 Hidrólisis Enzimática + Fermentación en la mejor configuración en reactor de mayor capacidad y con aeración slurry



## 1. Introducción a la metodología

La metodología general del presente trabajo está mostrada en la Figura 36, y fue dividida en dos partes. Las tres primeras etapas fueron realizadas por la alumna del Máster en Energías Renovables Irene Gómez Cruz (2017) para la realización de su Trabajo Fin de Máster. La parte restante es el objetivo del presente estudio, conteniendo la detoxificación, hidrólisis enzimática y fermentación utilizando distintas configuraciones.

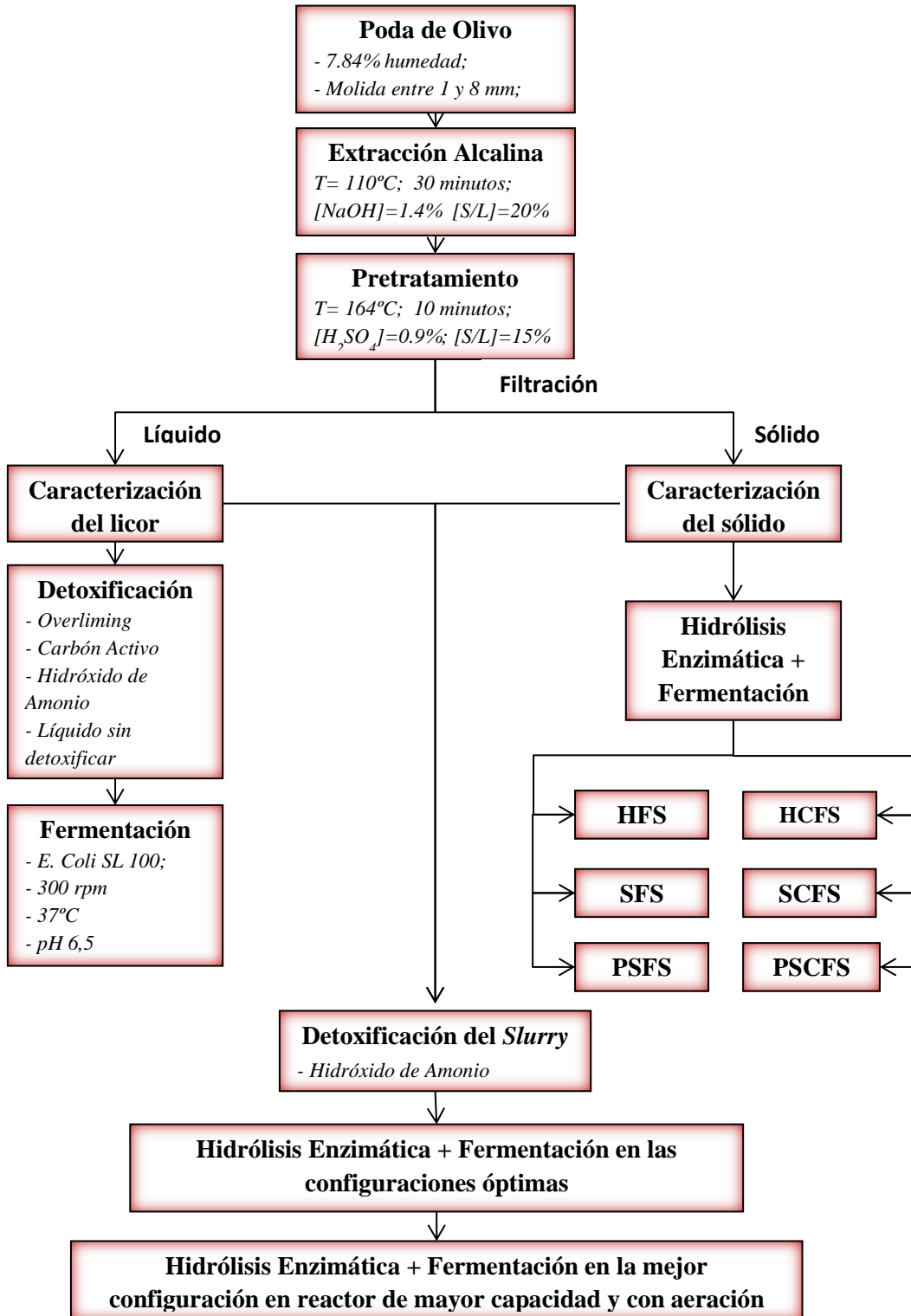


Figura 36. Esquema de la metodología adoptada en el presente trabajo.

## 2. Materia prima

Se ha seleccionado la poda de olivo como materia prima para la producción del bioetanol de segunda generación por ser un residuo de abundancia local con elevado contenido en azúcares, siendo una fuente potencial para la obtención de biocombustibles que no compite con la producción de alimentos.

La poda fue recogida en el campo tras la cosecha de la aceituna en el año de 2015. En el laboratorio, este residuo fue secado a temperatura ambiente, llegando a 7,84% de humedad. Posteriormente, utilizando un molino de cuchillas tipo Retsch SM 100 se realizó la molienda de la poda hasta obtener un tamaño de partícula entre 1 y 8 milímetros, que fue almacenada hasta su uso. El molino utilizado puede ser visto en la Figura 37.



**Figura 37. Molino tipo Retsch, modelo SM 100, utilizado para la molienda de la poda de olivo.** Fuente: Autor.

Después de esta etapa, se procedió a determinar las condiciones óptimas de una extracción básica con NaOH del sólido (resumidas en la Tabla 9), con el fin de eliminar componentes no estructurales que pueden interferir de manera negativa en las etapas siguientes de la producción del bioetanol. Para eso, se tomó por base el informe técnico del Laboratorio Nacional de Energías Renovables de Estados Unidos (NREL) de código NREL/TP-510-42619, que trata de la determinación de extractos en la biomasa. Basado en este informe y empleando un diseño de experimentos Box-Behnken con auxilio del software estadístico *Design Expert 7.0.0*, las siguientes condiciones fueron propuestas y probadas, utilizando para eso un autoclave, mostrada en la Figura 38. Para cada ensayo fueron pesados 50 gramos de poda totalmente seca (relación 20% S/L).

También fue realizada la caracterización de la materia prima para conocer su contenido en carbohidratos estructurales, lignina, cenizas y grupos acetilo siguiendo la metodología propuesta por el NREL de código NREL/TP-510-42618, que se encuentra en el Anexo 1.



Figura 38. Autoclave utilizada para el proceso de extracción. Fuente: autor.

Tabla 9. Condiciones de extracción propuestas según diseño de experimento Box-Behnken obtenido con el software estadístico *Design Expert 7.0.0*.

	Condiciones de Extracción		
	T (°C)	[NaOH] (g/L)	Tiempo (minutos)
Ensayo 1	120	0,5	30
Ensayo 2	130	0,5	60
Ensayo 3	130	2	60
Ensayo 4	120	1,25	60
Ensayo 5	120	1,25	60
Ensayo 6	120	0,5	90
Ensayo 7	120	2	90
Ensayo 8	120	1,25	60
Ensayo 9	110	1,25	30
Ensayo 10	120	1,25	60
Ensayo 11	130	1,25	90
Ensayo 12	110	0,5	60
Ensayo 13	120	2	30
Ensayo 14	120	1,25	60
Ensayo 15	110	1,25	90
Ensayo 16	110	2	60
Ensayo 17	130	1,25	30

### 3. Pretratamiento

En la realización del pretratamiento combinado térmico + ácido, fueron considerados los estudios conducidos por Martínez-Patiño et al. (2017a), en el que las condiciones óptimas aplicadas a la poda de olivo para una mayor recuperación de azúcares están resumidas en la Tabla 10. Un total de tres ensayos fueron realizados para la obtención de una cantidad suficiente de material para las etapas siguientes.

Tabla 10. Condiciones óptimas de pretratamiento según Martínez-Patiño et al. (2017a).

Condiciones Óptimas	
Relación Sólido/Líquido (%)	15
Temperatura (°C)	164
Tiempo (minutos)	10
Catalizador (p/v)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,9%

El reactor utilizado fue el modelo Parr (Parr Instrument Company, EE.UU.), con capacidad para 2 litros, y que puede ser visualizado en la Figura 39.



Figura 39. Reactor Parr utilizado para el pretratamiento. Fuente: autor. Datos: 1 - Manómetro; 2 - Termopar; 3 - Controlador de temperatura y agitación; 4 - Camisa de calefacción; 5 - Vaso de reacción; 6 - Sistema de agitación.

Después de realizado el pretratamiento, se obtuvo una mezcla de sólido y líquido denominada *slurry*. En este momento se hizo una filtración con el objetivo de separar cada una de las fases y caracterizarlas mediante distintos procedimientos. El sólido fue sometido a un lavado con agua hasta alcanzar un pH cercano al neutro y puesto en estufa entre 30 y 40 °C para eliminar el exceso de humedad.

#### 4. Caracterización de las fracciones sólida y líquida

Con respecto a la caracterización de la fracción sólida, se siguió el procedimiento NREL/TP-510-42618, el mismo anteriormente utilizado con la materia prima, para la determinación de azúcares celulósicos e hemicelulósicos y el contenido en lignina. Por otro lado, en la fracción líquida se determinó: el pH, mediante el uso de pHmetro digital (Figura 40); composición en azúcares celulósicos y hemicelulósicos (glucosa, xilosa, galactosa, manosa y arabinosa) y compuestos inhibidores (ácido acético, ácido fórmico, furfural y HMF) mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC por sus siglas en inglés); y fenoles totales, a través de espectrofotometría. La metodología seguida para la determinación de fenoles totales se ha basado en el procedimiento establecido por Singleton y Rossi (1965). Una alícuota de 0,5 mL de cada muestra se ha mezclado con 3,75 mL de agua, 0,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteau (1:1 v/v) y 0,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% p/v. El mismo procedimiento se ha hecho para el blanco y para el ácido gálico (patrón),

sustituyéndose la cantidad de muestra por agua y distintas concentraciones de ácido gálico, respectivamente. Después de una hora en oscuridad, se midió la absorbancia de las mezclas a 765 nm y se construyó una curva de calibración para el ácido gálico, siendo los resultados del contenido fenólico total en los prehidrolizados expresados como gramos de ácido gálico equivalente.

El HPLC utilizado para la medición de inhibidores, azúcares y etanol fue el modelo Hewlett-Packard 1100 (Palo Alto, CA, EE.UU.) con columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Hercules, CA, EE.UU.) operando a 65 °C con solución 5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eluyente y flujo de operación de 0,6 mL/minuto. Esta columna no es capaz de separar la xilosa, galactosa y manosa, entregando la suma de los tres azúcares, que se llamará en el presente trabajo XGM (Xilosa, Galactosa y Manosa). Un segundo HPLC (Waters, Milford, EE.UU.), equipado con columna CARBOsep CHO-782 PB (Transgenomic Inc, Omaha, EE.UU.), operando a 70°C con agua ultrapura como fase móvil y a un flujo de 0,6 ml/minuto fue utilizado para medir la composición exacta de los azúcares monoméricos, para determinar la composición exacta del XGM. Ambos equipos son ilustrados por las Figuras 41A y 41B.

Con el fin de determinar la concentración de azúcares oligoméricos en los prehidrolizados, se realizó una post-hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3% p/v a 120 °C por 20 minutos, comparándose el contenido en azúcares antes y después de la post-hidrólisis. Para eso, se utilizaron ambos HPLC (Waters, Milford, EE.UU., equipado con columna CARBOsep CHO-782 PB [Transgenomic Inc, Omaha, EE.UU.], y Hewlett-Packard 1100 [Palo Alto, CA, EE.UU.] con columna Aminex HPX-87H [Bio-Rad Hercules, CA, EE.UU.]).



**Figura 40. pHmetro digital utilizado en los ensayos. Los recipientes rojo, verde y azul contienen solución con pH conocido, destinados a la calibración del equipo. Fuente: Autor.**



Figura 41. "A": HPLC (Waters, Milford, EE.UU.); "B": HPLC Hewlett-Packard 1100 (Palo Alto, CA, EE.UU.).  
Fuente: autor.

## 5. Detoxificación de la fracción líquida

A partir del líquido, fueron preparados cuatro licores partiendo de distintas estrategias de detoxificación. Además de los tres métodos citados a continuación, una fracción del líquido no fue sometida a ningún proceso de detoxificación para comprobar si existía la necesidad real de esta etapa en el proceso, pasando el líquido simplemente por un ajuste de pH a las condiciones fermentativas y centrifugación para eliminación de sólidos. Para cada método fueron utilizados entre 320 y 350 mL de prehidrolizado, que tenía un pH inicial de 1,84, siendo todos los ensayos conducidos en matraces Erlenmeyer de 1L y con agitación orbital (agitador "Optic Ivymen System", mostrado en la Figura 42).



Figura 42. Agitador orbital "Optic Ivymen System". Fuente: Autor.



- **Detoxificación mediante Overliming:** este método consistió en subir el pH hasta 10 con el uso de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y mantener durante 30 minutos, a  $50^\circ\text{C}$  y 200 rpm de agitación, pasando por una posterior centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos para retirada de cualquier precipitado que se haya formado. La cantidad de licor fue medida al final para determinar la pérdida en volumen del proceso.

- **Detoxificación con Carbón Activo:** este método consistió en añadir 5% en masa de carbón activo con respecto al volumen de líquido a ser detoxificado y mantener durante 30 minutos a  $50^\circ\text{C}$  y 200 rpm. El líquido fue recuperado a través de proceso de filtración a vacío.

- **Detoxificación con Hidróxido de Amonio:** para este método se utilizó una solución 5N de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , añadiéndose una determinada cantidad hasta alcanzar el pH 9, observando las mismas condiciones de temperatura, tiempo y velocidad de agitación de los métodos anteriores. La recuperación del licor se hizo a través de centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos.

La Tabla 11 resume las condiciones, así como los volúmenes iniciales y recuperados en cada método.

**Tabla 11. Resumen de las condiciones operativas, el volumen recuperado de hidrolizado, para cada método de detoxificación estudiado.**

Método	Volumen inicial prehidrolizado (ml) (pH=1,84)	Cantidad añadida	Condiciones	Separación	Vol. Recuperado (ml)
Overliming	350	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ hasta pH 10	Matraz enlermeyer 1L, $50^\circ\text{C}$ , 200 rpm (orbital SI-600), 30 min	Centrifugación 5000 rpm, 5 min	325
Carbón activo	350	5% p/v (17,5 g)	Matraz enlermeyer 1L, $50^\circ\text{C}$ , 200 rpm (orbital SI-600), 30 min	Filtrado (papel de filtro) a vacío	320
$\text{NH}_4\text{OH}$ 5N	350	5,4 ml hasta pH 9	Matraz enlermeyer 1L, $50^\circ\text{C}$ , 200 rpm (orbital SI-600), 30 min	Centrifugación 5000 rpm, 5 min	325

Una vez finalizado los procesos de detoxificación de los licores, estos fueron almacenados a temperatura ambiente hasta el día siguiente (aproximadamente 12 horas). El pH fue entonces ajustado para adecuarse a las condiciones fermentativas (ver Tabla 12).

**Tabla 12. Ajuste de pH realizado para cada licor.**

Licor	pH inicial	Ajuste pH	pH final
Prehidrolizado centrifugado	1,84	Pastillas KOH (85%)	6,43
Carbón Activo	1,87	Pastillas KOH (85%)	6,57
Overliming	8,58	$\text{H}_2\text{SO}_4$ (96%)	6,53
$\text{NH}_4\text{OH}$	8,57	$\text{H}_2\text{SO}_4$ (96%)	6,65



## 6. Microorganismo y preparación del inóculo para las distintas configuraciones

En el presente trabajo, dependiendo de la configuración adoptada, se emplearon dos tipos de microorganismo: *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* SL100, genéticamente modificada.

### 6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Para la preparación del inóculo de *S. cerevisiae* cepa "Ethanol Red" (FERMENTIS, France), se cogió la levadura liofilizada en forma de gránulos y se disolvió en 250 mL de medio líquido basal (MLB) previamente esterilizado en autoclave a 120 °C y 20 minutos para su reactivación, mostrándose los componentes y respectivas concentraciones del MLB en la Tabla 13.

Tabla 13. Componentes y concentraciones del medio MLB.

Componente	Concentración (g/L)
Extracto levadura	5
NH <sub>4</sub> Cl	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3
Glucosa	20

Después de pasar 24 horas en orbital a 30°C y 150 rpm, se resiembra al 4% en un nuevo medio MLB autoclavado, dejando por otro período de 24 horas en orbital a 35 °C y 150 rpm. Para verificar que hubo un crecimiento adecuado, se midió la absorbancia (densidad óptica) en espectrofotómetro a 420 nm de longitud de onda. Para un crecimiento satisfactorio, la densidad óptica debe ser más que 1,0 después de 24 horas.

### 6.2 *Escherichia coli* SL 100

La cepa de *E.coli* utilizada es derivada de la MM170 (Nieves et al., 2011a), que con la ayuda de genes incorporados de la bacteria *Zymomonas mobilis* (*pdC*, *adhA* y *adhB*) y supresión de otros genes que creaban caminos de competición con la fermentación alcohólica (*IdhA*, *adhE*, *frdBC*, *msgSA*) es capaz de producir etanol como producto primario (Geddes et al., 2013).

Inicialmente, fue preparado el medio AM1 (Martínez et al., 2007) para el crecimiento del microorganismo, cuyos componentes están listados en la Tabla 14. Para ello, se preparaban soluciones stock de los diferentes compuestos, y dependiendo del volumen de medio se añadían las cantidades necesarias. Cada una de las soluciones era esterilizada a través de filtros con porosidad de 0,2 micras.



**Tabla 14. Componentes del medio AM1. Los elementos de 9 a 15 se denominan elementos traza, y su preparación se realiza en una única solución.**

Nº	Componente	Concentración en el medio de cultivo (g L <sup>-1</sup> )
1	Xilosa	16
2	Glucosa	10
3	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,63
4	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,87
5	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,246
6	KCl	0,149
7	Betaína	0,117
8	Ácido Cítrico	0,1
9	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,6
10	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,2
11	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1
12	ZnCl <sub>2</sub>	0,2
13	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2
14	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05
15	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,33

Ya con medio preparado, se cogían criotubos almacenados a -80°C que contenían la *E. coli* SL100, que se dejaban atemperar y entonces se ponían en el medio AM1 para su crecimiento durante 24h a 37 °C y 200 rpm.

## 7. Fermentación de la fracción líquida

Se prepararon 2 recipientes de 300 ml de capacidad (de ahora en adelante denominados “minifermentadores”), para cada licor (un total de 8), añadiéndose a cada uno 150 mL de licor y los componentes del medio AM1 con excepción de las sales de amonio, además de metabisulfito de sodio (1,5 mM) justo antes del microorganismo. Acreditado que el metabisulfito de sodio es capaz de reducir la toxicidad del medio fermentativo además de mejorar la metabolización de la xilosa por parte de la *E. coli* (Nieves et al., 2011b). El pH fue ajustado a 6,5 e inoculada la *E.coli* SL100. En la inoculación, se busca conseguir una concentración de células secas de 0,5 g por cada litro de medio, que a través de análisis de recta de calibrado hecha anteriormente para la *E. coli* se sabe que es equivalente a una densidad óptica de 1,5 a 420 nm de longitud de onda. Las células son entonces centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos y resuspendidas con el licor de fermentación en campana de flujo laminar, y por fin inoculadas al medio fermentativo.

El equipo donde se realizó la fermentación está ilustrado en la Figura 43. Los minifermentadores son puestos sobre placas de agitación y sumergidos en agua hasta por encima del volumen del medio fermentativo, manteniéndose a una temperatura uniforme de 37 °C en el baño termostático. Sobre el agua se ponen trozos de poliestireno expandido con el fin de disminuir la evaporación del agua y ayudar a mantener su temperatura. El equipo posee un sistema automático de ajuste del pH con hidróxido de potasio 2M, accionando una válvula para que gotee el KOH 2M cuando el pH baja de 6,4, y se apaga cuando el pH pasa 6,6. La sonda de pH y la conducción de silicona que lleva el KOH 2M se

encuentran encajadas en el tapón del minifermentador, que lleva además incorporado un filtro para la salida de CO<sub>2</sub> y una jeringa para la toma de muestras. Previamente al inicio de la fermentación, la sonda de pH es calibrada y la velocidad de goteo ajustada de tal forma que proporcione una subida gradual del pH.

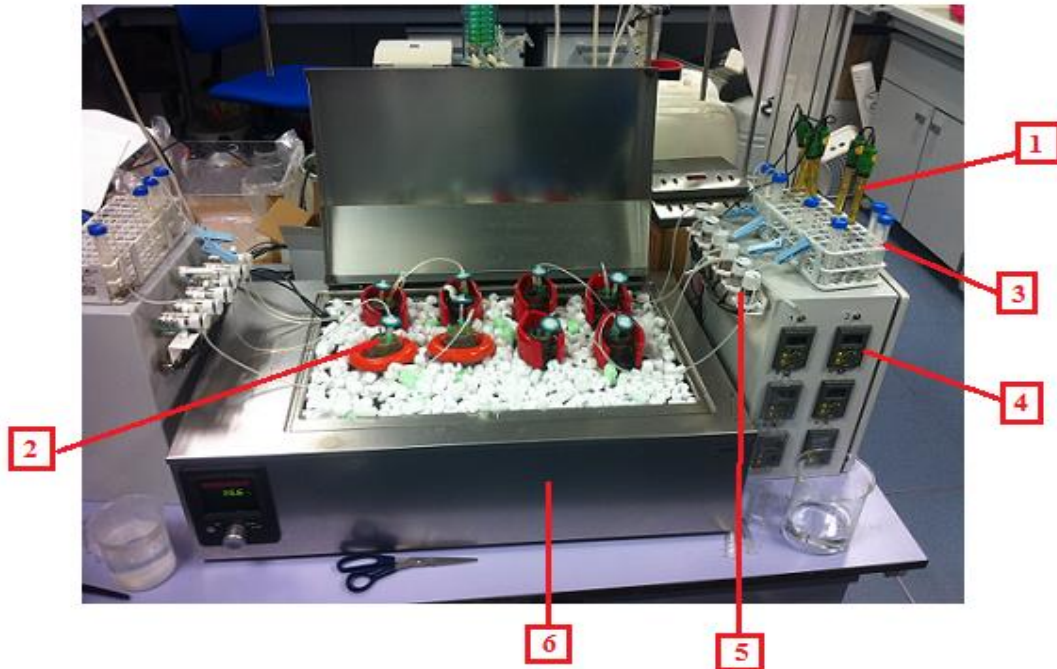


Figura 43. Equipo de fermentación. Las sondas de pH (1) se encajan sobre el tapón (2), que lleva incorporado el conductor de silicona del KOH, filtro para salida de gases y jeringa para toma de muestras. Al atingir un pH de 6,3 el sistema acciona la(s) válvula(s) (5) que inyectan el KOH 2M de los tubos (3) sobre el medio fermentativo. El sistema mantiene una temperatura constante gracias a la acción del baño termostatzado (6) y del poliestireno (material blanco sobre el agua). Se puede seguir las fluctuaciones del pH en las pantallas digitales (4) en donde también se puede parar totalmente la adición de KOH o mantenerlo de modo ininterrumpido.

## 8. Características de las configuraciones adoptadas para la fermentación del sólido

### 8.1 HFS – Hidrólisis y Fermentación por Separado

El inicio del proceso ocurre con la hidrólisis enzimática, en la cual se utilizaron matraces Erlenmeyer de 100 mL donde se pone el sustrato (que en este caso es el sólido pretratado) y una disolución enzimática compuesta de tampón cítrico-citrato 0,05M a pH 4,8 y enzimas celulasas suplementadas con  $\beta$ -glucanasa. La relación S/L empleada fue de 5% p/v (1,25 gramos de sustrato y 25 mL de disolución enzimática). El complejo celulítico utilizado fue el *Cellic Ctec-2*, en una proporción de 15 FPU/g<sub>sustrato</sub>, y la  $\beta$ -glucanasa en una proporción de 10% del volumen de enzima *Cellic Ctec-2*. El tampón cítrico-citrato se preparó a partir de distintas proporciones de ácido cítrico anhidro y citrato sódico 2-hidratado, ambos 0,1M, hasta pH 4,8.

Los ensayos se realizaron en triplicado de la muestra con un control de celulosa y otro control de disolución enzimática, con un total de cinco matraces. La velocidad de agitación era de 150 rpm, con una temperatura de 50°C y duración de 72 horas, tomándose 1 mL de muestra de cada matraz a cada 24 horas. Todas las muestras eran centrifugadas a 10.500



rpm por 10 minutos y pasadas por filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  antes de llevarse a HPLC para determinar su composición.

Transcurridas las 72 horas, se prepara la etapa de fermentación, inoculándose al 4% v/v un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* a 0,25 g/L (se centrifuga y resuspende con el medio de fermentación), a la misma velocidad de agitación de la HE pero con la temperatura a 37°C. El tiempo de muestreo también se daba a cada 24 horas y en las mismas condiciones que la HE.

## 8.2 HCFS – Hidrólisis y Co-Fermentación por Separado

En este método, la HE sigue las mismas condiciones de las explicadas para el HFS, cambiándose algunas características al transcurrir las 72 horas y seguir con la etapa de fermentación. Se ajustó el pH a 6,5 con KOH 2M y se añadieron las sales de amonio del medio AM1 para crear un tampón a este pH. Luego, se pusieron los demás componentes del medio AM1 (sin amonio y sin azúcares), metabisulfito de sodio 1,5 M en proporción de 1 mL/L<sub>muestra</sub> y se inoculó la *E. coli* al 4% v/v en concentración de 0,25 g/L (se centrifuga y resuspende con el medio de fermentación). El muestreo se realizaba a cada 24 horas reajustando el pH a 6,5 con KOH 2M, en 1 mL por cada uno de los cinco matraces y seguía el mismo preparo que la HFS.

## 8.3 SFS – Sacarificación y Fermentación Simultáneas

En este proceso, que es conducido a 37°C, 150 rpm y pH 4,8 del tampón citrato, se pone el conjunto enzimático *Cellic Ctec-2* a 15 FPU/g<sub>sustrato</sub> suplementado en 10% de su volumen con  $\beta$ -glucanasa juntamente a la inoculación del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* al 4% v/v y concentración de 0,25 g/L. También se utilizan cinco matraces, siendo un triplicado de la muestra, un control de celulosa y otro control de disolución enzimática, con el mismo ritmo de muestreo de las demás configuraciones.

## 8.4 SCFS – Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas

Esta configuración es similar a la SFS, teniendo como diferencia el ajuste del pH a 6,5, adición de los componentes del medio AM1, metabisulfito de sodio 1,5 M a una proporción de 1 mL/L e inoculación de la *E. coli* al 4% v/v a una concentración de 0,25 g/L. Hay también un control de pH a 6,5 con KOH 2M en cada muestreo, que es realizado a cada 24 horas, siguiendo las muestras centrifugación y filtración antes de la determinación de su composición en HPLC.

## 8.5 PSFS – Pre-Sacarificación y Fermentación Simultáneas

Aquí, se realiza una pre-sacarificación (HE) durante 6 horas antes de la inoculación de la *Saccharomyces cerevisiae*. Las condiciones y concentraciones de cada elemento para esta etapa son las mismas la verificada para SFS, con la diferencia que se toma una muestra al final de estas 6 horas. Para la inoculación de la *S. cerevisiae* al 4% v/v y concentración de 0,25 g/L (se centrifuga y resuspende con el medio de fermentación), la temperatura del medio se baja a 37°C, manteniéndose la agitación en 150 rpm. Una vez inoculada la levadura, se toma una muestra a cada 24 horas, siendo que el número de matraces y



preparo de la muestra sigue los mismos parámetros que para las configuraciones anteriores.

## 8.6 PSCFS – Pré-Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas

En esta configuración se observan las mismas 6 horas de pre-sacarificación en las mismas condiciones de la PSFS, de modo que al final de este tiempo se baja la temperatura a 37°C manteniéndose la agitación en 150 rpm, se sube el pH a 6,5, se añaden las sales del medio AM1, el metabisulfito 1,5 M a una proporción de 1 ml/L y se inocula la *E.coli* al 4% v/v y concentración de 0,25 g/L (se centrifuga y resuspende con el medio de fermentación). También se toma muestra al final de las 6 horas, realizando el siguiente muestreo a cada 24 horas conjuntamente a una corrección del pH a 6,5 con KOH 2M.

Un resumen de los principales parámetros de cada configuración puede ser visualizado en la Tabla 15.

## 9. Preparación y Detoxificación del *slurry*

Los *slurrys* fueron preparados a 5% p/v y a 8,8% p/v (concentración obtenida tras el pretratamiento) a partir de la poda de olivo pretratada y el líquido obtenido en el pretratamiento, dejándose la mezcla en reposo por cerca de 12 horas para humedecer mejor el material sólido. La detoxificación con NH<sub>4</sub>OH 5N ha sido aplicada a los *slurrys* por sus mejores resultados obtenidos al fermentar la fracción líquida en comparación a los demás métodos de detoxificación. El pH de la mezcla fue ajustado a 9 con agitación constante de 150 rpm y temperatura de 50 °C durante 30 minutos, bajándose el pH a 5 con ácido sulfúrico 96% para ajustarse a las condiciones de hidrólisis enzimática.

