

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Microbiología III



**EFFECTO DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN
ORIGINADOS EN LA EXPLOSIÓN POR VAPOR DE
BIOMASA DE CHOPO SOBRE *Kluyveromyces marxianus***

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

José Miguel Oliva Domínguez

Bajo la dirección de la Doctora:

Mercedes Ballesteros Perdices

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-1709-8

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III

EFFECTO DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN
ORIGINADOS EN LA EXPLOSIÓN POR VAPOR DE
BIOMASA DE CHOPO SOBRE *Kluyveromyces*
marxianus

TESIS DOCTORAL

JOSE MIGUEL OLIVA DOMÍNGUEZ
MADRID, 2003

INDICE

| | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. BIOCOMBUSTIBLES LÍQUIDOS..... | 1 |
| 1.1.1. Bioetanol como combustible..... | 3 |
| 1.2. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL..... | 4 |
| 1.2.1. Fuente de biomasa..... | 4 |
| 1.2.2. Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica..... | 5 |
| 1.2.2.1. Polisacáridos..... | 5 |
| 1.2.2.2. Lignina..... | 8 |
| 1.2.2.3. Otras sustancias..... | 11 |
| 1.3. PROCESOS DE OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA..... | 12 |
| 1.3.1. Hidrólisis ácida..... | 12 |
| 1.3.2. Hidrólisis enzimática..... | 14 |
| 1.3.2.1. Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica..... | 17 |
| 1.3.3. Procesos de conversión de la celulosa a etanol..... | 24 |
| 1.3.3.1. Proceso en dos etapas..... | 24 |
| 1.3.3.2. Proceso en una etapa..... | 25 |
| 1.3.4. Utilización de levaduras termotolerantes en los procesos de obtención de etanol..... | 26 |
| 1.4. COMPUESTOS TÓXICOS GENERADOS EN EL PRETRATAMIENTO..... | 27 |
| 1.4.1. Tipos y origen..... | 27 |
| 1.4.2. Efectos de los compuestos tóxicos sobre los microorganismos..... | 29 |
| 1.4.2.1. Furfural e Hidroximetilfurfural..... | 29 |
| 1.4.2.2. Ácidos alifáticos..... | 30 |
| 1.4.2.3. Compuestos fenólicos..... | 31 |
| 1.5. AUMENTO DE LA FERMENTABILIDAD DE LOS HIDROLIZADOS OBTENIDOS TRAS EL PRETRATAMIENTO..... | 33 |
| 1.5.1. Métodos biológicos..... | 33 |
| 1.5.2. Métodos químicos y físicos..... | 34 |
| 1.5.2.1. Tratamiento con hidróxidos..... | 34 |
| 1.5.2.2. Evaporación..... | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 1.5.2.3. Carbón activo..... | 35 |
| 1.5.2.4. Carbón vegetal..... | 35 |
| 1.5.2.5. Resinas de intercambio iónico..... | 35 |
| 1.5.2.6. Lignina residual..... | 36 |
| 1.5.2.7. Utilización de zeolitas..... | 36 |
| 1.5.2.8. Proceso de oxidación avanzada..... | 37 |
| 1.6. PERSPECTIVAS DE FUTURO PARA LA COMERCIALIZACIÓN DEL ETANOL A PARTIR DE LIGNOCELULOSA..... | 39 |
| 2. OBJETO DE INTERÉS..... | 42 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 44 |
| 3.1. MATERIA PRIMA..... | 44 |
| 3.2. PRETRATAMIENTO CON EXPLOSIÓN POR VAPOR..... | 44 |
| 3.3. PRODUCTOS QUÍMICOS..... | 45 |
| 3.4. MEDIOS DE CULTIVO..... | 45 |
| 3.5. MICROORGANISMO..... | 45 |
| 3.6. ENSAYOS DE FERMENTACIÓN..... | 46 |
| 3.6.1. Preparación del inóculo..... | 46 |
| 3.6.2. Pruebas de fermentación..... | 46 |
| 3.6.3. Diseño de composición central modificado..... | 47 |
| 3.6.4. Cálculo de los parámetros de fermentación..... | 48 |
| 3.7. DETERMINACIONES ANALÍTICAS..... | 49 |
| 3.7.1. Caracterización de la materia prima y el material pretratado..... | 49 |
| 3.7.2. Caracterización de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento..... | 50 |
| 3.7.3. Determinación de los productos de degradación..... | 50 |
| 3.7.4. Determinación de etanol..... | 52 |
| 3.7.5. Determinación de azúcares..... | 52 |
| 3.8. TRATAMIENTO DE DESTOXIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN LÍQUIDA OBTENIDA TRAS EL PRETRATAMIENTO..... | 52 |
| 3.8.1. Tratamiento con hidróxidos..... | 52 |
| 3.8.2. Reacción de Fenton..... | 53 |
| 3.8.3. Evaporación..... | 53 |
| 3.8.4. Tratamiento con productos de naturaleza zeolítica..... | 53 |
| 3.9. ESTUDIO DE FERMENTABILIDAD DE LA FRACCIÓN LÍQUIDA UNA VEZ DESTOXIFICADA..... | 54 |

| | |
|--|-----------|
| 3.10. ENSAYOS DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA UTILIZANDO LA FRACCIÓN LÍQUIDA..... | 54 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 55 |
| 4.1. COMPOSICION DE LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA EXPLOSION POR VAPOR..... | 55 |
| 4.2. EFECTOS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN IDENTIFICADOS EN LA FRACCIÓN LÍQUIDA SOBRE LA FERMENTACIÓN DE <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10875..... | 62 |
| 4.2.1 Efecto de los compuestos tóxicos añadidos individualmente sobre la producción de biomasa y etanol..... | 62 |
| 4.2.1.1. Influencia del pH del medio de fermentación en la toxicidad de los ácidos..... | 75 |
| 4.2.1.2. Asimilación de los productos de degradación..... | 79 |
| 4.2.1.3. Efecto de los aldehídos sobre la fermentación de glucosa..... | 82 |
| 4.2.2. Efecto de combinaciones binarias de catecol y aldehídos sobre la producción de biomasa y etanol por <i>K. marxianus</i> CECT 10875.... | 88 |
| 4.2.2.1. Efecto de combinaciones binarias a una concentración inicial de 0,5 g/l..... | 89 |
| 4.2.2.2. Efecto de combinaciones binarias a una concentración inicial de 1 g/l..... | 90 |
| 4.2.2.3. Estudio de efectos sinérgicos de las combinaciones binarias de catecol, vainillina, furfural y 4-hidroxibenzaldehído..... | 96 |
| 4.2.3. Influencia de la combinación de ácido acético, furfural y catecol sobre la tasa específica de crecimiento, productividad volumétrica, rendimiento en biomasa y rendimiento en etanol de <i>K. marxianus</i> CECT 10875..... | 103 |
| 4.2.3.1. Efecto de la combinación de ácido acético, furfural y catecol sobre la tasa específica de crecimiento..... | 106 |
| 4.2.3.2. Efecto de la combinación de acético, furfural y catecol sobre la productividad volumétrica..... | 108 |
| 4.2.3.3. Efecto de la combinación de acético, furfural y catecol sobre el rendimiento en etanol..... | 109 |
| 4.2.3.4. Efecto de la combinación de acético, furfural y catecol sobre el rendimiento en biomasa..... | 113 |
| 4.3 UTILIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LÍQUIDA OBTENIDA TRAS EL PRETRATAMIENTO COMO MEDIO DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL..... | 117 |
| 4.3.1. Tratamientos de la fracción líquida..... | 118 |
| 4.3.1.1. Efecto de la dilución sobre la fermentabilidad de la fracción líquida..... | 118 |

| | |
|---|-----|
| 4.3.1.2. Efecto de la neutralización sobre la fermentabilidad de la fracción líquida..... | 120 |
| 4.3.1.3. Efecto de la oxidación avanzada sobre la fermentabilidad de la fracción líquida. | 123 |
| 4.3.1.4. Efecto de la evaporación sobre la fermentabilidad de la fracción líquida..... | 125 |
| 4.3.1.5. Efecto de la utilización de productos de naturaleza zeolítica (PNZs) sobre la fermentabilidad de la fracción líquida. | 127 |
| 4.3.2. Utilización de la fracción líquida como medio de fermentación en un proceso de SFS. | 130 |
| 5. CONCLUSIONES. | 132 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA. | 134 |
| ANEXO I. | 151 |
| ANEXO II. | 155 |
| ANEXO III. | 156 |

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. BIOCOMBUSTIBLES LÍQUIDOS.

La Unión Europea consume cada vez más energía, al mismo tiempo que aumenta su dependencia energética. Hoy importa el 50% de sus necesidades y, según las previsiones que se recogen en el Libro Verde de seguridad del abastecimiento energético (Comisión Europea, 2001) en el año 2030 se acercará al 70%, con una dependencia aún más marcada de los hidrocarburos.

Reducir la alta dependencia energética de los productos petrolíferos, y aumentar la seguridad del suministro de un combustible sostenible en el sector del transporte constituye un objetivo prioritario de la estrategia energética en la Unión Europea. Los biocombustibles líquidos suponen una alternativa interesante para contribuir a alcanzar estas metas, como se establece en la recientemente aprobada Directiva por el Parlamento Europeo para la promoción y utilización de biocarburantes en el sector del transporte (COM 2001-547). La Directiva establece como objetivo que el uso de biocarburantes sea en el año 2010 un 6% del consumo total de energía en el sector del transporte. Esta Directiva, junto a otra que permitirá exonerar de impuestos especiales a este tipo de biocombustibles, creará un mercado de estos productos competitivo en Europa.

El término biocombustible engloba a todos aquellos combustibles derivados de la biomasa vegetal. Se trata por tanto, de combustibles de origen vegetal que tienen características parecidas a las de los combustibles fósiles, lo que permite su utilización en motores sin tener que efectuar modificaciones importantes. Además no contienen azufre, uno de los principales causantes de la lluvia ácida, ni contribuyen a aumentar la cantidad de CO₂ emitido a la atmósfera.

Por otra parte, la producción de biocombustibles supone una alternativa interesante para aquellas tierras agrícolas que quedan abandonadas como resultado de la limitación de la superficie dedicada a los diversos cultivos herbáceos extensivos que establece la Reforma de la Política Agraria Común (PAC), contribuyendo de forma eficaz a la generación de empleo en los sectores de la agricultura, industria y servicios, fundamentalmente en el área rural.

No obstante, para que los biocombustibles de origen agrícola sean una alternativa energética real se necesita que estos productos, no sólo presenten características equivalentes a los de procedencia fósil, sino también que, en el conjunto de los procesos de obtención, se consigan balances energéticos positivos y que lleguen al mercado a un coste similar al de los productos derivados del petróleo.

En la actualidad los biocombustibles líquidos se obtienen a partir de productos agrícolas tales como el azúcar, los cereales y semillas oleaginosas, que se producen principalmente para el sector alimentario. Estos cultivos crecidos sobre tierras agrícolas, particularmente tierras de retirada, están sujetos a fuerzas socio-económicas distintas de las meramente energéticas.

El principal inconveniente con el que se enfrenta la comercialización de los biocombustibles en el sector de transporte es el alto coste de fabricación. Basado en los niveles de precio actuales para el petróleo (aprox. 30 euros/barril) se calcula el coste adicional del litro de biocombustible en 0,3 euros. Para que estos productos fueran equivalentes en precio a los de procedencia fósil serían necesarios precios del petróleo en torno a los 70 euros/barril. Por ello, en la actualidad su utilización sólo es viable si se aplican sistemas de ayudas, como las de tipo fiscal, que reducen el tipo de impuesto especial aplicable a los biocombustibles de origen agrícola y que ya se aplican en Estados Unidos, Brasil y la Unión Europea. En España los biocarburantes gozan de una exención total sobre los impuestos especiales desde el pasado 1 de enero, conforme dispone la Ley 53/2002 de 30 diciembre de 2002.

Se pueden distinguir dos clases de biocombustibles líquidos para su utilización en el sector del transporte (Ballesteros, 2001):

- Los aceites vegetales (bioaceites), obtenidos a partir de cultivos de semillas oleaginosas como la colza, soja o el girasol. Se pueden utilizar en forma de aceite sin refinar o modificarlos, mediante un proceso químico (transesterificación), para obtener ésteres metílicos o etílicos (biodiesel). Tienen su aplicación en motores diesel, sustituyendo al gasóleo o mezclados con él.

- El alcohol etílico (bioetanol) y su derivado el 5-etil-ter-butil-eter (ETBE), que pueden utilizarse en motores Otto, sustituyendo a la gasolina o bien mezclado con ella en distintas proporciones.

1.1.1. Bioetanol como combustible.

El etanol puede utilizarse como único combustible, realizando modificaciones a los motores, o en mezclas con la gasolina desde un 10 % hasta mezclas mucho más altas como el E-85 (15 % de gasolina y 85 % de etanol), que puede utilizarse en los vehículos denominados FFV (Flexible Fuel Vehicle), equipados con un sensor de combustible que detecta la proporción etanol/gasolina, adaptando los sistemas de inyección e ignición a las características de la mezcla. Estos vehículos están disponibles en países como Estados Unidos, Brasil o Suecia.

En algunos países se prefiere utilizar mezclas de etanol con gasolina después de transformar el etanol en ETBE, producto principal de la reacción en la que interviene una molécula de etanol y otra de isobuteno. El ETBE es una alternativa al MTBE (metil terciario butil éter) que actualmente se está utilizando como producto oxigenado sustitutivo del tetraetilo de plomo para mejorar el índice de octano. El ETBE tiene un índice de octano y un poder calorífico ligeramente superior al MTBE, y su rendimiento de fabricación, a partir del isobuteno, es más elevado.



El ETBE se puede producir en las mismas instalaciones en las que ahora se obtiene el MTBE, y en los países de la UE se acepta la incorporación del ETBE como mejorante de las gasolinas hasta un porcentaje del 10% sin que tenga que realizarse un mercado especial, siendo su empleo totalmente aceptado por los fabricantes de automóviles. Su desventaja frente al MTBE es el mayor coste del etanol, obtenido por fermentación, frente al metanol de origen petroquímico, lo que hace que en la actualidad el ETBE sea más caro de producir (Ballesteros, 2001).

Para mejorar la competitividad del bioetanol frente a los combustibles derivados del petróleo se deben reducir los costes de producción, y para ello se necesita reducir el precio de las materias primas, ya que estas suponen alrededor del 60% del coste final del etanol. Es necesario desarrollar nuevos cultivos y considerar la biomasa secundaria y los residuos orgánicos como recursos complementarios para la producción de biocombustibles. La utilización de biomasa lignocelulósica es, a medio plazo, la opción más prometedora para la obtención de etanol combustible a bajos costes, posibilitando que este producto pueda ser adoptado por la industria.

1.2. LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL.

1.2.1. Fuentes de biomasa.

Bajo el término biomasa se incluye toda la materia orgánica que tiene su origen inmediato en un proceso biológico (Fernández, 1995). La formación de biomasa vegetal a partir de luz solar se lleva a cabo mediante la fotosíntesis, gracias a la cual se forman moléculas de alto contenido energético en forma de energía química. La producción de biomasa a escala global en el planeta es muy alta, estimándose que la fotosíntesis fija anualmente $2,2 \times 10^{11}$ toneladas de peso seco de biomasa, lo que supone unas diez veces la demanda energética mundial.

Atendiendo a su origen, la biomasa se puede clasificar en (Ballesteros, 2001):

- Biomasa natural, producida en los ecosistemas naturales. Aunque es una de las principales fuentes energéticas en los países en vías de desarrollo, no es la más adecuada para un aprovechamiento energético masivo, ya que podría originar una rápida degradación de los ecosistemas.

- Biomasa residual, generada como residuo en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial. Los residuos agrícolas proceden de los cultivos leñosos y herbáceos, destacando los producidos en los cultivos de cereal. Los de origen

forestal proceden de los tratamientos silvícolas, de mejora y mantenimiento de los montes y masas forestales. También se pueden considerar incluidos en este grupo los residuos de la industria papelera y la fracción orgánica de los residuos domésticos e industriales, los cuales no sólo no tienen valor económico en el contexto en que se generan, sino que suelen provocar problemas ambientales en su eliminación.

- Cultivos energéticos, son aquellos dedicados a la producción de biomasa para su utilización energética con fines no alimentarios. Se diferencian dos tipos: los orientados a la producción de materiales leñosos con especies de crecimiento rápido como el eucalipto o el chopo, y los orientados a la producción de especies vegetales anuales, como por ejemplo, el cardo cynara.

1.2.2. Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica.

Los materiales lignocelulósicos tienen tres componentes fundamentales, los polisacáridos, la lignina y otras sustancias que no forman parte de la pared celular.

1.2.2.1. Polisacáridos.

El componente polisacárido comprende carbohidratos de alto peso molecular (celulosa y hemicelulosa), que representan entre el 60-80% del total de los materiales lignocelulósicos.

Celulosa.

La celulosa, componente mayoritario de las paredes celulares de las fibras de madera, es un polímero lineal de β -D-Glucosa con un peso molecular de aproximadamente 500.000. Las moléculas individuales de glucosa están unidas por enlaces β -(1,4), según se muestra en la figura 1.1. El número de azúcares de cadena (grado de polimerización G.P.), varía en los diferentes materiales celulósicos.

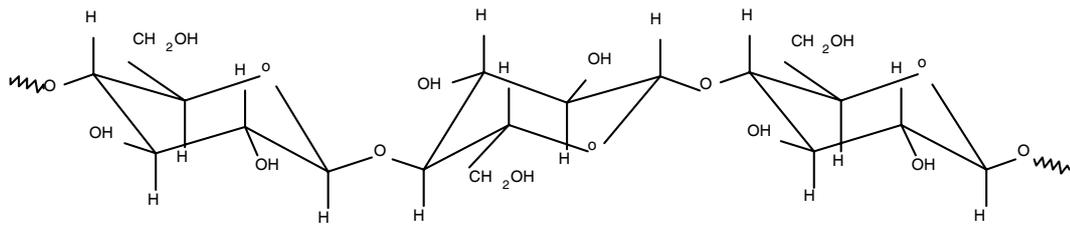


Figura 1.1.- Estructura primaria de la celulosa.

El anillo de piranosa está en conformación 4C_1 , es decir, que los grupos $-CH_2OH$ y $-OH$, así como los enlaces glucosídicos, están en posición ecuatorial con respecto al plano medio del anillo, y los átomos de hidrógeno en posición axial.

Cuando la molécula de celulosa está completamente extendida y toma forma de cinta aplanada, con los grupos $-OH$ sobresaliendo lateralmente, se pueden formar puentes de hidrógeno inter e intramoleculares. La superficie de la cinta, compuesta por átomos de hidrógeno unidos directamente a carbono, es hidrofóbica. Estas dos características de la estructura molecular son las responsables de su estructura supramolecular, y determina muchas de las propiedades físicas y químicas de la celulosa.

Hemicelulosa.

Las hemicelulosas están constituidas por polímeros de unidades de anhidroazúcares unidas por enlaces glucosídicos, formadas por más de un tipo de azúcar (hexosas o pentosas), y además presentan ramificaciones y sustituciones. Su papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa. En estado natural existe en forma amorfa con un grado de polimerización que no excede de 200 (G.P.).

Existen dos tipos de hemicelulosas que se encuentran tanto en las maderas duras como en las blandas: los xilanos y los glucomananos.

En las maderas duras, las hemicelulosas predominantes son los xilanos, un polímero de unidades de β -xilopiranosas unidas por enlaces β -(1,4), que presenta ligeras

ramificaciones. En los xilanos los grupos hidróxilo pueden estar sustituidos por grupos 4-O-metilglucurónico unidos por enlaces α -(1,2), y por grupos acetilo unidos a través de enlaces éster a posiciones 2 y 3 del anillo de pentosa (figura 1.2.).

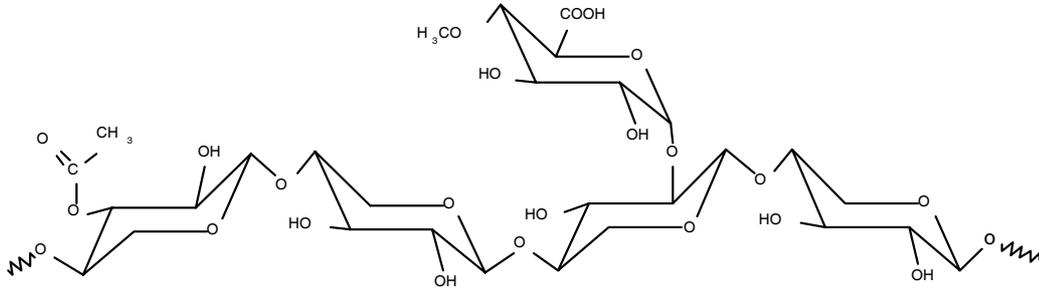


Figura 1.2.- Estructura del O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano.

Los glucomananos de maderas duras son polímeros lineales de glucosa y manosa unidos por enlaces β -(1,4), con predominio de las manosas, y que no presentan ramificaciones ni grupos sustituyentes laterales (figura 1.3.).