### 9.1 Hidrólisis Enzimática + Fermentación del *slurry*

Una vez analizados los resultados de la etapa de tratamiento de la fracción sólida y de la composición del prehidrolizado, se seleccionaron como configuraciones la HCFS y PSCFS, realizándose un duplicado de cada uno. A cada minifermentador se añadió el *slurry* al 5% p/v previamente preparado y detoxificado, conteniendo 150 mL de licor y 7,5 gramos de sólido seco. La Hidrólisis Enzimática fue llevada a cabo en las mismas condiciones descritas para el sólido pretratado, que puede ser vista en el apartado “8” (“Características de las configuraciones adoptadas para la fermentación del sólido”). Para el HCFS la HE (50 °C) tuvo una duración de 72 horas mientras que para la PSCFS de 6 horas. La fermentación tuvo lugar en el mismo equipo descrito en el apartado “7” (“Fermentación de la fracción líquida”), a 37 °C, 300 rpm y pH 6,5. La concentración de células de *E. coli* SL100 fue de 0,5 g de célula por cada litro de medio fermentativo, siendo el microorganismo inicialmente sembrado en medio AM1 y esta cantidad separada de este medio de cultivo mediante centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos, resuspendiéndose la *E. coli* SL100 en el *slurry* en campana de flujo laminar y añadido al medio fermentativo, que llevaba incorporado los componentes del medio AM1 sin las sales de amonio y el metabisulfito de sodio 1,5 M en proporción de 1 mL/L<sub>muestra</sub>.



Tabla 15. Resumen de las etapas involucradas en cada configuración de hidrólisis y fermentación adoptada.

Configuración	Etapas	Tª, rpm	Control pH	Matraces	Volumen de inóculo	Disolución
HFS	HE	50 °C, 150 rpm	No	5	0	Tampón citrato
	Fermentación ( <i>S. Cerevisiae</i> )	37 °C, 150 rpm	No		4% v/v	
HCFS	HE	50 °C, 150 rpm	No	5	0	Tampón citrato
	Fermentación ( <i>E. coli</i> )	37 °C, 150 rpm	Si, ajuste y control pH 6,5		4% v/v	Todas las sales del AM1+ metabisulfito de sodio
SFS	Simultáneo	37 °C, 150 rpm	No	5	4% v/v	Tampón citrato-vol. inóculo
SCFS	Simultáneo	37 °C, 150 rpm	Si, ajuste y control pH 6,5	5	4% v/v	AM1 +metabisulfito de sodio-vol. inóculo
PSFS	Pre-sacarificación	50 °C, 150 rpm	No	5	0	Tampón citrato
	SSF	37 °C, 150 rpm	No		4% v/v	
PSCFS	Pre-sacarificación	50 °C, 150 rpm	No	5	0	Tampón citrato
	SSF	37 °C, 150 rpm	Si, ajuste y control pH 6,5		4% v/v	Todas las sales del AM1+ metabisulfito de sodio

## 9.2 Hidrólisis Enzimática + Fermentación en la mejor configuración en reactor de mayor capacidad y con aeración *slurry*

En esta etapa se ha utilizado el equipo de fermentación Dasgip Bioblock compuesto de cuatro fermentadores de 1 litro de capacidad que permiten control de temperatura y agitación a través del controlador DASGIP TC4SC4; control de pH y aireación con el controlador DASGIP PHPO, y control de bombeo con el controlador DASGIP MP8. El software DASware permite la modificación de todas las variables y hace la captura y almacenamiento de los datos. Los controladores pueden ser vistos en la Figura 44A y el bloque de fermentadores en la Figura 44B.

Para esta etapa se ha seleccionado la configuración PSCFS, de tal forma que uno de los fermentadores ha recibido un *slurry* de 5% p/v (400 mL de licor y 20 gramos de sólido seco) y el otro un *slurry* de 8,8 % p/v (400 mL de licor y 35,2 gramos de sólido seco). Los *slurrys* fueron inicialmente detoxificados con  $\text{NH}_4\text{OH}$  5N conforme explicado en el apartado "5" ("Detoxificación de la fracción líquida"), añadiéndose posteriormente las enzimas *Cellic Ctec-2* que realizaron una pré-sacarificación durante 6 horas a una temperatura de 50 °C y pH de 4,8. Transcurrido este tiempo, se ajustó el pH a 6,5, la temperatura a 37 °C y la agitación a 250 rpm, inoculándose la *E. coli* SL100 a una concentración de 0,5 g de célula por cada litro de medio fermentativo. El microorganismo inicialmente fue sembrado en medio AM1 y la cantidad correspondiente a la concentración necesaria separada de este medio de cultivo mediante centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos, resuspendiéndose la *E. coli* SL100 en el *slurry*.



Figura 44. Equipo de fermentación empleado para fermentar el *slurry* con aireación. "A": controladores DASGIP TC4SC4 (control de temperatura y agitación), DASGIP PHPO (control de pH y oxígeno disuelto) y DASGIP MP8 (control del bombeo de base); "B": DASGIP Bioblock con 4 posiciones, donde fueron realizadas las fermentaciones con aireación del *slurry*. Fuente: Autor.

El control de pH era realizado automáticamente con KOH 2M y la aeración mantenida en un valor de 0,1 vvm con los rotámetros manuales.



## V. Resultados y Discusión

---

1. Introducción a los resultados y discusión
2. Composición de la materia prima, licor y sólido pretratado
3. Detoxificación de los prehidrolizados
4. Fermentación de los licores
5. Fermentación del sólido pretratado utilizando las distintas configuraciones
  - 5.1 Hidrólisis Y Fermentación Por Separado (HFS)
  - 5.2 Hidrólisis y Co-Fermentación Por Separado (HCFS)
  - 5.3 Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS)
  - 5.4 Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas (SCFS)
  - 5.5 Pre-Sacarificación y Fermentación Simultánea (PSFS)
  - 5.6 Pre-Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas (PSCFS)
  - 5.7 Resumen Comparativo De Las Fermentaciones Del Sólido Pretratado
6. Hidrólisis Enzimática y Co-Fermentación del *slurry* en las configuraciones de más elevado rendimiento en etanol
  - 6.1 HSCF
  - 6.2 PSCFS
  - 6.3 Comparación entre la HCFS y PSCFS en el rendimiento (g etanol/100g materia prima) del *slurry*
7. Hidrólisis enzimática y fermentación del *slurry* en la mejor configuración en distintas concentraciones de sólido y empleo de aireación
  - 7.1 PSCFS a 5% p/v con el empleo de aireación
  - 7.2 PSCFS a 8,8% p/v con el empleo de aireación
  - 7.3 Comparación de la PSCFS a 5% y 8,8%
  - 7.4 Comparación entre la PSCFS a 5% con y sin el empleo de la aireación



## 1. Introducción a los resultados y discusión

En este apartado se van a analizar y discutir los datos obtenidos a lo largo de los experimentos propuestos. Inicialmente, se hará un análisis de la composición de la materia prima, licor y sólido pretratado. Después, se discutirán los resultados obtenidos para los licores detoxificados, el sólido, y por fin para el *slurry* operado con y sin aeración.

## 2. Composición de la materia prima, licor y sólido pretratado

La Tabla 16 muestra la composición de la materia prima utilizada en el trabajo antes y después de la etapa de extracción. La sigla “LAI” indica “Lignina Ácido Insoluble”; “LAS” significa “Lignina Ácido Soluble”, mientras “CAI” son las “Cenizas Ácido Insolubles”. La poda de olivo contenía cerca de 45 % de azúcares totales, siendo la glucosa el principal azúcar con el 25,82% de los cuales el 6,34% está como no estructural dentro de los extractos. La xilosa es la principal pentosa de la fracción hemicelulósica, contabilizando 86,6%. Hay que destacar la gran cantidad de extractos (cerca del 30%), valor dentro del rango normalmente encontrado para la poda de olivo, que según Ballesteros et al. (2011) puede estar entre 14 y 31% dependiendo de la concentración de hojas y del tipo de método de extracción utilizado. Cara et al. (2008a) han encontrado una cantidad mayor de extractos (31,4%) y cenizas en comparación al presente trabajo, pero una concentración de LAI, LAS, azúcares celulósicos e hemicelulósicos muy similares a la composición detallada en la Tabla 16. Martínez-Patiño et al. (2017a) han encontrado alrededor de 24,8% de extractos y concentraciones de glucosa, LAI y grupos acetilo también muy similares al presente trabajo (27,9%, 16,1% y 2%, respectivamente). Por el contrario, los autores han observado una mayor composición en azúcares hemicelulósicos (21,3%), indicando algunas de las diferencias que pueden ser encontradas al trabajar con una materia prima como la poda de olivo.

Tabla 16. Composición de la poda de olivo antes y después de la extracción con NaOH 1,4%.

Compuestos	Composición de la poda de olivo (%p.)	
	Materia prima sin tratar	Materia prima después de la extracción
<b>Glucosa</b>	25,82	31,11
<b>Azúcares hemicelulósicos</b>	14,27	16,36
Xilosa	10,98	12,35
Galactosa	1,34	1,33
Arabinosa	1,35	2,68
Manosa	0,6	0
<b>Lignina</b>	17,43	25,81
LAI	15,03	23,65
LAS	2,40	2,16
CAI	0,03	0,44
<b>Grupos Acetilo</b>	2	0
<b>Extractos</b>	29,46	7,34
Glucosa en extractos	6,34	0,23



La extracción con NaOH ha retirado prácticamente el 75% de los extractos, y ha aumentado las concentraciones de azúcares y LAI. Ballesteros et al. (2011) y Martínez-Patiño et al. (2017a) han observado un comportamiento similar al utilizar agua durante 1 hora en autoclave a 121 °C, donde también verificaron una presencia residual de extractos en la materia prima de  $8,5 \pm 0,7\%$  y  $8,9 \pm 0,5\%$ , respectivamente.

La composición del sólido pretratado obtenido después de la filtración del *slurry* es presentada en la Tabla 17. La glucosa es el principal componente (40,55%) seguido de la Lignina Ácido Insoluble (cerca de 38,55%). Los azúcares hemicelulósicos como arabinosa, manosa y galactosa fueron prácticamente solubilizados durante el pretratamiento, no siendo identificados en el sólido. Todavía, una pequeña cantidad de xilosa ha permanecido en una concentración de 5,22%. Eso también fue observado por Martínez-Patiño et al. (2017b) cuando han probado un pretratamiento ácido en la poda de olivo empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a distintas concentraciones, llegando a valores desde 1,9 a 17,3% de xilosa en el sólido pretratado. Negro et al. (2014) han encontrado resultados similares al presente trabajo al pretratar la poda de olivo con explosión por vapor impregnando con 1% p/p de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a distintas temperaturas, mostrando una concentración de glucosa entre 45,8% y 46,9%, de xilosa entre 2,3 y 4,7%, de LAI entre 44,5 y 42,9% y de galactosa, arabinosa y manosa cercanas a cero, siendo los valores correspondientes a las temperaturas probadas de 195 °C y 175 °C, respectivamente.

**Tabla 17. Composición del Sólido Pretratado**

<b>Composición Sólido Pretratado (%p.)</b>	
<b>Glucosa</b>	40,55
<b>Xilosa</b>	5,22
<b>LAI</b>	38,55

La composición del licor obtenido en el pretratamiento combinado térmico-ácido, empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,9% y 15% de carga de sólido se muestra en la Tabla 18. Los valores entre paréntesis indican la concentración de azúcares obtenidos en la post-hidrólisis, evidenciando la presencia de oligómeros en el licor. La sigla "XGM" indica Xilosa, Galactosa y Manosa, siendo el XGM compuesto de 80,34% de xilosa, 18,89% de galactosa y 0,78% de manosa. La galactosa y arabinosa se encuentran en una concentración entre 3-5 g/L debido a una casi completa solubilización de la hemicelulosa durante el pretratamiento, no siendo visualizados en el sólido como se puede ver en la Tabla 17. Una alta presencia relativamente inusual de glucosa ha sido observada, fruto probablemente, según Ballesteros et al. (2011), de una hidrólisis de fracciones de almidón durante el pretratamiento de la poda de olivo y en un menor grado de los glucósidos presentes en las hojas, como la oleuropeína.

Como se puede ver en la Tabla 18, no solamente hay azúcares, sino que también compuestos como el ácido acético (en una concentración de 0,23 g/L), proveniente de la hidrólisis de los grupos acetilo, además del ácido fórmico (1,17 g/L), furfural (0,65 g/L) e hidroximetilfurfural (HMF) (0,05 g/L) resultantes de la degradación de azúcares. Observaciones similares fueron hechas por Ballesteros et al. (2011), mientras Martínez-Patiño et al. (2017a) no han observado concentraciones de ácido acético menores de 1 g/L para ninguna de las 16 condiciones probadas en su trabajo.

Tabla 18. Composición del licor obtenido en el pretratamiento. Valores entre paréntesis indican las concentraciones de azúcares obtenidas tras post-hidrólisis.

Composición Licor Prehidrolizado (g/L)	
Glucosa	8,07 (10,86)
XGM	15,33 (16,21)
Arabinosa	5,08
Ácido fórmico	1,17
Ácido acético	0,23
Hidroximetilfurfural (HMF)	0,05
Furfural	0,65
Compuestos Fenólicos	2,50

### 3. Detoxificación de los prehidrolizados

Los efectos provocados por cada detoxificación sobre el prehidrolizado inicial en los licores están representados en la Figura 45. En general, ningún método ha reducido significativamente la concentración de azúcares inicial, y sí de un modo más incisivo el ácido fórmico y el HMF. Los métodos de detoxificación que supusieron una subida del pH por encima de las condiciones fermentativas aumentaron los niveles de ácido acético en 13,19% (*overliming*) y 11,42% (NH<sub>4</sub>OH). Además, estos dos métodos de detoxificación no fueron tan eficientes en la eliminación de los compuestos inhibidores como el carbón activo, que disminuyó la concentración del ácido fórmico (60,5%), ácido acético (32,18%), HMF (100%), furfural (92,3%) y fenoles totales (79,82%), siendo el único en bajar los niveles de ácido acético. El NH<sub>4</sub>OH fue el segundo más eficiente, con una reducción significativa del HMF (97,1%). Ya el *overliming*, considerado una de las técnicas de detoxificación más económicas y de alto rendimiento (Jonson et al., 2013), fue la técnica menos eficiente en detoxificar los hidrolizados de la poda de olivo.

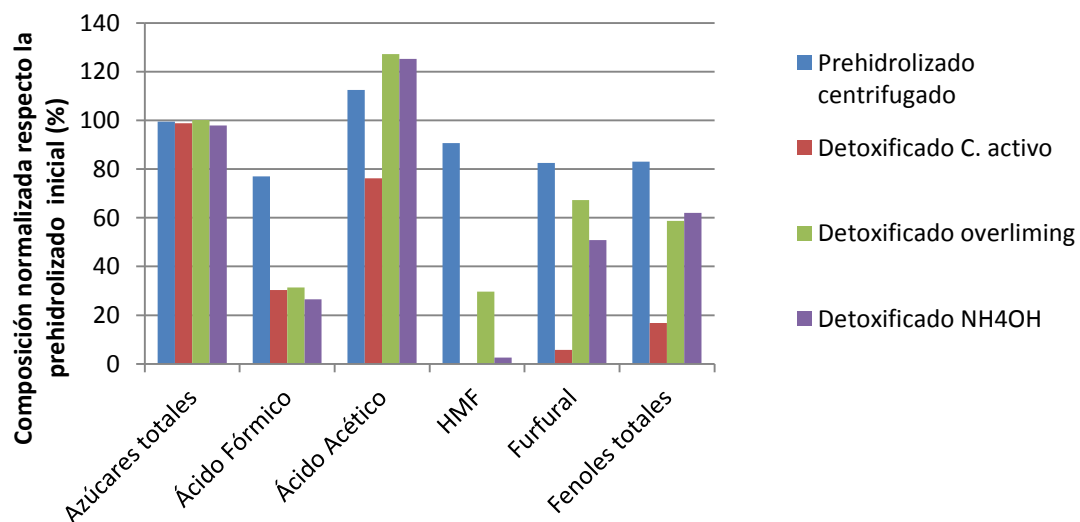


Figura 45. Composición de los distintos licores respecto al prehidrolizado inicial. Azúcares totales suma de glucosa, xilosa, galactosa, manosa y arabinosa

Con respecto al NH<sub>4</sub>OH, Geddes et al. (2013) al trabajar con bagazo de caña de azúcar investigaron los efectos de la acción del NH<sub>4</sub>OH 5N sobre los compuestos inhibidores y la



concentración de azúcares, probando el efecto de distintos pH (6, 7, 8, 9 y 10). A pH 9, los autores observaron una reducción de los niveles de furfural, 6% de azúcares y una subida del ácido acético, resultados similares a los encontrados en el presente trabajo con la diferencia que la degradación de azúcares fue menor (1,56%). Jennings y Schell (2011) trabajaron con hidrolizados de rastrojo de maíz, realizando una comparación entre las detoxificaciones con  $\text{NH}_4\text{OH}$  y  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , observando una reducción de 33% de furfural y una pérdida de azúcares insignificante trabajando con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado (29,8%) entre los pH de 6,0 a 8,5, resultados semejantes al presente trabajo. Todavía, estos mismos autores han encontrado una efectividad menor del  $\text{NH}_4\text{OH}$  en la disminución del HMF, que fue apenas de 33%.

Ya para el carbón activo, Klasson et al. (2013) han trabajado con carbón activo producido a partir de material orgánico para detoxificar hidrolizado de césped, observando una reducción de furfural y HMF de aproximadamente 76,3 y 66,6%, respectivamente, después de un contacto entre 1 y 2 horas y concentración de carbón de 3,5 % p/v. Lee et al. (2011) obtuvieron reducción de 42% del ácido fórmico, 14% del ácido acético, 96% del HMF y 93% del furfural al trabajar con autohidrólisis de una mezcla de astillas de madera dura con una concentración de 2,5% p/v de carbón activado, valores próximos al de este trabajo principalmente para los compuestos furánicos. Mateo et al. (2013) han trabajado con hidrolizado de poda de olivo utilizando distintos métodos de detoxificación, entre ellos el carbón activo. Los autores encontraron que el pH y concentración del carbón activo tienen gran influencia en la retirada de inhibidores, teniendo reducciones significativas del ácido acético (46%), compuestos furánicos (98%) y compuestos fenólicos (81%) a pH 2 con 8% de carbón activo y 30 minutos de contacto, condiciones y resultados similares a las realizadas por el presente trabajo. El pH, según Mussato y Roberto (2004), tiene un efecto muy importante sobre la adsorción de ácidos débiles (como fenoles y el ácido acético), ya que son mejor adsorbidos en su estado no-ionizado, que ocurre a pH bajos.

Sobre el *overliming*, Martínez-Patiño et al. (2017a) han utilizado la cepa MM160 de la *E. coli* para fermentar el hidrolizado de poda de olivo después de detoxificar, a través de *overliming*, distintas muestras obtenidas de diferentes condiciones empleadas en pretratamiento combinado térmico-ácido. Los autores también han verificado que algunas muestras presentaban elevados niveles de furfural mismo después de la detoxificación, siendo considerados medios impropios para la fermentación por parte de la *E. coli* MM160, que no es capaz de desarrollarse cuando la concentración de furfural pasa los 2 g/L (Geddes et al., 2011). Las pérdidas en azúcar tampoco fueron representativas.

#### 4. Fermentación de los licores

La Figura 46 muestra la producción (g/100 gramos de materia prima), productividad (g/l/h) y rendimiento en etanol (% del teórico), mientras la Figura 47 muestra un conjunto de gráficas que representan con más detalles el consumo de azúcares, producción de etanol y comportamiento de los compuestos inhibidores durante todo el proceso de fermentación de los licores. En el análisis conjunto de estas dos figuras, es posible notar que la fermentación del licor sin detoxificar (prehidrolizado centrifugado) ni siquiera ha arrancado, notándose el poder de inhibición de los compuestos presentes en el medio sobre la *E. coli* SL100. Otros microorganismos, como *Pachysolen tannophilus*, fueron



capaces de producir hasta 0,38 g de etanol por gramo consumido de sustrato trabajando con hidrolizado de poda de olivo sin detoxificar (Romero et al., 2007).

Un hecho contradictorio reportado por el presente trabajo fue que el detoxificado de carbón activo, a pesar de haber sido el método más eficiente en la eliminación de inhibidores, tuvo un desempeño muy inferior de entre las detoxificaciones utilizadas. En la literatura no fueron encontrados trabajos que utilizaran el carbón activo para la poda de olivo. Para otras materias primas, los valores encontrados en el presente trabajo no reflejan los resultados descritos en la literatura. Lee et al. (2011), al detoxificar el hidrolizado de mezclas de astillas de madera con carbón activo 2,5% p/v y fermentar con la cepa MO1442 del microorganismo *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, obtuvieron prácticamente 100% de rendimiento en etanol. Seo et al. (2009) han obtenido una productividad en etanol 2,4 veces mayor al emplear carbón activo en el hidrolizado de casco de maíz comparado con el hidrolizado sin detoxificar. Chandel et al. (2007) han obtenido rendimiento de 0,42 gramos de etanol por gramo de bagazo de caña de azúcar al tratar el hidrolizado de esta materia prima con carbón activo. Una hipótesis que puede explicar lo que haya ocurrido en el presente trabajo es que el carbón activo retiró, además de compuestos inhibidores, nutrientes u otras sustancias necesarias para el buen funcionamiento metabólico de la *E. coli* SL100.

Para el *overliming*, Martínez-Patiño et al. (2017a) fueron capaces de llegar a un rendimiento en etanol con respecto al teórico de entre 70 a 88% utilizando la cepa MM160 de la *E. coli*, mientras el presente trabajo ha llegado a poco más del 40%. Según los autores, bajos rendimientos en etanol pueden ser explicados por un consumo incompleto de la fracción XGM, lo mismo ya reportado por Geddes et al. (2011). Al observar la Figura 47, se nota este mismo fenómeno, con una cantidad próxima a los 10 g/L de XGM sin consumir, la misma cantidad reportada por Martínez-Patiño et al. (2017a). Este comportamiento, según Geddes et al. (2011) se da por la acción principalmente del furfural, que impide el consumo completo del XGM por el microorganismo. Sin embargo, la razón para que no hubiese una alta productividad en etanol del hidrolizado por *overliming* para el presente trabajo no encaja en esta explicación, ya que las concentraciones de furfural eran bajas y prácticamente del mismo orden del hidrolizado detoxificado con  $\text{NH}_4\text{OH}$ , que obtuvo los mejores resultados. Por alguna razón, hubo un crecimiento en la concentración de glicerol (línea azul de la gráfica del detoxificado de *overliming*). El glicerol es un co-producto producido típicamente por las levaduras durante la metabolización del azúcar o resultado de alguna contaminación bacteriana, acabando por afectar el rendimiento final de etanol pues exige un aporte de energía intenso por parte del microorganismo (Zabed et al., 2017).

Con respecto al perfil de consumo de los demás azúcares del detoxificado de *overliming*, Martínez-Patiño et al. (2017a) han observado un consumo total de la glucosa con cerca de 46 horas de fermentación (muy parecido al presente trabajo) y de la arabinosa a las 96 horas, con una producción máxima de etanol (aproximadamente 25 g/L) a las 120 horas de fermentación.

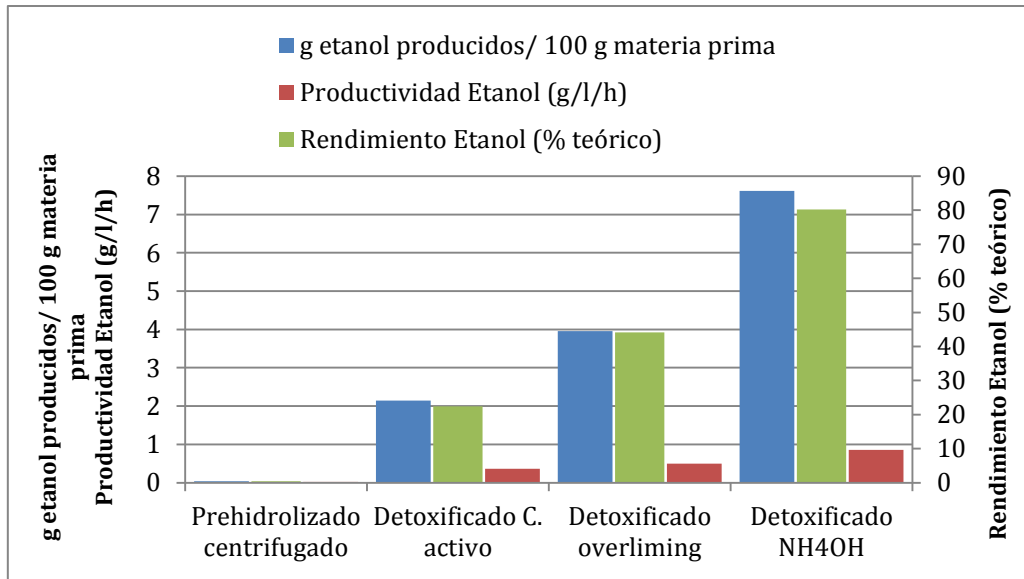
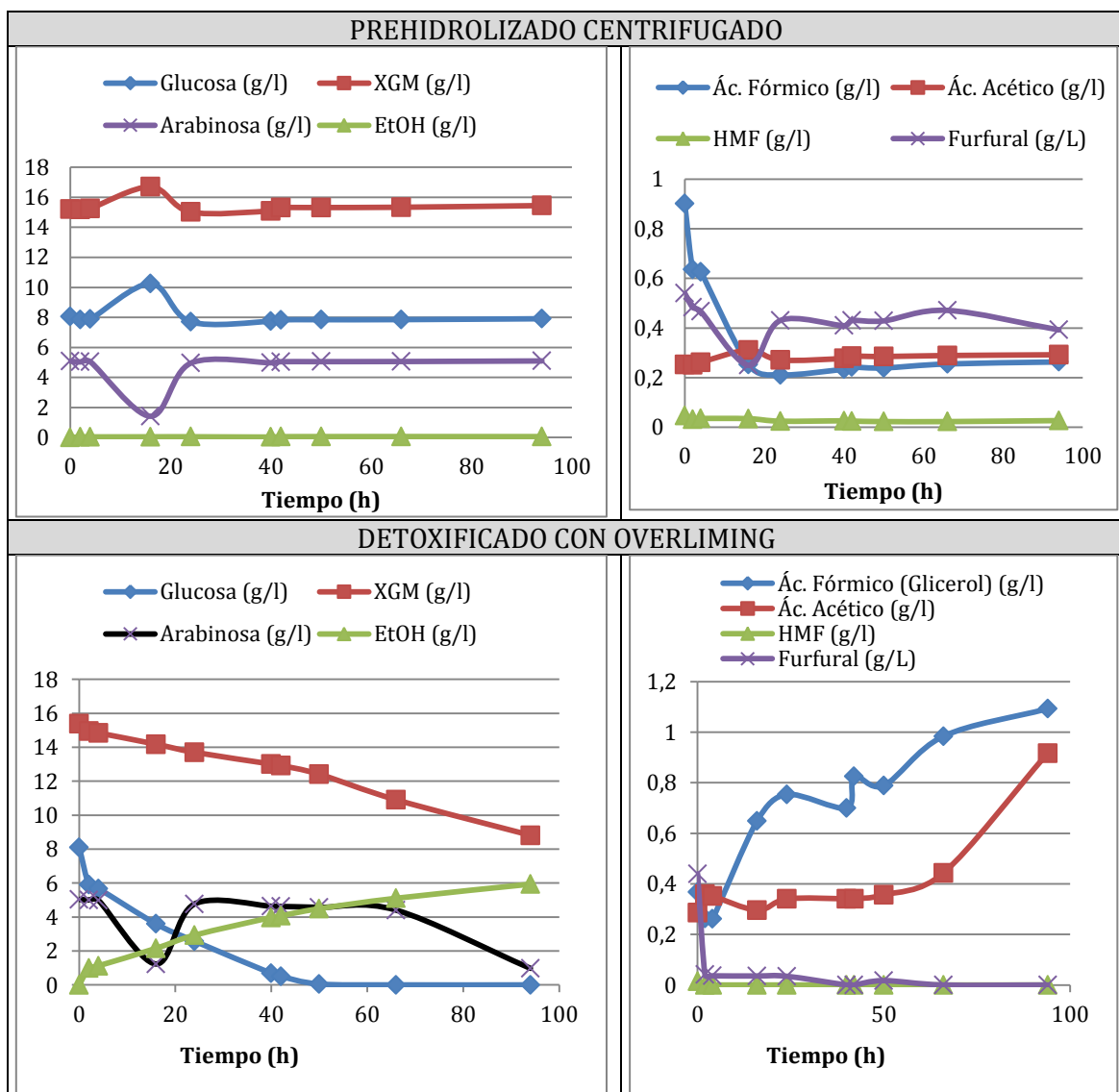


Figura 46. Producción, productividad máxima y rendimiento de etanol con los diferentes licores.



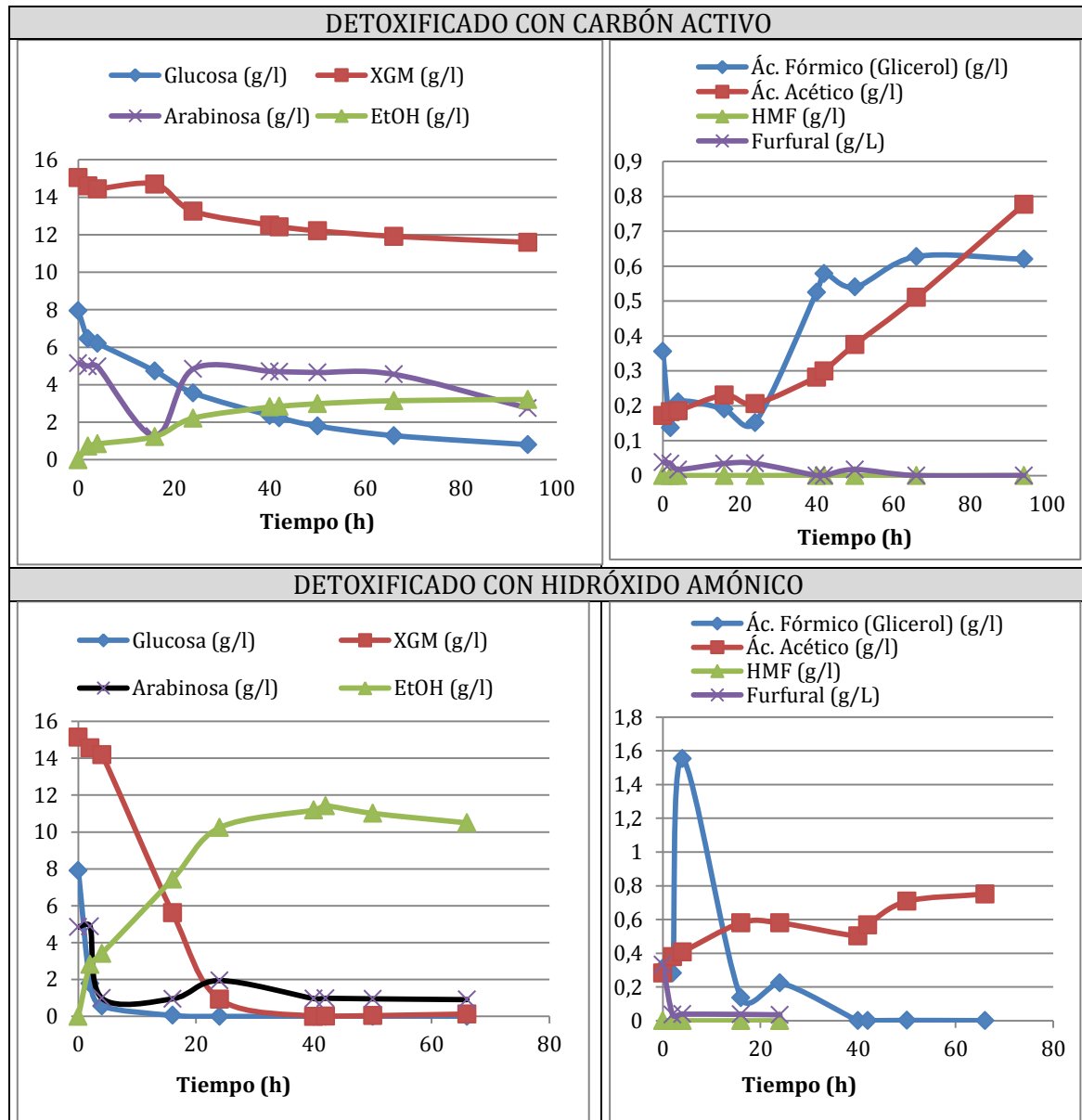


Figura 47. Evolución de los distintos compuestos durante la fermentación de los licores.

El licor detoxificado con  $\text{NH}_4\text{OH}$  ha obtenido los mejores resultados en la fermentación, incluso no siendo el más eficiente en la eliminación de compuestos inhibidores. Es importante destacar que las altas concentraciones de ácido acético mostradas en la Figura 45 no son impedimento para la *E. coli* SL100, pues es una cepa altamente resistente a este inhibidor, pudiendo hasta utilizar el acetato como fuente de carbono (Zaldivar y Ingram, 1999). Palmqvist y Hahn-Hagerdal (2000) ya habían identificado licores que tuvieron la producción de etanol estimulada con concentraciones elevadas de ácido acético y bajas de compuestos furánicos, en una especie de efecto sinérgico positivo de los compuestos de inhibición. De acuerdo con Mussato y Roberto (2004), no es posible definir una concentración máxima de cada inhibidor para un determinado microorganismo justamente porque el efecto de inhibición depende mucho del tipo y concentración de cada compuesto, del tipo de medio y de la posible sinergia entre compuestos, siendo factible elevadas producciones de etanol en presencia de inhibidores.



Jennings y Schell (2011) también encontraron un rendimiento mayor en etanol detoxificando rastrojo de maíz con  $\text{NH}_4\text{OH}$ , que llegó al 72% del máximo teórico y fue cerca de 7% más eficiente que la detoxificación con *overliming*. Los autores han atribuido esta mayor eficiencia a la remoción de fenoles u otro compuesto tóxico entre pH 6,8 a 8, contrariando hasta cierto punto lo propuesto por Alriksson et al. (Alriksson et al., 2006), que sugieren una mayor efectividad del  $\text{NH}_4\text{OH}$  gracias a su habilidad en eliminar compuestos furánicos y fenólicos, ya que Jennings y Schell (2011) no observaron una reducción efectiva de furfural ni tampoco de HMF. Un punto interesante es que estos autores han observado una inhibición del microorganismo fermentativo *Zymomonas mobilis* a pH 9, atribuyendo a una mayor concentración de sales inorgánicas resultantes de una elevada cantidad de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para llegar hasta el pH 9, que también ocurrió en el presente trabajo pero que no tuvo efectos sobre la *E. coli* SL100 empleada.

Geddes et al. (2013), trabajando a distintos pH y utilizando la *E. coli* SL100, tampoco han observado inhibición a pH 8 o 9, siendo incluso estos pH los que resultaron en una mayor productividad en etanol. Se puede atribuir este fenómeno a la reducción de algún compuesto tóxico no identificado, mejor aprovechamiento del  $\text{NH}_4\text{OH}$  como fuente de nitrógeno por parte de la *E. coli*, o algún efecto sinérgico, sin embargo, no es algo claro. Estos mismos autores (Geddes et al., 2013), con respecto al consumo de azúcares, han observado una preferencia por parte de la *E. coli* SL100 en consumir los monómeros en el siguiente orden: glucosa > arabinosa > galactosa > xilosa en el hidrolizado detoxificado con  $\text{NH}_4\text{OH}$  con el medio a pH 9. Según la gráfica de la Figura 47, la glucosa y arabinosa son consumidas en su totalidad ya en las primeras horas de fermentación, mientras la xilosa solo empieza a disminuir su concentración de modo significativo cuando los otros dos azúcares están en valores próximos a cero, corroborando por lo tanto con la literatura citada. El aparente aumento en la concentración de arabinosa se debe probablemente a un error de integración del HPLC.

## 5. Fermentación del sólido pretratado utilizando las distintas configuraciones

### 5.1 Hidrólisis Y Fermentación por Separado (HFS)

La Tabla 19 muestra los resultados de la etapa de hidrólisis de la poda de olivo, en la que se puede apreciar que los rendimientos aumentan de manera razonable cada 24 horas. El mayor rendimiento de la HE (43.13%) considerando la glucosa de toda la materia prima es bajo comparado con otros trabajos que utilizan la poda de olivo como materia prima, pero valores incluso más bajos que el encontrado en el presente trabajo ya fueron reportados por otros autores.

Cara et al. (2008a) han empleado una HE en condiciones muy similares al presente trabajo (concentración de enzimas de 15 FPU suplementado con  $\beta$ -glucosidasa, 5% p/p de concentración de sólidos del material pretratado, a 50°C) siendo la poda del olivo sometida a distintas condiciones de pretratamiento combinado térmico-ácido sin sufrir proceso de extracción previo. Los menores rendimientos de HE, después de 72 horas, fueron verificados para las condiciones más suaves de pretratamiento (temperaturas de 170 °C y 180 °C y 0,2% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  p/p) siendo de 15,3% y 17,8%, respectivamente, mientras los rendimientos más elevados para las condiciones más severas (200 °C y 210



°C, con 1,4% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p/p), que fueron de 75,6% y 76,5%, respectivamente, con respecto a la materia prima. Eso supone que la temperatura tiene una influencia muy importante en la digestibilidad del material pretratado. Esto está de acuerdo con lo reportado por Ballesteros et al. (2011), donde siguiendo las mismas condiciones de la HE de Cara et al. (2008a) y del presente trabajo, llegaron a rendimientos próximos del 95% y 80% del teórico gracias a las altas temperaturas empleadas en el pretratamiento (204 °C y 200 °C) y también, según los autores, a la etapa de extracción hecha antes del pretratamiento. Los menores rendimientos (por debajo de 40%) fueron alcanzados a menores temperaturas de pretratamiento que no permitieron una solubilización eficiente de la hemicelulosa, que permaneció en el sólido y disminuyó la digestibilidad del material. Todavía, pretratamientos que emplearon temperaturas más elevadas que las descritas anteriormente en este párrafo no obtuvieron éxito en lograr mayores rendimientos de HE, ilustrado en el trabajo de Cara et al (2008b), en el cual la poda de olivo fue sometida a temperaturas de 240°C y presentó un rendimiento de la HE de 50% a pesar de haber solubilizado toda la fracción de la hemicelulosa. En este caso, se atribuyó este fenómeno a la producción de compuestos “similares a la lignina” en los cuales los extractos podrían estar relacionados. En el presente trabajo, la etapa de extracción fue capaz de extraer 75% de los extractos, dejando aún en el medio una concentración de 7,34%, lo que podría haber contribuido a la creación de dichos compuestos “similares a la lignina”.

Ballesteros et al. (2011) y Martínez-Patiño et al. (2017a) no observaron la formación de estos productos cuando realizaron la etapa de extracción y trabajando con temperaturas menores de 180 °C en el pretratamiento, a pesar de verificar una presencia de más del 8% de extractos en la materia prima después de la extracción con agua. Se sugiere, por lo tanto, que las condiciones de pretratamiento (principalmente la temperatura) no fueron adecuadas para permitir un grado de digestibilidad adecuado de la celulosa por parte de las enzimas.

El rendimiento de la HE observado para el contenido de glucosa potencial en el sólido pretratado (63% a las 72 horas) también ya fue relatado en la literatura y por los motivos descritos en el párrafo anterior tampoco fueron satisfactorios, debido a las bajas temperaturas empleadas en el pretratamiento. Negro et al. (2014) han alcanzado distintos rendimientos en la HE del sólido de la poda de olivo dependiendo de la temperatura y carga de sólidos empleadas en el pretratamiento y de la realización previa al pretratamiento de una etapa de extracción. Menores rendimientos (58% y 63%) fueron obtenidos a 10% y 15% de carga de sólidos, respectivamente, cuando el pretratamiento se realizó a 175°C; los rendimientos subieron a 88% y 84% cuando la temperatura utilizada en el pretratamiento subió a 195°C para 10% y 15% de carga de sólidos, respectivamente; y obtuvieron valores superiores a 90% de rendimiento al realizar la etapa de extracción, revelando que los productos “similares a la lignina” pueden obstaculizar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa y disminuir la obtención de azúcares en el caso de que no sean retirados por extracción, conforme relatado también en el párrafo anterior.

Los valores de xilosa que sobrepasaron los 100% son debidos a que el complejo enzimático utilizado (Cellic Ctec-2) lleva incorporado consigo una pequeña fracción de hemicelulasas, capaces de hidrolizar la fracción hemicelulósica presente en el sólido.



**Tabla 19. Producción y recuperación de glucosa y xilosa con respecto al material pretratado y a la materia prima en la etapa de HE de la configuración HFS.**

Tiempo (h)	g glucosa producidos/ 100 g materia prima	% Glucosa recuperada respecto al material pretratado	% Glucosa recuperada respecto a la materia prima	g xilosa producidos/ 100 g materia prima	% xilosa recuperada respecto al material pretratado	% xilosa recuperada respecto a la materia prima
24	7,65	43,28	29,62	2,07	90,87	18,83
48	9,88	55,89	38,26	2,57	112,92	23,40
72	11,13	63,00	43,13	2,86	125,86	26,08

Los resultados de la fermentación pueden ser visualizados en la Tabla 20. Al utilizar la *S. cerevisiae* y teniendo en cuenta su incapacidad de fermentar la xilosa, los rendimientos han alcanzado casi el 90% si se considera la fuente de carbohidrato de la cual puede utilizar (glucosa), disminuyendo hasta 72,3% al considerar todos los azúcares disponibles. En el único trabajo encontrado que ha empleado la SHF para la poda de olivo, Manzanares et al. (2011) han obtenido entre 86 a 90% de rendimiento de etanol al emplear el pretratamiento de Agua Caliente a Presión (LHW, siglas en inglés) y entre 84 a 86% con el pretratamiento combinado térmico-ácido, después de apenas 24 horas y con la misma cepa de *S. cerevisiae* empleada en el presente trabajo, mostrando que los rendimientos obtenidos en esta investigación no están muy por debajo de lo que se puede alcanzar con esta materia prima en la SHF.

**Tabla 20. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la HFS.**

Tiempo (h)	g etanol producidos/ 100 g materia prima	Rendimiento de etanol, g etanol/g glucosa*100	Rendimiento de etanol, % del teórico	Rendimiento de etanol, g etanol/g azúcares*100	Rendimiento de etanol, % del teórico
24	4,92	42,27	82,87	35,04	68,70
48	5,35	43,68	85,65	36,21	71,01
72	5,45	44,47	87,20	36,87	72,30

Ya en la mayoría de los demás trabajos consultados, los autores, al optar por la HFS, vuelven a juntar la fracción sólida que ha pasado por una HE con el líquido detoxificado, diferentemente de este trabajo que fermenta la fracción sólida en tampón cítrico-citrato 0,05M a pH 4,8. En este sentido, Tavva et al. (2016) han obtenido rendimientos de 87% con las cepas *Schizosaccharomyces pombe* R3DOM3 y *Saccharomyces cerevisiae* R3DIM4 y de 79% con la *Torulasporea delbrueckii* R3DFM2, trabajando con *Parthenium hysterophorus* (una hierba común) que ha pasado por una hidrólisis ácida (4 horas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1%) e hidrólisis enzimática a una concentración celular de 64 FPU. Peng y Chen (2011) han utilizado lodo de papel y condiciones de hidrólisis de 82,7 horas, 40,8 g/L de sustrato y 18,1 FPU de concentración de enzimas, fermentando con la *S. cerevisiae* GIM-2. El rendimiento logrado fue de 56,3% en etanol considerando todos los azúcares disponibles en el sustrato inicial, algo menor que el rendimiento presentado en las primeras 24 horas del presente trabajo.



## 5.2 Hidrólisis y Co-Fermentación por Separado (HCFS)

Como se esperaba, los resultados de la etapa de hidrólisis enzimática de la HCFS (Tabla 21) son muy parecidos al de la HFS, ya que fueron realizadas en las mismas condiciones. También fue observado el aumento de la concentración de xilosa, que se supone ocurrió debido a las mismas razones apuntadas para la HFS.

Se observa, tanto para la Hidrólisis y Co-Fermentación por Separado como para la Hidrólisis y Fermentación por Separado, que la mayor liberación de glucosa ocurre en las primeras 24 horas (68,7% para la HFS y 70,33% para la HCFS), con prácticamente 89% estando disponibles en las 48 horas de hidrólisis en ambas configuraciones. Así, desde un punto de vista económico, el ligero aumento en la concentración de glucosa verificado hasta las 72 horas no es justificable a nivel industrial, pues no trae un rendimiento mucho más significativo tanto en la disponibilidad de azúcares como en la producción de etanol, lo mismo siendo verificado por otros autores como López-Linares et al. (2014).

Resultados de la HE con autores que emplearon la HCFS son encontrados para otras materias primas. Por ejemplo, Erdei et al. (2012) han utilizado el mismo complejo enzimático del presente trabajo (Cellic Ctec-2) a una concentración de 14 FPU y 7% de concentración de sólidos, observando un rendimiento de 63% de la HE después de 72 horas para la paja de trigo.

**Tabla 21. Producción y recuperación de glucosa y xilosa con respecto al material pretratado y a la materia prima en la etapa de HE de la configuración HCFS.**

Tiempo (h)	g glucosa producidos/ 100 g materia prima	% Glucosa recuperada respecto al material pretratado	% Glucosa recuperada respecto a la materia prima	g xilosa producidos/ 100 g materia prima	% xilosa recuperada respecto al material pretratado	% xilosa recuperada respecto a la materia prima
24	8,13	46,01	31,49	2,05	90,25	18,70
48	10,30	58,28	39,89	2,53	111,43	23,09
72	11,56	65,44	44,79	2,83	124,54	25,81

En la etapa fermentativa (Tabla 22), se esperaba que los resultados fuesen similares o superiores a los observados para la HFS, principalmente debido al empleo de la *E. coli* SL100 que en teoría produciría más etanol en virtud de la presencia de xilosa en el sólido. Por alguna razón, el microorganismo empezó a consumir etanol como fuente de carbono después de las 24 horas iniciales. Una posible hipótesis es que la fermentación haya llegado a su máximo antes de haber sido tomada la primera muestra, ya que el consumo de etanol por parte de la *E. coli* indica, en teoría, que no hay más azúcares disponibles en el medio para utilizar como fuente de energía, cambiando su metabolismo para utilizar como alimento lo que antes producía como principal producto.



**Tabla 22. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la HCFS.**

Tiempo (h)	g etanol producidos/ 100 g materia prima	Rendimiento de etanol, g etanol/g glucosa*100	Rendimiento de etanol, % del teórico	Rendimiento de etanol, g etanol/g azúcares*100	Rendimiento de etanol, % del teórico
24	4,70	40,78	79,95	33,81	66,29
48	4,43	37,41	73,36	31,02	60,83
72	4,38	34,74	68,12	28,81	56,48

En la literatura la mayoría de los trabajos conducen la HCFS utilizando el *slurry*, y no solamente el sólido como el presente trabajo, aumentando la productividad en etanol por una mayor presencia en azúcares. En este sentido Erdei et al. (2012) han obtenidos rendimientos entre 86 y 93% empleando la cepa TMB340 de *S. cerevisiae* (capaz de co-fermentar xilosa y glucosa) para la paja de trigo pretratada variando la concentración del sólido en el líquido hidrolizado (18,5% y 7%, respectivamente) y cambiando la forma de alimentación de la materia prima.

### 5.3 Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS)

Los rendimientos en etanol obtenidos utilizando la configuración SFS están resumidos en la Tabla 23. Se muestra un aumento de productividad más significativo entre las 24 primeras horas que en las 24 últimas, los mismo reportado por Negro et al. (2014), que observaron que la producción de etanol se mantuvo constante en las 9 primeras horas, aumentando entre las 24-48 horas del proceso y manteniéndose constante hasta el final del proceso. Además, también se muestra un mayor rendimiento en etanol con respecto al teórico considerando solamente la glucosa como azúcar, lo que ya se esperaba por haberse utilizado una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que no era capaz de metabolizar pentosas. Todavía, los resultados en general están muy por debajo de lo esperado, o por un mal desarrollo de la enzima ya que no estaba operando en sus condiciones óptimas, o por una ineficiencia en el pretratamiento que no ha quitado suficientemente la cristalinidad de la celulosa y por consecuencia ha dificultado la acción de las enzimas. En la literatura, el pretratamiento de explosión por vapor es el más común para la poda de olivo y muestra mejores rendimientos que el presente trabajo cuando se emplea esta configuración.

**Tabla 23. Rendimientos en etanol con respecto al teórico a partir de glucosa y azúcares potenciales para la configuración SFS.**

Tiempo (h)	g etanol producidos/ 100 g materia prima	Rendimiento de etanol, g etanol/g glucosa potenciales*100	Rendimiento de etanol, % del teórico	Rendimiento de etanol, g etanol/g azúcares potenciales*100	Rendimiento de etanol, % del teórico
24	1,94	4,78	9,37	4,23	8,30
48	2,51	6,18	12,13	5,48	10,74
72	2,53	6,23	12,23	5,52	10,83

Por ejemplo, Ruiz et al. (2006) emplearon la explosión a vapor sobre la biomasa del olivo utilizando el sólido deslignificado en una concentración del 10% (p/v) para un proceso de SFS con la *S. cerevisiae*. Después de 72 horas de proceso, se obtuvieron 30g/L de etanol, o 7,5 gramos de etanol de cada 100 gramos de madera de olivo (casi 3 veces más que el



presente trabajo), correspondiente al 43% del teórico, un potencial de 95,1 litros de etanol por cada tonelada de madera de olivo. Negro et al. (2014) han empleado la explosión a vapor a distintas temperaturas (175 y 195°C) asociada al uso de 1% p/p de ácido fosfórico sobre la poda de olivo, separando la fracción sólida y la líquida y empleando la SFS para la fracción sólida con utilización de *S. cerevisiae*, alcanzando de 53% a 80% de rendimiento cuando la temperatura del pretratamiento fue de 175 y 195°C, respectivamente, mostrando la influencia que la temperatura del pretratamiento puede tener en el rendimiento en etanol. Cara et al. (2008b) sometieron la poda de olivo a explosión a vapor con y sin impregnación previa de agua o solución de ácido sulfúrico, empleando posterior SFS. Los autores obtuvieron un rendimiento de 7,2 g de etanol / 100 gramos de materia prima con residuo impregnado con agua a 240 °C.

#### 5.4 Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas (SCFS)

Los resultados obtenidos utilizando la configuración SCFS en la producción de etanol están recogidos en la Tabla 24. Se observan mayores rendimientos en etanol considerando tanto la glucosa como todos los azúcares potenciales, así como una productividad más significativa en etanol en las últimas 24 horas comparándose a la SFS, evidenciando la mejor adaptabilidad de la *E. coli* SL100 al medio fermentativo. Todavía, estos valores están muy lejos de representar un avance importante en términos de rendimiento en etanol, muy probablemente por los mismos motivos relatados en SFS: insuficiente hidrólisis del material por mal desarrollo de la enzima fuera de sus condiciones óptimas, o por una ineficiencia del pretratamiento que no ha disminuido suficientemente el grado de cristalinidad de la celulosa.

Los resultados encontrados en literatura muestran rendimientos más elevados en la SCFS utilizándose tanto un único microorganismo capaz de metabolizar pentosas y hexosas como un conjunto de ellos que asimilan cada uno un tipo de azúcar. Carrasco et al. (2011) pretrataron paja brava a través de explosión por vapor catalizada con SO<sub>2</sub> y utilizaron la SCFS con cargas de sólido de 5 a 10%, empleando la cepa TMB3400 de *S. cerevisiae*, capaz de fermentar azúcares C6 y C5, obtuvieron entre 74 a 85% de rendimiento en etanol con respecto al teórico.

Koppram et al. (2013) han utilizado siete distintas cepas recombinantes de *S. cerevisiae* capaces de fermentar xilosa en hidrolizados de mazorcas de maíz pretratadas con vapor de agua, alcanzando rendimientos teóricos de 75% en etanol a nivel de laboratorio y a escalas mayores teniéndose en cuenta toda la glucosa y xilosa disponible. Según los autores, para un mayor rendimiento del proceso (y principalmente de la conversión de la xilosa a etanol) se debe mantener siempre que sea posible un mayor control en la liberación de glucosa por parte de la enzima y bajas concentraciones de glucosa durante toda la SCFS.

Ohgren et al. (2006) empleando la misma cepa de *S. cerevisiae*, pero trabajando con rastrojo de maíz pretratada por explosión por vapor, obtuvieron entre 64 a 98% de rendimiento en etanol con respecto al teórico dependiendo de la concentración de sólidos empleada. Con el mismo microorganismo y el mismo pretratamiento, Olofsson et al. (2008) han encontrado un rendimiento en etanol de 71% y 80% al emplear 9% y 7% de sólidos, respectivamente.



Trabajando con co-cultivos de *P. stipitis* y *S. cerevisiae*, Karagoz et al. (2012) han obtenido 11,6 gramos de etanol por 100 gramos de paja de colza (más de 3 veces el resultado del presente trabajo), que había sido pretratada con peróxido de hidrógeno a 5%.

**Tabla 24. Rendimientos en etanol con respecto al teórico a partir de glucosa y azúcares potenciales para la configuración SCFS.**

Tiempo (h)	g etanol producidos/ 100 g materia prima	Rendimiento de etanol, g etanol/g glucosa potenciales*100	Rendimiento de etanol, % del teórico	Rendimiento de etanol, g etanol/g azúcares potenciales*100	Rendimiento de etanol, % del teórico
24	2,57	6,34	12,43	5,62	11,02
48	3,30	8,14	15,97	7,21	14,15
72	3,79	9,36	18,35	8,29	16,25

### 5.5 Pre-Sacarificación y Fermentación Simultánea (PSFS)

En esta configuración, hubo una hidrólisis enzimática en las condiciones óptimas para la enzima durante seis horas con ajuste a las condiciones fermentativas después de transcurrido este tiempo. Este corto periodo en que la enzima pudo operar en su temperatura y pH ideales ha reflejado positivamente en un mayor rendimiento en etanol comparado con la SFS, que durante todo el periodo trabajó en las condiciones óptimas del microorganismo. Los incrementos en rendimiento fueron semejantes entre los dos períodos de 24 horas, alcanzando un máximo de 18,60% considerando la glucosa potencial y 16,48% teniendo en cuenta todos los azúcares que podrían ser convertidos a etanol, como se puede ver en la Tabla 25.

Estos valores de rendimiento, en comparación con los datos encontrados en la literatura, están muy por debajo de lo esperado, ya que la PSFS sería, en teoría, una configuración capaz de incorporar algunas de las ventajas de la SFS y SHF y presentar un desempeño superior a ambas configuraciones (Fang et al., 2017). Boonsawang et al. (2012) han reportado que una pre-sacarificación de 6 horas no fue tan efectiva en el hidrolizado de fibra prensada de palma para aumentar el rendimiento en etanol cuando se procesaba la fermentación en el modo discontinuo como en el continuo, dando este último un rendimiento de 19,2 gramos de etanol por cada 100 gramos de celulosa. Además, según los autores, el modo continuo permitía una mayor carga de materia prima y requería menos enzimas, siendo más ventajoso que el modo discontinuo.

**Tabla 25. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la PSFS.**

Tiempo (h)	g etanol producidos/ 100 g materia prima	Rendimiento de etanol, g etanol/g glucosa potenciales*100	Rendimiento de etanol, % del teórico	Rendimiento de etanol, g etanol/g azúcares potenciales*100	Rendimiento de etanol, % del teórico
24	3,50	8,64	16,94	7,66	15,01
48	3,73	9,19	18,02	8,14	15,96
72	3,85	9,48	18,60	8,40	16,48

Manzanares et al. (2011) han probado la PSFS para la poda de olivo, estableciendo una etapa de pre-hidrólisis de 24 horas a 50 °C seguida de una SFS por 72 horas a 35 °C con la



adición de los nutrientes y la *S. cerevisiae*. La carga enzimática aplicada fue de 15 FPU y del microorganismo 4% v/v (las mismas condiciones empleadas en la presente investigación), probando tres concentraciones de sólidos (9, 17 y 23% p/p) provenientes de dos pretratamientos distintos. Los rendimientos máximos en etanol después de 72 horas fueron prácticamente los mismos para el material pretratado a través de Agua Caliente a Presión (50% del teórico) y alcanzaron el valor máximo (52%) y mínimo (cerca de 38%) cuando realizado el pretratamiento combinado térmico-ácido. Según los autores, los beneficios de la pre-sacarificación fueron visibles para la PSFS en comparación a la SFS solo durante las 24 primeras horas de fermentación a 17% de sólido, cuando la PSFS había logrado 15,2 g/L de etanol mientras en la SFS había solamente 1,82 g/L, sin embargo, al final del proceso, los rendimientos fueron prácticamente los mismos. Los autores han llegado concluir que las 24 horas de pre-sacarificación no resultan efectivas para un mayor rendimiento en etanol comparadas con la SFS, apoyados en trabajos realizados con otras materias, como rastrojo de maíz (Ohgren et al., 2007) y paja de cebada (Linde et al., 2007), en función probablemente de la producción de productos secundarios por parte de la levadura o por inactivación de las enzimas al no trabajaren en sus condiciones óptimas.

## 5.6 Pre-Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas (PSCFS)

El uso de un microorganismo capaz de co-fermentar xilosa y glucosa realizándose una pre-sacarificación ha traído resultados levemente superiores en comparación a la PSFS, como se puede ver en la Tabla 26. Los rendimientos han subido de forma importante a cada periodo de 24 horas, teniendo la *E. coli* SL100 un mejor aprovechamiento en la utilización de glucosa que la *S. cerevisiae*, llegando a producir 9,64 g de etanol/100g glucosa. Estos valores son también bastante bajos en comparación a los vistos en la literatura. Kim et al. (2008) han realizado pretratamiento con amoníaco acuoso sobre la cascara de cebada, obteniendo cerca de 18 g de etanol/100 gramos de materia prima con la *E. coli* KO11. Gupta y Lee (2009) han hecho el mismo tratamiento de amoníaco acuoso sobre el álamo híbrido, obteniendo 24 g de etanol/100 gramos de materia prima con la *E. coli* KO11.

**Tabla 26. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la PSCFS.**

Tiempo (h)	g etanol producidos/ 100 g materia prima	Rendimiento de etanol, g etanol/g glucosa potenciales*100	Rendimiento de etanol, % del teórico	Rendimiento de etanol, g etanol/g azúcares potenciales*100	Rendimiento de etanol, % del teórico
24	2,85	7,03	13,79	6,23	12,21
48	3,42	8,44	16,55	7,48	14,66
72	3,91	9,64	18,90	8,54	16,75

## 5.7 Resumen comparativo de las fermentaciones del sólido pretratado

Las distintas configuraciones empleadas para la fermentación de la fracción sólida de la poda de olivo están resumidas en la Figura 48. Se muestra que las mayores producciones de etanol fueron verificadas para la HFS y HCFS, seguidas de la PSFS, PSCFS, SCFS y SFS. Al operar la etapa de hidrólisis y fermentación en condiciones óptimas y después de un largo tiempo de HE, ya se esperaban mayores rendimientos por parte de la HFS y HCFS, que en este caso produjeron más etanol en las 24 primeras horas que todas las demás configuraciones después de 72 horas de proceso fermentativo. La HSCF es la única que



presenta una disminución en la producción de etanol, muy probablemente por haber llegado a su máxima productividad antes de la primera toma de muestra, como ya explicado en el apartado 4.2. También se puede observar un crecimiento más lento del rendimiento en etanol para la SFS y PSFS comparadas con sus correspondientes configuraciones, evidenciando el consumo casi completo de la glucosa por parte de la *S. cerevisiae* próximo a las 24 horas de proceso, mientras la *E. coli* SL 100 sigue progresivamente aumentando el rendimiento por su habilidad en metabolizar algunos azúcares hemicelulósicos.