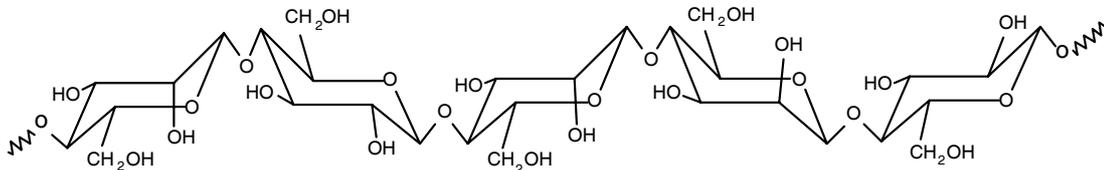


Figura 1.3.- Estructura del glucomanano.

En los xilanos de maderas blandas el esqueleto del polímero es idéntico al de maderas duras, los sustituyentes son los grupos 4-O-metilglucurónico, unidos por enlaces α -(1,2) y restos de arabinosa unidas por enlaces α -(1,3) (figura 1.4.).

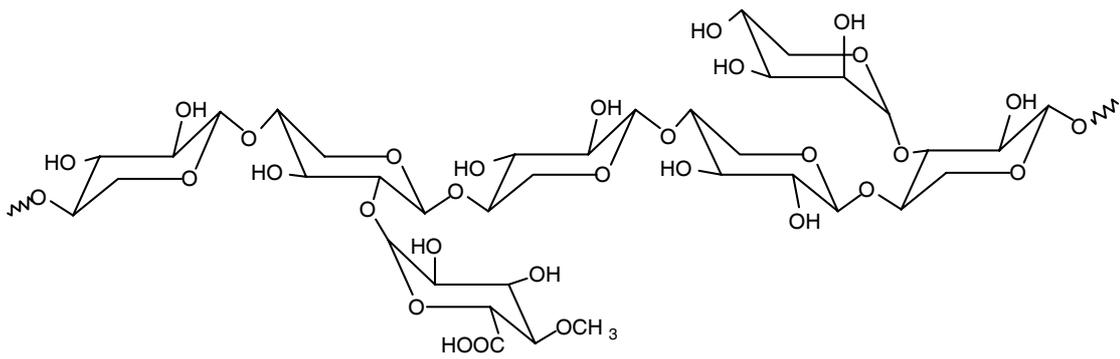


Figura 1.4.- Estructura del arabino-4-O-metilglucuronoxilano.

Los glucomananos de maderas blandas, con mayor cantidad de manosa que los de maderas duras, tienen dos tipos de sustituyentes; los grupos O-acetil unidos por enlaces éster a las posiciones 2 y 3 del esqueleto del azúcar; y la galactosa unida por enlaces α -(1,6). Estos glucomananos se denominan galactoglucomananos (figura 1.5.).

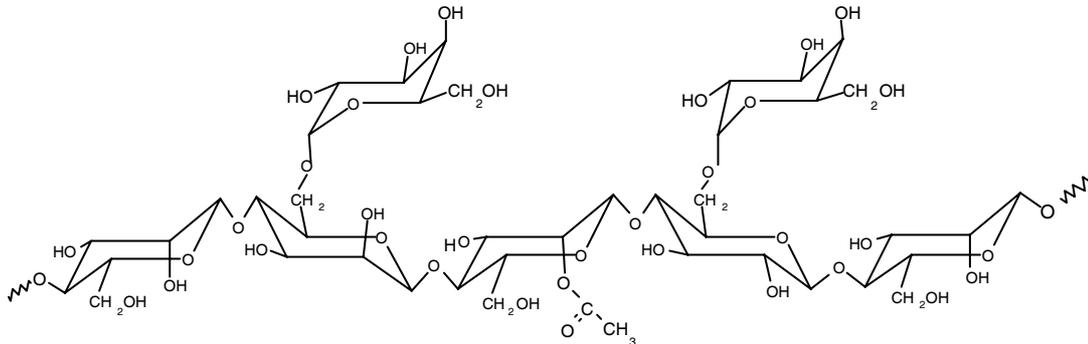


Figura 1.5.- Estructura del O-acetil-galactoglucomanano.

1.2.2.2. Lignina.

Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de

unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada (figura 1.6).

Los monómeros que forman la lignina son los denominados alcoholes cinamílicos (figura 1.7), diferenciados entre sí por las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático. Así, el alcohol p-cumarílico que da lugar a las unidades p-hidroxifenilo (unidades H) no presenta ningún sustituyente; el alcohol coniferílico que da lugar a las unidades guayacilo (unidades G) presenta un grupo metoxilo en la posición 3 del anillo aromático y el alcohol sinapílico que da lugar a las unidades siringilo (unidades S) presenta dos grupos metoxilo en posiciones 3 y 5 de dicho anillo.

La polimerización de estos precursores durante la formación de la pared celular se produce mediante la sucesión de una etapa enzimática y una etapa química. En la primera los precursores son oxidados por peroxidasas de la pared dando radicales fenoxilo (Higuchi, 1990) que, a continuación y durante la etapa química reaccionan al azar entre ellos. En este proceso se originan una gran variedad de formas resonantes que pueden reaccionar unas con otras, por ello la lignina no presenta una única estructura (Hernández, 1997). Las uniones pueden ser de tipo condensado (enlaces C-C) o de tipo no condensado (enlace aril-alquil éter) en las que intervienen tanto los anillos aromáticos como las cadenas propílicas (Adler, 1977). Los enlaces que van a condicionar una alta condensación de la lignina son los enlaces C-C que sólo pueden establecerse entre unidades H o G, ya que las unidades S al tener dos grupos metoxilo en posiciones 3 y 5 no puede establecer este tipo de enlaces.

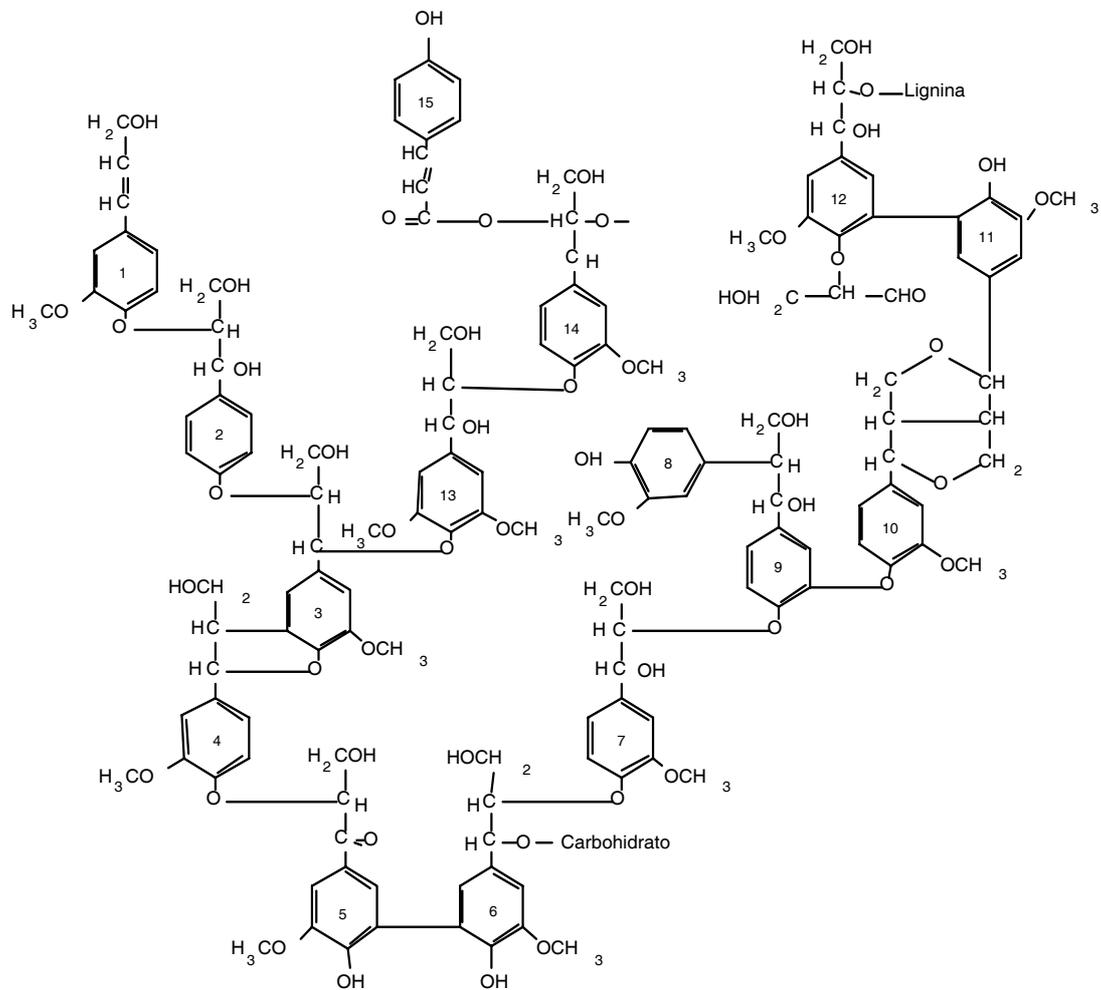
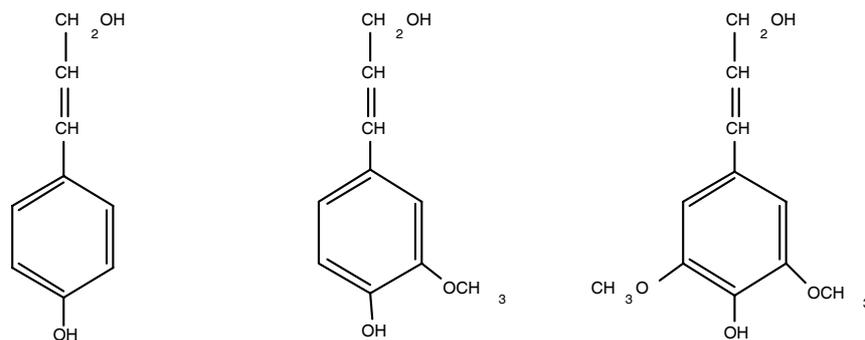


Figura 1.6.- Estructura de la lignina.



Alcohol p-cumarílico

Alcohol coniferílico

Alcohol sinapílico

Unidad p-hidroxifenilo

Unidad guayacilo

Unidad siringilo

Figura 1.7.- Alcoholes cinamílicos precursores de la lignina

La proporción de las tres unidades que forman la lignina y el tipo de enlace difiere según el tipo de planta, así como del grupo taxonómico, tejido o capa de la pared celular, estado de desarrollo y condiciones ambientales. Así, se puede hacer una diferenciación de la lignina dependiendo del grupo taxonómico (Hernández, 1997). La lignina de gimnospermas (maderas blandas), está formada mayoritariamente por unidades de tipo guayacilo, mientras que la lignina de las angiospermas leñosas (maderas duras) está formada por unidades guayacilo y siringilo. Esta alta proporción de unidades derivadas del alcohol sinapílico en las maderas duras determina la estructura y características de este tipo de lignina, ya que la presencia de los dos grupos metoxilo en posiciones 3 y 5 del anillo aromático reduce la formación de enlaces tipo eter y sobre todo los enlaces C-C, lo que se traduce en una reducción del grado de polimerización y en un menor grado de condensación. De esta forma las maderas duras son más fáciles de deslignificar que las maderas blandas.

1.2.2.3. Otras sustancias.

No forman parte de la estructura de la pared vegetal, y la mayoría son solubles en solventes neutros.

Los componentes solubles en solventes neutros, representan entre el 4-10% del peso seco de la madera. Hay una gran variedad de compuestos orgánicos, grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. Actúan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o parte de los mecanismos de defensa contra los ataques microbianos. Contribuyen al color, olor y resistencia al marchitamiento.

Las cenizas, son residuos inorgánicos que permanecen después de quemar la biomasa a altas temperaturas, suelen ser menos del 2% de peso seco de la madera.

1.3. PROCESOS DE OBTENCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.

La biomasa lignocelulósica presenta una estructura compleja, compuesta de varias fracciones que deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente de estos materiales a etanol. La fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa, compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces β (1-4) que, a su vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad. Esta estructura cristalina es la que dificulta la hidrólisis de la celulosa para la obtención de azúcares fermentables. La hidrólisis de la celulosa puede realizarse mediante procesos ácidos o enzimáticos.

1.3.1. Hidrólisis ácida.

La hidrólisis ácida consiste en un proceso químico que, mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. La hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósicos es un proceso conocido desde 1819 (Larsson, 2000), que alcanzó su mayor desarrollo durante las dos Guerras Mundiales, períodos en los que la escasez de petróleo hizo que se empleara masivamente la madera para la producción de etanol. Durante este período se desarrollaron numerosos procesos (Scholler, Madison, Bergius) cayendo posteriormente en desuso por razones económicas. Este tipo de hidrólisis puede realizarse empleando diferentes clases de ácidos como el ácido

sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico (Galbe y Zacchi, 2002). Sin embargo, sólo los ácidos clorhídrico y sulfúrico han sido empleados a escala industrial.

Los procesos industriales de hidrólisis ácida pueden agruparse en dos tipos: los que emplean ácidos concentrados y los que utilizan ácidos diluidos.

Los procesos que implican ácidos concentrados operan a baja temperatura, pudiendo obtenerse altos rendimientos de hidrólisis (superiores al 90% de la glucosa potencial). A pesar de esto, la gran cantidad de ácido empleado en la impregnación del material a tratar y lo costoso de su recuperación, unido a los efectos corrosivos de los ácidos concentrados que obliga a altas inversiones en los equipamientos, hacen que el proceso no sea rentable. Además, tiene el problema asociado de que es necesario una costosa etapa de neutralización antes de la fermentación (Keller, 1996). Sin embargo, los procesos que utilizan ácidos concentrados han adquirido un renovado interés debido a nuevos métodos que mejoran la economía de recuperación de los ácidos desarrollados por varias compañías como Masada Resource Group (Birmingham, Ala), Arkenol (Mission Viejo, California) y APACE (Australia) (Katzen, 1997).

Los procesos que emplean ácidos diluidos tienen su principal ventaja en el relativamente bajo consumo de ácidos. Sin embargo, se requieren relativamente altas temperaturas para alcanzar rendimientos aceptables de conversión de celulosa a glucosa. El máximo rendimiento en glucosa se consigue a altas temperaturas y tiempos de residencia cortos. Este tipo de procesos operan a una temperatura de 240 °C, una concentración de ácido de 1 % (p/v) y un tiempo de reacción de 6-12 segundos. Aún así, bajo estas condiciones los mejores rendimientos alcanzados están en torno al 60% del rendimiento teórico (Wyman, 1996). Las temperaturas que se emplean en estos procesos originan, por un lado, una mayor corrosión de los equipos empleados y, por otro lado, aumenta la tasa de degradación de los azúcares hemicelulósicos los cuales pueden afectar a la posterior etapa de fermentación.

Con objeto de disminuir la degradación de los azúcares originados en la hidrólisis, se puede utilizar un proceso en dos etapas. En la primera etapa y bajo condiciones más suaves, se produce la hidrólisis de la hemicelulosa, que por su estructura resulta más fácilmente hidrolizable. Esto permite que, durante la segunda

etapa, y bajo unas condiciones más severas, se produzca la hidrólisis de la celulosa, evitándose la degradación de los azúcares hemicelulósicos producidos en la primera etapa. Mediante los procesos en dos etapas es posible conseguir hasta un 98% de recuperación de los azúcares hemicelulósicos a partir de maderas blandas. Sin embargo, los rendimientos en glucosa no superan el 50% (Nguyen y col., 1999). En Estados Unidos, BCI comercializa la tecnología de hidrólisis en dos etapas con ácido diluido. En la primera etapa se produce la hidrólisis de la hemicelulosa en unas condiciones suaves (170-190 °C) y, en la segunda etapa, se hidroliza la celulosa en unas condiciones más severas (200-230 °C) (Wyman, 1999). Las altas temperaturas que se requieren para la hidrólisis de la celulosa hacen que se originen productos de degradación de los azúcares, que además de disminuir el rendimiento del proceso, pueden afectar a la posterior etapa de fermentación.

En Suecia, la Bioalcohol Fuel Foundation junto con St. Lawrence de Canada y Tennessee Valley Authority de Estados Unidos, desarrollaron un proceso en dos etapas con ácido diluido, conocido como el proceso CASH (O'Boyle y col., 1991). Se basa en una primera hidrólisis a temperatura moderada impregnando la madera con dióxido de azufre, seguido de una segunda hidrólisis utilizando ácido hidroclorehídrico diluido (Galbe y Zachi, 2002).

1.3.2. Hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, que son en realidad, una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa. Las plantas superiores, algunos invertebrados y principalmente microorganismos (hongos y bacterias) son productores de este tipo de enzimas. Las celulasas de origen fúngico, principalmente de los géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium*, han sido las más estudiadas por la capacidad de estos microorganismos de producirlas en grandes cantidades y de forma extracelular, facilitando su separación en los medios de cultivo.

El complejo celulolítico de hongos está formado por distintos componentes que actúan sinérgicamente. Este sistema enzimático tiene tres tipos diferentes de actividad

cuya denominación y mecanismo de acción son los siguientes (Montenecourt y Eveleigh, 1979):

1. Endo- β -glucanasas
 β - (1,4)-glucanglucanohidrolasa (EC 3.2.1.4.)
2. Exo- β -glucanasas.
 - a. β -(1,4)-glucancelobiohidrolasas (EC 3.2.1.91.)
Celobiohidrolasa (CBH)
 - b. β -(1,4)-glucanglucanohidrolasas (EC 3.2.1.74.)
Glucohidrolasa (GGH)
3. β - glucosidasa (EC 3.2.1.21.).

La endoglucanasa actúa al azar en el interior del polímero, hidrolizando enlaces β -(1,4) y generando nuevos finales de cadena no reductores. Puede actuar sobre celodextrinas y derivados sustituidos como carboximetilcelulosa (CMC) e hidroximetilcelulosa (HMC), así como celulosa amorfa, pero no actúa ni sobre celulosa cristalina ni sobre celobiosa. Supone, aproximadamente un 20% del total de proteínas del complejo.

La celobiohidrolasa actúa sobre los extremos no reductores de la cadena generados por la endoglucanasa, liberando moléculas de celobiosa. Este enzima tiene actividad sobre celulosa cristalina y amorfa, y sobre celodextrinas, pero no actúa sobre derivados sustituidos ni sobre celobiosa. Este enzima constituye del 50-80% del complejo celulolítico.

La glucohidrolasa se encuentra en pequeña proporción y actúa sobre los extremos no reductores liberando unidades de glucosa. Tiene actividad sobre celulosa amorfa, celo-oligosacáridos y CMC.

La β -glucosidasa hidroliza celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño, y es absolutamente necesaria para evitar la fuerte inhibición que sobre las endo y exoglucanasas produciría la celobiosa si se acumulara en el medio de reacción.

Un esquema del mecanismo de acción de las celulasas se representa en la figura 1.8.

Si se añaden celulasas al material lignocelulósico la hidrólisis de la celulosa es demasiado lenta, debido a la asociación de esta con la lignina que constituye una barrera física a la penetración de los enzimas. Otros factores como la porosidad (área superficial accesible), la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización y el contenido en lignina y hemicelulosa dificultan la accesibilidad de las celulasas reduciendo la eficiencia de la hidrólisis. Todos estos factores hacen necesaria una etapa de pretratamiento, previa a la hidrólisis de la celulosa, que altere la estructura del material lignocelulósico facilitando la acción de los enzimas.

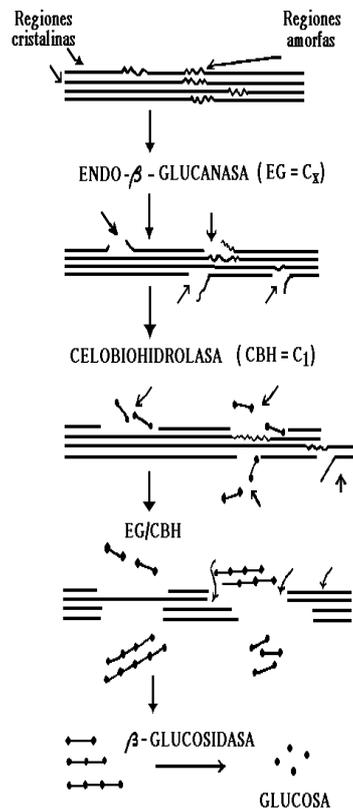


Figura 1.8.- Mecanismo de acción de las celulasas

1.3.2.1. Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.

Los objetivos fundamentales del pretratamiento van encaminados a: reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo celulosa-lignina, aumentar el área superficial del material y disminuir la presencia de aquellas sustancias que dificulten la hidrólisis. Además, un pretratamiento eficaz debe reunir otras características como: bajo consumo energético, bajos costes de inversión, utilización de reactivos baratos y fácilmente recuperables y debe ser aplicable a diversos sustratos.

Por su naturaleza, los pretratamientos se pueden dividir en cuatro grupos: físicos, físico-químicos, químicos y biológicos (Sun y Cheng, 2002).

1.3.2.1.1. Pretratamientos físicos.

Trituración mecánica

La trituración de los materiales lignocelulósicos mediante una combinación de astillado y molienda, reduce la cristalinidad de la celulosa, aumenta la superficie específica y la densidad aparente, facilitando la hidrólisis posterior. Existen diferentes tipos de molinos (molino de bolas, martillos, cuchillas, rodillos). Los molinos de bolas vibratorias se han mostrado más efectivos que los molinos de bolas ordinarios en la reducción de la cristalinidad y aumento de digestibilidad de astillas de abeto y chopo (Millet y col., 1976). Este tipo de pretratamiento tiene el inconveniente de su alto consumo energético que depende, tanto del tamaño final de partícula al que se muele el material, como del tipo de material a pretratar (Cadoche y López, 1989).