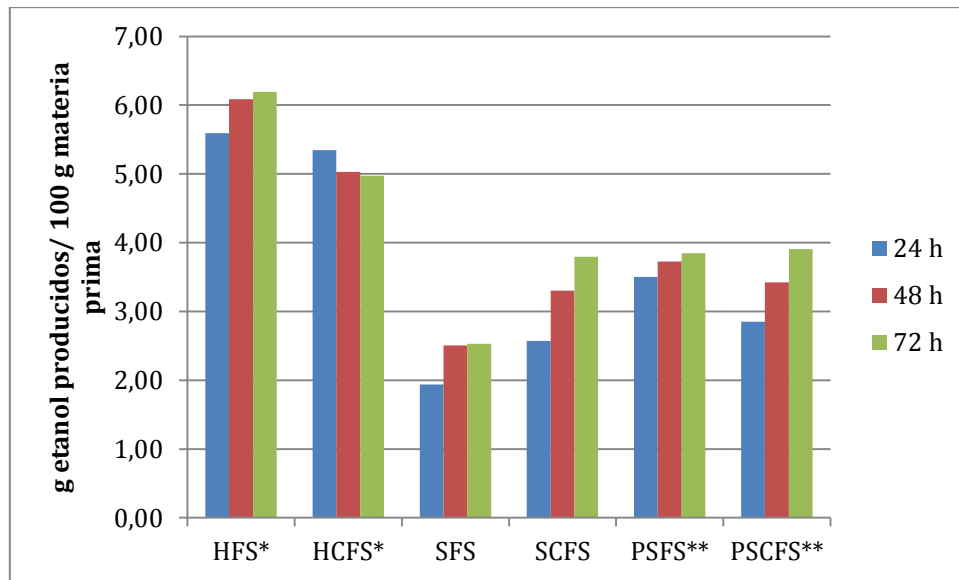


Figura 48. Resultado comparativo de todas las configuraciones de hidrólisis y fermentación aplicadas al sólido pretratado, en gramos de etanol producidos/100 gramos de materia prima. Nota: \*indica que fueron realizadas 72 horas de HE en las condiciones óptimas de la enzima antes de se iniciar la fermentación; \*\*indica que fueron realizadas 6 horas de HE en las condiciones óptimas de la enzima antes de se iniciar la fermentación.

Los resultados ilustrados en la Figura 48 difieren en comparación al único trabajo encontrado en la literatura que ha empleado distintas configuraciones de fermentación con la poda de olivo. Para Manzanares et al. (2011), en las configuraciones estudiadas a partir del pretratamiento combinado térmico-ácido ( $H_2SO_4$  a 1%, 180 °C y 10 minutos de proceso) la SFS ha proporcionado el mejor rendimiento en etanol en comparación a la HFS y PSFS en todas las cargas de sólidos ensayadas (9 a 23%). Ya en el caso de la poda tratada a través de Agua Caliente a Presión, para las cargas más altas de sólidos (17 y 23%) la HFS ha tenido mejores resultados que la SFS y la PSFS, ofreciendo una mejor mezcla entre el material hidrolizado y los microorganismos, mientras que a la menor carga (9%) la SFS ha sido ampliamente superior a las otras dos configuraciones, llegando al mayor rendimiento en etanol visto en el trabajo (76%).

## 6. Hidrólisis Enzimática y Co-Fermentación del *slurry* en las configuraciones de más elevado rendimiento en etanol

En este apartado, se han seleccionado dos configuraciones de la fermentación del sólido pretratado con mayor potencial para aprovechamiento de las hexosas y pentosas (HCSF y PSCFS), mezclándose las fracciones líquidas y sólidas para verificar el potencial de producción en etanol considerando todos los azúcares disponibles, siendo utilizada la *E.*



*coli* SL100. Todos los ensayos en esta parte fueron realizados en duplicado y a una relación 5% p/v (las otras condiciones se recogen en el apartado 9 de la metodología).

## 6.1 HSCF

El análisis de la Hidrólisis y Fermentación por Separado será realizado como se ha hecho en los apartados anteriores, analizándose inicialmente el desempeño de la HE (mostrado en la Tabla 27) y posteriormente el rendimiento en etanol (Tabla 28). Se ha tomado un número mayor de muestras para verificar el desempeño de las enzimas delante de una mayor concentración de azúcares iniciales. Conforme se puede ver en el tiempo 0h, ya había en el medio 7,85 g de glucosa y 13,10 g de xilosa por cada 100 gramos de materia prima, siendo que después de las 72 horas de proceso la producción de glucosa ha subido solamente 4,77 gramos (referida a la misma cantidad de materia prima), una producción bastante inferior a la verificada para HFS y HCFS del sólido que ya habían más que doblado esta cantidad a las 48 horas de proceso. La hipótesis más probable para esto es lo que apuntan Xiao et al. (2004), que han reportado que la xilosa (y otros azúcares, como manosa y galactosa) poseen efectos inhibitorios significativos sobre la acción de las celulasas durante la hidrólisis enzimática y pueden llevar a una conversión incompleta de carbohidratos, ya siendo demostrado por otros autores (Kim et al., 2011; Ximenes et al., 2011; Qing et al., 2010). Además, cócteles enzimáticos que llevan incorporados enzimas capaces de degradar la xilosa (como el empleado en el presente trabajo) pueden producir efectos perjudiciales sobre los rendimientos de glucosa (Modenbach y Nokes, 2013).

**Tabla 27. Producción y recuperación de glucosa y xilosa con respecto al material pretratado y a la materia prima en la etapa de HE de la configuración HCFS trabajando con slurry.**

Tiempo (h)	g glucosa producidos/ 100 g materia prima	% Glucosa recuperada respecto al material pretratado	% Glucosa recuperada respecto a la materia prima	g xilosa producidos/ 100 g materia prima	% xilosa recuperada respecto a la materia prima
0	7,85	44,45	30,43	13,10	119,30
3	8,31	47,02	32,19	12,24	111,48
6	10,27	58,13	39,79	14,06	128,11
10	10,98	62,16	42,55	14,16	128,98
24	11,14	63,02	43,14	14,28	130,06
48	12,15	68,78	47,08	15,03	136,90
72	12,62	71,43	48,90	15,40	140,33

Ya los resultados de la fermentación muestran que la *E. coli* SL100 ha sido capaz de convertir eficientemente a etanol prácticamente todos los azúcares del medio, llegando a 94,51% de rendimiento después de 120 horas de proceso (Tabla 28). Los saltos más significativos en la producción de etanol se verificaron entre las 8-24 horas y 24-50 horas, cuando ya se había producido el 92,6% de todo el etanol. Los resultados que excedieron el 100% son debidos a que, debido a la conversión de la fracción hemicelulósica, hay más etanol en el medio de lo que puede generar a través de la fermentación de la glucosa. En comparación con la literatura, Yu et al. (2017) han obtenido un rendimiento máximo de 72,12% al utilizar el microorganismo *Spathospora passalidarum* sobre la mazorca de maíz, mientras Loaces et al. (2017) han obtenido 0,17 g etanol/litro/hora utilizando *E. coli* para



fermentar la biomasa del *Arundo donax* después de pretratamiento combinado térmico-ácido.

**Tabla 28. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la HCFS del *slurry*.**

Tiempo (h)	g etanol producidos/ 100 g materia prima	Rendimiento de etanol, g etanol/g glucosa*100	Rendimiento de etanol, % del teórico	Rendimiento de etanol, g etanol/g azúcares*100	Rendimiento de etanol, % del teórico
0	0	0	0	0	0
2	2,05	13,44	26,35	5,83	11,43
4	3,15	20,61	40,41	8,94	17,52
8	4,63	30,28	59,37	13,13	25,74
24	8,90	58,25	114,22	25,26	49,52
50	15,74	102,96	201,88	44,64	87,53
72	16,49	107,86	211,50	46,77	91,70
96	16,78	109,79	215,28	47,60	93,34
120	16,99	111,17	217,98	48,20	94,51

## 6.2 PSCFS

Los resultados de la configuración de pre-sacarificación y co-fermentación simultáneas para el *slurry* se muestran en la Tabla 29. Son visibles los mejores rendimientos comparados con la fermentación realizada en el sólido, tanto para la PSFS como para la PSCFS. A las 16 horas de proceso el rendimiento ya había prácticamente doblado en relación a las mismas configuraciones realizadas en el sólido, estableciendo su máximo a las 92 horas. Todavía hubo una evolución muy poco significativa después de las 40 horas, siendo este tiempo el seleccionado en el caso de que el proceso fuese llevado a cabo a una mayor escala.

**Tabla 29. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la PSCFS del *slurry*.**

Tiempo (h)	g etanol producidos/ 100 g materia prima	Rendimiento de etanol, g etanol/g glucosa potenciales en el sólido*100	Rendimiento de etanol, % del teórico	Rendimiento de etanol, g etanol/g azúcares potenciales en el sólido*100	Rendimiento de etanol, % del teórico
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	1,25	3,09	6,07	2,74	5,38
4	2,60	6,40	12,55	5,67	11,12
16	7,22	17,79	34,89	15,76	30,91
24	9,58	23,63	46,33	20,93	41,05
40	13,86	34,17	67,01	30,28	59,36
48	14,28	35,22	69,06	31,20	61,19
66	14,73	36,33	71,23	32,19	63,11
92	14,77	36,44	71,44	32,28	63,29
140	14,50	35,75	70,10	31,68	62,11



En comparación con la literatura, los rendimientos obtenidos están por debajo de los valores reportados por otros autores que emplearon distintas materias primas y condiciones fermentativas. Geddes et al. (2011), por ejemplo, han trabajado con el bagazo de caña de azúcar utilizando la PSCFS con la *E. coli* MM160, empleando distintas temperaturas en el pretratamiento (160 a 180°C) con explosión por vapor y diferentes concentraciones de sólidos (10 a 14%) obteniendo rendimientos bastante similares en las condiciones de menor temperatura de pretratamiento y menor cantidad de sólidos (19,1 gramos de etanol a cada 100 gramos de materia prima) y mayor temperatura y cantidad de sólidos (20,7 gramos de etanol a cada 100 gramos de materia prima). Otros rendimientos, así como el mayor obtenido en el presente trabajo, están ilustrados en la Tabla 30.

Tabla 30. Comparación de los rendimientos obtenidos en la literatura para la configuración PSCFS.

Materia Prima	Pretratamiento	Microrganismo	Rendimiento en etanol*	Referencia
Casco de cebada	Amoníaco acuoso	<i>E. coli</i> KO11	18	Kim et al., 2008
Rastrojo de maíz	Amoníaco acuoso	<i>E. coli</i> KO11	18	Kim et al., 2007
Álamo híbrido	Amoníaco acuoso	<i>E. coli</i> KO11	24	Gupta y Lee, 2009.
Bagazo de caña de azúcar	Combinado térmico-ácido	<i>E. coli</i> MM160	20,7	Geddes et al., 2011
Lodo de papel	-	<i>S. cerevisiae</i> RWB222	26	Zhong et al., 2009
<i>Panicum virgatum</i>	AFEX	<i>S. cerevisiae</i> NRRL-D5A	20	Alizadeh et al., 2005
Sorgo forrajero	AFEX	<i>S. cerevisiae</i> 424 A (LNH-ST)	17	Li et al., 2009a
Bagazo de sorgo dulce	AFEX	<i>S. cerevisiae</i> 424 A (LNH-ST)	16	Li et al., 2009a
Paja de arroz	AFEX	<i>S. cerevisiae</i> 424 A (LNH-ST)	19	Zhong et al., 2009
Rastrojo de maíz	AFEX	<i>S. cerevisiae</i> 424 A (LNH-ST)	20	Lau y Dale, 2009
Poda de olivo	Combinado térmico-ácido	<i>E. coli</i> SL100	14,77	Este trabajo

La Figura 49 trae el perfil del consumo de azúcares obtenidos para la PSCFS. Inicialmente toda la glucosa disponible es consumida en 16 horas, siendo a partir de entonces aprovechada por el microorganismo a la misma medida que va siendo liberada de la hidrólisis. Cuando el nivel de glucosa llega en un equilibrio de producción x consumo, la xilosa entonces empieza a disminuir su concentración de forma más aguda, siendo consumida en 48 horas, momento en que también va siendo consumida a la medida que se va liberando. Después de las 92 horas de proceso, la concentración de etanol empieza a disminuir en virtud del término del proceso de hidrólisis enzimática y cambio del metabolismo de la *E. coli*, que empieza a consumir el etanol presente en el medio. Es



interesante que haya una parte de la arabinosa que no fue consumida por el microorganismo hasta el final del proceso.

Geddes et al. (2011) también han reportado que una parte de azúcares (xilosa) no fue consumida por la *E. coli* mismo después de 240 horas de fermentación, atribuyendo eso en función de una inhibición por furfural, que sería más acentuada en presencia de la xilosa. Aunque los niveles de HMF y furfural del presente trabajo permanecieron en cero después de las 4 horas de proceso, indicando que de alguna manera la *E. coli* estuvo imposibilitada de acceder a esta pequeña fracción de azúcar. La Figura 50 muestra la evolución de los compuestos inhibidores a lo largo de la fermentación. Se muestra el aumento en la concentración de ácido acético, que ha partido de 0,2 g/L en el inicio del proceso y llegó a casi 1,8 g/L. Geddes et al. (2011) y Geddes et al. (2013) también han observado el mismo fenómeno, relatando subidas de hasta 3 veces la concentración inicial de ácido acético. Los niveles del ácido fórmico también subieron, pero la *E. coli* se muestra resistente a este inhibidor, por lo que no hubo una interferencia en la producción de etanol.

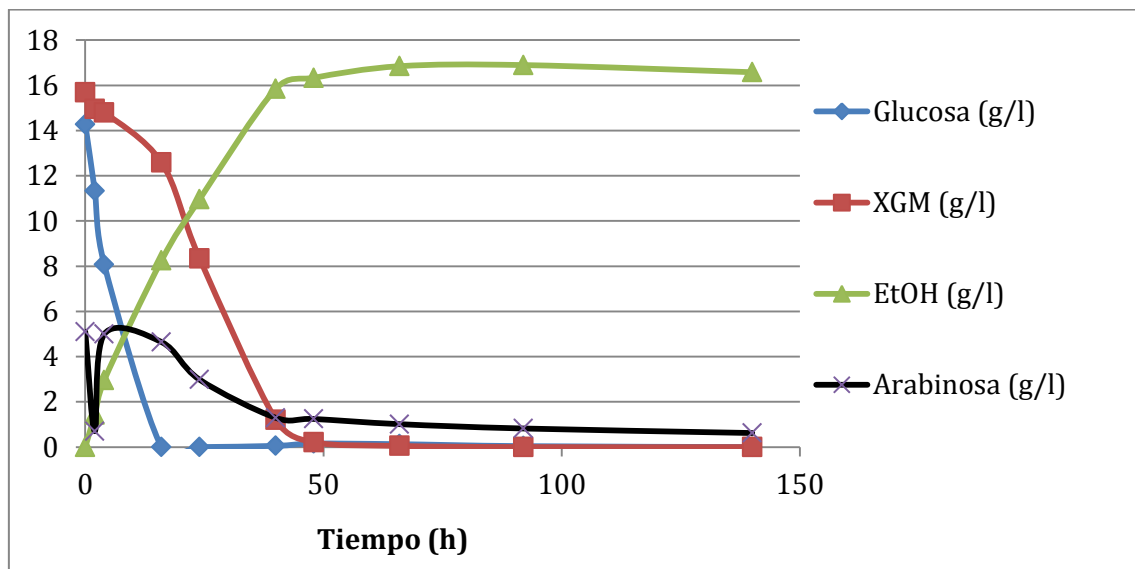


Figura 49. Concentración de los azúcares al largo de la PSCFS.

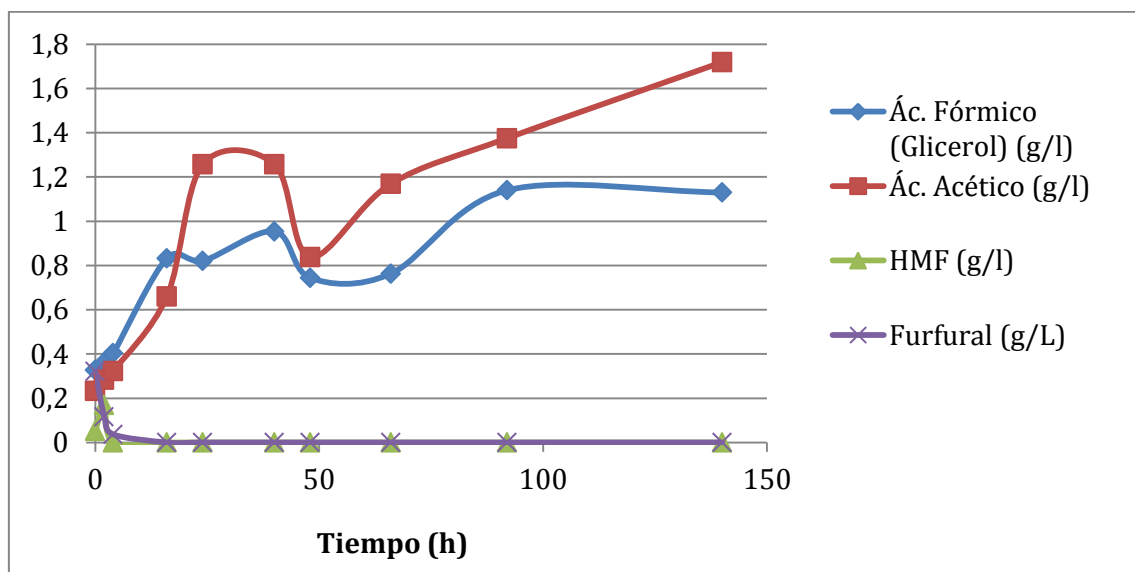


Figura 50. Evolución en la concentración de inhibidores durante todo el proceso fermentativo.



### 6.3 Comparación entre la HCFS y PSCFS en el rendimiento ( $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{100g}_{\text{materia prima}}$ ) del *slurry*

Con la intención de discutir los resultados obtenidos por las dos configuraciones aplicadas al *slurry*, se ha construido la gráfica ilustrada en la Figura 51. Numéricamente, se muestra que al final del proceso la HCFS tiene un mayor rendimiento, que llega a los 16,99 gramos de etanol por cada 100 gramos de materia prima en 120 horas, en comparación con 14,77 gramos de etanol de la PSCFS a las 92 horas. Hay que tener en cuenta que este mayor rendimiento fue obtenido después de 72 horas de HE en condiciones óptimas, mientras la PSCFS tuvo apenas un periodo de 6 horas en estas condiciones, y que hasta las 48 horas de proceso el rendimiento de ambas configuraciones era prácticamente igual, de modo que, si se considera el resultado obtenido a esta hora para la PSCFS y el más alto valor conseguido con la HCFS, la diferencia es de apenas 19%, con lo que se optó por proseguir para la siguiente etapa con la PSCFS.

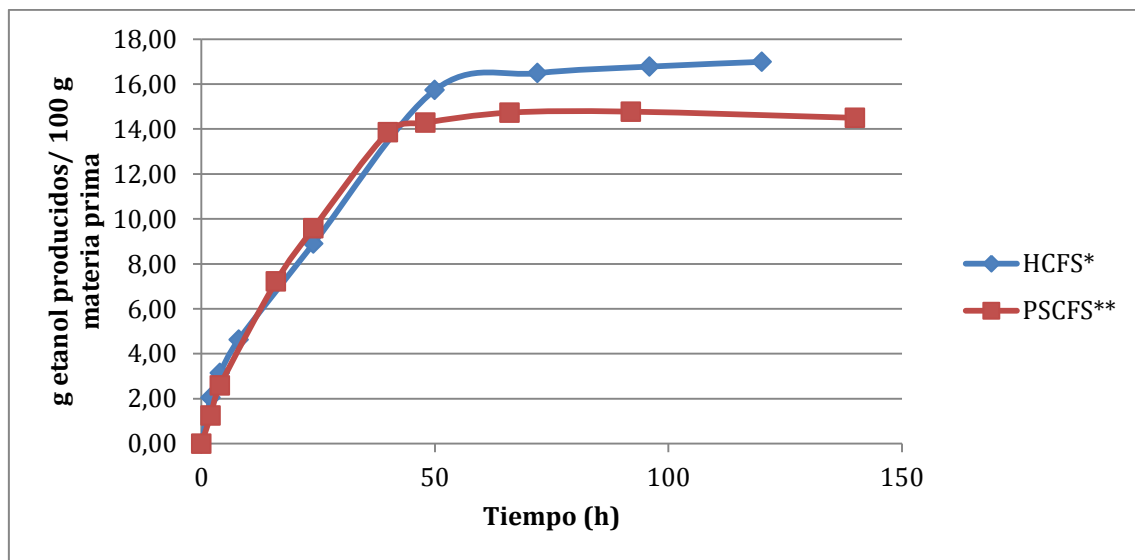


Figura 51. Comparación entre las configuraciones HSCF y PSCFS en el *slurry*. Nota: \*72 horas de HE en las condiciones óptimas \*\*6 horas de HE en las condiciones óptimas

## 7. Hidrólisis enzimática y fermentación del *slurry* en la mejor configuración en distintas concentraciones de sólido y empleo de aireación

La utilización de aire con el fin de mejorar las condiciones fermentativas de levaduras y bacterias ya ha sido objeto de estudio de otros autores, pero está lejos de establecer un consenso general sobre el tema. Schirmer-Michel et al. (2009) han obtenido mejoras en la producción de xilitol utilizando *Candida guilliermondii* bajo condiciones de microaireación (1vvm). Lawford y Rousseau (1994) reportaron una disminución en el rendimiento en etanol y aumento en la formación de co-productos de fermentación con la aplicación de aire bajo burbujeo subsuperficial, el opuesto al encontrado por Okuda et al. (2007), que observaron un aumento en la producción de etanol con burbujeo subsuperficial utilizando una *E. coli* etanológica. En este apartado, se probará los efectos de la inyección de aire sobre el *slurry* trabajando con la *E. coli* SL100.



Conforme a lo explicado en el apartado anterior, la PSCFS fue la configuración escogida para trabajar a una mayor escala empleando dos distintas concentraciones iniciales del sólido (5% y 8,8%) y bajo aireación. La concentración de 5% de sólido inicial fue seleccionada para comparar con todo lo que ya se había hecho anteriormente en el trabajo, mientras la de 8,8% fue para simular la concentración de sólido presente en el *slurry* a la salida del reactor. Los apartados siguientes muestran los resultados de estos ensayos.

### 7.1 PSCFS a 5% p/v con aireación

El desarrollo del proceso fermentativo con el empleo de aireación puede ser revisado en la Tabla 31 y Figura 52. Se observa que la máxima producción de etanol fue establecida a las 16 horas de proceso, con producción de 11,41 gramos de etanol por cada 100 gramos de materia prima (48,89% del rendimiento teórico). A partir de ahí, los niveles empiezan a caer hasta llegar a la menos de la mitad a las 144 horas de proceso. Por la gráfica, se ve claramente que la tasa de consumo de la glucosa y xilosa es parecida, y que todos los azúcares están en concentraciones próximas a cero justamente a las 16 horas del proceso, justamente en el punto más elevado de la curva del etanol, que después empieza a caer. Eso refleja que la producción de etanol ha ocurrido a partir de los azúcares producidos en la etapa de pre-sacarificación y de los ya disponibles en el líquido hidrolizado, de manera que la enzima no fue capaz de producir más carbohidratos monoméricos para el consumo de la *E. coli* SL100.

**Tabla 31. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la PSCFS del *slurry* con aireación a 5% S/L**

Tiempo (h)	g etanol producidos/ 100 g materia prima	Rendimiento de etanol, g etanol/g glucosa potenciales en el sólido*100	Rendimiento de etanol, % del teórico	Rendimiento de etanol, g etanol/g azúcares potenciales en el sólido*100	Rendimiento de etanol, % del teórico
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	1,02	2,53	4,95	2,24	4,39
4	2,79	6,89	13,50	6,10	11,96
16	11,41	28,14	55,18	24,93	48,89
24	10,43	25,73	50,45	22,80	44,70
48	6,78	16,71	32,77	14,81	29,03
66	5,38	13,26	25,99	11,74	23,03
72	5,34	13,17	25,82	11,67	22,88
139	5,74	14,16	27,77	12,55	24,60
144	5,52	13,62	26,70	12,07	23,66

Nieves et al. (2011b) ha obtenido resultados similares con respecto al consumo de azúcares, observando también un consumo más eficaz de la xilosa y una disminución considerable del tiempo de fermentación. Estos autores han verificado un aumento entre el 25% y 30% con el empleo de aire para la configuración PSCFS al contrario de lo mostrado en el presente trabajo. Este aumento provocado por la inyección de aire, a pesar de no ser bien conocido, es atribuido a la producción de compuestos reductores como el NADPH, que produce una disminución de los efectos de inhibidores como el furfural y permite el crecimiento celular en conjunto con el aumento de la producción de etanol. Por

lo que se observa para el presente trabajo, la *E. coli* se ha desarrollado bien con la aireación pero un mayor aumento del rendimiento en etanol no fue posible por una paralización de la actividad enzimática.

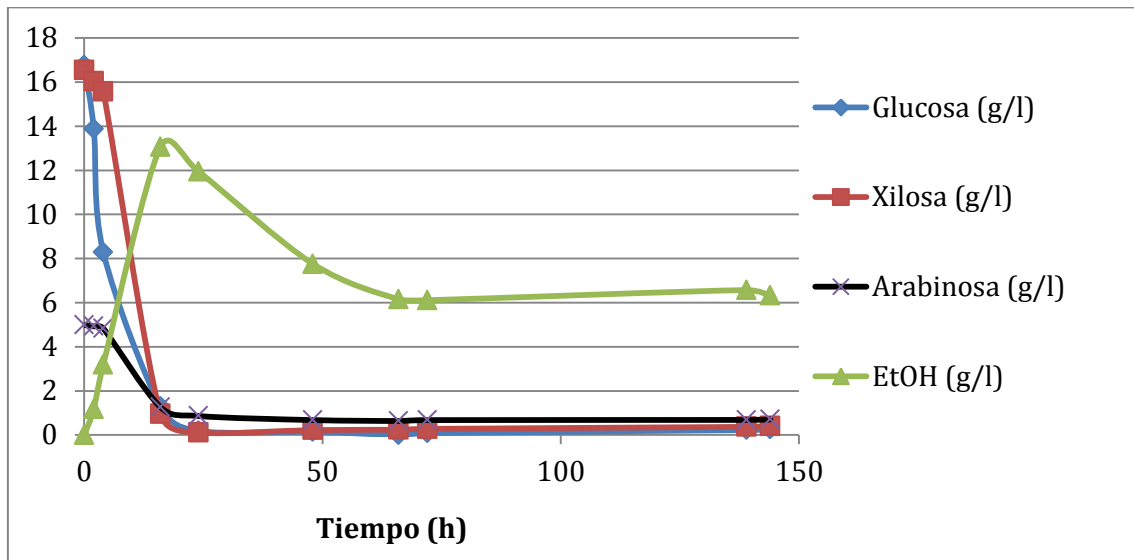


Figura 52. Desarrollo de la fermentación del *slurry* en la PSCFS con un 5% S/L.

## 7.2 PSCFS a 8,8% p/v con aireación

El empleo de la aireación a la concentración de sólidos a la salida del *slurry* está detallado en la Tabla 32 y Figura 53. En este proceso, en que hubo una mayor concentración de azúcares iniciales, se observa el máximo rendimiento en etanol a las 16 horas que va reduciendo hasta alcanzar casi la mitad a las 144 horas de proceso, comportamiento muy similar al realizado para 5% de sólidos. La razón es la misma del proceso anterior, con un consumo por parte del microorganismo de los azúcares disponibles del líquido hidrolizado y de las seis horas de pre-sacarificación con la interrupción del funcionamiento de la enzima cuando las condiciones fueron modificadas. Las tasas de consumo de glucosa y xilosa fueron prácticamente iguales una en comparación a la otra, disminuyendo su concentración a prácticamente cero entre las 16 y 24 horas de proceso. Esto permite que una mayor carga de sólidos sea utilizada sin que el tiempo de fermentación sea más largo.

Los rendimientos disminuyeron en comparación a la fermentación con 5% de sólidos iniciales, y están lejos de algunos datos encontrados en la literatura. Nieves et al. (2011b) han empleado 6 horas de pre-sacarificación utilizando la *E. coli* MM170, 10% de carga de sólidos y 0,01 vvm de aire, observando producciones hasta cinco veces mayores que los datos de la Tabla 32, no reportando ningún tipo de inhibición enzimática hasta el fin del proceso (a las 144 horas). Liu et al. (2016a) y Liu et al. (2016b) han encontrado un mayor consumo de glucosa y mayores rendimientos fermentativos empleando aireación hasta 0,02 vvm, observando disminución en la producción de etanol y residuos de azúcares no consumidos solamente por encima de este volumen de aire. Varela et al. (1992) han observado que la tasa de producción de etanol aumenta hasta 3,3 veces empleando pequeñas cantidades de oxígeno en la fermentación del suero empleando *Kluyveromyces fragilis*, también ha mostrado la disminución del rendimiento cuando son empleadas grandes cantidades de aire que han favorecido la formación de biomasa y estímulo de generación de co-productos.