Radiación de alta energía

Este tipo de irradiación rompe los enlaces β -glucosídicos y los enlaces entre la celulosa y la lignina (Khan y col., 1986). Sin embargo, este tipo de pretratamiento es de difícil aplicación técnica debido a la baja densidad de los materiales a tratar y las altas dosis requeridas que obligan al diseño de instalaciones muy complejas y de alto coste.

1.3.2.1.2. Pretratamientos físico-químicos.

Explosión por vapor

El material lignocelulósico se somete a temperaturas entre 190-230 °C, mediante la inyección directa de vapor saturado, durante un intervalo de tiempo entre 1 y 10 minutos. Tras el tiempo de tratamiento, se somete el material a una rápida despresurización. El efecto del pretratamiento sobre la biomasa es una combinación de alteraciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras) y químicas (despolimerización y rotura de enlaces). El efecto mecánico está causado por la rápida despresurización que provoca una evaporación del agua interna, creando unas fuerzas de cizalladura que producen la separación de las fibras, principalmente de las regiones más débiles (celulosa amorfa). El efecto químico se debe a la hidrólisis de los restos acetilos de las hemicelulosas produciendo ácido acético, que a la temperatura del proceso, cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa (autohidrólisis). Durante el tratamiento se destruyen parcialmente los enlaces lignina-carbohidrato. Como resultado, se obtiene un producto fibroso cuya celulosa es más accesible a la hidrólisis enzimática. La hemicelulosa se despolimeriza en mayor o menor medida dependiendo de las condiciones del tratamiento, siendo fácilmente recuperada por lavado. La lignina, prácticamente sin alterar puede ser extraída y utilizada con diferentes fines.

Las variables más importantes en el pretratamiento de explosión por vapor son la temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula y la humedad (Duff y Murray, 1996).

La explosión por vapor ha sido reconocida como un método muy efectivo para el pretratamiento de maderas duras y residuos agrícolas. Este pretratamiento se ha aplicado a diferentes materiales como chopo (Ramos y col., 1992; Excoffier y col., 1991; Ballesteros y col., 1998), eucalipto (Ramos y col., 1992), pino (San Martín y col., 1995; Ballesteros y col., 2000; Negro y col., 2003a), paja de arroz (Moniruzzaman, 1995), residuos herbáceos (Ballesteros y col., 2002), residuos oleícolas (Fernández-Bolaños y col., 1998, 2001), bagazo (Martín y col., 2002) etc. Sin embargo, este pretratamiento se ha mostrado menos efectivo con las maderas blandas, debido a su estructura mucho más rígida y su mayor contenido en lignina. Además, el contenido de grupos acetilados es

mucho menor que en las maderas duras, con lo que el proceso de autohidrólisis no ocurre en la misma medida. En el caso de las maderas blandas es deseable añadir un catalizador ácido. El ácido sulfúrico ha sido el más estudiado por su coste y efectividad (Torget y col., 1990, 1991, 1996; Nguyen y col., 1998, 1999, 2000; Tenborg y col., 1998). El SO₂ también ha sido empleado en numerosos trabajos (Clark y Mackie, 1987; Clark y col., 1989; Ramos y col., 1992; Stenberg y col., 1998, 2000a). Tiene la ventaja de no ser tan corrosivo como el sulfúrico y es fácil y rápido de introducir en el material. Su principal desventaja es su alta toxicidad. Una diferencia muy importante que se produce al utilizar en el pretratamiento uno u otro catalizador es la diferente fermentabilidad de las fracciones obtenidas tras el pretratamiento. Así, el material obtenido tras el tratamiento con sulfúrico muestra una baja fermentabilidad, debido a las altas concentraciones de productos tóxicos que se forman.

Entre las ventajas del pretratamiento con explosión por vapor debe citarse que el tamaño de partícula del material requerido (15-30 mm) es considerablemente superior a los utilizados en otros pretratamientos, reduciéndose costes en la molienda (Ballesteros, 2001). Además, no emplea catalizadores ácidos (en el caso de las maderas duras) con lo que se reducen los efectos medioambientales.

Entre sus limitaciones se encuentran, la destrucción de una parte de los xilanos de las hemicelulosas, la incompleta rotura de la matriz lignina-carbohidratos y la generación de compuestos que pueden resultar tóxicos para los microorganismos empleados en el proceso de fermentación tras la hidrólisis enzimática. Debido a la formación de estos compuestos, el material pretratado debe ser lavado con agua para eliminar estos productos inhibitorios (McMillan, 1994).

La identificación de los compuestos de degradación de las distintas fracciones que forman la biomasa lignocelulósica originados durante la explosión por vapor, así como el aprovechamiento de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento con objeto de minimizar las necesidades de agua y reducir la cantidad de agua residual generada en el proceso, son parte de los objetivos de este trabajo.

Para maximizar la recuperación de azúcares en el pretratamiento de explosión por vapor se requieren diferentes condiciones de pretratamiento para la recuperación de

los azúcares celulósicos y hemicelulósicos. Algunos autores (Stenberg y col., 1998 a y b; Tenborg y col., 1998) han sugerido un pretratamiento en dos etapas empleando sulfúrico en condiciones suaves en una primera etapa, seguido de una impregnación con SO₂ bajo unas condiciones más severas. De esta forma es posible conseguir un incremento de un 7% en el rendimiento global de azúcares después de la hidrólisis enzimática comparándolo con los procesos en una etapa. La explosión por vapor en dos etapas tiene una serie de ventajas como son, mayor rendimiento en etanol, mejor aprovechamiento de la materia prima y menor consumo de enzimas en la fase de hidrólisis. Sin embargo, es necesario una evaluación económica para determinar si estas ventajas justifican una explosión a vapor adicional (Galbe y Zacchi, 2002).

Proceso de explosión por vapor con amoníaco (AFEX).

Es un proceso similar a la explosión por vapor en el que el material es impregnado con amoníaco líquido (1-2 kg amoníaco/kg biomasa seca) a una temperatura en torno a los 90 °C, y un tiempo aproximado de 30 minutos. Transcurrido este tiempo el material es sometido a una rápida descompresión (Sun y Cheng, 2002).

Este tipo de pretratamiento ha sido empleado con diferentes tipos de sustratos como alfalfa, paja de trigo (Mes-Hartree y col., 1988), astillas de chopo (Tengerdy Nagy, 1988), bagazo (Holtzapple y col., 1991), residuos sólidos urbanos, papel residual (Holtzapple y col., 1992) y paja de cebada y arroz (Vlasenko y col., 1997). La diferencia con la explosión por vapor y otros tipos de pretratamiento ácidos, es que en este proceso no se solubiliza la hemicelulosa. La composición del material sometido a un proceso AFEX es prácticamente la misma que la del material original. Utilizando materiales con bajo contenido en lignina (hasta un 15%), se han obtenido rendimientos de hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa del 90%, después del pretratamiento. Sin embargo, este proceso no es tan efectivo con biomásas con un mayor contenido en lignina. En estos casos los rendimientos de hidrólisis posteriores han sido inferiores al 50% (McMillan, 1994).

Como ventajas del proceso pueden citarse que no se producen inhibidores que puedan afectar a las posteriores etapas del proceso de producción de etanol y no requiere pequeños tamaños de partícula para aumentar su eficiencia. Con objeto de

reducir costes y como medida protectora del medioambiente, el amoniaco debe ser reciclado después del pretratamiento.

Explosión con CO₂.

Es un proceso similar a la explosión por vapor o al proceso AFEX. La explosión con dióxido de carbono se basa en el hecho que el CO₂ forma ácido carbónico, lo que aumenta la tasa de hidrólisis. Este proceso ha sido empleado en el pretratamiento de alfalfa, obteniendo un rendimiento de hidrólisis del 75% a las 24 horas (Dale y Moreira, 1982). Aunque los rendimientos obtenidos son relativamente bajos comparados con la explosión por vapor y el proceso AFEX los estudios realizados con bagazo de caña y papel reciclado, demostraron que este proceso es más barato que la explosión con amoniaco y no origina los compuestos inhibitorios que se originan durante la explosión por vapor (Zheng y col., 1998).

1.3.2.1.3. Pretratamientos químicos.

El objetivo de estos pretratamientos es solubilizar la fracción de lignina y modificar la estructura de la celulosa facilitando la acción de las enzimas. Entre los pretratamientos químicos se encuentran los tratamientos con agua caliente líquida, oxidación húmeda, ozono, álcalis, ácidos, organosolventes y agentes oxidantes.

Tratamiento con agua caliente líquida

Consiste en someter a la biomasa a la acción de agua caliente en torno a una temperatura de 220 °C durante un tiempo determinado (Van Walsun y col., 1996). El reactor debe estar presurizado para mantener el agua en estado líquido. Durante este pretratamiento se recuperan la mayoría de los pentosanos (Negro y col., 2003b) y se obtiene un hidrolizado que no muestra inhibición en el posterior proceso de fermentación (Laser y col., 2002).

Oxidación húmeda

El material lignocelulósico, se somete a la acción de agua a elevadas temperaturas, en presencia de oxígeno (Schmidt y Thomsen, 1998). Este tratamiento tiene la ventaja de no generar prácticamente productos de degradación como el furfural e HMF (Klinke y col., 2002; Varga y col., 2003).

Tratamientos con ozono

El ozono ha sido utilizado para degradar la lignina y la hemicelulosa de numerosos materiales lignocelulósicos como paja de trigo, bagazo, pino, algodón y serrín de chopo (Vidal y Molinier, 1988). La degradación se limita fundamentalmente a la lignina ya que la hemicelulosa es atacada ligeramente y la celulosa apenas si se ve afectada. El tratamiento con ozono tiene una serie de ventajas como la eliminación efectiva de la lignina, no origina productos tóxicos que afecten a los procesos posteriores y la reacción se produce a una temperatura ambiente y presión atmosférica. Sin embargo, la gran cantidad de ozono empleado hace de este proceso un método caro.

Hidrólisis con álcalis.

El tratamiento con NaOH diluida produce un hinchamiento de la biomasa, lo que conduce a un aumento del área superficial interna, un descenso de la cristalinidad, una separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos y una rotura de la estructura de la lignina. El mecanismo de la hidrólisis alcalina de la biomasa parece estar basada en la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares que unen los xilanos de la hemicelulosa y otros componentes, como por ejemplo la lignina, u otros componentes de la hemicelulosa (Sun y Cheng, 2002). La efectividad de este pretratamiento depende del contenido de lignina del material a tratar. Así, por ejemplo, se ha conseguido aumentar la digestibilidad de sustratos como paja con un contenido de lignina del 18% (Bjerre y col., 1996) y de maderas duras, pero no de maderas blandas con un contenido de lignina superior al 26% (Millet y col., 1976).

Tratamiento con organosolventes.

Se emplea una mezcla de solventes orgánicos o acuosos junto con un catalizador ácido (clorhídrico o sulfúrico) para romper los enlaces internos de la lignina y la hemicelulosa. Entre los solventes orgánicos empleados en el proceso se encuentran: metanol, etanol, acetona y etilenglicol (Thring y col., 1990). También pueden emplearse ácidos orgánicos como el ácido oxálico, acetilsalicílico y salicílico. Con objeto de reducir costes y de evitar problemas en la posterior etapa de fermentación se deben reciclar los solventes.

1.3.2.1.4. Pretratamientos biológicos.

En este tratamiento el material lignocelulósico se somete a la acción de determinados microorganismos, como los hongos de la podredumbre blanca, marrón o blanda. El objetivo es degradar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático. Los hongos de la podredumbre marrón atacan principalmente la celulosa, mientras que los de la podredumbre blanca y marrón atacan la celulosa y la lignina. Los de la podredumbre blanca se han mostrado como los más efectivos en el tratamiento biológico de los materiales lignocelulósicos (Fan y col., 1987). Las ventajas del pretratamiento biológico son el bajo requerimiento energético y las suaves condiciones ambientales en la que se produce el proceso. Como inconveniente debe citarse que la tasa de hidrólisis es demasiado lenta. Entre todos los hongos estudiados destaca el de la podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium*, que durante el metabolismo secundario en respuesta a limitaciones de carbono y nitrógeno, produce enzimas como la lignina peroxidasa y la peroxidasa dependiente de magnesio que degradan la lignina (Boominathan y Reddy, 1992).

1.3.3. Procesos de conversión de la celulosa en etanol.

Los procesos conversión de celulosa en etanol pueden dividirse en dos grandes grupos (figura 1.9):

Procesos en dos etapas

Procesos en una etapa

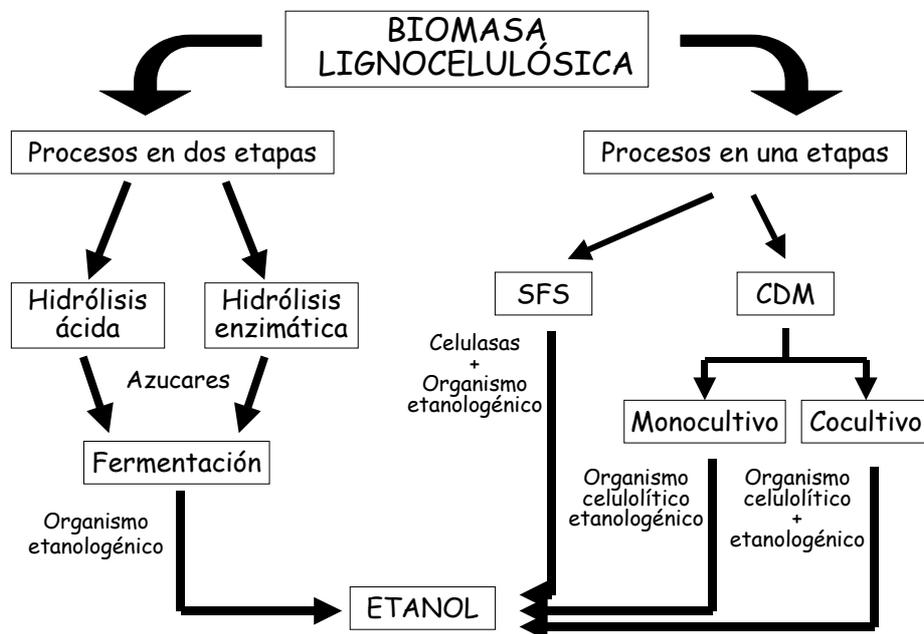


Figura 1.9.- Vías de producción de etanol.

1.3.3.1. Procesos en dos etapas.

En los procesos en dos etapas la hidrólisis (ácida o enzimática) y fermentación se realizan por separado (HFS).

En los procesos que utilizan la vía enzimática, una parte de la biomasa pretratada se utiliza como sustrato para la obtención de los enzimas. Una vez producidos los enzimas del complejo celulolítico se extraen del medio y se añaden al resto del material

pretratado en un reactor de hidrólisis. La glucosa obtenida en este reactor pasa a otro, donde se realiza la fermentación mediante la acción de los microorganismos. La ventaja de este proceso es que, al estar separadas la etapa de hidrólisis y de fermentación, ambas pueden realizarse en sus condiciones óptimas. La etapa de hidrólisis se realiza a la temperatura óptima del enzima (en torno a los 50 °C), mientras que la de fermentación se realiza a la temperatura óptima del microorganismo productor de etanol. La principal desventaja del proceso de HFS es que, la glucosa y celobiosa liberadas durante la etapa de hidrólisis enzimática, inhiben las enzimas implicadas en el proceso, obteniéndose bajos rendimientos.

Si en lugar de enzimas como catalizadores de la hidrólisis se emplea una hidrólisis ácida es necesario neutralizar los hidrolizados antes de la fermentación. Además, la generación de productos de degradación durante la hidrólisis, puede afectar al microorganismo encargado de realizar la fermentación.

1.3.3.2. Procesos en una etapa.

En los procesos en una etapa la hidrólisis y fermentación se realizan en el mismo reactor. La principal ventaja de estos procesos, es que se reduce la inhibición por producto final que se produce en la operación en dos etapas, ya que la presencia de microorganismos fermentadores, junto con los enzimas celulolíticos reducen la acumulación de azúcar en el fermentador. Por ello se consiguen mayores tasas de hidrólisis que en el proceso de hidrólisis y fermentación por separado, necesitándose una menor cantidad de enzimas y obteniéndose como resultado un aumento de los rendimientos de etanol (Ballesteros, 2000). Otra ventaja es que se realiza en un mismo reactor con lo cual se reducen los costes de inversión. La principal desventaja de este proceso es las diferentes condiciones óptimas de pH y temperatura de la etapa de hidrólisis y fermentación. Por ello es necesario realizar el proceso en unas condiciones que sean compatibles con ambas etapas. Puesto que la temperatura óptima de hidrólisis está próxima a los 50 °C y que las levaduras productoras de etanol convencionales trabajan en torno a los 37 °C, es aconsejable la utilización de microorganismos termotolerantes cuando se quieran realizar procesos de obtención de etanol en una sola etapa.

Los procesos en una etapa se pueden dividir en dos grupos: procesos en los que el mismo microorganismo produce los enzimas y realiza la fermentación, proceso conocido como conversión directa por el microorganismo (CDM); y procesos sacarificación y fermentación simultánea (SFS), en los que se emplean celulasas provenientes de un microorganismo celulolítico (normalmente un hongo), junto con la presencia de un microorganismo productor de etanol.

En los procesos CDM se pueden emplear monocultivos, en los que un único microorganismo hidroliza y fermenta los azúcares a etanol. Se han empleado bacterias del género *Clostridium* (Zeikus 1980; Ng y col. 1981, 1982; Ahring y col. 1996; Lynd 1996). Los rendimientos en etanol son bajos debido a la formación de subproductos, a la baja tolerancia del microorganismo al etanol y al crecimiento limitado del microorganismo en los hidrolizados debido a la existencia de productos tóxicos. También pueden emplearse cocultivos, en los que se utilizan dos microorganismos. Uno de ellos realiza la hidrólisis de la celulosa (*Clostridium thermocellum*) y una bacteria etanológica fermenta los azúcares producidos (Zeikus y col. 1983).

En la actualidad el proceso de SFS es el que ofrece las mejores expectativas. Las celulasas provienen de hongos celulolítico, normalmente *Trichoderma reesei*, y el microorganismo fermentador es una levadura.

1.3.4. Utilización de levaduras termotolerantes en los procesos de obtención de etanol.

La producción de etanol es un proceso exergónico. En un proceso industrial de producción de etanol, el empleo de levaduras termotolerantes evitaría problemas asociados con el sobrecalentamiento de los fermentadores y evitaría el enfriamiento con la consiguiente reducción de los costes de producción (Gera y col., 1997), y las paradas debidas a este sobrecalentamiento que a menudo se producen en países donde la temperatura ambiente es alta y el enfriamiento de los fermentadores no es posible (Kiran Sree y col., 2000). Otras ventajas de la utilización de altas temperaturas en el proceso de producción de etanol son el aumento de la productividad, la reducción de los riesgos de contaminación y una mayor facilidad en la recuperación del producto. Además de las ventajas mencionadas, la utilización de levaduras termotolerantes en un

proceso de producción de etanol sería muy ventajosa en un proceso de SFS ya que esto permitiría trabajar cerca de la temperatura óptima de la enzima. Entre las levaduras más citadas en la bibliografía, como capaces de realizar la fermentación alcohólica por encima de los 40 °C, se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Candida* (Ghose y col., 1984), *Saccharomyces* (Hacking y col., 1984; Kiran Sree y col., 2000) y *Kluyveromyces* (Hughes y col., 1984; Banat y col., 1992; Ballesteros y col., 1991; Farrel y col., 1998; Banat y col., 1998).

K. marxianus ha sido una de las levaduras más utilizadas en los procesos de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS), (Barron y col. 1995; Nilsson y col. 1995; Boyle y col. 1997; Lark, y col 1997), utilizando diferentes sustratos como madera de chopo (Ballesteros y col., 1998), abeto (Bollók y col., 2000) residuos de la industria olivarera y residuos de papeleras (Ballesteros y col., 2001; 2002).

1.4. COMPUESTOS TÓXICOS GENERADOS EN LOS PRETRATAMIENTOS.

1.4.1. Tipos y origen.

Durante el pretratamiento del material lignocelulósico no sólo se obtienen los azúcares provenientes de la hidrólisis y solubilización de la celulosa y hemicelulosa sino que, debido a las altas temperaturas y condiciones ácidas en las que se desarrollan estos pretratamientos, se originan una serie de compuestos que pueden actuar como inhibidores potenciales de la fermentación. La naturaleza y concentración de estos compuestos depende del tipo de materia prima (maderas duras, blandas o herbáceas), del pretratamiento utilizado, de las condiciones del proceso (temperatura y tiempo) y de la utilización o no de catalizadores ácidos (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996).

Los productos de degradación, que son potenciales inhibidores de la fermentación, pueden dividirse en tres grupos (Larsson, 2000): derivados del furano, ácidos alifáticos de bajo peso molecular y derivados fenólicos.