Tabla 32. Rendimiento en etanol en relación al teórico con respecto a la glucosa y a todos los azúcares en potencial, para la etapa fermentativa de la PSCFS del *slurry* con aireación a 8,8% S/L

Tiempo (h)	g etanol producidos/ 100 g materia prima	Rendimiento de etanol, g etanol/g glucosa potenciales en el sólido*100	Rendimiento de etanol, % del teórico	Rendimiento de etanol, g etanol/g azúcares potenciales en el sólido*100	Rendimiento de etanol, % del teórico
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,63	1,56	3,06	1,38	2,71
4	1,43	3,51	6,89	3,11	6,11
16	7,81	19,26	37,76	17,06	33,46
24	7,57	18,66	36,58	16,53	32,41
48	5,35	13,18	25,85	11,68	22,90
66	3,64	8,98	17,61	7,96	15,60
72	3,96	9,77	19,16	8,66	16,97
139	4,44	10,95	21,46	9,70	19,02
144	4,18	10,31	20,21	9,13	17,90

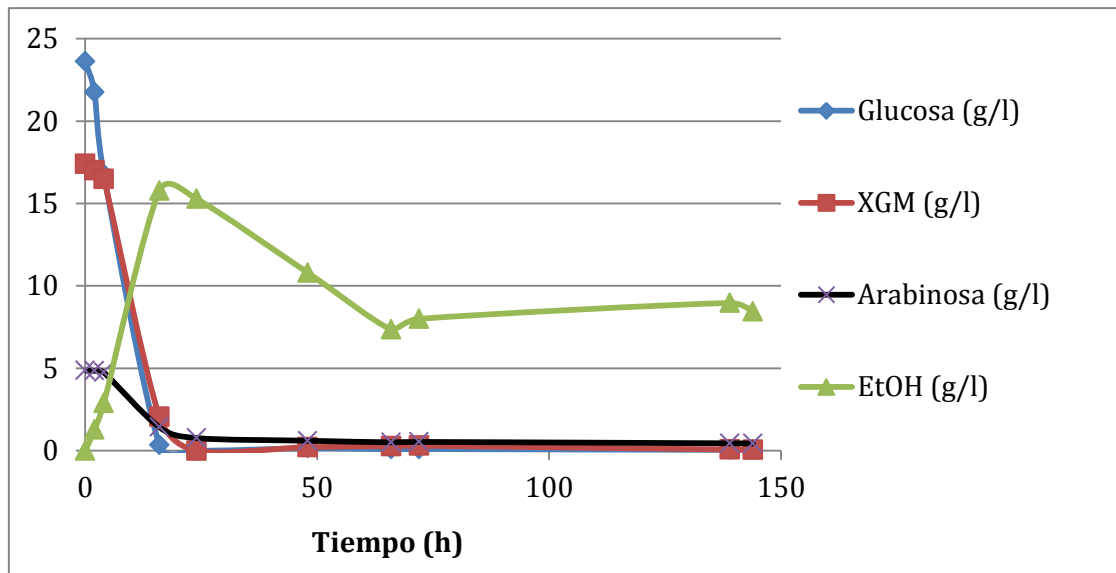


Figura 53. Desarrollo de la fermentación del *slurry* en la PSCFS con un 8,8% S/L.

### 7.3 Comparación de la PSCFS a 5% y 8,8% de concentración de sólidos

La Figura 54 muestra la comparación entre las dos concentraciones de sólidos empleados en la PSCFS con utilización de aireación. Como se puede ver, una menor concentración de sólidos ha dado un mejor rendimiento. En general, una mayor cantidad de sólidos en el *slurry* puede producir una inhibición por exceso de producto en las enzimas, haciendo bajar el rendimiento en la obtención de azúcares, además de producir problemas de viscosidad que dificultan la agitación y el contacto entre los componentes del medio. También, una concentración excesiva inicial de azúcares puede provocar una interrupción de la fermentación por aumentar el estrés osmótico sobre el microorganismo (Zabed et al., 2017). Sin embargo, estas justificaciones se aplican mejor cuando se trabajan con altas cargas de sólidos, generalmente por encima de 10 a 15 % (Modenbach y Nokes, 2013) y no explican con exactitud las diferencias observadas en el presente trabajo, que se esperaban

que fuesen menores y que los rendimientos en etanol fuesen mayores para ambas concentraciones.

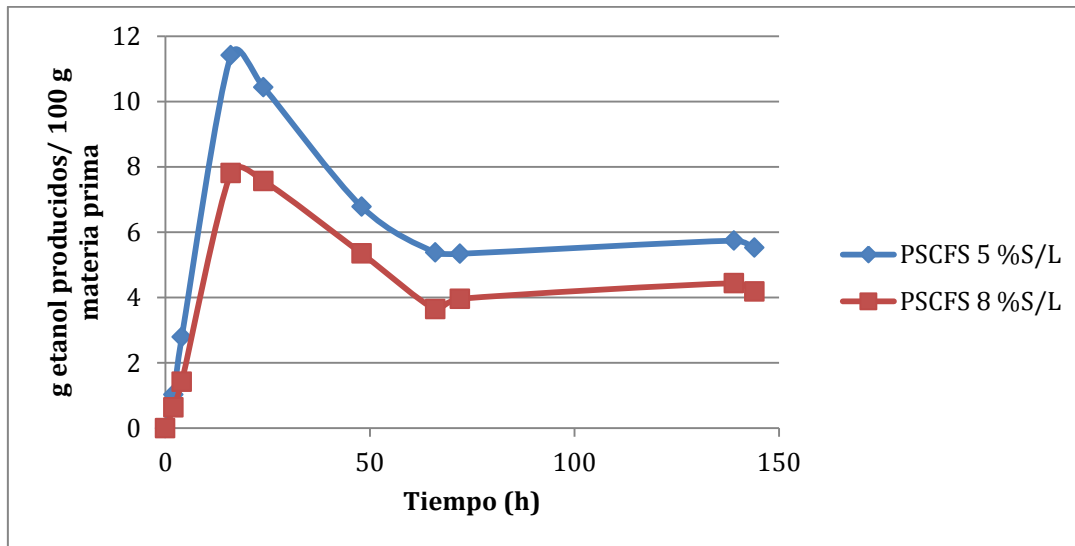


Figura 54. Evolución comparativa del rendimiento de la PSCFS a 5% y 8,8% S/L.

#### 7.4 Comparación entre la PSCFS a 5% de sólidos con y sin el empleo de la aireación

Finalmente se traza una comparación entre la PSCFS a 5% de sólidos iniciales para el *slurry* con y sin el empleo de aireación, mostrado en la Figura 55. En comparación al proceso con inyección de aire, la PSCFS sin aireación tuvo un rendimiento 30% mayor en etanol, con 14,77 gramos de etanol/100 gramos de materia prima a las 92 horas frente a 11,41 gramos de etanol/100 gramos de materia prima producidos en 16 horas. A pesar del menor rendimiento, se muestra el potencial de la inyección de aire en bajas cantidades, que fue capaz de disminuir el tiempo de fermentación de modo significativo, produciendo en 16 horas lo que el proceso sin aireación tardó 40 horas. Más investigaciones deben realizarse centrándose en el motivo por el cual ha ocurrido la inesperada inhibición de la enzima con la inyección de aire, pues la disminución del tiempo fermentativo es vital para un mayor despliegue de las instalaciones del bioetanol de segunda generación.

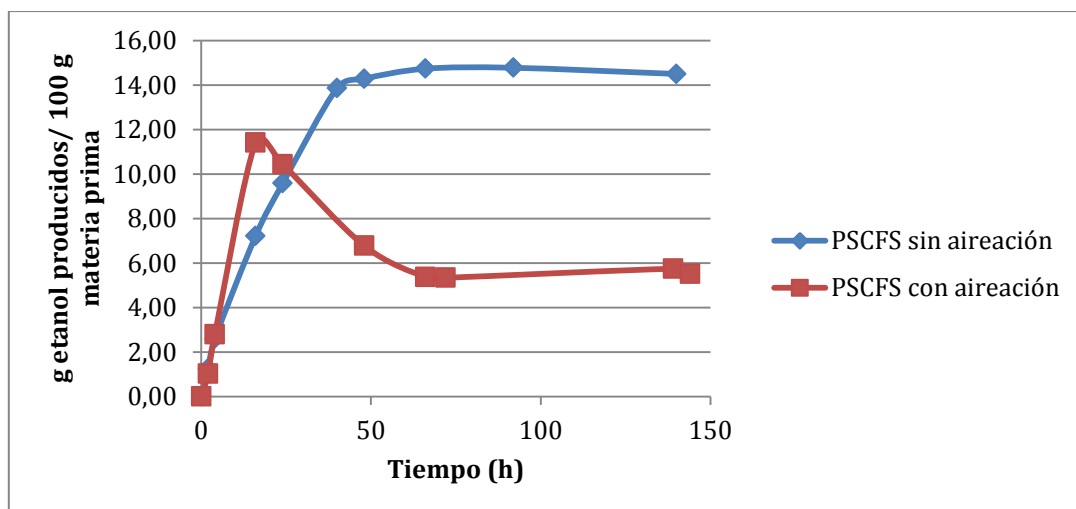


Figura 55. Evolución comparativa del rendimiento de la PSCFS a 5% con y sin aireación.

## 8. Esquema propuesto y balance de materia final para la producción de etanol de segunda generación a partir de la poda de olivo dentro de las condiciones ensayadas

Después de realizar una serie de ensayos probando distintos métodos de detoxificación y configuraciones de hidrólisis enzimática y fermentación, a partir de determinadas condiciones de pretratamiento, se propone el esquema para la producción de etanol de segunda generación a partir de la poda de olivo mostrado en la Figura 56. Como ya se ha visto en los apartados anteriores, el uso del  $\text{NH}_4\text{OH}$  5N no ha degradado los azúcares a la vez que proporcionó rendimientos fermentativos más eficientes que los demás métodos de detoxificación. Ya la configuración de PSCFS sin aireación ha demostrado tener buenos rendimientos con menores tiempos de fermentación, que son características muy atractivas para un posible aumento en la escala del proceso. Es importante destacar que el empleo de aireación tiene un gran potencial pues aumenta la tasa de consumo de azúcares y disminuye el tiempo de fermentación, habiendo que investigar las razones por las cuales ha ocurrido la interrupción de la actividad enzimática para hacer el proceso aún más eficiente. Otra posible aproximación sería el empleo de la configuración HCFS disminuyendo el tiempo de la HE hasta 10 horas y de la fermentación hasta 50 horas, ya que a partir de ahí los aumentos en producción de azúcares y etanol no son muy significativos.

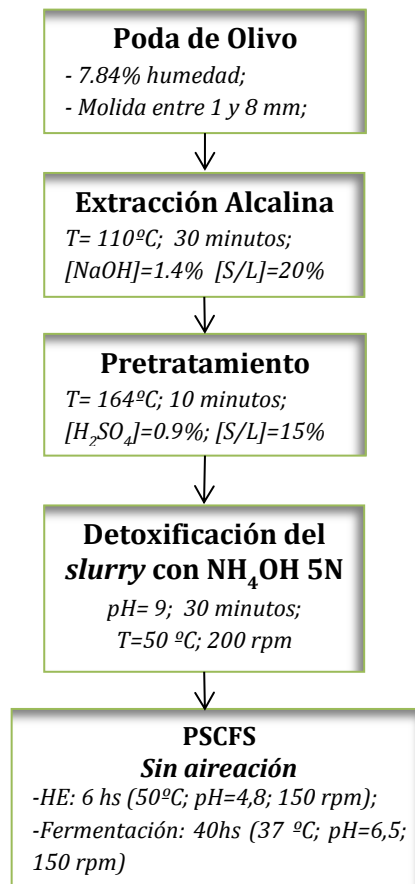


Figura 56. Esquema propuesto para el aprovechamiento de la poda del olivo en la producción de etanol de segunda generación.



Por fin, se presenta un balance de materia del esquema óptimo seleccionado para la poda del olivo, mostrado en la Figura 57. Se puede observar que un máximo de 20,45 gramos de etanol pueden ser obtenidos a partir de la cantidad de azúcares presentes en 100 gramos de poda, produciéndose, después de 46 horas de proceso, 68% del etanol potencial.

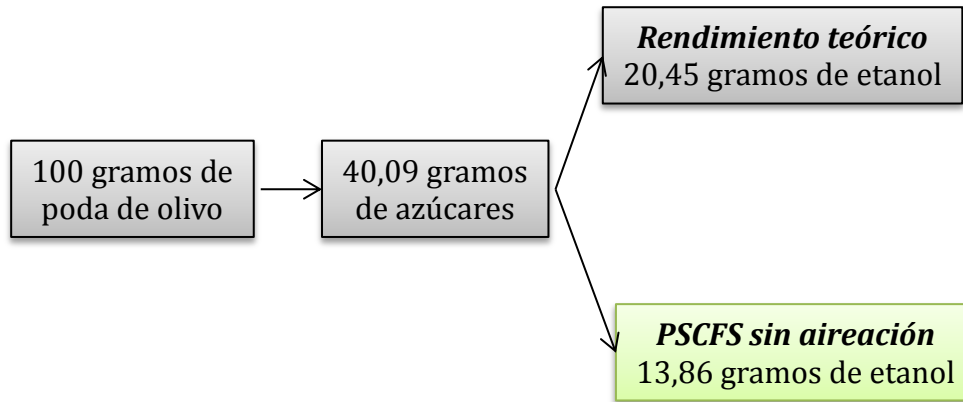


Figura 57. Balance de materia para el esquema óptimo adoptado en la producción de etanol a partir de la poda del olivo.



## VI. Conclusiones

---



Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo son las siguientes:

- La etapa de extracción realizada con NaOH 1,4% a 110 °C durante 30 minutos eliminó cerca de 75% de los extractos presentes en el olivo, contribuyendo de manera importante en la secuencia del proceso.
- El NH<sub>4</sub>OH 5N ha sido el método de detoxificación que propicia los mejores rendimientos fermentativos para la poda de olivo en comparación con el carbón activo y *overliming*.
- Entre las configuraciones probadas para la fracción sólida, las que realizaron hidrólisis enzimática y fermentación por separado (HSF y HSCF) han obtenido los mayores rendimientos (5,45 y 4,70 gramos de etanol por cada 100 gramos de materia prima, respectivamente), seguidas de en las que se empleó pre-sacarificación (PSFS y PSCFS) y por último las que emplearon fermentación e hidrólisis enzimática simultánea (SFS y SFCS).
- En la fermentación del *slurry*, la Pre-Sacarificación y Co-Fermentación Simultánea obtuvo rendimientos similares (14,28 gramos de etanol/100 gramos de materia prima) en menor tiempo de proceso (6 horas de HE y 48 horas de fermentación) que la Hidrólisis y Co-Fermentación por Separado (15,74 gramos de etanol/100 gramos de materia prima con 72 horas de HE y 50 horas de fermentación).
- El aumento de carga de sólidos inicial en la Pre-Sacarificación y Co-Fermentación Simultánea (PSCFS) del *slurry* con empleo de aireación (0,1 vvm) ha producido una disminución del rendimiento de producción de etanol (5% S/L, 11,41 gramos de etanol/100 gramos de materia prima; 8,8 % S/L, 7,81 gramos de etanol/100 gramos de materia prima).
- El empleo de aireación en la PSCFS del *slurry* aumentó la velocidad de consumo de azúcares por parte de la *E. coli* SL100 con una consecuente reducción del tiempo de fermentativo (16 horas), tanto para la carga de 5% como para la de 8,8% S/L iniciales. Sin embargo, los rendimientos obtenidos fueron menores (11,41 gramos de etanol/100 gramos de materia prima) en comparación al *slurry* sin inyección de aire (14,77 gramos de etanol/100 gramos de materia prima). Esto puede deberse a una interrupción inesperada de la actividad enzimática después de las 16 horas de proceso.
- Visto lo anterior, se propone como esquema óptimo para la producción de bioetanol a partir de la poda de olivo previamente extraída con NaOH 1,4% y pretratada con el método combinado térmico-ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,9%, 110 °C durante 30 minutos) una detoxificación del *slurry* con NH<sub>4</sub>OH 5N (pH 9, 50 °C, 30 minutos) y el empleo de la PSCFS sin aireación con 6 horas de hidrólisis enzimática a 50 °C, pH 4,8 y fermentación durante 40 horas a pH 6,5, 37 °C. En estas condiciones, la cantidad de etanol que se puede obtener a partir de 100 g de poda es de 13,86 gramos.



## VII. Bibliografía

---



Aditiya, H.B.; Mahlia, T.M.I.; Chong, W.T.; Nur, H.; Sebayang, A.H. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 66 (2016) 631-653.

Agbor, V.B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A.; Levin, D.B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. 29(2011) 675-685.

Aguilar-Reynosa, A.; Román, A.; Rodríguez-Jasso, R.M.; Aguilar, C.N.; Garrote, G.; Ruiz, H.A. Comparison of microwave and conduction-convection heating autohydrolysis pretreatment for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 243 (2017) 273-283.

Alcarde, V.E. Avaliação de parâmetros que afetam a floculação de leveduras e bactérias isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. Tesis Doctoral, Universidade Estadual de Campinas. (2001) 91p.

Alizadeh, H.; Teymouri, F.; Gilbert, T.I.; Dale, B.E. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 121 (2005) 1133-1141.

Allinger, N.L.; Cava, M.P.; Jongh, D.C.; Johnson, C.R.; Lebel, N.A. Stevens, C.L. *Química Orgánica*. Editorial Reverté S.A. 2 (1984).

Almario, M.P.; Reyes, L.H.; Kao, K.C. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*. 110 (2013) 2616-2623.

Ariksson, B.; Sjode, A.; Nilvebrant, N.; Jonsson, L. Optimal conditions for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 129-132 (2006) 599-611.

Alvarado, I. Biobutanol, opción energética de segunda generación. (2017). Disponible en <<http://www.gaceta.unam.mx/20170330/biobutanol-opcion-energetica-de-segunda-generacion/>>. Acceso en 23/08/2017.

Alvira, P.; Tomas-Pejo, E.; Ballesteros, M.; Negro, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 101 (2010) 4851-4861.

Amarasekara, A.S. Acid ionic Liquids. *Chemical Reviews*. 116 (2016) 6133-6183.

Amorim, H.V.; Lopes M.L.; Oliveira, J.V.C; Buckeridge, M.; Goldman, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91 (2011) 1267-1275.

Arora, R.; Behera, S.; Kumar, S. Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: A future perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 51 (2015) 699-717.

Arvaniti, E.; Bjerre, A.B.; Schmidt, J.E. Wet oxidation pretreatment of rape straw for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 39 (2012) 94-105.



- Avilés-Martínez, A.; Medina-Herrera, N.; Jiménez-Gutiérrez, A.; Serna-González, M.; Castro-Montoya, A.J. Risk Analysis Applied to Bioethanol Dehydration Processes: Azeotropic Distillation versus Extractive Distillation. *Computer Aided Chemical Engineering*. 37 (2015) 1835-1840.
- Azhar, S.H.M.; Abdulla, R.; Jambo, S.A.; Marbawi, H.; Gansau, J.A.; Faik, A.A.M.; Rodrigues, K.F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 10 (2017) 52-61.
- Balat, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management*. 52 (2011) 858-875.
- Ballesteros, I.; Ballesteros, M.; Cara, C.; Sáez, F.; Castro, E.; Manzanares, P.; Negro, M.J.; Oliva, J.M. Effect of water extraction on sugars recovery from steam exploded olive tree pruning. *Bioresource Technology*. 102 (2011) 6611-6616.
- Banerjee, S.; Mudliar, S.; Sen, R.; Giri, B.; Satpute, D.; Chakrabarti, T. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining-Biofpr*. 4 (2010) 77-93.
- Barreto, S.M. Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifola frondosa*. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en <<http://www.bdigital.unal.edu.co/956/1/sandramontoyabarreto.2008.pdf>>. 2008.
- Basso, L.C.; Amorim, H.V.; Oliveira, A.J.; Lopes, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*. 8 (2008) 1155-1163.
- Basso, T-O.; Gomes, F.S.; Lopes, M.L.; Amorim, H.V.; Eggleston, G.; Basso, L.C. Homo and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 105 (2014) 169-177.
- Behera, S.; Arora, R.; Nandhagopal, N.; Kumar, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 36 (2014) 91-106.
- Berlin, A.; Balakshin, M.; Gilkes, N.; Kadla, J.; Maximenko, V.; Kubo, S.; Saddler, J.N. Inhibition of cellulose, xylanase and b-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology*. 125 (2006) 198-209.
- Bertrand, E.; Vandenberghe, L.P.S.; Soccol, C.R.; Sigoillot, J.C.; Faulds, C. First generation bioethanol. *Green Fuels technology*, Springer International Publishing. (2016) 175-212.
- Bhutto, A.W.; Qureshi, K.; Harijan, K.; Abro, R.; Abbas, T.; Bazmi, A.A.; Karim, S.; Yu, G.; Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Energy*. 122 (2017) 724-745.
- BNDES y CGEE – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social y Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Bioetanol de Cana-de-Açúcar: Energia para o Desenvolvimento Sustentável. 1 (2008) 316p.



- Bommarius, A.S.B.; Riebel, B.R. Biocatalysis. Atlanta, USA: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2004.
- Boonsawang, P.; Subkaree, Y.; Srinorakutara, T. Ethanol production from palm pressed fiber by prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation (SSF). *Biomass and Bioenergy*. 40 (2012) 127-132.
- Borges, E.P.; Lopes, M.L.; Bernardino, C.; Godoy, A.; Ré, F.; Cherubin, R.A.; Paulillo, S.C.L.; Amorim, H.V. The benefits of applied research: 37 years of discoveries, adaptations and solutions. *Sugar Industry*. 140 (2015) 209-216.
- Borjesson, J.; Engqvist, M.; Sipos, B.; Tjerneld, F. Effect of poly (ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulose enzymes to pretreated lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*. 41 (2007) 186-195.
- Brat, D.; Boles, E.; Wiedemann, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*. 75 (2009) 2304-2311.
- Brown, N.A.; Castro, P.A.; Figueiredo, B.C.P. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. *FEMS Yeast Research*. 13 (2013) 277-290.
- Calixto, M. Mesmo sem EUA, Acordo de Paris não será um fracasso como foi Kyoto. (2017). Disponible en <<http://epoca.globo.com/ciencia-e-meio-ambiente/blog-do-planeta/noticia/2017/06/mesmo-sem-eua-acordo-de-paris-nao-sera-um-fracasso-como-foi-kyoto.html>>. Acceso en 24/08/2017.
- Canilha, L.; Chandel, A.K.; Milessi, T.S.S.; Antunes, F.A.F.A.; Freitas, W.L.C.; Felipe, M.G.A.; Silva, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. (2012) 1-15.
- Cara, C.; Romero, I.; Oliva, J.M.; Sáez, F.; Castro, E. Liquid hot water pretreatment of olive tree pruning residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 136-140 (2007) 379-394.
- Cara, C.; Ruiz, E.; Ballesteros, M.; Manzanares, P.; Negro, M.J.; Castro, E. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*. 87 (2008) 692-700.
- Cara, C.; Ruiz, E.; Ballesteros, I.; Negro, M.J.; Castro, E. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree Wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry*. 41 (2006) 423-429.
- Cara, C.; Ruiz, E.; Oliva, J.M.; Sáez, F.; Castro, E. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*. 99 (2008) 1869-1876.
- Cardona, C.A.; Quintero, J.A.; Paz, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*. 101 (2010) 4754-4766.



Carneiro, T.F.; Timko, M. Chapter 17 – Biomass Pretreatment with Carbon Dioxide. Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery. (2016) 385-407.

Carrasco, C.; Baudel, H.; Peñarrieta, M.; Solano, C.; Tejada, L.; Roslander, C.; Galbe, M.; Lidén, G. Steam pretreatment and fermentation of the straw material “Paja Brava” using simultaneous saccharification and co-fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 111 (2011) 167-174.

Carrere, H.; Antonopoulou, G.; Affes, R.; Passos, F.; Battimelli, A.; Lyberatos, G.; Ferrer, I. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. Bioresource Technology. 199 (2016) 386-397.

Carvalho, W.; Santos, J.C.; Canilha, L.; Silva, S.S.; Perego, P.; Converti, A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate: metabolic behavior of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. Biochemical Engineering Journal. 25 (2005) 25-31.

Chandel, A.K.; Chandrasekhar, G.; Radhika, K.; Ravinder, R.; Ravindra, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: a review and future directions. Biotechnology and Molecular Biology Reviews. 6 (2011) 8-20.

Chandel, A.K.; Kapoor, R.K.; Singh, A.; Kuhad, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. Bioresource Technology. 98 (2007) 1947-1950.

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

Chang, V.S.; Holtzapple, M. Fundamental factors affecting biomass reactivity. Applied Biochemistry and Biotechnology. 85 (2000) 5-37.

Chen, H.; Liu, J.; Chang, X.; Chen, D.; Xue Y.; Liu, P.; Lin, H.; Han, S. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. Fuel Processing Technology. 160 (2017) 196-206.

Chen, J.; Fales, S.L.; Varga, G.A.; Royse, D.J. Biodegradation of cell wall components of maize stover colonized by white-rot fungi and resulting impact on in-vitro digestibility. Journal of Science and Food Agriculture. 68 (1995) 91-98.

Chen, X.; Kuhn, E.; Jennings, E.; Nelson, R.; Zhang, M.; Ciesielski, P.N.; Tao, L.; Tucker, M.P.; DMR (deacetylation and mechanical refining) processing of corn stover achieves high monomeric sugar concentrations (230 g/L) during enzymatic hydrolysis and high ethanol concentration (> 10% v/v) during fermentation without hydrolysate purification or concentration. Energy & Environmental Science. 9 (2016) 1237-1245.

Chen, X.; Shekiri, J.; Pschorn, T.; Sabourin, M.; Tao, L.; Elander, R.; Park, S.; Jennings, E.; Nelson, R.; Trass, O.; Flanagan, K.; Wang, W.; Himmel, M.E.; Johnson, D.; Tucker, M.P. A highly efficient dilute alkali deacetylation and mechanical (disc) refining process for the



conversion of renewable biomass to lower cost sugars. *Biotechnology for Biofuels*. 7 (2014) 12p.

Cheng, J.; Huang, R.; Li, T.; Zhou, J.; Cen, K. Physicochemical characterization of wet microalgal cells disrupted with instant catapult steam explosion for lipid extraction. *Bioresource Technology*. 191 (2015) 66-72.

Chiaramonti, D.; Prussi, M.; Ferrero, S.; Oriani, L.; Ottonello, P.; Torre, P.; Cherchi, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*. 46 (2012) 25-35.

Chien, I-L.; Yu, B-Y.; Ai, Z.J. Chapter 15 – Design of Azeotropic Distillation Systems. *Chemical Engineering Process Simulation*. (2017) 355-385.

Chou Y-C.; Linger, J.; Yang, S.; Zhang, M. Genetic engineering and improvement of a *Zymomonas mobilis* for arabinose utilization and its performance on pretreated corn stover hydrolysate. *Journal of Biotechnology and Biomaterials*. 5 (2015) 8p.

Christoforou, E.; Fokaidis, P.A. A review of olive mil solid wastes to energy utilization techniques. *Waste Management*. 49 (2016) 346-363.

Chundawat, S.P.S.; Donohoe, B.S.; Sousa, L.C.; Elder, T.; Agarwal, U.P.; Lu, F.; Ralph, J.; Himmel, M.E.; Balan, V.; Dale, B.E. Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. *Energy & Environmental Science*. 4 (2011) 973-984.

Clark J., Deswarte F. Introduction to Chemicals from biomass. *Wiley Series in Renewable Sources*. (2008) 184 p.

Coughlan, M.P.; Hazlewood, G.P. 1-4-D-xylan degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 17 (1993) 259-298.

Cruz, J.M.; Domínguez, H.; Parajo, J.C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. *Food Biotechnology*. 14 (2002) 79-97.

Dagnino, E.P.; Chamorro, E.R.; Romano, S.D.; Felissia, F.E.; Area, M.C. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*. 42 (2013) 363-368.

Das, B.; Sarkar, S.; Maiti, S.; Bhattacharjee, S.; Studies on production of ethanol from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Materials Today: Proceedings*. 3 (2016) 3253-3257.

Dasgupta, D.; Ghosh, D.; Bandhu, S.; Adhikari, D.K.; Lignocellulosic sugar management for xylitol and ethanol fermentation with multiple cell recycling by *Kluyveromyces marxianus* IPE453. *Microbiological Research*. 200 (2017) 64-72.

Della-Bianca, B.E.; Basso, T.O.; Stambuk, B.U.; Basso, L.C.; Gombert, A.K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97 (2013) 979-991.