Como consecuencia de las altas temperaturas empleadas en los pretratamientos, los azúcares originados en la hidrólisis, principalmente de la hemicelulosa, se degradan originando dos compuestos derivados del furano: el furfural, formado a partir de la

degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroxiacetilfurfural (HMF), formado como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). A su vez, estos dos compuestos se pueden degradar a otros productos. El furfural puede degradarse a ácido fórmico o bien polimerizarse (Dunlop, 1948). El HMF origina cantidades equimoleculares de ácidos fórmico y levulínico (Ulbricht y col., 1984). Además de estos dos ácidos alifáticos (fórmico y levulínico), se origina ácido acético procedente de la hidrólisis de los restos acetilos de la hemicelulosa. La composición de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento depende del tipo de madera del que provenga. Los hidrolizados procedentes del pretratamiento de maderas duras tienen una mayor concentración de furfural y ácido acético que el hidrolizado obtenidos en el pretratamiento de maderas blandas, debido al mayor contenido en pentosas y restos acetilados de las hemicelulosas de las maderas duras.

Durante el pretratamiento, una parte de la lignina también se degrada originando una gran variedad de compuestos fenólicos. Se trata de un grupo de compuestos muy heterogéneo que se pueden encontrar en forma de monómeros, dímeros y polímeros con una gran variedad de sustituyentes (Larsson, 2000). Entre ellos, se encuentran ácidos, aldehídos y alcoholes aromáticos. Los fenoles originados en el pretratamiento varían según el tipo de biomasa, ya que existe una gran diferenciación de la lignina atendiendo al grupo taxonómico al que pertenezca la especie vegetal. Un derivado fenólico muy abundante en los hidrolizados de maderas duras es el ácido 4-hidroxibenzoico. Se origina por la rotura de los enlaces éster que lo unen a los grupos hidroxilos de los alcoholes cinámicos que forman la lignina (Sjöström, 1993). Otros derivados fenólicos abundantes en los hidrolizados de maderas duras son el siringaldehído y el ácido sirínico, procedentes de la degradación de las unidades siringilpropano de la lignina (Tran y Chambers, 1985; Ando y col., 1986; Jönsson y col., 1998). El 4-hidroxibenzaldehído y los ácidos gentísico, salicílico y protocatéquico han sido identificados también en hidrolizados procedentes de maderas duras (Jönsson y col., 1998).

Otros derivados fenólicos identificados tanto en maderas blandas como el pino (Clark y Mackie, 1984) y abeto (Nilvebrant y col., 2000), como en maderas duras como el chopo (Ando y col. 1986) roble (Tran y Chambers, 1985) y sauce (Jönsson y col. 1998), han sido la vainillina y el ácido vainílico originados como consecuencia de la

degradación de las unidades guayacilpropano de la lignina.. Además de los compuestos anteriormente citados, otros derivados fenólicos detectados en el hidrolizado de diferentes tipos de maderas han sido el catecol (Buchert y col., 1990; Jönssön y col., 1998), guayacol (Buchert y col., 1990), hidroquinona, (Palmqvist, 1998), aldehído coniferílico y ácido homovainílico (Larsson y col., 1999).

Un tipo de compuestos (no incluidos en los tres grupos citados anteriormente) que se liberaran durante el pretratamiento son los extractivos. Entre ellos se encuentran diferentes tipos de resinas (ácidos grasos, terpenoides, esteroides y ceras) y compuestos fenólicos (flavonoides, taninos, etc.) (Ekman y Holmbom, 2000). Estos compuestos, a pesar de su baja concentración, también pueden actuar como inhibidores de los microorganismos empleados en la fermentación de los hidrolizados procedentes de materiales lignocelulósicos (Larsson, 2000).

1.4.2. Efectos de los compuestos tóxicos sobre los microorganismos.

1.4.2.1. Furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

Entre los efectos producidos por el furfural sobre los microorganismos citados en la bibliografía se encuentran: reducción de la tasa específica de crecimiento (Azhar y col., 1981; Navarro, 1994); disminución de la productividad volumétrica de etanol (Navarro, 1994; Larsson y col., 1999b); descenso de la productividad específica de etanol (Palmqvist y col., 1999b; Taherzadeh y col., 2000b) y disminución de la producción de biomasa (Palmqvist y col., 1999b). Los efectos producidos por el HMF aunque menores ya que la toxicidad mostrada por este compuesto sobre los microorganismos es menor que la del furfural son los mismos (Taherzadeh y col., 2000 a; Larsson, 2000).

El efecto tóxico ocasionados por los furanos parece deberse a que, al ser aldehídos, son compuestos químicamente reactivos que pueden formar compuestos con determinadas moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Singh y Khan, 1995), o bien producir daños sobre la membrana plasmática (Zaldivar y col., 1999). Además, el furfural produce la inhibición de enzimas glicolíticos y fermentativos

(Banerjee y col., 1981; Zaldivar y col., 1999; Modig y col., 2002). La inhibición que el furfural ejerce sobre la alcohol deshidrogenasa podría explicar la excreción de acetaldehído observada durante las primeras horas de la fermentación en presencia de este derivado del furano (Palmqvist y col., 1998).

El furfural y el HMF son metabolizados tanto por bacterias como levaduras (Villa, 1992; Delgenes y col., 1996; Palmqvist y col., 1999b; Taherzadeh y col., 2000 a,b; Larsson y col., 2000; Gutiérrez y col., 2002). En condiciones de anaerobiosis, como consecuencia del metabolismo del furfural, se produce principalmente alcohol fufurílico y, en menor concentración, ácido furoico. La hipótesis de que la reducción de furfural a alcohol fufurílico está catalizada por una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH está prácticamente aceptada (Diaz de Villegas y col., 1992; Taherzadeh y col., 2000b). En condiciones de anaerobiosis, durante la fermentación se produce glicerol para regenerar el exceso de NADH producido en la biosíntesis y mantener el balance redox intracelular (Albers y col., 1996). En fermentaciones en presencia de furfural no se observa producción de glicerol, lo que sugiere que la reducción del furfural a alcohol fufurílico oxida el NADH en condiciones de anaerobiosis (Palmqvist y col., 1998). Sin embargo, esta hipótesis puede ser refutada por algunos argumentos. La especificidad de una enzima por un sustrato viene dada por la forma y tamaño del centro activo. El centro activo de la alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae* es demasiado pequeño para aceptar moléculas mayores que el acetaldehído. Además, la mayoría de experimentos en relación con la especificidad de este enzima se han realizado con preparaciones comerciales, que por un lado son una mezcla de isoenzimas y por otro lado difieren en algunos aminoácidos con la alcohol deshidrogenasa clonada de *S. cerevisiae*, lo cual puede influir en la especificidad del enzima por el sustrato (Reid y Fewson, 1994).

1.4.2.2. Ácidos alifáticos.

Aunque está bien documentado en la bibliografía que los ácidos alifáticos débiles producen descenso del rendimiento en etanol (Pampulha y Loureiro-Dias, 1989) y disminución de la producción de biomasa (Taherzadeh y col., 1997a), el mecanismo por el que se produce la inhibición no está completamente aclarado.

Uno de los mecanismos propuesto para explicar el efecto inhibitorio de los ácidos alifáticos es la teoría del desacoplamiento. Según esta, el efecto tóxico depende del pKa de los ácidos y del pH del medio. Únicamente la forma no disociada de los ácidos penetra en la célula por difusión (Verduyn y col., 1992), donde, debido al mayor pH intracelular se disocia, provocando un descenso del pH (Pampulha y Loureiro-Dias, 1989) que debe ser compensado por una ATPasa de membrana que bombea protones al exterior a costa de la hidrólisis de ATP. La menor cantidad de ATP disponible para la formación de biomasa celular, explicaría la disminución del crecimiento observada cuando hay en el medio ácidos alifáticos. Cuando la concentración de ácido es suficientemente alta, se supera la capacidad de bombeo de protones, lo que origina la acidificación del citoplasma y la posterior muerte celular (Imai y Ohono, 1995).

Otro mecanismo propuesto, para explicar este efecto inhibitorio de los ácidos es la acumulación intracelular de aniones (Russel, 1992). Según esta teoría, mientras que los protones son excretados al exterior los aniones son capturados en la célula produciéndose una acumulación de los mismos en el interior de esta. La inhibición podría estar relacionada con la toxicidad del anión.

Aunque no se conoce con certeza el mecanismo de inhibición de los ácidos alifáticos, el efecto tóxico mostrado por estos compuestos puede deberse tanto al desacoplamiento como al efecto inhibitorio de la acumulación de aniones. (Palmqvist y col., 1998). Probablemente, el efecto de los ácidos alifáticos de cadena corta también se deba a un efecto directo de estos compuestos sobre la integridad de la membrana (Heipieper y col., 1994). La inserción de las cadenas alifáticas en la membrana puede alterar su estructura e hidrofobicidad, produciendo un aumento de la permeabilidad de la misma y afectar a su función de barrera selectiva.

1.4.2.3. Compuestos fenólicos.

De los inhibidores identificados en los hidrolizados de los materiales lignocelulósicos, los compuestos aromáticos de bajo peso molecular son los que se han mostrado como los más tóxicos para los microorganismos (Tran y Chambers 1986; Buchert y col., 1989; Palmqvist, 1998; Zaldivar y col., 2001). Aunque, el mecanismo de inhibición no se conoce completamente, se ha estudiado el efecto de los derivados

fenólicos sobre procariotas como *Klebsiella pneumoniae* (Tran y Chambers, 1986; Nishikawa y col., 1988) y *Escherichia coli* (Zaldivar y col., 1999, Zaldivar y Ingram, 1999). El efecto tóxico de los aldehídos aromáticos puede deberse a una interacción con determinadas zonas hidrofóbicas de las células y causar pérdida de la integridad de la membrana afectando a su capacidad de actuar como una barrera selectiva (Heipieper y col. 1994). Zaldivar y col. (2000) demostraron que el efecto tóxico de los alcoholes aromáticos se debía al daño ocasionado por estos alcoholes sobre la membrana plasmática. El efecto inhibitorio mostrado por los ácidos aromáticos puede basarse en mecanismos semejantes al de los ácidos alifáticos descritos anteriormente (Larsson, 2000).

Aunque se han realizados diversos estudios sobre el efecto de los derivados fenólicos sobre levaduras (Mikulášová y col., 1990; Delgenes y col., 1996) y especialmente sobre *Saccharomyces cerevisiae* (Jönsson y col., 1998; Palmqvist y col., 1996a, 1998; Larsson y col., 1999b, 2000). El mecanismo de inhibición sobre los eucariotas no está completamente aclarado. Sin embargo, debido a que la estructura de la membrana plasmática es similar a la de procariotas, se postula que los mecanismos de inhibición pueden ser similares (Larsson, 2000).

Al igual que con el furfural e HMF, existen datos en la bibliografía que demuestran la capacidad de determinados microorganismos, tanto bacterias como *K. pneumoniae* (Nishikawa y col., 1988) o *Z. mobilis* (Delgenes y col., 1996), como levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Pachysolen* y *Candida* (De Wulf y col., 1986; Delgenes y col., 1996; Larsson y col., 2000) de metabolizar los aldehídos aromáticos. Sin embargo, los datos ofrecidos por la bibliografía sobre el papel de la alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae* en la conversión de estos compuestos resultan contradictorios (Bowen y col., 1986; Long y col., 1989). Otros enzimas, que pueden estar implicadas en el metabolismo de los aldehídos aromáticos son la vainillina oxidoreductasa (De Wulf y col., 1986), aldosa reductasa (Khun y col., 1995) o la aril-alcohol deshidrogenasa (Delnieri y col., 1999).

1.5. AUMENTO DE LA FERMENTABILIDAD DE LOS HIDROLIZADOS OBTENIDOS TRAS EL PRETRATAMIENTO.

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

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

1.5.1. Métodos biológicos.

Consiste en utilizar microorganismos capaces de metabolizar algunos de los compuestos tóxicos presentes en los hidrolizados. Un ejemplo de tratamiento biológico es la destoxificación de hidrolizados de sauce utilizando micelios de *Trichoderma reesei* (Palmqvist y col., 1997). Este microorganismo es capaz de metabolizar las pentosas y oligómeros presentes en el hidrolizado sin verse afectado por los productos tóxicos presentes en el mismo. Durante el tratamiento con este hongo se han eliminado compuestos como el ácido acético, el furfural y el ácido benzoico.

También pueden utilizarse enzimas (lacasa y peroxidasa) procedentes de hongos ligninolíticos. Se han utilizado enzimas procedentes de *Trametes versicolor* para la eliminación completa y selectiva de los monómeros fenólicos presentes en hidrolizados de sauce (Jönsson y col., 1998). Basado en los espectros de absorción, parece que el mecanismo por el que estas enzimas reducen el efecto tóxico de los hidrolizados es una polimerización oxidativa de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular a compuestos aromáticos de mayor peso molecular menos tóxicos.

1.5.2. Métodos químicos y físicos.

1.5.2.1. Tratamientos con hidróxidos.

El tratamiento de hidrolizados lignocelulósicos con diferentes hidróxidos ha sido uno de los métodos más empleados para la eliminación de los compuestos tóxicos generados en el pretratamiento (van Zyl y col., 1988). Consiste en añadir hidróxido cálcico (ó cualquier tipo de hidróxido, como hidróxido sódico, magnésico) al medio hasta alcanzar un pH de 10. Como consecuencia se produce un precipitado formado por sales de calcio de muy baja solubilidad que arrastra alguno de los compuestos tóxicos presentes en el hidrolizado como furfural e HMF (Larsson y col., 1999a) y ácido acético (Perego y col. 1990; Amarte y Jeffries 1996). Este precipitado debe ser eliminado del medio antes de la fermentación. El tratamiento puede ser combinado con la adición de sulfito, el cual de por sí es un eficiente método de destoxificación (Parajó y col., 1997).

Mediante el tratamiento de los hidrolizados del material lignocelulósico con hidróxido cálcico se han conseguido aumentos significativos en el rendimiento en etanol y en la productividad volumétrica de diferentes microorganismos como *E. coli* (Barbosa y col., 1992; Lawford y Rousseau, 1992; Olsson y col., 1995; Martinez y col. 2000), *Z. mobilis* (Ranatunga y col., 2000), *P. stipitis* (Van Zyl y col., 1988; Amarte y Jeffries, 1996), y *S. cerevisiae* (Larsson y col., 1999).

1.5.2.2. Evaporación.

Este tratamiento persigue la eliminación de compuestos volátiles como el furfural, ácido acético y ácido fórmico. Sin embargo compuestos como el ácido levulínico, el hidroximetilfurfural y los compuestos fenólicos no son eliminados. El tratamiento debe realizarse a un pH bajo ya que compuestos como el ácido acético y fórmico sólo son volátiles en la forma protonada (Larsson, 2000).

Este método se ha aplicado a hidrolizados de chopo (Wilson y col., 1989), y de abeto (Larsson y col., 1999), consiguiéndose, en ambos casos, aumentar parcialmente la

fermentabilidad. El limitado aumento de la fermentabilidad de los hidrolizados con este tratamiento puede deberse a la menor toxicidad de los compuestos volátiles eliminados en este método comparado con los compuestos fenólicos que no son eliminados (Palmqvist y col., 1996a).

1.5.2.3. Carbón activo.

La utilización de carbón activo en la destoxificación de hidrolizados muestra resultados contradictorios. Así, mientras que la aplicación de carbón activo a hidrolizados de pino antes de la fermentación con *C. acetobutylicum* no obtuvo buenos resultados (Maddox y Murray, 1983), tratamiento con carbón activo de hidrolizados de eucalipto y fermentados posteriormente con *Debaromyces hansenii* resultó muy efectivos (Pajaró y col., 1997).

1.5.2.4. Carbón vegetal.

Mediante la aplicación de carbón vegetal, preparado a partir de madera de abeto tratado a temperaturas superiores a 600 °C, se ha conseguido un aumento de la fermentabilidad de los hidrolizados mediante la eliminación selectiva de compuestos tóxicos como el furfural, HMF y derivados fenólicos, sin afectar a la concentración de azúcares fermentables (Miyafuji y col., 2003).

1.5.2.5. Resinas de intercambio iónico.

Aunque algunos autores han encontrado efectiva la utilización de resinas de intercambio catiónico para la destoxificación de hidrolizados (Buchert y col., 1990), los mejores resultados se han obtenido con las resinas de intercambio aniónico a un pH de 10 (Nilvebrant y col., 2001). Con estas resinas se consigue principalmente la eliminación de los compuestos fenólicos, debido a la formación de fuertes enlaces entre los grupos amonio cuaternarios de la resina (cargados positivamente) y los fenoles (cargados negativamente). Por el contrario los grupos sulfónicos con carga negativa de las resinas catiónicas originan unos efectos de repulsión con los inhibidores presentes en el hidrolizado.

Al tratar los hidrolizados con resinas de intercambio iónico, también se ve afectada la concentración de los furanos (debida en este caso a interacciones hidrofóbicas) y de los ácidos alifáticos. A pesar de los buenos resultados en la eliminación de productos tóxicos que se obtienen con el tratamiento con estas resinas, su alto coste y el descenso de azúcares fermentables observado en el tratamiento hacen inviable la utilización de estas resinas en los procesos industriales (Larsson, 2000).

1.5.2.6. Lignina residual.

Un nuevo método propuesto para la detoxificación de hidrolizados de lignocelulosa (Björklund y col., 2002), consiste en utilizar la lignina que se produce como residuo en el proceso de obtención de etanol y, utilizarla como absorbente en una extracción en fase sólida aprovechando sus propiedades hidrofóbicas. Las ventajas de utilizar como agente destoxificador la lignina residual frente a resinas cromatográficas, son principalmente económicas y hace que se reduzcan en gran medida los costes del tratamiento. Además, la lignina es un subproducto del proceso de obtención de etanol y después de utilizarse en el proceso de destoxificación, puede ser empleada como combustible sólido.

1.5.2.7 Utilización de zeolitas.

El término zeolita engloba a un gran número de minerales, tanto naturales como sintéticos, compuestos de un esqueleto cristalino formado por la combinación tridimensional de tetraedros TO_4 (T= Si, Al, B, Ga,) unidos entre sí a través de átomos de oxígeno comunes. Esta estructura confiere a las zeolitas una serie de propiedades entre las que se encuentran: importante capacidad de intercambio iónico, una notable superficie específica y la existencia de lugares activos que permiten una importante actividad catalítica (López y col., 2000):

Aunque su mecanismo de actuación es desconocido, las zeolitas se han aplicado con éxito en numerosos procesos. Se han utilizado como catalizadores de reacciones de hidrólisis de diferentes disacáridos como la celobiosa, maltosa, lactosa, etc. (Shukla y col., 1985), con un importante papel en el control ambiental de residuos industriales en la eliminación de metales tóxicos (cromo, cobalto, níquel), (Rodríguez y col., 2001),

para aumentar el rendimiento del cultivo en piscifactorías (Voltolina y col., 1997; López y col., 2000).

Las zeolitas también se han utilizado para mejorar los procesos de obtención de etanol con levaduras. En los procesos de obtención de etanol a partir de melazas, la adición de zeolitas a los medios de fermentación, produjo aumentos de la tasa de fermentación. Se han postulado distintos mecanismos para explicar este aumento de la tasa de fermentación, la disminución de los niveles de sodio de las melazas, la posible inmovilización de las levaduras sobre las zeolitas (Roque-Malherbe y col., 1987) o la disminución de la concentración de los compuestos tóxicos presentes en las melazas (SivaRaman y col., 1994). La aceleración de la fermentación de glucosa observada al añadir zeolitas a levaduras floculantes puede deberse a una disminución del tamaño del flóculo con la consiguiente disminución de las restricciones en la difusión (Prabhune y col., 1996). Otros autores (Eken-Saraçoglu y Arslan, 2000) han conseguido un aumento de la fermentabilidad de hidrolizados de maíz mediante un tratamiento combinado de neutralización y adición de zeolitas y posterior fermentación con *Candida shehatae*.

1.5.2.8. Procesos de oxidación avanzada.

Los procesos de oxidación avanzada se basan en la generación de radicales hidroxilo. Entre ellos podríamos citar la reacción de Fenton. Esta se basa en la combinación de peróxido de hidrógeno y sales de hierro (II) para generar radicales hidroxilo que actúan como especies oxidantes (Safarzadeh-Amiri y col., 1997)



En esta reacción los iones Fe^{+3} se van acumulando en el sistema a medida que los iones Fe^{+2} se consumen hasta que la reacción se detiene.

Aunque la oxidación avanzada mediante la reacción de Fenton no ha sido aplicada en el tratamiento de hidrolizados de biomasa lignocelulósica, su utilización ha dado buenos resultados en el tratamiento de aguas contaminadas ya que permite aunar costes razonables de tratamiento y una versatilidad suficiente para realizar tratamientos

in situ (Legrini y col., 1993). Por ello, en este trabajo se ha utilizado como método de destoxificación de los hidrolizados de chopo antes de la fermentación.

Como puede observarse, existen numerosos resultados en la bibliografía sobre diferentes tratamientos para aumentar la fermentabilidad de los hidrolizados obtenidos en el pretratamiento. La elección del tipo de destoxificación más adecuado para tratar la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento va a depender de la composición del hidrolizado, del tipo de materia prima a pretratar y del microorganismo utilizado en la fermentación. Así por ejemplo, la evaporación es un método más efectivo para el tratamiento de los hidrolizados de maderas duras que un hidrolizado procedente de maderas blandas debido a su mayor concentración de ácido acético y furfural (Tahezadeh y col., 1997b).