- Demirbas, A. Biorefineries: For Biomass Upgrading Facilities.1 (2010) 240 p.
- Demirbas, A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *Journal of Hazardous Materials*. 157 (2008) 220-229.
- Demirbas, F.M. Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review. *Applied Energy*. 86 (2009) 5151-5161.
- Díaz, M.J.; Huijgen, W.J.J.; Van der Laan, R.R.; Reith, J.H.; Cara, C.; Castro, E. Organosolv pretreatment of olive tree biomass for fermentable sugars. *International Journal of the Biology, Chemistry, Physics, and Technology of Wood*. 65 (2011) 177-183.
- Dunn, K.L.; Rao, C.V. Expression of a xylose-specific transporter improves ethanol production by metabolically engineered *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98 (2014) 6897-6905.
- Dunn, K.L.; Rao, C.V. High-throughput sequencing reveals adaptation-induced mutations in pentose-fermenting strains of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 112 (2015) 2228-2240.
- Duque, A.; Manzanares, P.; Ballesteros, M. Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: fundamentals and applications. *Renewable Energy*. In Press, Corrected Proof (2017).
- Ebrahimi, M.; Caparanga; A.R. Ordone, E.E.; Villaflores, O.B. Evaluation of organosolv pretreatment on the enzymatic digestibility of coconut coir fibers and bioethanol production via simultaneous saccharification and fermentation. *Renewable Energy*. 109 (2017) 41-48.
- Elgharbawy, A.A.; Alam, M.Z.; Moniruzzaman, M.; Goto, M. Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biochemical Engineering Journal*. 109 (2016) 252-267.
- EPA – United States Environmental Protection Agency. Global Greenhouse Gas Emissions Data. (2016). Disponible en < <https://www.epa.gov/ghgemissions/global-greenhouse-gas-emissions-data>>. Acceso en 24/08/2017.
- EPE – Empresa de Pesquisa Energética. Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis: Ano 2016. Disponible en < [http://www.epe.gov.br/Petroleo/Documents/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADveis%20-%20boletins%20peri%C3%B3dicos/Analise\\_de\\_Conjuntura\\_Ano\\_2016\\_r1.pdf](http://www.epe.gov.br/Petroleo/Documents/An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura%20dos%20Biocombust%C3%ADveis%20-%20boletins%20peri%C3%B3dicos/Analise_de_Conjuntura_Ano_2016_r1.pdf)>. Acceso en 24/08/2017.
- Erdei, B.; Frankó, B.; Galbe, M.; Zacchi, G. Separate hydrolysis and co-fermentation for improved xylose utilization in integrated ethanol production from wheat meal and wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*. 5 (2012) 12p.
- Errico, M.; Rong, B-G.; Tola, G.; Spano, M. Optimal synthesis of distillation systems for bioethanol separation. Part 1: extractive distillation with simple columns. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 52 (2013) 1612-1619.



Esteghlalian, A.R.; Svivastava, V.; Gilkes, N.; Gregg, D.J.; Saddler, J.N. An overview of factors influencing the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic feedstocks. *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*. (2001) 100-111.

Eykens, L.; De Sitter, K.; Dotremont, C.; Pinoy, L.; Van der Bruggen, B. Membrane synteshis for membrane distillation: A review. *Separation and Purification Technology*. 182 (2017) 36-51.

Fahd, S.; Fiorentino, G.; Mellino, S.; Ulgiati, S. Cropping bioenergy and biomaterials in marginal land: the added value of the biorefinery concept. *Energy*. V. 37, p. 79-93. 2012.

Fang, Z.; Smith Jr., R.; Qi, X. *Production of Platform Chemicals from Sustainable Resources*. Springer. 1 (2017).

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. (2017). Disponible en < <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>>. Acceso en 14/07/2017.

Ferreira, V.F.; Rocha, D.R.; Silva, F.C. Potentiality and opportunity in the chemistry of sucrose and other sugars. *Química Nova*. 32 (2009) 623-628.

Fullarton, D.; Schlunder, E.U. Diffusion Distillation – A New Separation process for Azeotropic Mixtures. Part I: Selectivity and Transfer Efficiency. *Chemical Engineering and Processing*. 20 (1986) 255-263.

García-Maraver, A.; Zamorano, M.; Ramos-Ridao, A.; Días, L.F. Analysis of olive grove residual biomass potential for electric and thermal energy generation in Andalusia (Spain). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16 (2012) 745-751.

Geddes, C.C.; Mullinix, M.T.; Nieves, I.U.; Hoffman, R.W.; Sagues, W.J.; York, S.W.; Shanmugam, K.T.; Erickson, J.E.; Vermerris, W.E.; Ingram, L.O. Seed train development for the fermentation of bagasse from sweet sorghum and sugarcane using a simplified fermentation process. *Bioresource Technology*. 128 (2013) 716-724.

Geddes, C.C.; Mullinix, M.T.; Nieves, I.U.; Peterson, J.J.; Hoffman, R.W.; York, S.W.; Yomano, L.P.; Miller, E.N.; Shanmugam, K.T.; Ingram, L.O. Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant *Escherichia coli* strain MM160. *Bioresource Technology*. 102 (2011) 2702-2711.

Girio, F.M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*. 101 (2010) 4775-4800.

Godoy, A.; Amorim, H.V.; Lopes, M.L.; Oliveira, A.J. Continous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *International Sugar Journal*. 110 (2008) 175-181.

Gómez, J. Los residuos de origen vegetal ¿problema o recurso?. *Real Academia Nacional de Farmacia*. (1991). Disponible en < <https://www.analesranf.com/index.php/discurso/article/view/763/0>>. Acceso en 23/08/2017.



Gonçalves, F.A.; dos Santos, E.S.; de Macedo, G.R. Alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* in the presence of inhibitory compounds and seawater. *Journal of Basic Microbiology*. 55 (2015) 695-708.

Gupta, A.; Verma, J.P. Sustainable bioethanol production from agro-residues: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 41 (2015) 550-567.

Gupta, R.; Khasa, Y.P.; Kuhad, R.C. Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. *Carbohydrate Polymer*. 84 (2010) 1103-1109.

Gupta, R.; Lee, Y.Y.; Pretreatment of hybrid poplar by aqueous ammonia. *Biotechnology Progress*. 25 (2009) 357-364.

Hasunuma, T.; Ismail, K.S.K.; Nambu, Y.; Kondo, A. Co-expression of TAL1 and ADH1 in recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysates in the presence of furfural. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 117 (2014) 165-169.

Hayes, D.J. An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. *Catalysis Today*. 145 (2009) 138-151.

Heluane, H.; Spencer, J.F.T.; Spencer, D.; Figueroa, L.; Callieri, D.A.S. Characterization of hybrids obtained by protoplast fusion between *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. 40 (1993) 98-100.

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

Herrera, J.A.L.C. Instalación de gasificación de restos de poda de olivar integrada en una almazara. (2012). Disponible en <<http://www.interempresas.net/Produccion-Aceite/Articulos/103875-Instalacion-de-gasificacion-de-restos-de-poda-de-olivar-integrada-en-una-almazara.html>>. Acceso en 24/08/2017.

Ho, N.W.Y.; Chen, Z.; Brainard, A.P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Applied Environmental Microbiology*. 64 (1998) 1852-1859.

Hodge, D.B.; Karim, M.N.; Schell, D.J.; McMillan, J.D. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 152 (2009) 88-107.

Hoşgün, E.Z.; Berikten, D.; Kivanç, M.; Bozan, B. Ethanol production from hazelnut shells through enzymatic saccharification and fermentation by low-temperature alkali pretreatment. *Fuel*. 196 (2017) 280-287.

Hu, Q.I.; Fan, L.; Gao, D. Pilot-scale investigation on the treatment of cellulosic ethanol biorefinery wastewater. *Chemical Engineering Journal*. 309 (2017) 409-416.

Huang, Y.; Wei, X.; Zhou, S.; Liu, M.; Tu, Y.; Li, A.; Chen, P.; Wang, Y.; Zhang, X.; Tai, H. Steam explosion distinctively enhances biomass enzymatic saccharification of cotton stalks by



largely reducing cellulose polymerization degree in *G. barbadense* and *G. hirsutum*. *Bioresource Technology*. 181 (2015) 224-230.

IDAE – Instituto para Diversificación y Ahorro de la Energía. BIOONLINE: Herramienta WEB de cálculo de biomasa. Disponible en <[http://www.idae.es/uploads/documentos/documentos\\_03\\_Manual\\_Bionline\\_239f8133.pdf](http://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_03_Manual_Bionline_239f8133.pdf)>. Acceso en 23/08/2017.

IEA – International Energy Agency. Disponible en <[www.iea.org](http://www.iea.org)>. Acceso en 29/07/2017.

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation (SRREN). (2015). Disponible en <<http://www.ipcc.ch/report/srren/>>. Acceso en 24/08/2017.

Itoh, H.; Wada, M.; Honda, Y.; Kuwahara, M.; Watanabe, T. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of Biotechnology*. 15 (2003) 273-280.

Jahnavi, G.; Prashanthi, G.S.; Sravanthi, K.; Rao, L.V. Status of availability of lignocellulosic feed stocks in India: Biotechnological strategies involved in the production of Bioethanol. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 73 (2017) 798-820.

Jambo, S.A.; Abdulla, R.; Azhar, S.H.M.; Marbawi, H.; Gansau, J.A.; Ravindra, P. A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 65 (2016) 756-769.

Jennings, E.W.; Schell, D.J. Conditioning of dilute-acid pretreated corn stover hydrolysate liquors by treatment with lime or ammonium hydroxide to improve conversion of sugars to ethanol. *Bioresource Technology*. 102 (2011) 1240-1245.

Jiang, L.; Zheng, A.; Zhao, Z.; He, F.; Li, H.; Liu, W. Obtaining fermentable sugars by dilute acid hydrolysis of hemicellulose and fast pyrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*. 182 (2015) 364-367.

Jonson, L.J.; Alriksson, B.; Nilvebrant, N.O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for biofuels*. 1 (2013) 6-16.

Jonsson, L.J.; Martín, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 199 (2016) 103-112.

Joshi, B.; Bhatt, M.R.; Sharma, D.; Joshi, J.; Malla, R.; Sreema, L. Lignocellulosic ethanol production: current practices and recent developments. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 6 (2011) 172-182.

Junior, J.L.B.; Souza, R.F.; Weiss, L.A.S.; Vesco, D.G. Ensaio Teórico sobre Viabilidade da Produção de Etanol a partir do milho: uma possibilidade para as usinas sucroalcooleiras e produtores de grãos do estado de Mato Grosso. (2015). Disponible en <<http://www.singep.org.br/4singep/resultado/319.pdf>>. Acceso en 19/08/2017.



Junta de Andalucía – Conserjería de Agricultura y Pesca. Potencial energético de los subproductos de la industria olivarera en Andalucía. (2010). Disponible en <[http://ws128.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/export/sites/default/comun/galerias/galeriaDescargas/cap/servicio-estadisticas/Estudios-e-informes/desarrollo-rural-sost/IND\\_OLIVAR\\_V1\\_CC.pdf](http://ws128.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/export/sites/default/comun/galerias/galeriaDescargas/cap/servicio-estadisticas/Estudios-e-informes/desarrollo-rural-sost/IND_OLIVAR_V1_CC.pdf)>. Acceso en 25/08/2017.

Kaar, W.E.; Holtzapple, M.T. Using lime pretreatment to facilitate the enzymatic hydrolysis of corn stover. *Biomass and Bioenergy*. 18 (2000) 189-199.

Kajaste, R. Chemicals from biomass – managing greenhouse gas emissions in biorefinery production chains – a review. *Journal of Cleaner Production*. 75 (2014) 1-10.

Kamm B., Gruber P., Kamm M. *Biorefineries – Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*. WILEY-VCH. 2 (2005) 497p.

Kamzon, M.A.; Abderafi, S.; Bounahmidi, T. Promising bioethanol processes for developing a biorefinery in the Moroccan sugar industry. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41 (2016) 20880-20896.

Karagoz, P.; Rocha, I.V.; Ozkan, M.; Angelidaki, I. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by Same Vessel Saccharification and Co-Fermentation. *Bioresource Technology*. 104 (2012) 349-357.

Karimi, S.; Ghobadian, B.; Omidkhah, M-R.; Towfighi, J.; Yaraki, M.T. Experimental investigation of bioethanol liquid phase dehydration using natural clinoptilolite. *Journal of Advanced Research*. 7(2016) 435-444.

Kashaninejad, M.; Tabil, L.G. Effect of microwave-chemical pretreatment on compression characteristics of biomass grinds. *Biosystems Engineering*. 108 (2011) 36-45.

Keikhosro K.; Giti, E.; Mohammad, J.T. Production of ethanol and mycelial biomass from rice Straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochemistry*. 41 (2006) 653-658.

Keshav, P.K.; Shaik, N.; Koti, S.; Linga, V.R. Bioconversion of alkali delignified cotton stalk using two-stage dilute acid hydrolysis and fermentation of detoxified hydrolysate into ethanol. *Industrial Crops and Products*. 91 (2016) 323-331.

Kieliszek, M.; Kot, A.M.; Bzducha-Wróbel, A.; Blazejak, S.; Gientka, I.; Kurcz, A. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. *Fungal Biology Reviews*. In Press, Corrected Proof. (2017).

Kim, J.S.; Lee, Y.Y.; Kim, T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 199 (2016) 42-48.

Kim, J.W.; Kim, K.S.; Lee, J.S.; Park, S.M.; Cho, H.Y.; Park, J.C.; Kim, J.S. Two-stage pretreatment of rice straw using aqueous ammonia and dilute acid. *Bioresource Technology*. 102 (2011) 8992-8999.

Kim, T.H.; Lee, Y.Y. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 137 (2007) 81-92.



- Kim, T.H.; Taylor, F.; Hicks, K.B. Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresource Technology*. 99 (2008) 5694-5702.
- Kim, Y.; Ximenes, E.; Mosier, N.S.; Ladish, M.R. Soluble inhibitors/deactivators of cellulose enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 48 (2011) 408-415.
- Kitagawa, T.; Tokuhira, K.; Sugiyama, H.; Kohda, K.; Isono, N.; Hisamitsu, M. Construction of  $\beta$ -glucosidase expression system using the multistress-tolerant yeast *Issatchenkia orientalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87 (2010) 1841-1853.
- Klasson, K.T.; Dien, B.S.; Hector, R.R. Simultaneous detoxification, saccharification, and ethanol fermentation of weak-acid hydrolyzates. *Industrial Crops and Products*. 49 (2013) 292-298.
- Ko, J.K.; Kim, Y.; Ximenes, E.; Ladisch M.R. Effect of liquid hot water pretreatment severity on properties of hardwood lignin and enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*. 112 (2015b) 252-262.
- Ko, J.K.; Um Y.; Park, Y-C.; Seo, J.H.; Kim, K.H. Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99 (2015a) 4201-4212.
- Kootstra, A.M.J.; Beeftink, H.H.; Scott, E.L.; Sanders, J.P.M. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal*. 46 (2009) 126-131.
- Koppram, R.; Nielsen, F.; Albers, E.; Lambert, A.; Wannstrom, S.; Welin, L.; Zacchi, g.; Olsson, L. Simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production using corncobs at lab, PDU and demo scales. *Biotechnology for Biofuels*. 6 (2013) 10p.
- Kremer, T.A.; LaSarre, B.; Posto, A.L.; McKinlay, J.B. N<sub>2</sub> gas is an effective fertilizer for bioethanol production by *zymomonas mobilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112 (2015) 2222-2226.
- Krishna, R. Highlighting multiplicity in the Gilliland solution to the Maxwell-Stefan equations describing diffusion distillation. *Chemical Engineering Science*. 164 (2017) 63-70.
- Kristensen, J.B.; Felby, C.; Jorgensen, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels*. 2 (2009).
- Kuhad, R.C.; Gupta, R.; Khasa, Y.P.; Singh, A.; Zhang, Y-H.P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15 (2011) 4950-4962.
- Kumar, P.; Barrett, D.M.; Delwiche, M.J.; Stroeve, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 48 (2009b) 3713-3729.



- Kumar, R.; Mago, G.; Balan, V.; Wyman, C.E. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 100 (2009) 3948-3962.
- Kumar, S.; Singh, N.; Prasad, R. Anhydrous ethanol: a renewable source of energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14 (2010) 1830-1844.
- Kundu, C.; Trinh, L.T.P.; Lee, H-J.; Lee, J-W. Bioethanol production from oxalic acid-pretreated biomass and hemicellulose-rich hydrolysates via a combined detoxification process. *Fuel*. 161 (2015) 129-136.
- Kupiec, K.; Rakoczy, J.; Komorowicz, T.; Larwa, B. Heat and mass transfer in adsorption-desorption cyclic process for ethanol dehydration. *Chemical Engineering Journal*. 241 (2014) 485-494.
- Lane, M.M.; Morrissey, J.P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*. 24 (2010) 17-26.
- Larsen, J.; Ostergaard, H.M.; Thirup, L. Inbicon makes lignocellulosic ethanol a commercial reality. *Biomass and Bioenergy*. 46 (2012) 36-45.
- Larsen, J.; Petersen, M.O.; Thirup, L.; Li, H.W.; Iversen, F.K. The IBUS process-lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality. *Chemical Engineering & Technology*. 31 (2008) 765-772.
- Lau, M.W.; Dale, B.E. Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424 (LNH-ST). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 (2009) 1368-1373.
- Laureano-Pérez, L.; Teymouri, F.; Alizadeh, H.; Dale, B.E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 121 (2005) 1081-1099.
- Lawford, H.G.; Rousseau, J.D. Effect of oxygen on ethanol production by a recombinant ethanologenic *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 45-46 (1994) 349-366.
- Le, Q-K.; Halvorsen, I.J.; Pajalic, O.; Skogestad, S. Dividing Wall columns for heterogeneous azeotropic distillation. *Chemical Engineering Research and Design*. 99 (2015) 111-119.
- Lee, J.M.; Venditti, R.A.; Jameel, H.; Kenealy, W.R. Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Biomass and Bioenergy*. 35 (2011) 626-636.
- Levin, L. Degradación de materiales lignocelulósicos por *Trametes trogii* (*Aphylllophorales*, *Basidiomycetes*). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. 1998.
- Li, B.Z.; Balan, V.; Yuan, Y.J.; Dale, B.E. Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. *Bioresource Technology*. 101 (2010) 1285-1292.



- Li, J.; Zhao, X.; Liu, F.; Ren, J.; Bai, F. Construction of yeast strains for efficient ethanol fermentation from xylose by protoplast fusion. *Journal of Biotechnology*. 136 (2008) 402-459.
- Li, M.F.; Fan, Y.M.; Xu, F.; Sun, R.C.; Zhang, X.L. Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: characterization of the cellulose rich fraction. *Industrial Crops and Products*. 32 (2010) 551-559.
- Liang, K.; Li, W.; Luo, H.; Xia, M.; Xu, C. Energy-efficient extractive distillation process by combining preconcentration column and entrainer recovery column. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 53 (2014) 7121-7131.
- Linde, M.; Galbe, M.; Zacchi, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme and Microbial Technology*. 40 (2007) 1100-1107.
- Liobikiene, G.; Butkus, M. The European Union possibilities to achieve targets of Europe 2020 and Paris agreement climate policy. *Renewable Energy*. 106 (2017) 298-309.
- Liu, C-G.; Hao, X-M.; Lin, Y-H.; Bai, F-W. Redox potential driven aeration during very-high-gravity ethanol fermentation by using flocculating yeast. *Nature – Scientific Reports*. 6 (2016) 6p.
- Liu, Z.; Ho, S.H.; Hasunuma, T.; Chang J.S.; Ren, N.Q.; Kondo, A. Recent advances in yeast cell-surface display technologies for waste biorefineries. *Bioresource Technology*. 215 (2016) 324-333.
- Loaces, I.; Schein, S.; Noya, F. Ethanol production by *Escherichia coli* from *Arundo donax* biomass under SSF, SHF or CBP process configurations and *in situ* production of a multifunctional glucanase and xylanase. *Bioresource Technology*. 224 (2017) 307-313.
- Lopes, M.L.; Paulillo, S.C.L.; Godoy, A.; Cherubin, R.A.; Lorenzi, M.S.; Giometti, F.H.C.; Bernardino, C.D.; Neto, H.B.A.; Amorim, H.V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47 (2016) 64-76.
- López-Linares, J.C.; Romero, I.; Cara, C.; Ruiz, E.; Castro, E.; Moya, M. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different configurations. *Fuel*. 122 (2014) 112-118.
- Loy, Y.Y.; Lee, X.L.; Rangaiah, G.P. Optimization and Economic Evaluation of Bioethanol Recovery and Purification Processes involving Extractive Distillation and Pressure Swing Adsorption. *Computer Aided Chemical Engineering*. 37 (2015) 413-418.
- Lu, Y.; Yang, B.; Gregg, D.; Saddler, J.; Mansfield, S. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98 (2002) 641-654.
- Lucyszyn, N.; Ono, L.; Lubambo, A.F.; Woehl, M.A.; Sens, C.V.; Souza, C.F.; Sierakowski, M.R. Physicochemical and *in vitro* biocompatibility of films combining reconstituted bacterial cellulose with arabinogalactan and xyloglucan. *Carbohydrate Polymers*. 151 (2016) 889-898.



- Luo, A.; Lior, N. Study of advancement to higher temperature membrane distillation. *Desalination*. 419 (2017) 88-100.
- MacFarlane, D.R.; Tachikawa, N.; Forsyth, M.; Pringle, J.M.; Howlett, P.C.; Elliott, G.D.; Davis, J.H.; Watanabe, M.; Simon, P.; Angell, C.A. Energy applications of ionic liquids. *Energy & Environmental Science*. 7 (2014) 232-250.
- Maity, S.K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part II. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 43 (2015) 1446-1466.
- Manochio, C.; Andrade, B.R.; Rodriguez, R.P.; Moraes, B.S. Ethanol from biomass: A comparative overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 80 (2017) 743-755.
- Mansfield, S.D.; Mooney, C.; Saddler, J.N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*. 15 (1999) 804-816.
- Manzanares, P.; Negro, M.J.; Oliva, J.M.; Saéz, F.; Ballesteros, I.; Ballesteros, M.; Cara, C.; Castro, E.; Ruiz, E. Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 86 (881-887) 2011.
- Martín, F.M. Presente y futuro de los biocombustibles. *Los Biocombustibles*. 2 (2008) 40-69.
- Martínez, A.; Grabar, T.B.; Shanmugam, K.T.; Yomano, K.T. York, S.W.; Ingram, L.O. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*. 29 (2007) 397-404.
- Martínez, A.; Rodriguez, M.E.; York, S.W.; Preston, J.F.; Ingram, L.O. Effects of Ca(OH)<sub>2</sub> treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering*. 69 (2000) 526-536.
- Martínez-Patiño, J.C.; Romero, I.; Ruiz, E.; Cara, C.; Romero-García, J.M.; Castro, E. Design and Optimization of Sulfuric Acid Pretreatment of Extracted Olive Tree Biomass Using Response Surface Methodology. *BioResources*. 12 (2017a) 1779-1797.
- Martínez-Patiño, J.C.; Ruiz, E.; Romero, I.; Cara, C.; López-Linares, J.C.; Castro, E. Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 239 (2017b) 326-335.
- Mateo, S.; Roberto, I.C.; Sánchez, S.; Moya, A.J. Detoxification of hemicellulosic hydrolysate from olive tree pruning residue. *Industrial Crops and Products*. 49 (2013) 196-203.
- Mears, L.; Stocks, S.M.; Sin, G.; Gernaey, K. A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. *Journal of Biotechnology*. 245 (2017) 34-46.
- Melin, K.; Kohl, T.; Koskinen, J.; Hurme, M. Performance of biofuel processes utilizing separate lignin and carbohydrate processing. *Bioresource Technology*. 192 (2015) 397-409.



Meneghin, S.P.; Reis, F.C.; Almeida, P.G.; Ceccato-Antoini. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39 (2008) 337-343.

Merrettig-Bruns, U.; Sayder, B. Chapter 20 – Pretreatment With Ammonia. *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. (2016) 461-481.

Michalena, E.; Hills, J.M. Renewable energy issues and implementation of European energy policy: the missing generation? *Energy Policy*. 45 (2012) 201-216.

MME- Ministério de Minas e Energia. *RenovaBio*. (2017). Disponible en <<http://www.mme.gov.br/web/guest/secretarias/petroleo-gas-natural-e-combustiveis-renovaveis/programas/renovabio/principal>>. Acceso en 24/08/2017.

Modenbach, A.A.; Nokes, S.E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. *Biomass and Bioenergy*. 56 (2013) 526-544.

Mohapatra, S.; Mishra, C.; Behera, S.S.; Thatoi, H. Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 78 (2017) 1007-1032.

Monasterio, R.P.; Fernández, M.Á.; Silva, M.F. Olive Oil by Capillary Electrophoresis: Characterization and Genuineness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (2013) 4477-4496.

Mood, S.H.; Golfeshan, A.H.; Tabatabaei, M.; Jouzani, G.S.; Najafi, G.H.; Gholami, M.; Ardjmand, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 27 (2013) 77-93.

Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 96 (2005) 673-686.

Mupondwa, E.; Li, X.; Tabil, L.; Sokhansanj, S.; Adapa, P. Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part I: Pretreatment Technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 72 (2017) 178-190.

Mussato, S.I.; Roberto, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology* 93 (2004) 1-10.

Negro, M.J.; Alvarez, C.; Ballesteros, I.; Romero, I.; Ballesteros, M.; Castro, E.; Manzanares, P.; Moya, M.; Oliva, J.M. Ethanol production from glucose and xylose obtained from steam exploded water-extracted olive tree pruning using phosphoric acid as catalyst. *Bioresource Technology*. 153 (2014) 101-107.

Nguyen, D.T.N.N.; Lameloise, M-L.; Guiga, W.; Lewandowski, R.; Bouix, M.; Fargues, C. Optimization and modeling of diafiltration process for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates – Study at pre-industrial scale. *Journal of Membrane Science*. 512 (15) 111-121.



Nieves, I.U.; Geddes, C.C.; Mullinix, M.T.; Hoffman, R.W.; Tong, Z.; Castro, E.; Shanmugam, K.T.; Ingram, L.O. Injection of air into the headspace improves fermentation of phosphoric acid pretreated sugarcane bagasse by *Escherichia coli* MM170. *Bioresource Technology*. 102 (2011) 6959-6965.

Nieves, I.U.; Geddes, C.C.; Miller, E.N.; Mullinix, M.T.; Hoffman, R.W.; Fu, Z.; Tong, Z.; Ingram, L.O. Effect of reduced sulfur compounds on the fermentation of phosphoric acid pretreated bagasse by ethanologenic *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 102 (2011) 6959-6965.

NOVACANA. Brasil é Mercado hesitante para carro elétrico; flex fuel ainda traz melhor custo-benefício. (2017). Disponible en < <https://www.novacana.com/n/combate/carro-eletrico/brasil-mercado-hesitante-carros-eletricos-flex-fuel-custo-beneficio-230117/> >. Acceso en 19/08/2017.

NREL – National Renewable Energy Laboratory. Disponible en <<http://www.nrel.gov>>. Acceso en 23/08/2017.

Nueva Genesis. La celulosa ¿Qué es?. Disponible en < <https://clavesdesalud.blogspot.com.es/2012/02/la-celulosa-que-es.html> >. 2012.

Nurfahmi; Ong, H.C.; Jan, B.M.; Tong, C.T.; Fauzi, H.; Chen, W-H. Effects of organosolv pretreatment and acid hydrolysis on palm empty fruit bunch (PEFB) as bioethanol feedstock. *Biomass and Bioenergy*. 95 (2016) 78-83.

Ohgren, K.; Bengtsson, O.; Gorwa-Grauslund, M.F.; Galbe, M.; Hahn-Hagerdal, B.; Zacchi, G. 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 (2006) 488-498.

Ohgren, K.; Vehmaanpera, J.; Siika-Aho, M.; Galbe, M.; Viikari, L.; Zacchi, G. High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*. 40 (2007) 607-613.

Okuda, N.; Ninomiya, N.; Takao, M.; Katakura, Y.; Shioya, S. Microaeration enhances productivity of bioethanol from hydrolysate of waste house wood using ethanologenic *E. coli* KO11. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 103 (2007) 350-357.

Oliveira, S.C.; Oliveira, R.C.; Tacin, M.V.; Gattás, E.A.L. Kinetic Modeling and Optimization of a Batch Ethanol Fermentation Process. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 6 (2016) 266-272.

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

Özdenkçi, K.; Blasio, C.; H.R. Muddassar; Melin, K.; Oinas, P.; Koskinen, J.; Sarwar, G.; Jarvinen, M. A novel biorefinery integration concept for lignocellulosic biomass. *Energy Conversion and Management*. 149 (2017) 974-987.



- Palmqvist, E.; Hahn-Hagerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates, inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 74 (2000) 17-24.
- Pan, X.; Arato, C.; Gilkes, N.; Gregg, D.; Mabee, W.; Pye, K.; Xiao, Z.; Zhang, X.; Saddler, J. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnology and Bioengineering*. 90 (2005) 473-481.
- Pan, X.; Elzen, M.; Hohne, N.; Teng, F.; Wang, L. Exploring fair and ambitious mitigation contributions under the Paris Agreement goals. *Environmental Science & Policy*. 74 (2017) 49-56.
- Pan, X.; Xie, D.; Gilkes, N.; Gregg, D.J.; Saddler, J.N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 124 (2005) 1069-1079.
- Patel, S.J.; Onkarappa, R.; Shobha, K.S. Comparative study of ethanol production from microbial pretreated agricultural residues. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 11 (2007) 137-141.
- Pazuch, F.A.; Nogueira, C.E.C.; Souza, S.N.M.; Micuanski, V.C.; Friedrich, L.; Lenz, A.M. Economic evaluation of the replacement of sugar cane bagasse by vinasse, as a source of energy in a power plant in the state of Paraná, Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 76 (2017) 34-42.
- Peng, L.; Chen, Y. Conversion of paper sludge to ethanol by separate hydrolysis and fermentation (SHF) using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*. 35 (2011) 1600-1606.
- Peral, C. Chapter 5 – Biomass Pretreatment Strategies (Technologies, Environmental Performance, Economic Considerations, Industrial Implementation). *Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products*. (2016) 125-160.
- Pereda, C.F. Qué ocurre con el Acuerdo de París tras el abandono de Estados Unidos. (2017). Disponible en <[https://elpais.com/internacional/2017/05/31/estados\\_unidos/1496238308\\_555328.html](https://elpais.com/internacional/2017/05/31/estados_unidos/1496238308_555328.html)>. Acceso en 24/08/2017.
- Pereira, S.R.; Portugal-Nunes, D.J.; Evtuguin, D.V.; Serafim, L.S.; Xavier, A.M.R.B. Advances in ethanol production from hardwood spent sulphite liquors. *Process Biochemistry*. 48 (2013) 272-282.
- Pérez, A.G. Procesamiento de Aceituna. Universidad Nacional Agraria La Molina. (2015). Disponible en <<http://www.lamolina.edu.pe/postgrado/pmdas/cursos/dpactl/lecturas/Separata%20procesamiento%20de%20la%20aceituna.pdf>>. Acceso en 24/08/2017.
- Pérez-Rodríguez, N.; García-Bernet, D.; Domínguez, J.M. Extrusion and enzymatic hydrolysis as pretreatments on corn cob for biogás production. *Renewable Energy*. 107 (2017) 597-603.



Phukoetphim, N.; Salakkam, A.; Laopaiboon, P.; Laopaiboon, L. Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed-batch fermentations: Effects of sugar levels, nitrogen supplementation, and feeding regimes. *Electronic Journal of Biotechnology*. 26 (2017) 84-92.

PIRACICABA ENGENHARIA. Etanol de Milho. (2017). Disponible en <<http://piracicabaengenharia.com.br/2017/etanol-milho/>>. Acceso en 19/08/17.

Poli-USP – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. RCGI busca parceiros para criar o primeiro carro híbrido flex do mundo. (2017). Disponible en <<http://www.poli.usp.br/pt/comunicacao/noticias/2314-rcgi-busca-parceiros-para-criar-o-primeiro-carro-hibrido-flex-do-mundo.html>>. Acceso en 26/08/2017.

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

Rabemanolontsoa, H.; Saka, S. Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource Technology*. 199 (2016) 83-91.

Raele, R.; Boaventura, J.M.G.; Fischmann, A.A.; Sarturi, G. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. *Technological Forecasting and Social Change*. 87 (2014) 205-223.

Raman, J.K.; Gnansounou, E. Furfural production from empty fruit bunch – A biorefinery approach. *Industrial Crops and Products*. 69 (2015) 371-377.

Rastogi, M.; Shrivastava, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 80 (2017) 330-340.

Ravindran, R.; Jaiswal, A.K. A comprehensive review on pretreatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresource Technology*. 199 (2016) 92-102.

Reis, V.R.; Bassi, A.P.G.; da Silva, J.C.G.; Ceccato-Antonini, S.R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44 (2013) 1121-1131.

REN21 – Renewable Energy Policy Network for the 21st Century. Avanzando en la transición mundial hacia la energía renovable: puntos destacados del reporte de REN21 sobre la situación mundial de las energías renovables 2017 en perspectiva. (2017a). Disponible en <[http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2017/07/17-8399\\_GSR\\_2017\\_KEY-FINDINGS\\_Spanish\\_lowres.pdf](http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2017/07/17-8399_GSR_2017_KEY-FINDINGS_Spanish_lowres.pdf)>. Acceso en 23/08/2017.

REN21 - Renewable Energy Policy Network for the 21st Century. Global Status Report. (2017c) Disponible en <[http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2017/06/17-8399\\_GSR\\_2017\\_Full\\_Report\\_0621\\_Opt.pdf](http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2017/06/17-8399_GSR_2017_Full_Report_0621_Opt.pdf)>. Acceso en 23/08/2017.

REN21 - Renewable Energy Policy Network for the 21st Century. Renewables Global Futures Report: Great Debates Towards 100% Renewable Energy. (2017b) Disponible en



< [http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2017/07/16-8325-GFR-Full-Report-2017\\_X1.pdf](http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2017/07/16-8325-GFR-Full-Report-2017_X1.pdf)>. Acceso en 23/08/2017.

Rodríguez-Antón, L.M.; Gutiérrez-Martín, F.; Martínez-Arevalo, C. Experimental determination of some physical properties of gasolina, etanol and ETBE ternary blends. *Fuel*. 156 (2015) 81-86.

Romero, I.; Moya, M.; Sánchez, S.; Rodríguez, L.V.B. Ethanol fermentation of phosphoric acid hydrolysates from olive tree pruning. *Industrial Crops and Products*. 25 (2007) 160-168.

Romero, I.; Sanchez, S.; Moya, M.; Castro, E.; Ruiz, E.; Bravo, V. Fermentation of olive tree pruning acid-hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*. *Biochemical Engineering Journal*. 36 (2008) 108-115.

Romero-García, J.M. La biomasa del olivar como fuente energética y de bioproductos. Avances hacia la Biorrefinería del Olivar. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén. (2016) 363p.

Romero-García, J.M.; Lama-Muñoz, A.; Rodríguez-Gutiérrez G.; Moya, M.; Ruiz, E.; Fernández-Bolaños, J.; Castro, E. Obtaining sugars and natural antioxidants from olive leaves by steam-explosion. *Food Chemistry*. 210 (2016) 457-465.

Romero-García, J.M.; Niño, L.; Martínez-Patiño, C.; Álvarez, C.; Castro, E.; Negro, M.J. Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends. *Bioresource Technology*. 159 (2014) 421-432.

Rosúa, J.M.; Pasadas, M. Biomass potential in Andalusia, from grapevines, olives, fruit trees and poplar, for providing heating in homes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16 (2012) 4910-4195.

Ruiz, E.; Cara, C.; Ballesteros, M.; Manzanares, P.; Ballesteros, I.; Castro, E. Ethanol production from pretreated olive tree Wood and sunflower stalks by an SSF process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 129-132 (2006) 631-643.

Ruiz, E.; Gullón, B.; Moura, P.; Carvalheiro, F.; Eibers, G.; Cara, C.; Castro, E. Bifidobacterial growth stimulation by oligosaccharides generated from olive tree pruning biomass. *Carbohydrate Polymers*. 169 (2017) 149-156.

Saleh, M.; Cuevas, M.; García, J.F.; Sánchez, S. Valorization of olive stones for xilitol and etanol production from dilute acid pretreatment via enzymatic hydrolysis and fermentation by *Pachysolen tannophilus*. *Biochemical Engineering Journal*. 90 (2014) 286-293.

Sánchez, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 27 (2009). 185-194.

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

Sanda, T.; Hasunuma, T.; Matsuda, F.; Kondo, A. Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Sacharomyces cerevisiae* strain



metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. *Bioresource Technology*. 102 (2011) 7917-7924.

Sanmartino, J.A.; Khayet, M.; García-Payo, M.C. Reuse of discarded membrane distillation membranes in microfiltration technology. *Journal of Membrane Science*. 539 (2017) 273-283.

Santos, J.I.; Fillat, U.; Martín-Sampedro, R.; Eugenio, M.E.; Negro, M.J.; Ballesteros, I.; Rodríguez, A.; Ibarra, D. Evaluation of lignins from side-streams generated in an olive tree pruning-based biorefinery: bioethanol production and alkaline pulping. *International Journal of Biological Macromolecules*. *In Press*. 2017.

Sauer, U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 73 (2001) 129-169.

Sawatdeenarunat, C.; Surendra, K.C.; Takara, D.; Oechsner, H.; Khanal, S.K. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*. 178 (2015) 178-186.

Scaramuzzo, M. Raízen inaugura usina de etanol de 2ª geração. Estadão. (2015). Disponible en < <http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,raizen-inaugura-usina-de-etanol-de-2-geracao-imp-,1730379> >. Acceso en 19/08/2017.

Schirmer-Michel, A.; Flôres, S.H.; Hertz, P.F.; Ayub, M.A.Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 84 (2009) 223-228.

Scown, C.D.; Gokhale, A.A.; Willems, P.A.; Horvath, A.; McKone, E. Role of Lignin in Reducing Life-Cycle Carbon Emissions, Water Use, and Cost for United States Cellulosic Biofuels. *Environmental Science & Technology*. 15 (2014) 8446-8455.

Seidl, P.R.; Goulart, A.K. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2 (2016) 48-53.

Şener, Ş.E.C.; Sharp, J.L.; Anctil, A. Factors impacting diverging paths of renewable energy: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. *In Press*, Corrected Proof. (2017)

Seo, H-B.; Kim, S.; Lee, H-Y.; Jung, K-H. Improved Bioethanol Production Using Activated Carbon-treated Acid Hydrolysate from Corn Hull in *Pachysolen tannophilus*. *Mycobiology*. 37 (2009) 133-140.

Shen, J.; Agblevor, F.A. Modeling semi-simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose. *Biomass and Bioenergy*. 34 (2010) 1098-1107.

Shi, J.; Chinn, M.S.; Sharma-Shivappa, R.R. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*. 99 (2008) 6556-6564.



- Signori, L.; Passolunghi, S.; Ruohonen, L.; Porro, D.; Branduardi, P. Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain. *Microbial Cell Factories*. 13 (2014) 51-63.
- Silva, S.S.; Felipe, M.G.A.; Vitolo, M. Xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 grown in pretreated sugar cane bagasse hydrolysate. *Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry: strategies towards achievement*. (1998) 1116-1119.
- Sindhu, R.; Binod, P.; Mathew, A.K.; Abraham, A.; Gnansounou, E.; Ummalyma, S.B.; Thomas, L.; Pandey, A. Development of a novel ultrasound-assisted alkali pretreatment strategy for the production of bioethanol and xylanases from chili post-harvest residue. *Bioresource Technology*. 242 (2017) 146-151.
- Sindhu, R.; Binod, P.; Pandey, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*. 199 (2016) 76-82.
- Singh, J.; Suhag, M.; Dhaka, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydrate Polymers*. 117 (2015) 624-631.
- Singhania, R.R.; Patel, A.K.; Sukumaran, R.K.; Larroche, C.; Pandey, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 127 (2013) 500-507.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16 (1965) 144-158.
- Skupin, P.; Metzger, M. Stability analysis of the continuous ethanol fermentation process with a delayed product inhibition. *Applied Mathematical Modelling*. 49 (2017) 48-58.
- Smith, J.; van Rensburg, E.; Gorgens, J.F. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. *BMC Biotechnology*. 14 (2014) 41-58.
- Snoek, t.; Verstrepen, K.J.; voordeckers, K. How do yeast cells become tolerant to high ethanol concentrations? *Current Genetics*. 62 (2016) 475-480.
- Soontornchaiboon, W.; Kim, S.M.; Pawongrat, R. Effects of alkaline combined with ultrasonic pretreatment and enzymatic hydrolysis of agricultural wastes for high reducing sugar production. *Sains Malaysiana*. 45 (2016) 955-962.
- Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. V.83 (2002) 1-11.
- Swatloski, R.P.; Spear, S.K.; Holbrey, J.D.; Rogers, R.D. Dissolution of Cellose with Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 124 (2002) 4974-4975.
- Tabari, A.; Ahmad, A. A semicontinuous approach for heterogeneous azeotropic distillation processes. *Computers & Chemical Engineering*. 73 (2015) 183-190.



- Taheri, S.; Lakmehsari, M.S.; Soltanabadi, A. Separation based adsorption of ethanol-water mixture in azeotropic solution by single-walled carbon, boron-nitride and silicon-carbide nanotubes. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 75 (2017) 149-164.
- Taherzadeh, M.J.; Karimi, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*. 2 (2007) 472-499.
- Tamaki, Y.; Mazza, G. Measurement of structural carbohydrates, lignins and micro-components of straw and shives: effects of extractives, particle size and crop species. *Industrial Crops and Products*. 31 (2010) 534-541.
- Tanimura, A.; Nakamura, t.; Watanabe, I.; Ogawa, J.; Shima, J. Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. *SpringerPlus*. 1 (2012)
- Tavva, S.S.M.D.; Deshpande, A.; Durbha, S.R.; Palakollu, A.R.; Goparaju, A.U.; Yechuri, V.R.; Bandaru, V.R.; Muktinutalapati, V.S.R. Bioethanol production through separate hydrolysis and fermentation of *Parthenium hysterophorus* biomass. *Renewable Energy*. 86 (2016) 1317-1323.
- Tejirian, A.; Xu, F. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*. 48 (2011) 239-247.
- Thangavelu, S.K.; Ahmed, A.S.; Ani, F.N. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 56 (2016) 820-835.
- Thinnakorn, K.; Tscheikuna, J. Biodiesel production via transesterification of palm olein using sodium phosphate as a heterogeneous catalyst. *Applied Catalysis A: General*. 476 (2014) 26-33.
- Tran, D-T.; Chang, J-S.; Lee, D-J.; Recent insights into continuous-flow biodiesel production via catalytic and non-catalytic transesterification. *Applied Energy*. 185 (2017) 376-409.
- Travaini, R.; Martín-Juárez, J.; Lorenzo-Hernando, A.; Bolado-Rodríguez, S. Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. *Bioresource Technology*. 199 (2016) 2-12.
- Tsanas, C.; Tzani, A.; Papadopoulos, A.; Detsi, A.; Voutsas, E. Ionic liquids as entrainers for the separation of the ethanol/water system. *Fluid Phase Equilibria*. 379 (2014) 148-156.
- Valdivia, M.; Galan, J.L.; Laffarga, J.; Ramos, J.L. Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. *Microbial Technology*. 9 (2016) 585-594.
- Vallejos, M.E.; Chade, M.; Mereles, E.B.; Begoechea, D.I.; Brizuela, J.G.; Felissia, F.E.; Area, M.C. Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*. 91 (2016) 161-169.
- Vanzela, E.; Nadaleti, W.C.; Baricatti, R.A.; Cremonez, P.A.; Rossi, E.; Filho, P.B.; Andrezza, R.; Quadro, M.S.; Souza, S.N.M. Physicochemical properties of ethanol with the addition of biodiesel for use in Otto cycle internal combustion engines: Results and revision. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 74 (2017) 1181-1188.



- Varela, H; Ferrari, M.D.; Loperena, L.; Lareo, C. Effect of aeration rate on the alcoholic fermentation of whey by *Kluyveromyces fragilis*. *Microbiologia*. 8 (1992) 14-20.
- Verma, V.K.; Banerjee, T. Ionic liquids as entrainers for water + ethanol, water + 2-propanol, and water + THF systems: a quantum chemical approach. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. 42 (2010) 909-919.
- Vohra, M.; Manwar, J.; Manmode, R.; Padgilwar, S.; Patil, S. Bioethanol production: feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2 (2014) 573-584.
- Wan, C.; Li, W. Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispota* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresource Technology*. 101 (2010) 6398-6403.
- Wang, H.; Cao, S.; Wang, W.T.; Wang, K.T.; Jia, X. Very high gravity ethanol and fatty acid production of *Zymomonas mobilis* without amino acid and vitamin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 43 (2016) 861-871.
- Wang, P.; Chung, T-S. Recent advances in membrane distillation processes: Membrane development, configuration design and application exploring. *Journal of Membrane Science*. 474 (2015) 39-56.
- Wang, X.; Tsang, Y.F.; Li, Y.; Ma, X.; Cui, S.; Zhang, T-A.; Hu, J.; Gao, M-T. Inhibitory effects of phenolic compounds of rice straw formed by saccharification during ethanol fermentation by *Pichia stipites*. *Bioresource Technology*. In Press, Accepted Manuscript. (2017).
- Wang, X.; Yomano, L.P.; Lee, J.Y.; York, S.W.; Zheng, H.; Mullinnix, M.T.; Shanmugam, K.T.; Ingram, L.O. Engineering furfural tolerance in *Escherichia coli* improves the fermentation of lignocellulosic sugars into renewable chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (2013) 4021-4026.
- Wei, H.; Yingting, Y.; Jingjing, G.; Wenshi, Y.; Junhong, T. Lignocellulosic Biomass Valorization: Production of Ethanol. *Encyclopedia of Sustainable Technologies*. (2017) 601-604.
- Wijaya, Y.P.; Putra, R.D.D.; Widayana V.T.; Ha, J-M.; Suh, D.J.; Kim, C.S. Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 164 (2014) 221-231.
- Wimalasena, T.T.; Greetham, D.; Marvin, M.E.; Liti, G; Chandelia, Y.; Hart, A.; Louis, E.J.; Phister, T.G.; Tucker, G.A.; Smart, K.A. Phenotypic characterization of *Saccharomyces* spp. yeast for tolerance to stresses encountered during fermentation of lignocellulosic residues to produce bioethanol. *Microbial Cell Factories*. 47 (2014) 1-13.
- Win, D.T. Furfural – Gold from garbage. *AU Journal of Technology*. 8 (2005) 185-190.
- Wyman, C.E.; Dale, B.E.; Elander, R.T.; Holtzapple, M.; Ladisch, M.R.; Lee, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 96 (2005) 1959-1966.



- Xiao, Z.; Zhang, X.; Gregg, D.J.; Saddler, J.N. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 113-116 (2004) 1115-1126.
- Ximenes, E.; Kim, Y.; Mosier, N.; Dien, B.; Ladish, M. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*. 46 (2011) 170-176.
- Yang, B.; Wyman, C.E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2 (2008) 26-40.
- Yang, S.; Fei, Q.; Zhang, Y.; Contreras, L.M.; Utturkar, S.M.; Brown, S.D.; Himmel, M.E.; Zhang, M. *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemical. *Microbial Biotechnology*. 9 (2016) 699-717.
- Yee, K.F.; Mohamed, A.R.; Tan, S.H. A review on the evolution of ethyl tert-butyl ether (ETBE) and its future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 22 (2013) 604-620.
- Yokoya, F.; Oliva-Neto, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Revista de Microbiologia*. 22 (1991) 12-16.
- Yoo, C.G.; Pu, Y.; Ragauskas, A.J. Ionic liquids: promising green solvents for lignocellulosic biomass utilization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 5 (2017) 5-11.
- Yu, H.; Gui, J.; Chen, Y.; Fu, G.; Li, B.; Guo, X.; Xiao, D. Efficient utilization of hemicellulose and cellulose in alkali liquor-pretreated corncob for bioethanol production at high solid loading by *Spathaspora passalidarum* U1-58. *Bioresource Technology*. 232 (2017) 168-175.
- Yu, Y.; Christopher, L.P. Detoxification of hemicellulose-rich poplar hydrolysate by polymeric resins for improved ethanol fermentability. *Fuel*. 203 (2017) 187-196.
- Yu, Z.; Zhang, B.; Yu, F.; Xu, G.; Song, A. A real explosion: the requirement of steam explosion pretreatment. *Bioresource Technology*. 121 (2012) 335-341.
- Yuan, T.; Xu, F.; Sun, R. Role of lignin in a biorefinery: Separation, characterization and valorization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 88 (2013) 346-352.
- Yuan, Z.; Wen, Y. Evaluation of an integrated process to fully utilize bamboo biomass during the production of bioethanol. *Bioresource Technology*. 236 (2017) 202-211.
- Yucel, H.G.; Aksu, Z. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. *Fuel*. 158 (2015) 793-799.
- Yuvadatkun, P.; Boonmee, M. Ethanol Production Capability of *Candida shehatae* in mixed sugars and rice straw hydrolysate. *Sains Malaysiana*. 45 (2016) 581-587.
- Zabed, H.; Sahu, J.N.; Suely, A.; Boyce, A.N.; Faruq, G.; Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 71 (2017) 475-501.



- Zaldivar, J.; Ingram, L.O. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*. 66 (1999) 203-210.
- Zhang, K.; Pei, Z.; Wang, D. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemical: A review. *Bioresource Technology*. 199 (2016) 21-33.
- Zhang, Q.; Huang, H.; Han, H.; Qiu, Z.; Achal, V. Stimulatory effect of *in-situ* detoxification on bioethanol production by rice straw. *Energy*. 135 (2017) 32-39.
- Zhao, L.; Lyu, X.; Wang, W.; Shan, J.; Qiu, T. Comparison of heterogeneous azeotropic distillation and extractive distillation methods for ternary azeotrope ethanol/toluene/water separation. *Computers & Chemical Engineering*. 100 (2017) 27-37.
- Zhao, L.; Zhang, X.; Tan, T. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. *Biomass and Bioenergy*. 32 (2008) 1156-1161.
- Zhao, X.; Xiong, L.; Zhang, M.; Bai, F. Towards efficient bioethanol production from agricultural and forestry residues: Exploration of unique natural microorganisms in combination with advanced strain engineering. *Bioresource Technology*. 215 (2016) 84-91.
- Zheng, Y.; Zhao, J.; Xu, F.; Li, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*. 42 (2014) 35-53.
- Zhong, C.; Lau, M.W.; Balan, V.; Dale, B.E.; Yuan, Y.J. Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84 (2009) 667-676.
- Zhu, J.Y.; Wang, G.S.; Pan, X.J.; Gleisner, R. Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification. *Chemical Engineering Science*. 64 (2009) 474-485.
- Zhu, Z.; Ri, Y.; Li, M.; Jia, H.; Wang, Y.; Wang, Y. Extractive distillation for ethanol dehydration using imidazolium-based ionic liquids as solvents. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 109 (2016) 190-198.
- Zhuang, X.; Wang, W.; Yu, Q.; Qi, W.; Wang, Q.; Tan, X.; Zhou, G.; Yuan, Z. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. *Bioresource Technology*. 199 (2016) 68-75.



# Anexo

---

Anexo 1. Determinación de Carbohidratos Estructurales y Lignina en la Biomasa. Norma NREL/TP-510-42618.



# **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**

## **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**

**Issue Date: April 2008**

**Revision Date: August 2012  
(Version 08-03-2012)**

**A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata,  
J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker**

**NREL is a national laboratory of the U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency & Renewable Energy, operated by the Alliance for Sustainable Energy, LLC.**

**Technical Report**  
NREL/TP-510-42618  
Revised August 2012

Contract No. DE-AC36-08GO28308

# Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass

## Laboratory Analytical Procedure (LAP)

**Issue Date: April 2008**

**Revision Date: August 2012  
(Version 08-03-2012)**

A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker

NREL Laboratory Analytical Procedures for standard biomass analysis are available electronically at

[http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html)

NREL is a national laboratory of the U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency & Renewable Energy, operated by the Alliance for Sustainable Energy, LLC.

## DISCLAIMER

These Standard Biomass Analytical Methods (“Methods”) are provided by the National Renewable Energy Laboratory (“NREL”), which is operated by the Alliance for Sustainable Energy, LLC (“ASE”) for the Department Of Energy.

Access to and use of these Methods shall impose the following obligations on the user. The user is granted the right, without any fee or cost, to use, copy, modify, alter, enhance and distribute these Methods for any purpose whatsoever, except commercial sales, provided that this entire notice appears in all copies of the Methods. Further, the user agrees to credit NREL/ASE in any publications that result from the use of these Methods. The names NREL/ASE, however, may not be used in any advertising or publicity to endorse or promote any products or commercial entity unless specific written permission is obtained from NREL/ASE. The user also understands that NREL/ASE is not obligated to provide the user with any support, consulting, training or assistance of any kind with regard to the use of these Methods or to provide the user with any updates, revisions or new versions.

THESE METHODS ARE PROVIDED BY NREL/ASE "AS IS" AND ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE DISCLAIMED. IN NO EVENT SHALL NREL/MRI BE LIABLE FOR ANY SPECIAL, INDIRECT OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OR ANY DAMAGES WHATSOEVER, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO CLAIMS ASSOCIATED WITH THE LOSS OF DATA OR PROFITS, WHICH MAY RESULT FROM AN ACTION IN CONTRACT, NEGLIGENCE OR OTHER TORTIOUS CLAIM THAT ARISES OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE ACCESS, USE OR PERFORMANCE OF THESE METHODS.

Cover Photos: (left to right) PIX 16416, PIX 17423, PIX 16560, PIX 17613, PIX 17436, PIX 17721



Printed on paper containing at least 50% wastepaper, including 10% post consumer waste.

# Procedure Title: Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass

## Laboratory Analytical Procedure

### 1. Introduction

- 1.1 Carbohydrates and lignin make up a major portion of biomass samples. These constituents must be measured as part of a comprehensive biomass analysis. Carbohydrates can be structural or non-structural. Structural carbohydrates are bound in the matrix of the biomass, while non-structural carbohydrates can be removed using extraction or washing steps. Lignin is a complex phenolic polymer.
- 1.2 Portions of this procedure are substantially similar to ASTM E1758-01 “Standard Method for the Determination of Carbohydrates by HPLC.”
- 1.3 This procedure is suitable for samples that do not contain extractives. This procedure uses a two-step acid hydrolysis to fractionate the biomass into forms that are more easily quantified. The lignin fractionates into acid insoluble material and acid soluble material. The acid insoluble material may also include ash and protein, which must be accounted for during gravimetric analysis. The acid soluble lignin is measured by UV-Vis spectroscopy. During hydrolysis the polymeric carbohydrates are hydrolyzed into the monomeric forms, which are soluble in the hydrolysis liquid. They are then measured by HPLC. Protein may also partition into the liquid fraction. A measure of acetyl content is necessary for biomass containing hemicellulose with a xylan backbone, but not biomass containing a mannan backbone. Acetate is measured by HPLC.

### 2. Scope

- 2.1 This procedure is appropriate for extractives free biomass, which includes biomass that has been extracted using LAP “Determination of Extractives in Biomass,” as well as process solids containing no extractives. Results are reported on an oven dry weight basis. Results may be reported on an as received biomass basis or an extractives free basis, depending on type of biomass used. LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis” should be used prior to this procedure.
- 2.2 This procedure is appropriate for biomass containing the components listed throughout the procedure. Any biomass containing other interfering components not listed must be further investigated.
- 2.3 A measure of acetyl content is necessary for biomass containing hemicellulose with a xylan backbone, but not biomass containing a mannan backbone.
- 2.4 All analyses should be performed in accordance with an appropriate laboratory specific Quality Assurance Plan (QAP).

### 3. Terminology

- 3.1 *Oven dry weight (ODW)*—the weight of biomass mathematically corrected for the amount of

moisture present in the sample at the time of weighing.

- 3.2 *Prepared biomass*—biomass prepared according to LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis.”
- 3.3 *Extractives free biomass*—biomass after exhaustive water and ethanol extraction (refer to LAP “Determination of Extractives in Biomass”).
- 3.4 *Acid insoluble lignin*—the residue remaining on a medium porosity filtering crucible after a two step hydrolysis, with correction for acid insoluble ash and acid insoluble protein, if necessary.
- 3.5 *Structural carbohydrates*—polymeric carbohydrates, namely cellulose and hemicellulose.
- 3.6 *Non-structural components*—non-chemically bound components of biomass that include but are not limited to sucrose, nitrate/nitrites, protein, ash, chlorophyll, and waxes.

#### **4. Significance and Use**

- 4.1 This procedure is used, possibly in conjunction with other procedures, to determine the amount of structural carbohydrates and lignin in a solid biomass sample.

#### **5. Interferences**

- 5.1 This procedure has been optimized for the particle size range specified in LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis.” Deviation to a smaller particle size may result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to excessive carbohydrate degradation. Deviation to a larger particle size may also result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to incomplete hydrolysis of polymeric sugars to monomeric sugars.
- 5.2 Samples containing extractives are not suitable for this procedure. Extractives will partition irreproducibly, resulting in a high lignin bias.
- 5.3 Samples with an ash content above 10 wt % may not be suitable for this procedure, as the sample may contain soil or other minerals that will interfere with appropriate acid concentrations and may catalyze side reactions.
- 5.4 Samples with a moisture content above 10 wt % may not be suitable for this procedure, as the excess moisture will interfere with appropriate acid concentrations. Samples should be dried (air-dried or oven dried at less than 40°C) prior to this procedure.
- 5.5 Samples containing protein will bias the acid insoluble lignin high unless the protein is accounted for in the gravimetric determination of acid insoluble material. An independent nitrogen analysis is required to estimate the protein content of the residue. The protein estimate is then subtracted from the acid insoluble residue measurement. Physical separation of the acid insoluble protein from the acid insoluble lignin is beyond the scope of this procedure.
- 5.6 This procedure is not suitable for samples containing added acid, base, or catalyst.
- 5.7 Certain guard columns for carbohydrate quantification may cause artifact peaks. Individual carbohydrates should be run on new columns and guard columns to verify to absence of artifact peaks.

#### **6. Apparatus**

- 6.1 Analytical balance, accurate to 0.1 mg.
- 6.2 Convection drying oven, with temperature control of  $105 \pm 3^\circ\text{C}$ .
- 6.3 Muffle furnace, equipped with a thermostat, set to  $575 \pm 25^\circ\text{C}$  or equipped with optional ramping program.
- 6.4 Water bath, set at  $30 \pm 3^\circ\text{C}$ .
- 6.5 Autoclave, suitable for autoclaving liquids, set to  $121 \pm 3^\circ\text{C}$ .
- 6.6 Filtration setup, equipped with a vacuum source and vacuum adaptors for crucibles.

- 6.7 Desiccator containing desiccant.
- 6.8 HPLC system equipped with refractive index detector and the following columns:
  - 6.8.1 Shodex sugar SP0810 or Biorad Aminex HPX-87P column (or equivalent) with ionic form  $\text{H}^+/\text{CO}_3^-$  deashing guard column.
  - 6.8.2 Biorad Aminex HPX-87H column (or equivalent) equipped with an appropriate guard column.
- 6.9 UV-Visible spectrophotometer, diode array or single wavelength, with high purity quartz cuvettes of pathlength 1 cm.
- 6.10 Automatic burette, capable of dispensing 84.00 mL water, optional.