Un parámetro que debe considerarse en la elección del método de destoxificación es el coste del proceso. Deben realizarse análisis económicos para evaluar el coste adicional que, sobre el proceso global de producción de etanol, supone el método de destoxificación seleccionado. La combinación de una neutralización con hidróxidos y la adición de sulfito incrementa en un 22% el coste de la producción de etanol a partir de un hidrolizado de sauce utilizando como microorganismo fermentador una cepa recombinante de *E. coli* (von Sivers y col., 1994).

Es difícil establecer comparaciones entre los resultados obtenidos en la bibliografía empleando diferentes métodos de destoxificación, ya que, en la mayoría de los casos, se emplean diferentes hidrolizados y diferentes microorganismos. Estos hidrolizados varían en su grado de toxicidad y cada microorganismo presenta un distinto grado de tolerancia a los inhibidores (Palmqvist, 1998). No obstante, un método de destoxificación apropiado debería eliminar selectivamente los inhibidores, ser barato y fácil de integrar en el proceso de producción de etanol sin que fuera necesario introducir nuevas etapas en el proceso.

1.6. PERSPECTIVAS DE FUTURO PARA LA COMERCIALIZACIÓN DEL ETANOL A PARTIR DE LIGNOCELULOSA

Entre las tecnologías para la producción de etanol-combustible, las basadas en hidrólisis enzimática, se vislumbran como las más prometedoras debido a sus altos rendimientos potenciales. Aunque los procesos de hidrólisis enzimática son relativamente nuevos (la investigación comenzó en los años 70), durante la última década se han producido avances significativos en el desarrollo de cada una de las etapas que componen el proceso (pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación, recuperación del producto y tratamiento de los efluentes del proceso). No obstante, todavía existen oportunidades para conseguir progresos significativos que conduzcan a aumentar el rendimiento y la productividad y, por lo tanto, a la reducción de los costes de esta tecnología. Las áreas que necesitan un esfuerzo de investigación adicional, y que conducirán a la adquisición de nuevos conocimientos que contribuyan a mejorar la economía del proceso se centran, por un lado, en el desarrollo de tecnologías de pretratamiento e hidrólisis más eficientes y, por otro lado, en la mejora del microorganismo que realiza la etapa de fermentación.

Es necesario seguir investigando en el desarrollo de tecnologías de pretratamiento de los materiales lignocelulósicos que aumenten el rendimiento de obtención de azúcares fermentables y disminuyan los productos de degradación. También es necesario avanzar en el desarrollo de nuevos catalizadores enzimáticos, ya que uno de los mayores obstáculos para la comercialización de estas tecnologías es el alto precio de las celulasas. Actualmente, el coste del enzima supone unos 0,15 euros por litro de etanol producido. Se calcula que este coste debe ser reducido diez veces para que el etanol sea económicamente competitivo. Para reducir el coste de producción de celulasas es necesario aumentar su actividad específica y la eficiencia de producción. Se están clonando celulasas en bacterias, levaduras, hongos y plantas creando nuevos sistemas de obtención de estos enzimas, mejorando tanto su producción como su actividad (Wood y col., 1997; Ziegler y col., 2000; Dai y col., 2000; Hooker y col., 2001). Recientemente, el Departamento de Energía de Estados Unidos ha apoyado, con más de 30 millones de dólares, un programa de investigación a tres años enfocado a reducir el coste de la producción de celulasas.

La mejora de la etapa fermentación de los azúcares, obtenidos a partir de la biomasa, en etanol es otra de las áreas que ofrece oportunidades para reducir los costes del proceso global. Es necesario aumentar la tolerancia de los microorganismos a los inhibidores producidos en el pretratamiento y, para ello, es necesario realizar investigaciones, como la que se recoge en esta Tesis Doctoral, para conocer el efecto que los compuestos tóxicos ejercen sobre el metabolismo de estos microorganismos. La adaptación de los microorganismos a los inhibidores puede lograrse, mediante adaptaciones graduales del microorganismo a estos medios, atribuida a la síntesis de nuevos enzimas o coenzimas que afectan al metabolismo de los inhibidores (Boyer y col., 1992, Lawford y col., 1999); o mediante ingeniería genética, logrando la expresión de lacasas procedentes de hongos (Larsson y col., 2001) y sobreexpresando las enzimas responsables del metabolismo de los compuestos tóxicos (Larsson y Jönsson, 2001).

Sin duda, uno de los mayores retos para aumentar el rendimiento del proceso de transformación de la biomasa lignocelulósica en etanol es la fermentación de todos los azúcares presentes en la biomasa (C_5 y C_6). Se está trabajando intensamente en la obtención de microorganismos modificados genéticamente que puedan transformar la xilosa y la arabinosa en etanol. Como ejemplos podemos citar la introducción de operones que codifican enzimas para la asimilación de xilosa y de la ruta de las pentosas fosfato en *Zymomona mobilis* (Zhang y col., 1995), cepas recombinantes de *E. coli* con genes de *Z. mobilis* para una conversión más eficiente de piruvato a etanol (Dien y col., 2000), e introducción de plásmidos con genes de xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa de *P. stipitis* en *Saccharomyces ssp* para la cofermentación eficiente de glucosa y xilosa (Ho y col., 1998). La cepa *K. marxianus* CECT 10875 utilizada en este trabajo, ofrece buenas perspectivas ya que, aunque no es capaz de producir etanol, puede crecer sobre xilosa y presenta actividad xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa (Negro y col., 2002).

Además de seguir avanzando en el desarrollo del proceso de producción de etanol, es necesario desarrollar investigación a nivel de planta piloto, con objeto de verificar la tecnología y obtener datos útiles para la comercialización de las tecnologías. Estas instalaciones piloto permitirán aumentar la integración del proceso; reduciendo el número de etapas, el consumo energético y permitiendo reutilizar las diferentes

corrientes generadas en el mismo con objeto de minimizar la necesidad de agua limpia y reduciendo los efluentes. Diferentes grupos de investigación como NREL (EE.UU), la Universidad de Lund (Suecia) y el CIEMAT (España), poseen o están trabajando en la construcción de plantas piloto que integren las diferentes etapas de los procesos desarrollados en el laboratorio.

Una posibilidad que reducir los costes de producción, es la integración de la producción de etanol con una planta combinada de calor y electricidad, consiguiéndose en este caso hasta un 20 % de reducción de los costes (Kadam y col., 2000, Galbe y Zacchi, 2002). El CIEMAT está participando en un proyecto subvencionado por la Unión Europea para la coproducción de etanol y electricidad a partir de paja de cereal (Energy Project NNE5-2001-00729).

Las últimas propuestas para la reducción del coste del etanol, prevén la generación de nuevos productos de alto valor a partir de la biomasa lignocelulósica. Las plantas de procesado de biomasa estarían más cercanas a una biorefinería que a una planta de producción de etanol. Entre los productos que podrían obtenerse cabe citarse el furfural, con una importante aplicación industrial como materia prima para la producción de alcohol fufurílico, que a su vez es el producto de partida para la producción de resinas furánicas y disolventes. A partir de los xilanos, podría obtenerse xilitol para su utilización en la industria alimentaria como edulcorante. De la fermentación de la xilosa también puede obtenerse acetona, ácido acético y butanol que son la base de numerosos productos. De la fracción de lignina podrían obtenerse quelantes, lignosulfonatos y productos químicos como el catecol, vainillina y diferentes aditivos de la gasolina.

Los avances que se prevén en los próximos años podrán reducir el coste de producción de etanol en los próximos diez años hasta niveles competitivos con la gasolina (Wooley y col., 1999).

2. OBJETO DE INTERES.

La biomasa lignocelulósica constituye una abundante fuente de materia prima para la producción de etanol-combustible. Entre los procesos de obtención de bioetanol a partir de biomasa, las que utilizan hidrólisis enzimática son las que ofrecen las mejores perspectivas de comercialización (Ballesteros, 2001).

El material lignocelulósico, debido a su estructura, presenta una baja susceptibilidad de hidrólisis necesitando un pretratamiento previo. La explosión por vapor es un excelente pretratamiento del material lignocelulósico que rompe la estructura física y química de las fibras, aumentando la accesibilidad del enzima y, por lo tanto, el rendimiento de hidrólisis. Sin embargo, durante el pretratamiento se forman una serie de productos de degradación que pueden afectar al microorganismo actuando como potenciales inhibidores de la fermentación. Estos productos (ácidos alifáticos, productos de degradación de los azúcares y compuestos aromáticos de degradación de la lignina) son solubilizados y recuperados en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento. En un proceso de producción de etanol esta fracción debería ser utilizada como medio de fermentación con objeto de minimizar las necesidades de agua y disminuir la cantidad de efluentes producidos en el proceso.

La Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS) ha sido reconocido como un método muy prometedor para la obtención de etanol, ya que la presencia de levaduras junto con el complejo enzimático, reduce la acumulación de azúcares en el reactor evitando la inhibición por producto final del complejo enzimático, obteniéndose mayores rendimientos y tasas de sacarificación que en el proceso de hidrólisis y fermentación separada. Sin embargo, el proceso de SFS tiene el inconveniente de la diferente temperatura óptima de cada una de las fases que lo constituyen. Puesto que la temperatura óptima de sacarificación está próxima a los 50 °C, sería aconsejable la utilización de microorganismos termotolerantes capaces de realizar la fermentación a una temperatura cercana a esta. Entre los diferentes microorganismos citados en la bibliografía capaces de fermentar a temperaturas superiores a los 40 °C, *Kluyveromyces marxianus* aparece como uno de los más prometedores para la obtención de etanol mediante este proceso.

El efecto producido por algunos de los compuestos tóxicos generados durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, ha sido estudiado en bacterias y levaduras, principalmente en *S. cerevisiae*. Sin embargo, no existen datos en la bibliografía sobre el efecto de estos compuestos sobre *Kluyveromyces marxianus*. Por ello, los objetivos de este trabajo son:

- Identificación de los compuestos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo que pudieran actuar como inhibidores potenciales de la fermentación.

- Estudio del efecto de estos compuestos sobre la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, tanto individualmente como en combinaciones binarias y ternarias.

- Estudios de la fermentabilidad de la fracción líquida obtenida tras la explosión por vapor de la madera de chopo mediante la aplicación de diferentes métodos de destoxificación.

- Utilización de la fracción líquida, una vez sometida a diferentes métodos de destoxificación, como medio de fermentación en un proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS) utilizando como sustrato madera de chopo pretratada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materia prima.

El material lignocelulósico utilizado fue biomasa de chopo (*Populus nigra*), suministrada por el Centro de Desarrollo de Energías Renovables (CEDER) (Lubia, Soria), con un contenido de humedad del 6%. La biomasa fue triturada hasta un tamaño de partícula de 2 mm, utilizando un molino de cuchillas tipo Restsch.

3.2. Pretratamiento con explosión por vapor.

El pretratamiento de la biomasa de chopo se realizó en una planta piloto diseñada por la empresa INTECSA y construida en las instalaciones del CIEMAT. La planta piloto, basada en la tecnología Masonite de aplicación muy extendida en la industria papelera (Marchessault y col., 1983), consta de un generador de vapor, un reactor para el pretratamiento de biomasa de 2 litros de capacidad y un ciclón de 50 litros en el que se recoge el material pretratado. La descripción de esta planta piloto se muestra en el anexo I.

Para la realización del pretratamiento se introdujeron en el reactor 100 gramos de biomasa y, mediante la acción directa de vapor saturado, se calentó hasta 210 °C, manteniéndose a esa temperatura durante 4 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, el material se sometió a una descompresión súbita, recogiendo en el ciclón de descarga y enfriándose hasta una temperatura aproximada de 40 °C. El material pretratado se filtra obteniéndose dos fracciones, una sólida y otra líquida. Ambas fracciones se analizaron según se describe en el apartado 3.7.1. Las condiciones de pretratamiento de 210 °C y 4 minutos, se eligieron en un trabajo previo teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación del material pretratado, su composición y el rendimiento de hidrólisis enzimática (Ballesteros, 2000; Negro y col., 2003 b).

Durante el pretratamiento se produce la solubilización de alguno de los componentes de la biomasa. El porcentaje de solubilización (% S) de los distintos componentes del material lignocelulósico, se calculó teniendo en cuenta el contenido

del compuesto en el residuo pretratado (referido a la materia prima) y el contenido del compuesto en la materia prima inicial, según la siguiente fórmula:

$$\% S = \left(1 - \frac{\text{Contenido del compuesto en el residuo pretratado} \text{ (ref. a la materia prima)}}{\text{Contenido del compuesto en la materia prima}} \right) \times 100$$

3.3. Productos químicos.

Todos los productos químicos utilizados en este trabajo fueron suministrados por Sigma (San Luis, MO), excepto el alcohol sirínico (alcohol 4-hidroxi-3,5-dimetoxibencílico) que fue suministrado por Lancaster Synthesis (Morecambe, Inglaterra).

Las preparaciones enzimáticas, Celluclast 1.5 L (60 UPF/ml) y Novozyme 188 (790 UI β -Glucosidasa/ml) fueron suministradas por NOVO Nordisk (Dinamarca). Las actividades enzimáticas se determinaron siguiendo el procedimiento descrito por Ghose (1987).

3.4. Medios de cultivo.

Los medios de cultivos utilizados para el mantenimiento y crecimiento del microorganismo se muestran en el anexo II.

3.5. Microorganismo.

El microorganismo utilizado en este trabajo fue la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 obtenida en los laboratorios del CIEMAT mediante mutagénesis química y selección (Ballesteros, 2000). El microorganismo se conservó en tubos de agar inclinado con medio sólido a una temperatura de 4 °C.

3.6. Ensayos de fermentación.

3.6.1. Preparación del inóculo.

El microorganismo se incubó durante 12 horas en medio líquido basal (MLB) estéril, en un agitador orbital Braun CERTOMAT-R a una temperatura de 42 °C y 150 rpm de agitación.

3.6.2. Pruebas de fermentación.

Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 25 ml del medio correspondiente (pH 5,5). Se añadió un 4% (v/v) de inóculo y se incubaron en un agitador orbital Braun CERTOMAT-R a una temperatura de 42 °C y una agitación de 150 rpm. Como medios de fermentación se utilizaron: MLB sin esterilizar, la fracción líquida a la que se añaden glucosa y sales minerales en la misma concentración del MLB y la fracción líquida tras ser sometida a diferentes métodos de destoxificación descritos en el apartado 3.8., y a la que se añaden glucosa y sales minerales en la misma concentración del MLB.

Los ensayos para el estudio del efecto sobre el microorganismo de los productos de degradación identificados en la fracción líquida se realizaron añadiendo diferentes cantidades de cada compuesto individualmente, en combinaciones binarias o ternarias al MLB sin esterilizar. Como control se utilizó MLB al que no se le añadió ningún tóxico.

En las fermentaciones en las que se añadieron ácidos, el pH del medio se ajustó a 5,5 con NaOH 2 N. La medida de pH se realizó con un pH-metro Basic 20 (Crison). Se tomaron muestras periódicamente, analizándose la composición del medio y la producción de biomasa y etanol. Todas las fermentaciones se realizaron por triplicado.

3.6.3. Diseño de composición central modificado.

El estudio del efecto de la mezcla de tres compuestos (ácido acético, furfural y catecol) sobre la tasa específica de crecimiento (μ), productividad volumétrica (Q), rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) y rendimiento en etanol ($Y_{P/S}$), se realizó empleando un diseño de composición central (Montgomery, 1997), modificado por Palmqvist y col., (1999a) incluyendo fermentaciones control. Este diseño permite determinar los efectos principales de los compuestos estudiados sobre los parámetros de fermentación y sus interacciones.

El modelo se divide en 2 bloques (I y II), el bloque I replicado tres veces y el bloque II replicado dos veces. Los experimentos realizados en cada bloque así como la concentración de cada uno de los compuestos utilizados en cada experimento se muestran en la tabla 3.I. Cada replicado se realiza con un inóculo diferente con objeto de aleatorizar la influencia del inóculo en el modelo (Palmqvist y col., 1999a).

Tabla 3.I.- Diseño experimental para el análisis de la influencia de ácido acético, furfural y catecol sobre la tasa específica de crecimiento (μ), productividad volumétrica (Q), rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) y rendimiento en etanol ($Y_{P/S}$).

| Bloque | Nº Exp. | Compuesto (g/l) | | |
|--------|---------|-----------------|----------|---------|
| | | Acético | Furfural | Catecol |
| I | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 2 | 0,4 | 0,2 |
| | 3 | 8 | 0,4 | 0,2 |
| | 4 | 2 | 0,4 | 0,8 |
| | 5 | 8 | 0,4 | 0,8 |
| | 6 | 2 | 1,6 | 0,2 |
| | 7 | 8 | 1,6 | 0,2 |
| | 8 | 2 | 1,6 | 0,8 |
| | 9 | 8 | 1,6 | 0,8 |
| II | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 1 | 0,5 |
| | 3 | 10 | 1 | 0,5 |
| | 4 | 5 | 1 | 0 |
| | 5 | 5 | 1 | 1 |
| | 6 | 5 | 0 | 0,5 |
| | 7 | 5 | 2 | 0,5 |
| | 8 | 5 | 1 | 0,5 |
| | 9 | 5 | 1 | 0,5 |

Para describir la influencia de los distintos compuestos sobre las variables estudiadas, se aplicó un modelo de regresión según la ecuación:

$$Y = b + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{23} x_2 x_3 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{33} x_3^2 + b_{123} x_1 x_2 x_3 + \varepsilon,$$

Donde Y es la respuesta predicha para cada uno de los parámetros; b es una constante; b_1 , b_2 , y b_3 son los coeficientes para cada uno de los factores acético (1), furfural (2) y catecol (3); b_{12} , b_{13} y b_{23} son los coeficientes para las interacciones de los factores acético-furfural (1-2), acético-catecol (1-3) y furfural-catecol (2-3); b_{11} , b_{22} y b_{33} son los coeficientes para los efectos cuadráticos de los factores acético (1), furfural (2) y catecol, y b_{123} es el coeficiente de interacción para los tres factores

3.6.4. Cálculos de los parámetros de fermentación.

La **producción de biomasa** se calcula a partir de una recta patrón obtenida representando la densidad óptica (DO) frente al peso seco. La ecuación resultante es:

$$DO = 0,02982 + 0,1727 \times \text{peso seco (g/l)} \quad (r = 0,994)$$

La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro Jasco V-530 UV/V a una longitud de onda de 600 nm.

El peso seco se determinó filtrando 5 ml de cultivo en un filtro HA Millipore de 0,45 μm , lavándose tres veces con agua destilada, secándose en un microondas durante 15 minutos y pesándose en una balanza de precisión (Sartorius 1801) (Larsson y col., 1999a).

La **tasa específica de crecimiento** (μ) fue calculada mediante regresión lineal del Ln (DO) frente al tiempo entre 2 y 8 horas.

La **productividad volumétrica** (Q) se calculó dividiendo el etanol producido en las primeras 8 horas por el número de horas.

El *rendimiento en etanol* ($Y_{P/S}$), se calculó dividiendo el etanol producido a las 24 horas por la concentración inicial de glucosa.

El *rendimiento en biomasa* ($Y_{X/S}$), se calculó dividiendo la producción de biomasa a las 24 horas por la concentración inicial de glucosa.

3.7. Determinaciones analíticas.

3.7.1. Caracterización de la materia prima y del material pretratado.

La caracterización de la materia prima y la fracción sólida obtenida tras la explosión por vapor de la madera de chopo se realizaron siguiendo el esquema mostrado en la figura 3.1.

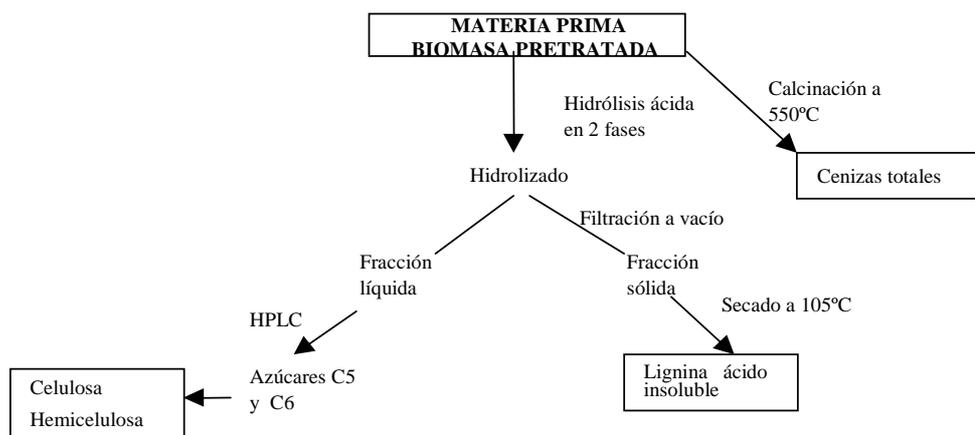


Figura 3.1.- Procedimiento seguido para la caracterización de la materia prima y de la biomasa pretratada.

La determinación tanto en la materia prima como en el material pretratado de carbohidratos estructurales, lignina ácido insoluble y cenizas se realizó mediante los procedimientos LAP-002, LAP-003 y LAP-005 respectivamente del Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL) (Colorado, Estados Unidos).

3.7.2. Caracterización de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento.

El análisis de los productos de degradación de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.7.3.

La determinación de azúcares en la fracción líquida se realizó como se describe en el apartado 3.7.5., tras realizar una posthidrólisis con ácido sulfúrico (4% v/v) a 120 °C durante 30 minutos.

3.7.3. Determinación de los productos de degradación.

El análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos vainillina, ácido vainílico, alcohol vainílico, siringaldehído, ácido siríngico, alcohol siríngico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzóico, alcohol bencílico, catecol, guayacol, furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF), se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard (HP) modelo 1100 con un detector UV de fotodiodos (Diodo Array) HP 1040A. Se utilizó una columna cromatográfica Aminex HPX-87H (Sulfonated divinyl benzene styrene copolymer), resina en forma iónica de hidrógeno de 300 mm x 7,8 mm de diámetro interno, (Bio-Rad Labs, CA, USA). La temperatura de trabajo fue de 55 °C. La fase móvil fue una mezcla (v/v) de 82% ácido sulfúrico 5 mM y 18% acetonitrilo a un flujo de 0,3 ml/min.

La utilización de un detector de fotodiodos permite hacer un barrido total de longitudes de onda, obteniéndose el espectro de absorción UV completo para cada pico cromatográfico. Esta técnica permite medir absorbancias frente a tiempos de retención y longitudes de onda simultáneamente, lo que proporciona resultados a diferentes longitudes de onda para cada compuesto contenido en la muestra, y permite obtener un análisis cuantitativo para cada compuesto a la longitud de onda de máxima absorción. El rango de longitudes de onda en el que han sido realizados los análisis fue de 200-320 nm.

La tabla 3.II muestra los compuestos tóxicos identificados en la fracción líquida recogida en el pretratamiento de explosión por vapor de la biomasa de chopo mediante

el análisis cromatográfico con un detector UV de fotodiodos (Diodo-Array) y la absorbancia máxima a la cual ha sido realizado el análisis cuantitativo.

Tabla. 3.II.- Compuestos tóxicos identificados y sus absorbancias máximas

| Compuesto | λ_{\max} (nm) |
|---------------------------|-----------------------|
| Furfural | 275 |
| 5-Hidroximetilfurfural | 285 |
| Catecol | 200 |
| Alcohol 4-hidroxibenzoico | 200 |
| Alcohol vainílico | 200 |
| Alcohol sirínico | 200 |
| Ácido 4-hidroxibenzoico | 255 |
| Ácido vainílico | 260 |
| Ácido sirínico | 275 |
| 4 -hidroxibenzaldehído | 285 |
| Vainillina | 280 |
| Siringaldehído | 306 |
| Guayacol | 275 |

El alcohol furfurílico fue analizado en el mismo equipo cromatográfico Hewlett-Pachard 1100 con un detector UV (Diodo-Array) y con una columna cromatográfica de fase reversa Lichrosorb RP18 (250 mm x 4 mm). La fase móvil fue una mezcla (v/v) de 90% solución tampón de 1,25 g/l de fosfato sódico monobásico y 1,25 g/l de fosfato sódico dibásico, y 10% metanol a un flujo de 0,6 ml/min y una temperatura de 50 °C.

La determinación analítica de los ácidos acético, levulínico y fórmico se realizó mediante un cromatógrafo de líquidos HPLC, Waters, modelo 590, provisto de un detector de índice de refracción, Waters 410. La separación cromatográfica se realizó mediante una columna de acero inoxidable, Aminex HPX-87H (Bio-Rad Labs, CA, USA) de 300 mm x 7.6 mm de diámetro interno. La fase móvil utilizada fue ácido sulfúrico 5 mM, a un flujo de 0,6 ml/min y 65 °C de temperatura de columna.

3.7.4. Determinación de etanol.

El etanol se analizó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II, equipado con un inyector automático Agilent serie 6890, un detector de ionización de llama (FID) y una columna Carbowax 20M (2 m x 1/8 in) a una temperatura de 85 °C. La temperatura del detector e inyector fue de 150 °C.

3.7.5. Determinación de azúcares.

Los azúcares (glucosa, galactosa, manosa, arabinosa y xilosa) fueron analizados mediante un cromatógrafo de líquido HPLC, Waters, modelo 590, equipado con un detector de índice de refracción, Waters 410, una columna cromatográfica Aminex HPX87P, resina en forma iónica de plomo de 300 mm x 7,8 mm de diámetro interno, de la firma comercial Bio-Rad Labs, CA, USA. La temperatura de trabajo fue de 85 °C y como fase móvil se utilizó agua de calidad reactiva Millipore a un flujo de 0,6 ml/min.

3.8. Tratamientos de destoxificación de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento

La fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor de biomasa de chopo se sometió a los siguientes métodos de destoxificación:

3.8.1. Tratamiento con hidróxidos.

Este tratamiento consistió en la adición a la fracción líquida de hidróxido cálcico (20% p/v) o hidróxido sódico (2,5 N) hasta alcanzar un pH de 10. Una vez alcanzado este pH se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se ajustó el pH a 5,5 con ácido sulfúrico concentrado y se filtró con objeto de eliminar el precipitado.

3.8.2. Reacción de Fenton.

Se tomaron 250 ml de la fracción líquida ajustándose el pH con ácido sulfúrico a valores menores de 3 para evitar la precipitación del hierro. A continuación se termostató el reactor hasta la temperatura de reacción (70 °C) añadiéndose SO_4Fe como catalizador en una concentración óptima de 70 ppm. Se realizaron dos ensayos, uno con una concentración de agua oxigenada de 0,07 M y un tiempo de reacción de una hora, y otro con una concentración de agua oxigenada de 0,14 M y un tiempo de reacción de 2 horas.

3.8.3. Evaporación.

El proceso de evaporación se realizó en un rotavapor BUCHI R-124. Se concentraron 200 ml de la fracción líquida obtenida tras la explosión a vapor (pH 3,8) hasta un 75%, 50% y 25 % del volumen inicial. Posteriormente, se recupera el volumen inicial mediante la adición de agua con objeto de no concentrar los compuestos no volátiles.

3.8.4. Tratamiento con productos de naturaleza zeolítica (PNZ).

En este tratamiento se ensayaron tres productos de naturaleza zeolítica diferentes suministrados por la Universidad de Cádiz: Clinoptilolita (zeolita natural con propiedades de intercambio iónico), Zecer-56 ($\text{SiO}_2/\text{AlO}_3$) (R = 8,3) (producto de naturaleza zeolítica preparado mediante tratamiento alcalino a partir de residuos cerámicos) y Zesep-56 ($\text{SiO}_2/\text{AlO}_3$) (R = 12,1) (preparada a partir de sepiolita).

Se realizaron dos ensayos diferentes. En el primero se añadieron los PNZs en una concentración de 10 g/l a la fracción líquida, dejándolos actuar durante 24 horas en agitación a temperatura ambiente, posteriormente se filtró el medio separando los PNZs y se procedió a la fermentación según se describió anteriormente. El otro ensayo se realizó añadiendo los PNZs en la misma concentración de 10 g/l, pero manteniéndolos en el medio durante toda la fermentación.

3.9. Estudios de fermentabilidad de la fracción líquida una vez destoxificada.

Una vez sometida la fracción líquida a los diferentes métodos de destoxificación se analizó su composición con objeto de ver la evolución del furfural, HMF, ácidos alifáticos (como suma de acético y fórmico) y fenoles (como suma de ácido 4-hidroxibezoico, catecol, vainillina y siringaldehído). Posteriormente se ajustó el pH a 5,5 (con NaOH 2 N o H₂SO₄ concentrado) y se añadieron glucosa y sales hasta alcanzar la composición del MLB, tras lo cual se realizaron los ensayos de fermentación como se ha explicado en el apartado 3.6.2. Como parámetro de fermentabilidad se utilizó la producción de etanol a las 24 horas.

3.10. Ensayos de Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS) utilizando la fracción líquida.

Las pruebas de SFS se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 25 ml de medio. Como medio de fermentación se empleó la fracción líquida, sometida a los diferentes métodos de destoxificación, a la que se añadieron sales minerales en la concentración del medio líquido basal y una concentración de sustrato de 10 % (p/v) de biomasa de chopo pretratada. Se añadió una carga de enzima de 15 unidades de papel de filtro (UPF) por gramo de sustrato de Celluclast 1.5 L y 12,6 UI/ gramo de sustrato de Novozyme 188 (Ghose, 1987). Se inoculó un 4% (v/v) de un cultivo crecido 12 horas, incubándose a 42 °C y una agitación de 150 rpm. Como control se empleó medio líquido basal en el que se sustituyó la glucosa por un 10% de sustrato pretratado. A las 48 horas se tomaron muestras, se centrifugaron para eliminar el residuo insoluble y se analizó el sobrenadante.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 COMPOSICIÓN DE LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA EXPLOSIÓN POR VAPOR

La materia prima utilizada en este trabajo ha sido madera de chopo (*Populus nigra*), ya que, entre los cultivos de corta rotación destinados a la producción de biomasa, el chopo está considerado como un cultivo energético prometedor para el centro y sur de Europa debido a su alto rendimiento (El Bassam, 1996).

Como fase previa a la hidrólisis enzimática es necesario un pretratamiento que haga accesible la biomasa lignocelulósica al ataque enzimático. En este trabajo se ha utilizado un pretratamiento de explosión por vapor para facilitar la hidrólisis enzimática de madera de chopo. Las condiciones utilizadas durante el pretratamiento (210 °C y 4 minutos) se fijaron como óptimas en un trabajo previo (Negro y col., 2003 b).

Tras el pretratamiento se obtienen dos fracciones: una sólida y una líquida. La fracción sólida, o biomasa pretratada, se recupera en un 60% con respecto a la materia prima inicial. La fracción líquida se obtiene en una relación materia prima/fracción líquida de 1/10 (p/v); es decir, por cada 100 gramos de materia prima que se introducen en el reactor de pretratamiento se recuperan 60 gramos de material pretratado y 1 litro de fracción líquida.

Los resultados de la composición de la materia prima y de la fracción sólida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor de biomasa de chopo, realizados según los métodos descritos en el apartado 3.7, se muestran en la tabla 4.I. La celulosa, componente mayoritario, constituye el 43,2% del total de la materia prima. La hemicelulosa (24,8% del total de la materia prima) está compuesta principalmente por xilosa, representando este azúcar el 72% del total de la hemicelulosa. El alto contenido en xilosa es característico de las maderas duras, debido a que la hemicelulosa de estas maderas está constituida principalmente por xilanos formados por unidades de xilosa unidas por enlaces β (1-4). La fracción de lignina determinada como lignina ácido

insoluble, representa en este material un 26,2% del total. El contenido en cenizas es 1,8%.

A partir de los análisis de la composición de la fracción sólida del material pretratado referido a materia prima (composición del material pretratado x porcentaje de recuperación) (tabla 4.I), se pueden calcular los porcentajes de solubilización durante el pretratamiento de la hemicelulosa (88%), lignina (17%) y celulosa (15%). Como puede observarse, la fracción hemicelulósica se solubiliza casi en un 90%. Considerando los azúcares hemicelulósicos individualmente los porcentajes de solubilización de xilosa y manosa son del 87% y 78% respectivamente. La galactosa y arabinosa se solubilizan en un 100%.

Tabla 4.I.- Composición de la materia prima y de la fracción sólida obtenida tras la explosión por vapor de chopo (210 °C 4 minutos). Los datos son media de cuatro repeticiones. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

| Composición (%) (p/p) | Materia prima | Material pretratado (Referido a materia prima) |
|------------------------------|----------------------|---|
| Hemicelulosa | 24,8 (0,9) | 2,9 (0,4) |
| Xilosa | 17,9 (0,8) | 2,3 (0,4) |
| Arabinosa | 1,6 (0,2) | 0 |
| Galactosa | 2,5 (0,27) | 0 |
| Manosa | 2,8 (0,2) | 0,6 (0,1) |
| Celulosa (como glucosa) | 43,2 (1,39) | 36,8 (1,1) |
| Lignina ácido insoluble | 26,2 (1,1) | 21,7 (0,7) |
| Cenizas | 1,8 (0,1) | 0,6 (0,01) |

La composición en azúcares, productos de degradación y pH de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor de madera de chopo se muestra en la tabla 4.II. Respecto a los carbohidratos, el azúcar mayoritario es la xilosa encontrándose en una concentración máxima de 7,1 g/l. Teniendo en cuenta el contenido en azúcares hemicelulósicos (24,8%), el porcentaje de solubilización y la concentración de azúcares hemicelulósicos en el líquido (9,6 g/l), sólo se recupera en la fracción líquida un 44% de la hemicelulosa solubilizada, produciéndose un 56% de

degradación. Considerando individualmente los azúcares hemicelulósicos, en la fracción líquida sólo se recupera el 45% de la xilosa solubilizada, el 54% de la manosa y el 32% de la galactosa y arabinosa. En cuanto a la glucosa, del 8% que se solubiliza sólo se recupera en la fracción líquida 1,8 g/l, lo que supone una degradación del 72%.

Tabla. 4.II.- Intervalo de concentración de los azúcares y productos de degradación encontrados en la fracción líquida después del pretratamiento con explosión por vapor de chopo a una temperatura de 210°C y 4 min.

| Compuesto | Concentración (g/l) |
|---------------------------------|---------------------|
| Azúcares | |
| Glucosa | [1,8 - 1,4] |
| Manosa | [1,2 - 1,1] |
| Galactosa | [0,8 - 0,7] |
| Xilosa | [7,1 - 6,4] |
| Arabinosa | [0,5 - 0,4] |
| Productos de degradación | |
| Acido acético | [2,1 - 1,9] |
| Acido fórmico | [0,46 - 0,43] |
| Acido levulínico | < 0,05 |
| Furfural | [0,62 - 0,46] |
| Hidroximetilfurfural (HMF) | [0,12 - 0,08] |
| Acido 4-hidroxibenzoico | [0,1 - 0,08] |
| 4-hidroxibenzaldehído | < 0,01 |
| Catecol | [0,03 - 0,02] |
| Guayacol | < 0,01 |
| Acido siríngico | < 0,01 |
| Siringaldehído | [0,05 - 0,03] |
| Acido vainílico | < 0,01 |
| Vainillina | [0,016 - 0,014] |
| pH | [3,9-3,7] |

Respecto a los productos de degradación del material lignocelulósico, todos los compuestos identificados en esta fracción, han sido previamente detectados en

hidrolizados de diferentes maderas duras como chopo (Ando y col., 1986; Fenske y col., 1998; Luo y col., 2002), roble (Tran y col., 1985; Lee y col., 1999) y sauce (Jönsson y col., 1998). Estos productos de degradación pertenecen a tres grupos: ácidos alifáticos, furanos y compuestos fenólicos. Los compuestos identificados en la fracción líquida y su origen se muestran en la figura 4.1.

El ácido acético es el compuesto mayoritario, siendo su concentración máxima de 2,1 g/l. Este ácido tiene su origen en la hidrólisis de los grupos acetilos de las hemicelulosas que se produce durante el pretratamiento. La alta concentración de este compuesto, con relación al resto de productos, se debe al elevado número de restos acetilo que presentan las maderas duras. Estas maderas pueden tener hasta siete grupos acetilo por cada diez restos de xilosa (Martín y Manzanares 1994).

El segundo compuesto, en cuanto a su concentración en la fracción líquida, es el furfural, encontrándose en una concentración máxima de 0,62 g/l. Este compuesto se origina como consecuencia de la degradación de las pentosas (en este caso principalmente xilosa) que se produce a esta temperatura y en estas condiciones. Sin embargo, esta concentración del furfural sólo puede explicar parcialmente las pérdidas de xilosa y arabinosa producidas en el pretratamiento (47 y 69 % de degradación respectivamente). Hay que tener en cuenta que se trata de un producto volátil, por lo que es probable que se haya producido pérdida por evaporación durante la descompresión producida en el pretratamiento, o que se produzcan recondensaciones en el interior del reactor (Laser y col., 2002). Otro furano identificado es el 5-hidroximetilfurfural (HMF) en una concentración máxima de 0,12 g/l. Este compuesto se origina por la degradación de las hexosas (glucosa, galactosa y manosa) que, en este caso al tratarse de una madera dura, son componentes minoritarios de las hemicelulosas. Esto explica la baja concentración de HMF en la fracción líquida.

MADERA DE CHOPO

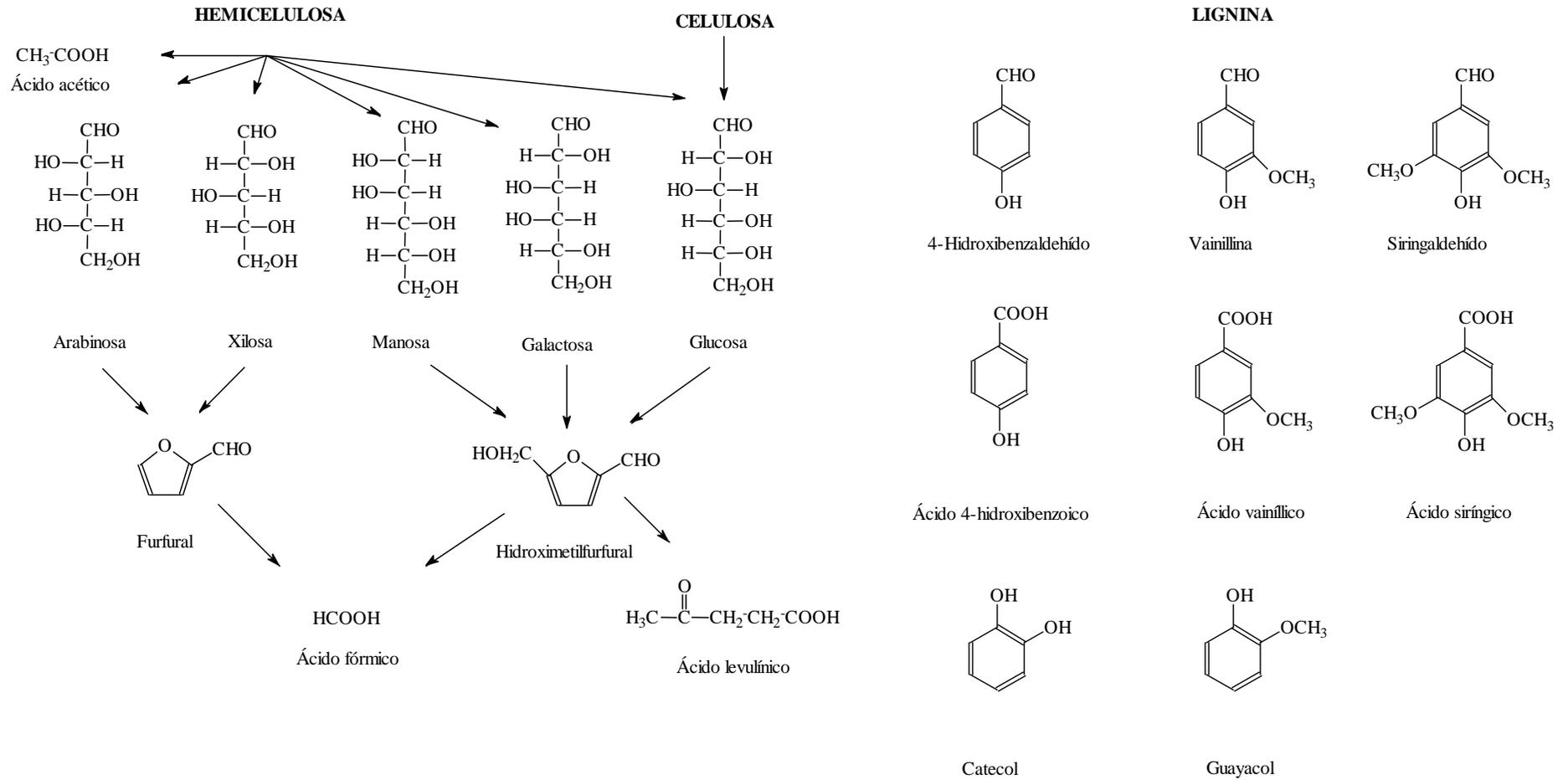


Figura 4.1.- Generación de los compuestos identificados en la fracción líquida obtenida en la explosión a vapor de madera de choipo.

La concentración máxima de ácido fórmico es de 0,46 g/l. Este compuesto procede de la degradación que se produce, en condiciones ácidas a elevadas temperaturas, del furfural y del HMF. Dentro de los ácidos alifáticos el compuesto minoritario es el ácido levulínico, encontrándose en una concentración inferior a 0,05 g/l. Este ácido se origina por la degradación del HMF que, a estas temperaturas, se rompe en concentraciones equimolares de ácido fórmico y levulínico (Ulbricht y col., 1984). La baja concentración de ácido levulínico, en comparación con el ácido fórmico, puede deberse a la baja concentración de HMF presente en el hidrolizado (0,12 g/l). Por lo tanto, en este caso el ácido fórmico se origina principalmente como consecuencia de la degradación del furfural.

Entre los productos de degradación de la lignina, el ácido 4-hidroxibenzoico es el que se encuentra en mayor concentración (0,1 g/l). Es un componente característico de la lignina de chopo (Lapierre y col., 1983), que está unido con los grupos hidroxilos de la lignina mediante enlaces éster y también, posiblemente, mediante enlaces éter (Sjöström, 1993). Por lo tanto, es muy probable que este compuesto se origine durante el pretratamiento por la rotura de estos enlaces. Su correspondiente aldehído (4-hidroxibenzaldehído) también ha sido identificado en la fracción líquida, siendo su concentración inferior a 0,01 g/l.