## 7. Reagents and Materials

### 7.1 Reagents

- 7.1.1 Sulfuric acid, 72% w/w (specific gravity 1.6338 at 20°C) – (also commercially available as a reagent for the determination of fluorine, from Fluka #00647).
- 7.1.2 Calcium carbonate, ACS reagent grade.
- 7.1.3 Water, purified, 0.2  $\mu\text{m}$  filtered.
- 7.1.4 High purity standards: D-cellobiose, D(+)glucose, D(+)xylose, D(+)galactose, L(+)arabinose, and D(+)mannose.
- 7.1.5 Second set of high purity standards, as listed above, from a different source (manufacturer or lot), to be used to prepare calibration verification standards (CVS).

### 7.2 Materials

- 7.2.1 QA standard, well characterized, such as a National Institute of Standards and Technology (NIST) biomass standard or another well characterized sample of similar composition to the samples being analyzed.
- 7.2.2 Pressure tubes, minimum 90 mL capacity, glass, with screw on Teflon caps and o-ring seals (Ace glass # 8648-30 tube with #5845-47 plug, or equivalent).
- 7.2.3 Teflon stir rods sized to fit in pressure tubes and approximately 5 cm longer than pressure tubes.
- 7.2.4 Filtering crucibles, 25 mL, porcelain, medium porosity, Coors #60531 or equivalent.
- 7.2.5 Bottles, wide mouth, 50 mL.
- 7.2.6 Filtration flasks, 250 mL.
- 7.2.7 Erlenmeyer flasks, 50 mL.
- 7.2.8 Adjustable pipettors, covering ranges of 0.02 to 5.00 mL and 84.00 mL.
- 7.2.9 pH paper, range 4–9.
- 7.2.10 Disposable syringes, 3 mL, fitted with 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filters.
- 7.2.11 Autosampler vials with crimp top seals to fit.

## 8. ES&H Considerations and Hazards

- 8.1 Sulfuric acid is corrosive and should be handled with care.
- 8.2 Use caution when handling hot pressure tubes after removal from the autoclave, as the pressurized tubes can cause an explosion hazard.
- 8.3 When placing crucibles in a furnace or removing them, use appropriate personal protective equipment, including heat resistant gloves.
- 8.4 Operate all equipment in accordance with the manual and NREL Safe Operating Procedures.
- 8.5 Follow all applicable NREL chemical handling procedures.

## 9. Sampling, Test Specimens, and Test Units

- 9.1 Care must be taken to ensure a representative sample is taken for analysis.
- 9.2 LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis” should be performed

prior to this analysis. Samples must have a minimum total solids content of 85%.

- 9.3 LAP “Determination of Extractives in Biomass” should be performed prior to this analysis if extractives are present in the sample.
- 9.4 LAP “Determination of Solids in Biomass” should be performed at the same time that samples for this analysis are weighed out.
- 9.5 This procedure is suitable for samples that have been air dried or lyophilized. Samples dried at a temperature of 45°C or higher are not suitable for this procedure.
- 9.6 Steps 9.2 to 9.4 should be applied to the QA standard.

## 10. Procedure

10.1 Prepare the sample for analysis and hydrolyze.

- 10.1.1 Place an appropriate number of filtering crucibles in the muffle furnace at  $575 \pm 25$  °C for a minimum of four hours. Remove the crucibles from the furnace directly into a desiccator and cool for a specific period of time, one hour is recommended. Weigh the crucibles to the nearest 0.1 mg and record this weight. It is important to keep the crucibles in a specified order, if they are not marked with identifiers. Permanent marking decals are available from Wale Apparatus. Do not mark the bottom of the filtering crucible with a porcelain marker, as this will impede filtration.
- 10.1.2 Place the crucible back into the muffle furnace at  $575 \pm 25$  °C and ash to constant weight. Constant weight is defined as less than  $\pm 0.3$  mg change in the weight upon one hour of re-heating the crucible.
- 10.1.3 Weigh  $300.0 \pm 10.0$  mg of the sample or QA standard into a tared pressure tube. Record the weight to the nearest 0.1 mg. Label the pressure tube with a permanent marker. LAP “Determination of Total Solids in Biomass” should be performed at the same time, to accurately measure the percent solids for correction. Each sample should be analyzed in duplicate, at minimum. The recommended batch size is three to six samples and a QA standard, all run in duplicate.
- 10.1.4 Add  $3.00 \pm 0.01$  mL (or  $4.92 \pm 0.01$  g) of 72% sulfuric acid to each pressure tube. Use a Teflon stir rod to mix for one minute, or until the sample is thoroughly mixed.
- 10.1.5 Place the pressure tube in a water bath set at  $30 \pm 3$  °C and incubate the sample for  $60 \pm 5$  minutes. Using the stir rod, stir the sample every 5 to 10 minutes without removing the sample from the bath. Stirring is essential to ensure even acid to particle contact and uniform hydrolysis.
- 10.1.6 Upon completion of the 60-minute hydrolysis, remove the tubes from the water bath. Dilute the acid to a 4% concentration by adding  $84.00 \pm 0.04$  mL deionized water using an automatic burette. Dilution can also be done by adding  $84.00 \pm 0.04$  g of purified water using a balance accurate to 0.01 g. Screw the Teflon caps on securely. Mix the sample by inverting the tube several times to eliminate phase separation between high and low concentration acid layers.

Note: The volume of the 4% solution will be 86.73 mL, as demonstrated in the following calculations.

$$\text{Density } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4 = d_{72\% \text{ H}_2\text{SO}_4} = 1.6338 \text{ g/mL}$$

$$\text{Density H}_2\text{O} = d_{\text{H}_2\text{O}} = 1.00 \text{ g/mL}$$

$$\text{Density } 4\% \text{ H}_2\text{SO}_4 = d_{4\% \text{ H}_2\text{SO}_4} = 1.025 \text{ g/mL}$$

1. The weight of 3.00 mL 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> is:

$$3.00 \text{ mL } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4 \times d_{72\% \text{ H}_2\text{SO}_4} = 4.90 \text{ g } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4$$

2. The composition of 3 mL of 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> is:

$$4.90 \text{ g } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4 \times 72\% \text{ (acid wt)} = 3.53 \text{ g acid}$$

$$4.90 \text{ g } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4 \times 28\% \text{ (water wt)} = 1.37 \text{ g water}$$

3. The concentration of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  after dilution is:

$$3.53 \text{ g acid} / (84.00 \text{ g H}_2\text{O} + 4.90 \text{ g } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4) = 3.97 \% \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ (w/w)}$$

4. The total volume of solution present after dilution is:

$$(4.90 \text{ g H}_2\text{SO}_4 + 84.00 \text{ g H}_2\text{O}) \times (d_{4\% \text{ H}_2\text{SO}_4})^{-1} = 86.73 \text{ mL}$$

- 10.1.7 Prepare a set of sugar recovery standards (SRS) that will be taken through the remaining hydrolysis and used to correct for losses due to destruction of sugars during dilute acid hydrolysis. SRS should include D-(+)glucose, D-(+)xylose, D-(+)galactose, -L-(+)arabinose, and D-(+)mannose. SRS sugar concentrations should be chosen to most closely resemble the concentrations of sugars in the test sample. Weigh out the required amounts of each sugar, to the nearest 0.1 mg, and add 10.0 mL deionized water. Add 348  $\mu\text{L}$  of 72% sulfuric acid. Transfer the SRS to a pressure tube and cap tightly.
- 10.1.7.1 A fresh SRS is not required for every analysis. A large batch of sugar recovery standards may be produced, filtered through 0.2  $\mu\text{m}$  filters, dispensed in 10.0 mL aliquots into sealed containers, and labeled. They may be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex the frozen SRS prior to use. If frozen SRS are used, the appropriate amount of acid must be added to the thawed sample and vortexed prior to transferring to a pressure tube.
- 10.1.8 Place the tubes in an autoclave safe rack, and place the rack in the autoclave. Autoclave the sealed samples and sugar recovery standards for one hour at 121°C, usually the liquids setting. After completion of the autoclave cycle, allow the hydrolyzates to slowly cool to near room temperature before removing the caps. (If step 10.2 is not performed, draw a 10 mL aliquot of the liquor for use in step 10.5.)
- 10.2 Analyze the sample for acid insoluble lignin as follows.
- 10.2.1 Vacuum filter the autoclaved hydrolysis solution through one of the previously weighed filtering crucibles. Capture the filtrate in a filtering flask.
- 10.2.2 Transfer an aliquot, approximately 50 mL, into a sample storage bottle. This sample will be used to determine acid soluble lignin as well as carbohydrates, and acetyl if necessary. Acid soluble lignin determination must be done within 6 hours of hydrolysis. If the hydrolysis liquor must be stored, it should be stored in a refrigerator for a maximum of two weeks. It is important to collect the liquor aliquot before proceeding to step 10.2.3.
- 10.2.3 Use deionized water to quantitatively transfer all remaining solids out of the pressure tube into the filtering crucible. Rinse the solids with a minimum of 50 mL fresh deionized water. Hot deionized water may be used in place of room temperature water to decrease the filtration time.
- 10.2.4 Dry the crucible and acid insoluble residue at  $105 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  until a constant weight is achieved, usually a minimum of four hours.
- 10.2.5 Remove the samples from the oven and cool in a desiccator. Record the weight of the crucible and dry residue to the nearest 0.1 mg.
- 10.2.6 Place the crucibles and residue in the muffle furnace at  $575 \pm 25 \text{ }^\circ\text{C}$  for  $24 \pm 6$  hours.
- 10.2.6.1 A furnace with temperature ramping may also be used.
- Furnace Temperature Ramp Program:  
Ramp from room temperature to 105 °C  
Hold at 105 °C for 12 minutes

Ramp to 250 °C at 10 °C / minute  
 Hold at 250 °C for 30 minutes  
 Ramp to 575 °C at 20 °C / minute  
 Hold at 575 °C for 180 minutes  
 Allow temperature to drop to 105 °C  
 Hold at 105 °C until samples are removed

- 10.2.7 Carefully remove the crucible from the furnace directly into a desiccator and cool for a specific amount of time, equal to the initial cool time of the crucibles. Weigh the crucibles and ash to the nearest 0.1 mg and record the weight. Place the crucibles back in the furnace and ash to a constant weight. (The amount of acid insoluble ash is not equal to the total amount of ash in the biomass sample. Refer to LAP “Determination of Ash in Biomass” if total ash is to be determined.)
- 10.3 Analyze the sample for acid soluble lignin as follows.
- 10.3.1 On a UV-Visible spectrophotometer, run a background of deionized water or 4% sulfuric acid.
- 10.3.2 Using the hydrolysis liquor aliquot obtained in step 10.2.2, measure the absorbance of the sample at an appropriate wavelength on a UV-Visible spectrophotometer. Refer to section 11.3 for suggested wavelength values. Dilute the sample as necessary to bring the absorbance into the range of 0.7–1.0, recording the dilution. Deionized water or 4% sulfuric acid may be used to dilute the sample, but the same solvent should be used as a blank. Record the absorbance to three decimal places. Reproducibility should be  $\pm 0.05$  absorbance units. Analyze each sample in duplicate, at minimum. (This step must be done within six hours of hydrolysis.)
- 10.3.3 Calculate the amount of acid soluble lignin present using calculation 11.3.
- 10.4 Analyze the sample for structural carbohydrates.
- 10.4.1 Prepare a series of calibration standards containing the compounds that are to be quantified, referring to Table 1 for suggested concentration range. Use a four point calibration. If standards are prepared outside of the suggested ranges, the new range for these calibration curves must be validated.

10.4.1.1 Table 1. Suggested concentration ranges for 10.4.1 calibration standards

Component	Suggested concentration range (mg/ml)
D-cellobiose	0.1–4.0
D(+)glucose	0.1–4.0
D(+)xylose	0.1–4.0
D(+)galactose	0.1–4.0
L(+)arabinose	0.1–4.0
D(+)mannose	0.1–4.0
CVS	Middle of linear range, concentration not equal to a calibration point (2.5 suggested)

- 10.4.1.2 A fresh set of standards is not required for every analysis. A large batch of standards may be produced, filtered through 0.2  $\mu\text{m}$  filters into autosampler

vials, sealed and labeled. The standards and CVS samples may be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex frozen standards prior to use. During every use, standards and CVS samples should be observed for unusual concentration behavior. Unusual concentrations may mean that the samples are compromised or volatile components have been lost. Assuming sufficient volume, standards and CVS samples should not have more than 12 injections drawn from a single vial. In a chilled autosampler chamber, the lifetime of standards and CVS samples is approximately three to four days.

- 10.4.2 Prepare an independent calibration verification standard (CVS) for each set of calibration standards. Use reagents from a source or lot other than that used in preparing the calibration standards. Prepare the CVS at a concentration that falls in the middle of the validated range of the calibration curve. The CVS should be analyzed on the HPLC after each calibration set and at regular intervals throughout the sequence, bracketing groups of samples. The CVS is used to verify the quality and stability of the calibration curve(s) throughout the run.
- 10.4.3 Using the hydrolysis liquor obtained in step 10.2.2, transfer an approximately 20 mL aliquot of each liquor to a 50 mL Erlenmeyer flask.
- 10.4.4 Use calcium carbonate to neutralize each sample to pH 5–6. Avoid neutralizing to a pH greater than 6 by monitoring with pH paper. Add the calcium carbonate slowly after reaching a pH of 4. Swirl the sample frequently. After reaching pH 5–6, stop calcium carbonate addition, allow the sample to settle, and decant off the supernatant. The pH of the liquid after settling will be approximately 7. (Samples should never be allowed to exceed a pH of 9, as this will result in a loss of sugars.)
- 10.4.5 Prepare the sample for HPLC analysis by passing the decanted liquid through a 0.2  $\mu\text{m}$  filter into an autosampler vial. Seal and label the vial. Prepare each sample in duplicate, reserving one of the duplicates for analysis later if necessary. If necessary, neutralized samples may be stored in the refrigerator for three or four days. After this time, the samples should be considered compromised due to potential microbial growth. After cold storage, check the samples for the presence of a precipitate. Samples containing a precipitate should be refiltered, while still cold, through a 0.2  $\mu\text{m}$  filter.
- 10.4.6 Analyze the calibration standards, CVS, and samples by HPLC using a Shodex sugar SP0810 or Biorad Aminex HPX-87P column equipped with the appropriate guard column.

HPLC conditions:

Injection volume: 10–50  $\mu\text{L}$ , dependent on concentration and detector limits

Mobile phase: HPLC grade water, 0.2  $\mu\text{m}$  filtered and degassed

Flow rate: 0.6 mL/minute

Column temperature: 80–85  $^{\circ}\text{C}$

Detector temperature: as close to column temperature as possible

Detector: refractive index

Run time: 35 minutes

Note: The deashing guard column should be placed outside of the heating unit and kept at ambient temperature. This will prevent artifact peaks in the chromatogram.

- 10.4.7 Check test sample chromatograms for presence of cellobiose and oligomeric sugars. Levels of cellobiose greater than 3 mg/mL indicate incomplete hydrolysis. Fresh samples should be hydrolyzed and analyzed.

- 10.4.8 Check test sample chromatograms for the presence of peaks eluting before cellobiose (retention time of 4–5 minutes using recommended conditions). These peaks may indicate high levels of sugar degradation products in the previous sample, which is indicative of over hydrolysis. All samples from batches showing evidence of over-hydrolysis should have fresh samples hydrolyzed and analyzed.
- 10.5 Analyze the sample for acetyl content if necessary.
- 10.5.1 Prepare 0.005 M (0.01 N) sulfuric acid for use as a HPLC mobile phase. In a 2 L volumetric flask, add 2.00 mL of standardized 10 N sulfuric acid and bring to volume with HPLC grade water. Filter through a 0.2  $\mu\text{m}$  filter and degas before use. If 10N sulfuric acid is not available, concentrated sulfuric acid may also be used. 278  $\mu\text{L}$  concentrated sulfuric acid brought to volume in a 1 L volumetric flask with HPLC grade water will also produce 0.005 M sulfuric acid.
- 10.5.2 Prepare a series of calibration standards containing the compounds that are to be quantified. Acetic acid is recommended, formic acid and levulinic acid are optional. A range of 0.02 to 0.5 mg/mL is suggested. An evenly spaced four point calibration is suggested. If standards are prepared outside of the suggested ranges, the new range for these calibration curves must be validated.
- 10.5.3 Prepare an independent calibration verification standard (CVS) for each set of calibration standards, using components obtained from a source other than that used in preparing the calibration standards. The CVS must contain precisely known amounts of each compound contained in the calibration standards, at a concentration that falls in the middle of the validated range of the calibration curve. The CVS should be analyzed on the HPLC after each calibration set and at regular intervals throughout the sequence, bracketing groups of samples. The CVS is used to verify the quality and stability of the calibration curve(s) throughout the run.
- 10.5.4 Prepare the sample for HPLC analysis by passing a small aliquot of the liquor collected in step 10.2.2 through a 0.2  $\mu\text{m}$  filter into an autosampler vial. Seal and label the vial. If it is suspected that the sample concentrations may exceed the calibration range, dilute the samples as needed, recording the dilution. The concentrations should be corrected for dilution after running.
- 10.5.5 Analyze the calibration standards, CVS, and samples by HPLC using a Biorad Aminex HPX-87H column equipped with the appropriate guard column.
- HPLC conditions:
- Sample volume: 50  $\mu\text{L}$
  - Mobile phase: 0.005 M sulfuric acid, 0.2  $\mu\text{m}$  filtered and degassed
  - Flow rate: 0.6 mL/minute
  - Column temperature: 55–65  $^{\circ}\text{C}$
  - Detector temperature: as close to column temperature as possible
  - Detector: refractive index
  - Run time: 50 minutes

## 11. Calculations

- 11.1 Calculate the oven dry weight (ODW) of the extractives free sample, using the average total solids content as determined by the LAP “Standard Method for the Determination of Total Solids in Biomass.”

$$ODW = \frac{Weight_{air\ dry\ sample} \times \% Total\ solids}{100}$$

- 11.2 Calculate and record the weight percent acid insoluble residue (AIR) and acid insoluble lignin (AIL) on an extractives free basis.

$$\% AIR = \frac{Weight_{crucible\ plus\ AIR} - Weight_{crucible}}{ODW_{sample}} \times 100$$

$$\% AIL = \frac{(Weight_{crucible\ plus\ AIR} - Weight_{crucible}) - (Weight_{crucible\ plus\ ash} - Weight_{crucible}) - Weight_{protein}}{ODW_{sample}} \times 100$$

Where:

$Weight_{protein}$  = Amount of protein present in the acid insoluble residue, as determined in LAP “Determination of Protein Content in Biomass.” This measurement is only necessary for biomass containing high amounts of protein. Our studies have shown that, for a corn stover feedstock, only a minor fraction of the protein condenses into the residue. For a pretreated corn stover, a significant amount of the nitrogenous material condenses into the AIR. The amount of nitrogen in the residue can be determined. If a nitrogen value is determined, the user should be aware that the nitrogen-to-protein factor will no longer be valid, as the nitrogenous material will likely have degraded.

- 11.3 Calculate the amount of acid soluble lignin (ASL) on an extractives free basis.

$$\% ASL = \frac{UVabs \times Volume_{filtrate} \times Dilution}{\epsilon \times ODW_{sample} \times Pathlength} \times 100$$

Where:

$UVabs$  = average UV-Vis absorbance for the sample at appropriate wavelength (see table below)

$Volume_{hydrolysis\ liquor}$  = volume of filtrate, 86.73 mL

$$\text{Dilution} = \frac{\text{Volume}_{\text{sample}} + \text{Volume}_{\text{diluting solvent}}}{\text{Volume}_{\text{sample}}}$$

$\epsilon$  = Absorptivity of biomass at specific wavelength (see table below)

ODW<sub>sample</sub> = weight of sample in milligrams

Pathlength = pathlength of UV-Vis cell in cm

Absorptivity constants for acid soluble lignin measurement for select biomass types

Biomass type	Lambda max (nm)	Absorptivity at lambda max (L/g cm)	Recommended wavelength (nm)	Absorptivity at recommended wavelength (L/g cm)
Pinus Radiata- NIST SRM 8493	198	25	240	12
Bagasse- NIST SRM 8491	198	40	240	25
Corn Stover- NREL supplied feedstock	198	55	320	30
Populus deltoides- NIST SRM 8492	197	60	240	25

Note: Lambda max values often contain interfering peaks from carbohydrate degradation products. Recommended wavelength values have been chosen to minimize these interferences.

11.4 Calculate the total amount of lignin on an extractives free basis.

$$\% \text{Lignin}_{\text{ext free}} = \% \text{AIL} + \% \text{ASL}$$

11.5 Calculate the total lignin value to an as received basis, if necessary

$$\% \text{Lignin}_{\text{as received}} = (\% \text{Lignin}_{\text{ext free}}) \times \frac{(100 - \% \text{Extractives})}{100}$$

Where:

% Extractives = percent extractives in the prepared biomass sample, as determined in LAP “Determination of Extractives in Biomass”

11.6 Create a calibration curve for each analyte to be quantified using linear regression. From these curves, determine the concentration in mg/mL of each component present in the samples analyzed by HPLC, correcting for dilution if required.

11.7 Calculate and record the amount of each calibration verification standard (CVS) recovered following HPLC analysis.

$$\% CVS \text{ recovery} = \frac{\text{conc. detected by HPLC, mg/mL}}{\text{known conc. of standard, mg/mL}} \times 100$$

- 11.8 For the sugar recovery standards (SRS), calculate the amount of each component sugar recovered after dilute acid hydrolysis, accounting for any dilution made prior to HPLC analysis. Average any replicate ( $\%R_{\text{sugar}}$ ) values obtained for each individual sugar and report  $\%R_{\text{avg, sugar}}$ .

$$\% R_{\text{sugar}} = \frac{\text{conc. detected by HPLC, mg/mL}}{\text{known conc. of sugar before hydrolysis, mg/mL}} \times 100$$

- 11.9 Use the percent hydrolyzed sugar recovery values calculated in step 11.8 to correct the corresponding sugar concentration values obtained by HPLC for each of the hydrolyzed samples ( $C_{\text{cor. sample}}$ ), accounting for any dilution made prior to HPLC analysis.

$$C_x = \frac{C_{\text{HPLC}} \times \text{dilution factor}}{\% R_{\text{ave. sugar}} / 100}$$

Where:  $C_{\text{HPLC}}$  = conc. of a sugar as determined by HPLC, mg/mL  
 $\% R_{\text{ave. sugar}}$  = average recovery of a specific SRS component  
 $C_x = C_{\text{cor. sample}}$ , concentration in mg/mL of a sugar in the hydrolyzed sample after correction for loss on 4% hydrolysis

- 11.10 Calculate the concentration of the polymeric sugars from the concentration of the corresponding monomeric sugars, using an anhydro correction of 0.88 (or 132/150) for C-5 sugars (xylose and arabinose) and a correction of 0.90 (or 162/180) for C-6 sugars (glucose, galactose, and mannose).

$$C_{\text{anhydro}} = C_{\text{corr}} \times \text{Anhydro correction}$$

Note: To be completely correct, the hydrolysis of the hemicellulose branches should be accounted for in the xylan values, since the loss of functional groups adds either a proton or a hydroxide to the xylan. Two examples of branch compounds that are quantified in this LAP are acetate and minor sugars such as galactan, arabinan, and mannan. However, for the typical concentrations of acetate and minor sugars seen in biomass samples, the resulting changes in xylan values are negligible, and so this correction is not performed. If desired, the correction can be applied per the equations below. However, this correction actually increases the uncertainty of the xylan value, since the uncertainties of the measured concentration values of the minor sugars are much larger than for xylose. It also makes the assumption that each of the minor sugars and acetate groups branch directly from the xylan backbone, which is likely an erroneous assumption.

$$C_{\text{anhydro\_xylan}} = (\text{Xylose}_{\text{corr}} \times (1 - \text{Xylose}_{\text{A correction}} - \text{Xylose}_{\text{Minorsugarcorrection}})) \times 132/150$$

$$\text{Where: } Xylose_{AA\text{ correction}} = \frac{\text{Acetic\_acid\_concentration}}{Xylose\_concentration} \times \frac{17(OH^-MW)}{132(xyloseMW)}$$

$$Xylose_{Minorsugar\text{ correction}} = \frac{\text{Minor\_sugar\_concentration}}{Xylose\_concentration} \times \frac{1(H^+MW)}{132(xyloseMW)}$$

11.11 Calculate the percentage of each sugar on an extractives free basis.

$$\% \text{ Sugar}_{\text{ext free}} = \frac{C_{\text{anhydro}} \times V_{\text{filtrate}} \times \frac{1g}{1000mg}}{ODW_{\text{sample}}} \times 100$$

Where:  $V_{\text{filtrate}}$  = volume of filtrate, 86.73 mL

11.12 Calculate the percentage of each sugar on an as received basis, if necessary.

$$\% \text{ Sugar}_{\text{as received}} = (\% \text{ Sugar}_{\text{ext free}}) \times \frac{(100 - \% \text{ Extractives})}{100}$$

Where:

% Extractives = percent extractives in the prepared biomass sample, as determined in LAP “Determination of Extractives in Biomass”

11.13 Calculate the acetate percentage on an extractives free basis.

$$\% \text{ Acetate}_{\text{ext free}} = \frac{C_{AA,HPLC} \times \text{Volume}_{\text{filtrate}} \times \text{Conversion factor}}{ODW_{\text{sample}}} \times 100$$

Where:

$C_{AA,HPLC}$  = concentration in mg/mL of acetic acid as determined by HPLC

$\text{Volume}_{\text{hydrolysis liquor}}$  = volume of filtrate, generally 86.73 mL

Conversion factor = (59/60) = 0.983, the conversion from acetic acid to acetate in biomass

Note (July 8, 2011): The conversion factor has been updated from previous versions of the LAP. The previous value was (43/60) = 0.717.

11.14 Calculate the acetyl percentage on an as received basis, if necessary.

$$\% \text{ Acetyl}_{\text{as received}} = (\% \text{ Acetyl}_{\text{ext free}}) \times \frac{(100 - \% \text{ Extractives})}{100}$$

11.15 To report or calculate the relative percent difference (RPD) between two samples, use the following calculation.

$$RPD = \left( \frac{X_1 - X_2}{X_{mean}} \right) \times 100$$

Where:

$X_1$  and  $X_2$  = measured values  
 $X_{mean}$  = the mean of  $X_1$  and  $X_2$

11.16 To report or calculate the root mean square deviation (RMS deviation) or the standard deviation (st dev) of the samples, use the following calculations.

First find the root mean square (RMS) of the sample using:

$$RMS = x_m = mean = \sqrt{\left( \frac{\sum^n x}{n} \right)^2}$$

Then find the root mean square deviation, or standard deviation, using:

$$RMS deviation = \sigma = stdev = \sqrt{\frac{\sum^n (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Where:

$x_m$  = the root mean square of all x values in the set  
 $n$  = number of samples in set  
 $x_i$  = a measured value from the set

## 12. Report Format

12.1 Report the weight percent of lignin, each sugar, and acetate. Report on an as received basis, correcting for extractives if necessary.

12.2 For replicate analyses, report the average and relative percent difference.

## 13. Precision and Bias

13.1 *Round robin testing* – For a report documenting an international round robin test of biomass analysis methods, including this procedure, see Milne et al., 1992.

## 14. Quality Control

14.1 Reported significant figures or decimal places: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.

- 14.2 Replicates: Run all samples in duplicate.
- 14.3 Blank: None.
- 14.4 Relative percent difference criteria: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.
- 14.5 Calibration verification standard: Calibration verification standards should be independently prepared and analyzed as appropriate, per the procedure.
- 14.6 Sample size: 4g, minimum, of sample, extracted if necessary (including amount necessary for percent solids determination).
- 14.7 Sample storage: Hydrolysis liquors may be stored in a refrigerator for up to two weeks. Neutralized hydrolysis liquors may be stored in a refrigerator for up to four days.
- 14.8 Standard storage: HPLC standards should be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex samples prior to use.
- 14.9 Standard preparation: Standards should be prepared as described in the procedure, including a QA standard.
- 14.10 Definition of a batch: Any number of samples that are analyzed and recorded together. The recommended size is three to six samples with a QA standard, all run in duplicate.
- 14.11 Control charts: All CVS, SRS recoveries, and NIST or QA standards should be control charted.

## 15. Appendices

- 15.1 None

## 16. References

- 16.1 NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure “Determination of Total Solids in Biomass.”
- 16.2 NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure “Determination of Ash in Biomass.”
- 16.3 NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure “Determination of Extractives in Biomass.”
- 16.4 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#002 “Determination of Structural Carbohydrate Content in Biomass by High Performance Liquid Chromatography.”
- 16.5 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#003 “Determination of Acid Insoluble Lignin in Biomass.”
- 16.6 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#017 “Determination of o-Acetyl Groups in Biomass by High Performance Liquid Chromatography.”
- 16.7 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#019 “Hydrolysis of Corn Stover for Compositional Analysis.”
- 16.8 Moore, W., and D. Johnson. 1967. *Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products*. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture.
- 16.9 ASTM E1758-01 “Standard method for the Determination of Carbohydrates by HPLC.” In *2003 Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.05*. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, International
- 16.10 Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). “Standardized Analytical Methods.” *Biomass & Bioenergy*. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar, 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K.. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366

## 17. List of Revisions

Version 08-03-2012:

- Page 11: Section 11.10 includes notes on the correction of the xylan number for minor sugars and acetate, as well as has a corrected  $C_{anhydro\_xylan}$  equation.

Version 07-08-2011:

- Page 9: Section 11.2 includes notes on nitrogenous material in AIR.
- Page 9-10: Section 11.3 includes pathlength in the ASL equation, which has always been assumed to be 1 cm, but may differ.
- Page 11-12: Section 11.10 includes explanations and equations to correct xylan for branched hemicelluloses components.
- Page 12: Section 11.13 corrects the acetic acid to acetate conversion factor.

Previous version (July 2010).