Otros derivados fenólicos detectados en la fracción líquida han sido la vainillina y el siringaldehído. La vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), en una concentración de 0,016 g/l, procede de la degradación de las unidades guayacilpropano de la lignina. El siringaldehído (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído), en una concentración de 0,05 g/l, se origina por la degradación de las unidades siringilo de la lignina. La presencia de derivados siringilo en la fracción líquida se debe a la alta proporción de unidades derivadas del alcohol sinapílico (unidades S) que forman parte de la lignina de las maderas duras. Sus respectivos ácidos, el ácido vainílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) y el ácido sirínico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico) también han sido identificados, encontrándose en ambos casos en concentraciones inferiores a 0,01 g/l.

El catecol (0,03 g/l) y guayacol (< 0,01 g/l), son los únicos alcoholes aromáticos derivados de lignina que han sido identificados en la fracción líquida. En el caso del

catecol, además de originarse como producto de degradación de la lignina, algunos autores han citado su formación por el calentamiento de soluciones acuosas ácidas de azúcares (Popoff y Theander, 1972; 1976).

De los resultados obtenidos se observa que, tras el tratamiento de explosión por vapor de biomasa de chopo, se produce una alta solubilización de las hemicelulosas (89 %), requisito necesario para poder utilizar este material como sustrato en un proceso de obtención de etanol mediante una Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS) (Ballesteros 2000). No obstante únicamente se recupera un 39 % de estas hemicelulosas en la fracción líquida. Esto significa que aproximadamente la mitad de los azúcares hemicelulósicos y un 10% de celulosa que se solubiliza durante el pretratamiento se degrada.

La fracción líquida obtenida en el pretratamiento presenta una composición muy compleja. No sólo se encuentran los azúcares procedentes de la hidrólisis y solubilización de las hemicelulosas y la celulosa, sino también una mezcla de productos de degradación de las distintas fracciones que componen el material lignocelulósico (figura 4.2). Buchert y col., (1990) consiguieron separar más de 60 compuestos mediante cromatografía de gases, lo cual da una idea de la complejidad de esta fracción líquida. Luo y col., (2002) mediante HPLC y cromatografía de gases con espectrometría de masas identificaron más de 70 compuestos en un hidrolizado de chopo.

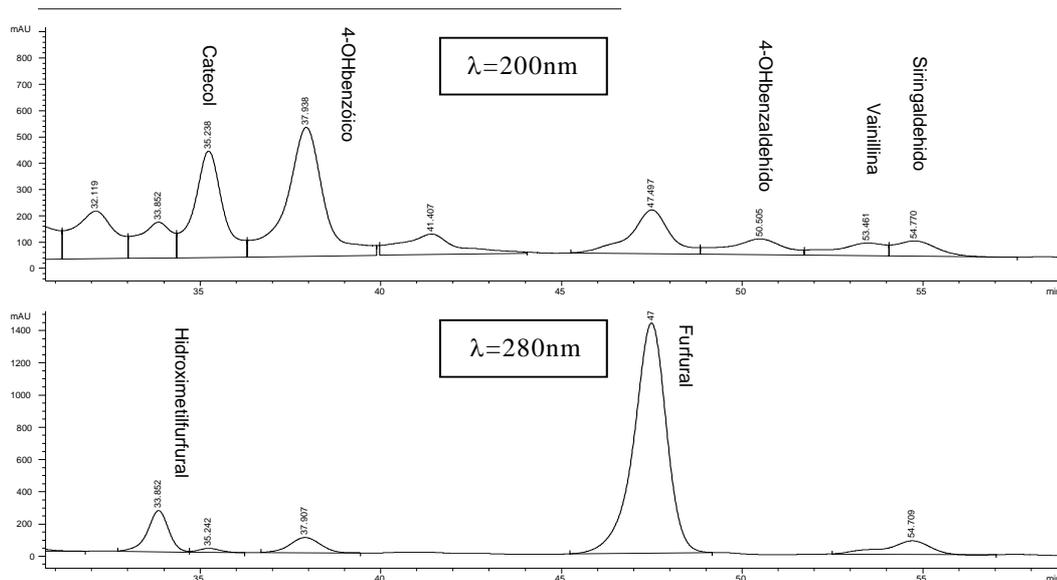


Figura 4.2.- Cromatograma de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento.

4.2 EFECTOS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN SOBRE LA FERMENTACIÓN DE *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875.

Como se ha visto en el apartado anterior, durante el pretratamiento de explosión por vapor se generan una serie de compuestos solubles en la fracción líquida que pueden actuar como inhibidores potenciales de la fermentación. El efecto de los productos de degradación del material lignocelulósico, originados durante los diferentes pretratamientos, ha sido estudiado sobre numerosos microorganismos como procariotas (Nishikawa y col., 1988; Zaldivar y col., 1999; Klinkle y col., 2001), levaduras fermentadoras de pentosas (Weigert y col., 1988; Delgenes y col., 1996), hongos ligninolíticos (Dekker y col., 2002) y sobre todo *Saccharomyces cerevisiae* (De Wulf y col., 1986; Villa y col., 1992; Diaz de Villegas y col., 1992; Delgenes y col., 1996; Palmqvist y col., 1999; Larsson y col., 2000; Taherzadeh y col., 2000; Martín y Jönsson, 2003). Sin embargo, no aparecen datos publicados del efecto de estos compuestos sobre levaduras termotolerantes pertenecientes al género *Kluyveromyces*.

4.2.1 Efecto de los compuestos tóxicos añadidos individualmente sobre la producción de biomasa y etanol.

En los ensayos de fermentación, de la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 utilizando como medio la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor a la que se añade glucosa y sales minerales (pH 5,5), no se observa ni crecimiento ni producción de etanol. La total inhibición del crecimiento y producción de etanol indica que la fracción líquida ejerce un efecto sobre el microorganismo.

Con objeto de estudiar el efecto de cada uno de los compuestos de degradación identificados en la fracción líquida, se realizaron ensayos añadiendo de manera individual cada uno de los compuestos al medio de cultivo, analizando su efecto sobre el crecimiento y la producción de etanol de la levadura a las 24 horas. De esta forma se determinan curvas dosis-respuesta para cada compuesto. Los resultados se muestran como porcentaje de una fermentación control a la que no se le añadió ningún compuesto tóxico.

Las curvas dosis-respuesta para la producción de biomasa y etanol de los furanos se muestran en la figura 4.3. La producción de biomasa se ve más afectada que la producción de etanol, siguiendo en ambos casos un patrón sigmoide. Ambos procesos no se ven afectados por concentraciones iniciales de furfural inferiores a 1,5 g/l (figura 4.2 superior). Una concentración de 2 g/l de furfural causa una inhibición del 15% de la producción de biomasa, y 2,5 g/l producen una inhibición de la producción de biomasa y etanol del 45% y 33% respectivamente. Una concentración inicial de 3 g/l causa la inhibición total de ambos procesos.

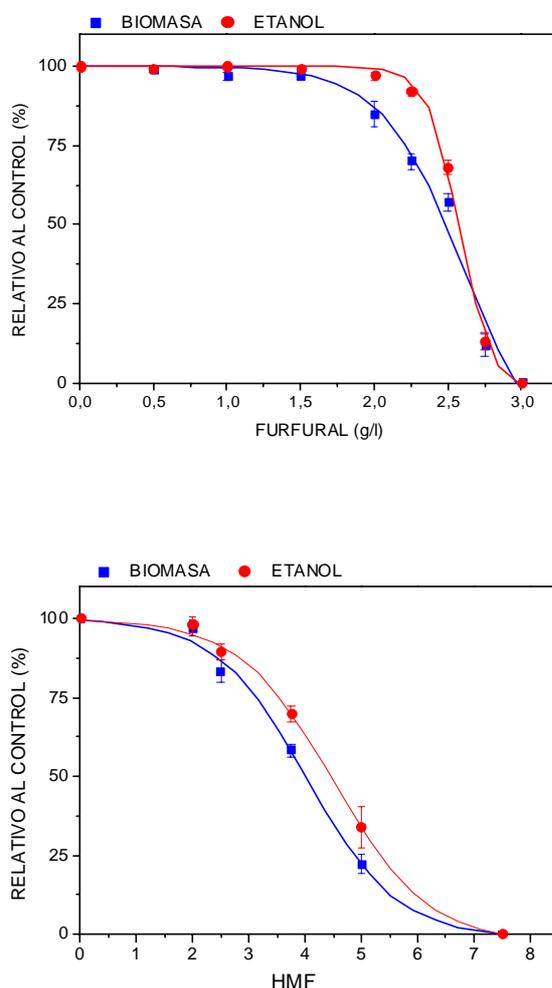


Figura 4.3.- Efecto del furfural (superior) e hidroximetilfurfural (HMF) (inferior) sobre la producción de biomasa y etanol a las 24 horas de *K. marxianus* CECT 10875. Las barras de error representan la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol = $12,6 \pm 0,6$ g/l. 100% biomasa = $3,5 \pm 0,1$ g/l).

La adición de HMF al medio de fermentación sigue un patrón similar al furfural. Concentraciones inferiores a 2 g/l no ejercen prácticamente ningún efecto inhibitorio. Sin embargo, el HMF se muestra mucho menos tóxico que el furfural, ya que una concentración de 3,7 g/l (tóxica en el caso del furfural) produce una inhibición inferior al 50%, tanto de la producción de etanol como de biomasa, necesitándose una concentración superior a 7 g/l para inhibir totalmente la fermentación.

En la tabla 4.III., se muestra el efecto del furfural e HMF sobre la producción de etanol de diferentes microorganismos citados en la literatura. Aunque es difícil hacer una comparación entre los resultados obtenidos en los diferentes trabajos debido a las distintas condiciones de cultivo de cada microorganismo, en general, exceptuando *E. coli* LY01, *K. marxianus* CECT 10875 es más resistente a estos dos compuestos que la mayoría de los microorganismos citados.

La figura 4.4, muestra las curvas dosis-respuesta para las producciones de biomasa y etanol a las 24 horas de los aldehídos aromáticos encontrados en la fracción líquida (vainillina, siringaldehído y 4-hidroxibenzaldehído). En los tres casos la producción de biomasa está más afectada que la producción de etanol, siendo más notable este efecto en el caso del 4-hidroxibenzaldehído. Las curvas para la vainillina y siringaldehído muestran un perfil sigmoide similar, en el que, a concentraciones inferiores a 2 g/l, no se ve afectada la producción de etanol. La vainillina se muestra ligeramente más tóxica respecto a la producción de biomasa, ya que una concentración inicial de 2 g/l produce un 17% de inhibición. Esta misma concentración de siringaldehído, prácticamente no tiene efectos inhibitorios sobre el crecimiento. Las concentraciones necesarias para inhibir totalmente el crecimiento y la producción de etanol son 3 y 3,5 g/l para la vainillina y siringaldehído respectivamente.

Tabla 4.III.- Efecto del furfural e hidroximetilfurfural sobre la producción de etanol en algunos microorganismos etanológicos citados en la bibliografía

| Tóxico | Concentración | % Inhibición | Microorganismo | Referencia |
|----------|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| Furfural | 3 | 33 | <i>S. cerevisiae</i> | Azhar y col., 1981 |
| | 1,3 | 9 | <i>P. stipitis</i> | Tran y Chambers, 1986a |
| | 0,95 | 42 | <i>Z. mobilis</i> | Ranatunga y col., 1997 |
| | 2 | 95 | <i>P. stipitis</i> | Delgenes y col., 1996 |
| | 2 | 90 | <i>C. shehatae</i> | " " |
| | 2 | 56 | <i>Z. mobilis</i> | " " |
| | 2 | 89 | <i>S. cerevisiae</i> | " " |
| | 4 | 79 | <i>S. cerevisiae</i> | Palmqvist y col., 1999 |
| | 3,5 | 0 | <i>E. coli LY01</i> | Zaldivar y col.,1999 |
| 2,5 | 35 | <i>K.marxianus</i> CECT 10875 | | |
| HMF | 0,09 | 20 | <i>Z. mobilis</i> | Ranatunga y col., 1997 |
| | 3 | 90 | <i>C. shehatae</i> | Delgenes y col., 1996 |
| | 3 | 90 | <i>P. stipitis</i> | " " |
| | 3 | 83 | <i>S. cerevisiae</i> | " " |
| | 3 | 13 | <i>Z. mobilis</i> | " " |
| | 8 | 50 | <i>E. coli LY01</i> | Zaldivar y col.,1999 |
| | 4 | 30 | <i>K.marxianus</i> CECT 10875 | |

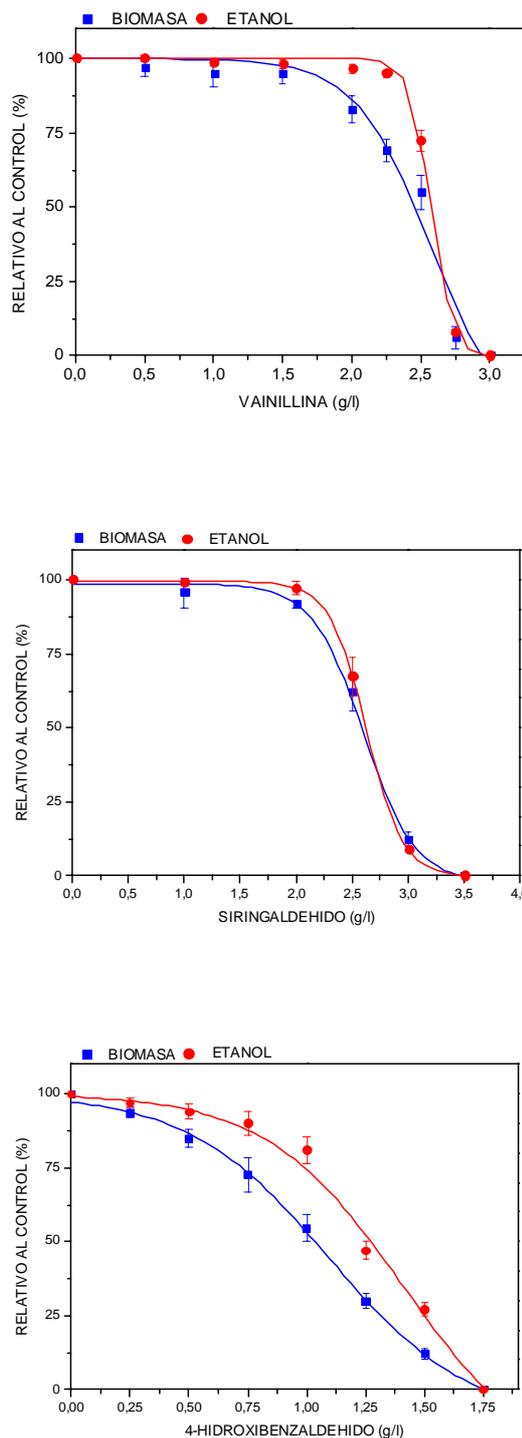


Figura 4.4.- Efecto de la vainillina (superior), siringaldehído (media) y 4-hidroxibenzaldehído (inferior) sobre la producción de biomasa y etanol a las 24 horas de *K. marxianus* CECT 10875. Las barras de error representan la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol = $12,6 \pm 0,6$ g/l. 100% biomasa = $3,5 \pm 0,1$ g/l).

En ensayos con 4-hidroxibenzaldehído, la curva de producción de etanol parece indicar una tendencia sigmoide. A concentraciones inferiores a 0,5 g/l los efectos inhibitorios son leves. La producción de biomasa, a partir de esa concentración, se ve mucho más afectada. Así, una concentración de 0,75 g/l produce una inhibición de la producción de biomasa y etanol del 25% y 7% respectivamente. Concentraciones iniciales de 1,75 g/l inhiben totalmente la fermentación.

Aunque el mecanismo para explicar la toxicidad de los aldehídos (tanto furanos como aromáticos) no se conoce con certeza, diversos autores señalan daños ocasionados en la membrana plasmática, daños debidos a la reactividad química de estos compuestos o inhibición directa de la glucólisis y la fermentación, como posibles mecanismos de actuación de los aldehídos (Zaldivar y col.,1999).

Zaldivar y col. (1999) relacionan la toxicidad de los aldehídos con su grado de hidrofobicidad y establecen, mediante los coeficientes de partición (expresados como $\text{Log } P_{\text{octanol/agua}}$), el siguiente orden creciente de hidrofobicidad: HMF (-0,37); furfural (0,41); siringaldehído (0,99); vainillina (1,21); y 4-hidroxibenzaldehído (1,35). Los resultados obtenidos en nuestros ensayos respecto a la toxicidad de los aldehídos identificados en la fracción líquida sobre el microorganismo coinciden con este orden. El HMF, que presenta menos hidrofobicidad, muestra un menor grado de inhibición del crecimiento y la producción de etanol de *K. marxianus* CECT 10875. El 4-hidroxibenzaldehído, que es el compuesto más hidrófobo de los aldehídos ensayados, ha resultado el más tóxico para el microorganismo. La relación entre la toxicidad mostrada por estos compuesto y su hidrofobicidad puede indicar que el efecto tóxico podría deberse a la interacción de estos compuestos con determinadas zonas hidrofóbicas de la célula como la membrana plasmática, complejos multiproteicos o sistemas de transporte de membrana (Isken y de Bont, 1998).

Algunos autores (Ando y col., 1986) han propuesto que el grado de toxicidad de estos productos de degradación varía dependiendo de los sustituyentes unidos al anillo aromático. De esta forma, los valores inhibitorios relativos para cada grupo funcional serian: CH=CH (+3); CHO (+1,5); p-OH (+1); COOH (+0,5); m-OH (0); OCH₃ (-1). Los resultados obtenidos en este trabajo en los ensayos con los aldehídos aromáticos,

concuerdan con la hipótesis anterior. El 4-hidroxibenzaldehído que tiene un grupo hidroxilo en posición *para* se ha mostrado como el más tóxico de los tres compuestos estudiados. A su vez la vainillina se mostró más tóxica que el siringaldehído debido a que este último tiene dos grupos metoxi en posiciones 3 y 5 mientras que la primera sólo tiene uno en la posición 3 del anillo aromático.

En la tabla 4.IV se muestra el efecto del 4-hidroxibenzaldehído, vainillina y siringaldehído sobre la producción de etanol de varios microorganismos citados en la bibliografía. Al igual que con el furfural e HMF, la levadura *K. marxianus* CECT 10875 es más resistente a la inhibición de estos compuestos que la mayoría de los microorganismos citados.

K. marxianus CECT 10875 es una cepa termotolerante que ha sido seleccionada basándose en su resistencia a la temperatura (Ballesteros, 2000). En *S. cerevisiae* se han demostrado dos sistemas diferentes de control de la transcripción activados por determinadas situaciones de estrés (Piper, 1997). Uno de respuesta al choque térmico (HSE), activado por calor. Otro de respuesta sensible al estrés (STRE) activado por un amplio número de situaciones de estrés, como falta de nutrientes, elevada osmolaridad, bajo pH, presencia de ácidos débiles o de etanol (Palmqvist, 1998). Algunos autores (Piper y col., 1997) han sugerido que la tolerancia de un microorganismo a una situación de estrés puede reflejarse en una mayor tolerancia a otras situaciones de estrés diferentes, es decir, como si existiese una tolerancia cruzada a las diferentes condiciones de estrés. Por lo tanto, la adaptación de *K. marxianus* CECT 10875 a crecer a temperaturas superiores a las que crecen la mayoría de las levaduras podría estar relacionada con la mayor tolerancia que exhibe esta cepa frente a los aldehídos por la posible resistencia cruzada a las diferentes situaciones de estrés.

Tabla 4.IV.- Efectos del 4-hidroxibenzaldehído, vainillina y siringaldehído sobre la producción de etanol de algunos microorganismos citados en la bibliografía

| Compuesto | Concentración | % Inhibición | Microorganismo | Referencia |
|-----------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| 4-hidroxibenzaldehído | 1 | 72 | <i>S. cerevisiae</i> | Ando y col., 1986 |
| | 0,75 | 83 | <i>C. shehatae</i> | Delgenes y col., 1996 |
| | 0,75 | 70 | <i>P. stipitis</i> | " " |
| | 0,75 | 37 | <i>S. cerevisiae</i> | " " |
| | 0,75 | 86 | <i>Z. mobilis</i> | " " |
| | 2 | 97 | <i>E. coli LY01</i> | Zaldivar y col., 1999 |
| | 1,25 | 54 | <i>K.marxianus</i> CECT 10875 | |
| Vainillina | 1,3 | 50 | <i>S. cerevisiae</i> | Clark y Mackie, 1984 |
| | 1 | 25 | <i>S. cerevisiae</i> | Ando y col., 1986 |
| | 1 | 94 | <i>C. shehatae</i> | Delgenes y col., 1996 |
| | 1 | 91 | <i>P. stipitis</i> | " " |
| | 1 | 83 | <i>S. cerevisiae</i> | " " |
| | 2 | 80 | <i>Z. mobilis</i> | " " |
| | 0,043 | 45 | <i>Z. mobilis</i> | Ranatunga y col., 1997 |
| | 3 | 98 | <i>E. coli LY01</i> | Zaldivar y col., 1999 |
| 2,5 | 35 | <i>K.marxianus</i> CECT 10875 | | |
| Siringaldehído | 0,22 | 72 | <i>P. Slipili</i> | Tran y Chambers, 1986 |
| | 1,5 | 97 | <i>S. cerevisiae</i> | Delgenes y col., 1996 |
| | 1,5 | 94 | <i>P. stipitis</i> | " " |
| | 1,5 | 67 | <i>S. cerevisiae</i> | " " |
| | 1,5 | 17 | <i>Z. mobilis</i> | " " |
| | 0,13 | 36 | <i>Z. mobilis</i> | Ranatunga y col., 1997 |
| | 2,5 | 13 | <i>E. coli LY01</i> | Zaldivar y col., 1999 |
| | 2,5 | 30 | <i>K.marxianus</i> CECT 10875 | |

Las curvas dosis-respuesta para el catecol y guayacol se muestran la figura 4.5. Como puede observarse, en ambos casos el crecimiento está mucho más afectado que la producción de etanol. Así, mientras que la producción de etanol sigue un perfil sigmoide, como en todos los compuestos estudiados anteriormente, el crecimiento parece seguir un patrón lineal. Se observan efectos negativos sobre la producción de biomasa desde las concentraciones más bajas ensayadas. Ambos alcoholes a 0,5 g/l de concentración producen aproximadamente un 20% de inhibición del crecimiento respecto a fermentaciones control. A esta concentración la producción de etanol prácticamente no se ve afectada. Las concentraciones necesarias para inhibir totalmente la producción de etanol y el crecimiento son 1,75 para el catecol y 2,25 g/l para el guayacol.

Aunque todos los compuestos tóxicos ensayados afectan más al crecimiento que a la producción de etanol, en el caso de los alcoholes aromáticos ensayados este efecto es mucho más acusado. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por otros autores en *S. cerevisiae* (Larsson y col., 2000) y en *E. coli* (Zaldivar y col., 2000). Estos compuestos aromáticos son moléculas anfipáticas, con sustituyentes hidrofílicos, que se disuelven relativamente bien en la membrana. Presentan una estructura similar a los fosfolípidos pudiendo afectar la función de barrera selectiva de la membrana (Hepieper y col., 19994). Al igual que con los aldehídos parece existir una relación entre la hidrofobicidad de los alcoholes aromáticos y su efecto tóxico sobre los microorganismos (Zaldivar y col., 2000). No obstante, aunque el guayacol es más hidrófobo que el catecol, en nuestros experimentos ha resultado menos tóxico. Esto puede deberse a la presencia de un grupo metoxi como sustituyente del anillo aromático en el guayacol, lo que como se ha comentado anteriormente, le confiere menor toxicidad.

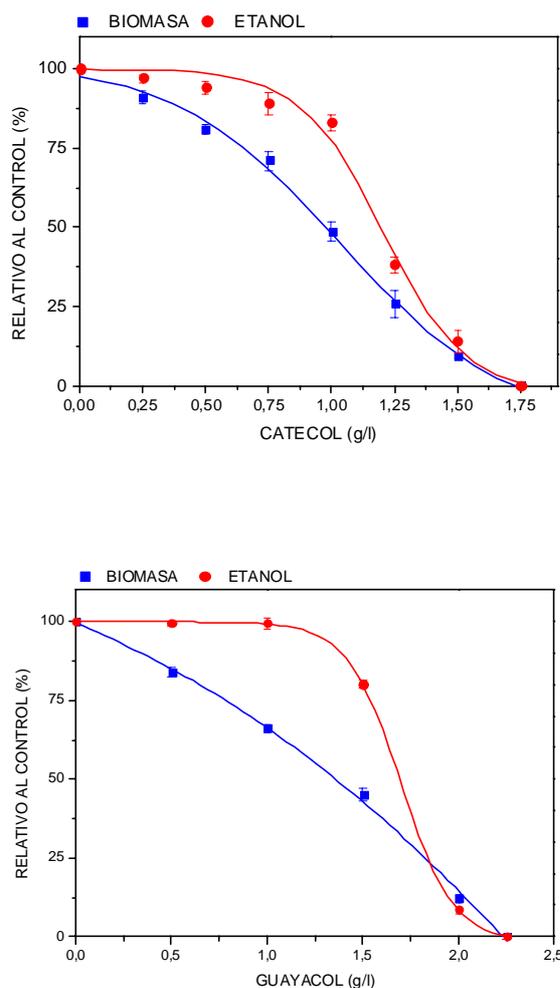


Figura 4.5.- Efecto del catecol (superior) y guayacol (inferior) sobre la producción de biomasa y etanol a las 24 horas de *K. marxianus* CECT 10875. Las barras de error representan la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol = $12,6 \pm 0,6$ g/l. 100% biomasa = $3,5 \pm 0,1$ g/l).

El efecto de la presencia de los ácidos acético, fórmico y levulínico sobre la producción de biomasa y etanol de *K. marxianus* se muestra en la figura 4.6. A un pH inicial de 5,5 (pH del medio de fermentación) la producción de etanol prácticamente no se ve afectada por la presencia de estos compuestos, alcanzándose, en todos los casos producciones de etanol superiores al 90% del control, aún a la máxima concentración estudiada (10g/l).

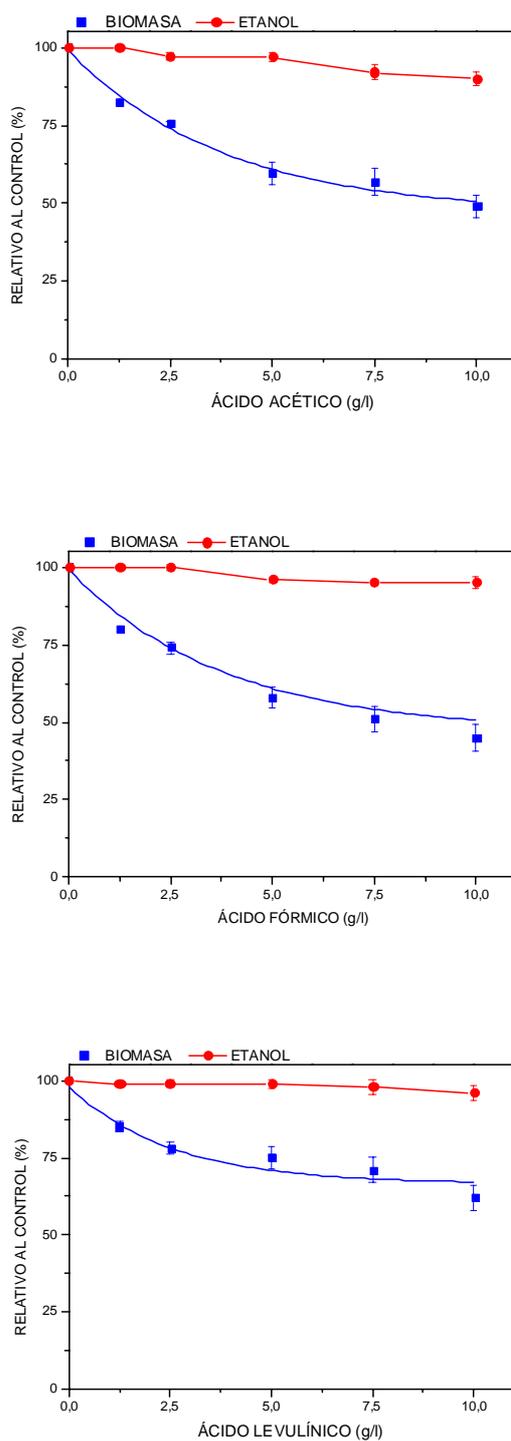


Figura 4.6.- Efecto del ácido acético (superior), fórmico (medio) y levulínico (inferior), sobre la producción de biomasa y etanol a las 24 horas por *K. marxianus*. Las barras de error representan la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol = $12,6 \pm 0,6$ g/l. 100% biomasa = $3,5 \pm 0,1$ g/l).

A pH 5,5, la presencia de ácido acético, fórmico y levulínico causa una cierta inhibición de la producción de biomasa celular. No obstante, a las concentraciones estudiadas no se produce inhibición total del crecimiento. La inhibición en la producción de biomasa por el ácido acético, fórmico y levulínico es de 48%, 55% y 38%, respectivamente.

El descenso de la producción de biomasa, cuando se añaden ácidos alifáticos al medio de fermentación ha sido descrito previamente en *S. cerevisiae* (Taherzadeh y col., 1997a). El mecanismo por el que se produce esta inhibición se basa en que la forma protonada de los ácidos penetra en la célula por difusión, disociándose en el citoplasma debido al mayor pH intracelular. Esta disociación, origina un descenso del pH intracelular que debe ser compensado por una ATPasa de membrana bombeando protones hacia el exterior mientras hidroliza ATP. La menor disponibilidad de ATP para la formación de biomasa celular conduce a la disminución en el crecimiento observada. Debido a que el mayor suministro de ATP, necesario para el bombeo de protones desde el interior de la célula hacia el exterior, se produce a costa de aumentar la fermentación, se pensó que bajas concentraciones de ácido acético podrían favorecer la producción de etanol a costa del crecimiento celular. Por ello, se realizaron experimentos añadiendo bajas concentraciones de ácidos alifáticos (1 g/l) al medio de fermentación de *K. marxianus* CECT 10875. No se observó ningún aumento en la producción de etanol con los ácidos ensayados a esta concentración (datos no mostrados).

En la tabla 4.V se muestra el efecto del ácido acético sobre la producción de etanol por algunos microorganismos citados en la bibliografía. Debido a la influencia del pH en la toxicidad de los ácidos en la tabla se ha incluido el pH al que están realizados los ensayos.

Tabla 4.V.- Efecto del ácido acético sobre la producción de etanol por algunos microorganismos citados en la bibliografía

| Tóxico | Concentración | % Inhibición | Microorganismo | pH | Referencia |
|---------|---------------|--------------|--------------------------------------|-----|---------------------------|
| Acético | 1,4 | 50 | <i>S. cerevisiae</i> | 4,5 | Pampulha y Loureiro, 1989 |
| | 4,3 | 50 | <i>S. cerevisiae</i> | 5,5 | " " |
| | 8 | 98 | <i>P. stipitis</i> | 5,1 | van Zyl y col., 1991 |
| | 8 | 25 | <i>P. stipitis</i> | 6,5 | " " |
| | 9 | 100 | <i>Z. mobilis</i> | | Ranatunga y col., 1997 |
| | 10 | 38 | <i>C. shehatae</i> | 5,6 | Delgenes y col., 1996 |
| | 10 | 69 | <i>P. stipitis</i> | 5,6 | " " |
| | 10 | 27 | <i>S. cerevisiae</i> | 5,6 | " " |
| | 10 | 0 | <i>Z. mobilis</i> | 5,6 | " " |
| | 6 | 74 | <i>S. cerevisiae</i> | 4,0 | Phowchinda y col., 1995 |
| | 10 | 95 | <i>P. stipitis</i> | 5,0 | Ferrari y col., 1992 |
| | 15 | 21 | <i>E. coli LY01</i> | 7,0 | Zaldivar e Ingram, 1999 |
| | 10 | 5 | <i>K.marxianus</i> CECT 10875 | 5,5 | |

Del análisis de los resultados obtenidos en los experimentos en presencia de cada uno de los compuestos tóxicos identificados en la fracción líquida, obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor de biomasa de chopo, podemos concluir que:

La producción de biomasa de *K. marxianus* CECT 10875 se ve más afectada que la producción de etanol en presencia de los compuestos identificados en la fracción líquida. Este efecto es más acusado en los ensayos con ácidos alifáticos (acético, fórmico y levulínico) y alcoholes aromáticos (catecol y guayacol).

De los compuestos estudiados, el catecol y 4-hidroxibenzaldehído se muestran como los más tóxicos. Concentraciones de 1,75 g/l en ambos casos inhiben totalmente la fermentación.

A las concentraciones en las que se encuentran estos compuestos en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión a vapor de biomasa de chopo a 210 °C y 4 minutos, ninguno de los compuestos identificados muestra efectos tóxicos sobre el crecimiento y la producción de etanol de *K. marxianus* CECT 10875. Por lo tanto, el efecto inhibitorio mostrado por la fracción líquida puede deberse a la existencia de otros compuestos no identificados en dicha fracción o a la actuación sinérgica de estos compuestos sobre el microorganismo.

4.2.1.1. Influencia del pH del medio de fermentación en la toxicidad de los ácidos.

Como se ha comentado anteriormente, el pH del medio de fermentación tiene un notable efecto sobre la toxicidad de los ácidos sobre el crecimiento. Por ello, se ha estudiado la influencia de 4 g/l de cada uno de los compuestos ácidos (alifáticos y aromáticos) detectados en la fracción líquida, a tres pH iniciales diferentes (4; 4,75 y 5,5). La influencia del pH inicial sobre la producción de biomasa y etanol por parte de *K. marxianus* CECT 10875 en presencia de los diferentes ácidos se muestran en la figura 4.7.

Como puede observarse, a medida que aumenta el pH la toxicidad de los ácidos sobre el metabolismo del microorganismo es menor.

A pH 4, la presencia de ácido siríngico apenas afecta la fermentación de la levadura, ya que a este pH muestra un crecimiento superior al 90% del control y una producción de etanol del 75% del control. El ácido 4-hidroxibenzoico provoca un 70% de inhibición de la producción de biomasa y etanol. La presencia en el medio de fermentación de ácido acético, fórmico, levulínico y vainíllico inhibe totalmente el crecimiento y la producción de etanol.

Cuando el pH inicial es 4,75 se observa crecimiento en todos los casos ensayados. El ácido siríngico, a este pH y esta concentración, apenas afecta al crecimiento del microorganismo. El ácido 4-hidroxibenzoico disminuye un 20% el crecimiento. La adición de ácido levulínico, fórmico acético y vainíllico, que a pH 4 inhibieron completamente el crecimiento, a pH 4,75, aunque reducen la producción de biomasa, muestra efectos menos severos. En fermentaciones en presencia de levulínico y vainíllico la producción de biomasa es el 60% y 50% de la obtenida en fermentaciones control respectivamente. El ácido acético y fórmico son los que muestran un mayor efecto sobre el crecimiento, obteniendo un 70% y 80% de inhibición de la producción de biomasa respectivamente. La producción de etanol se ve mucho menos afectada por la presencia de ácidos en el medio de fermentación y, únicamente en presencia de 4 g/l de ácido fórmico la producción de etanol se reduce un 25%.

A pH 5,5 todos los ácidos muestran menor efecto tóxico que a pH inferiores. El ácido acético y fórmico inhiben en mayor medida el crecimiento (65% del control), seguidos del ácido levulínico (76%). Los ácidos aromáticos prácticamente no muestran ningún efecto inhibitorio comparado con el control. A este pH inicial la producción de etanol no se ve afectada siendo igual a la del control para todos los ácidos estudiados.

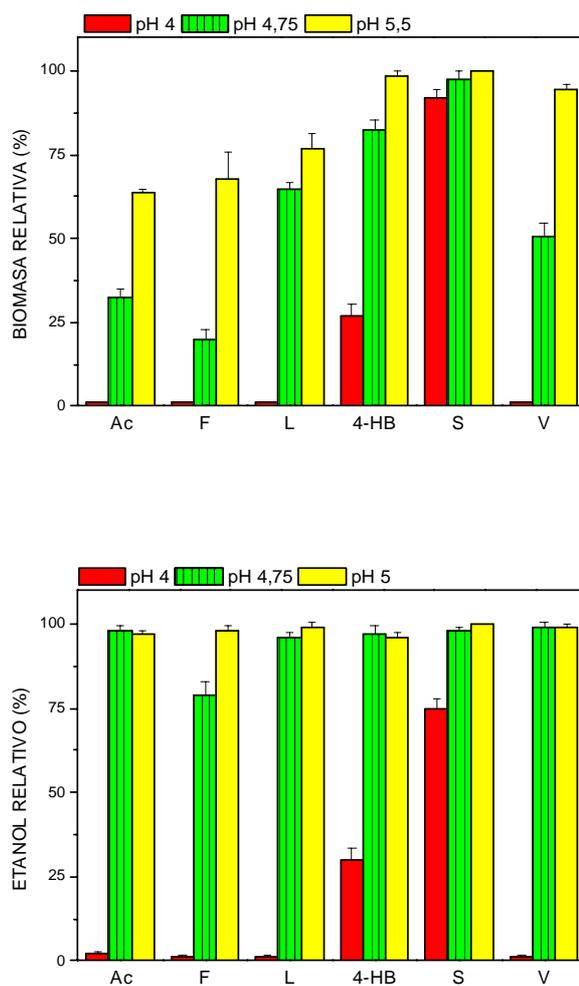


Figura 4.7.- Efecto de los ácidos identificados en la fracción líquida (Ac= acético; F= fórmico; L= levulínico; 4-HB= 4-hidroxibenzoico; S= sirínico; V= vainílico) a diferentes pH iniciales (4, 4,75 y 5) sobre la producción de biomasa (superior) y etanol (inferior) de *K. marxianus* a las 24 horas. Las barras de error representan la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol = $12,6 \pm 0,6$ g/l. 100% biomasa = $3,5 \pm 0,1$ g/l).

Del análisis de los resultados puede concluirse que, la toxicidad de los ácidos, tanto alifáticos como aromáticos, depende del pH del medio de fermentación.

Casal y col. (1996) demostraron, en *S. cerevisiae* que, la forma disociada de los ácidos no penetra en la célula. Por el contrario, la forma no disociada penetra en la célula mediante difusión (Verdyn y col., 1992). De esta forma, la toxicidad de estos

compuestos va a depender tanto de la constante de disociación del ácido (pK_a) como del pH del medio. Por lo tanto, a la hora de evaluar la toxicidad de estos compuestos se debe tener en cuenta más que la concentración total del ácido, la concentración de la forma protonada de cada ácido estudiado.

En la tabla 4.VI se muestran las constantes de disociación (pK_a), la concentración total (mM) y la concentración de la forma protonada (mM) para cada ácido a los distintos pH inicial estudiados. Las concentraciones de la forma no disociada se calculan mediante la ecuación de Hendersson-Hasselbach (González de Buitrago y col., 1982)

Tabla 4.VI.- Constantes de disociación (pK_a), concentración total y de la forma protonada (mM) de los distintos ácidos estudiados a pH 4; 4,75 y 5,5.

| Acido | pK_a | Concentración (mM) | | | |
|---------------|---------------------|--------------------|-----------------|---------|--------|
| | | Total | Forma protonada | | |
| | | | pH 4 | pH 4,75 | pH 5,5 |
| Fórmico | 3,75 ⁽¹⁾ | 87 | 31,4 | 7,9 | 1,5 |
| Acético | 4,75 ⁽¹⁾ | 67 | 57,2 | 33,5 | 1 |
| Levulínico | 4,5 ⁽²⁾ | 34,5 | 26,7 | 17,6 | 3,1 |
| Vainílico | 4,5 ⁽³⁾ | 24 | 19,1 | 9 | 2,2 |
| 4-OH-Benzoico | 4,6 ⁽³⁾ | 46 | 23,2 | 12 | 2,1 |
| Siríngico | 4,34 ⁽⁴⁾ | 20 | 13,8 | 5,7 | 1,3 |

(1) Weast, 1975-1976.

(2) Soni y col., 1982

(3) Zaldivar y col., 1999

(4) Pinto, 2002.

Aunque la concentración total del ácido fórmico es mayor que la del resto de los ácidos, a pH 4,75 y debido a su menor pK_a , la concentración de la forma no disociada es similar, e incluso menor, que la de los demás compuestos (excepto el ácido siríngico). Sin embargo, se muestra como el más inhibidor de la producción de biomasa y del etanol. La mayor toxicidad mostrada puede explicarse por el menor tamaño de la molécula, lo que facilitaría su mayor difusión a través de la membrana plasmática y

también probablemente a una mayor toxicidad del anión procedente del ácido fórmico al acumularse en el citoplasma (Larsson y col., 1999). El menor efecto inhibitorio mostrado por el ácido siríngico, podría deberse al mayor tamaño de la molécula, lo que dificultaría su difusión al interior de la célula.

4.2.1.2. Asimilación de los productos de degradación.

El análisis de los medios de cultivo en presencia de inhibidores a lo largo de la fermentación muestra que, ni los ácidos ni los alcoholes son metabolizados por la levadura, permaneciendo constante su concentración durante el curso de la fermentación. Sin embargo, en el caso de los furanos (furfural e HMF) y de los aldehídos aromáticos (vainillina, siringaldehído y 4-hidroxibenzaldehído), *K. marxianus* CECT 10875 es capaz de metabolizar dichos compuestos.

En la figura 4.8 se muestran los perfiles de asimilación de los diferentes aldehídos encontrados en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento a dos concentraciones iniciales (1 y 2 g/l).

Cuando la concentración inicial es de 1 g/l, el furfural es asimilado casi totalmente en las primeras cuatro horas, y no se detecta en el medio tras 6 horas de incubación. El HMF, siringaldehído y vainillina presentan una tasa de asimilación más lenta, no detectándose en el medio de fermentación tras 8 horas de incubación. La tasa de asimilación del 4-hidroxibenzaldehído es significativamente más lenta, y tras 8 horas de incubación su concentración en el medio es de 0,9 g/l, necesitando 24 horas para asimilarse completamente.

A una concentración inicial de 2 g/l, el furfural y HMF presentan una tasa de asimilación similar, desapareciendo completamente del medio a las 8 horas de fermentación. La vainillina y el siringaldehído muestran un periodo de asimilación más largo ya que son necesarias 16 horas para su desaparición total del medio. En el caso del 4-hidroxibenzaldehído, *K. marxianus* CECT 10875 sólo es capaz de asimilar un 30%, permaneciendo en el medio una concentración de 1,4 g/l tras 24 horas de incubación

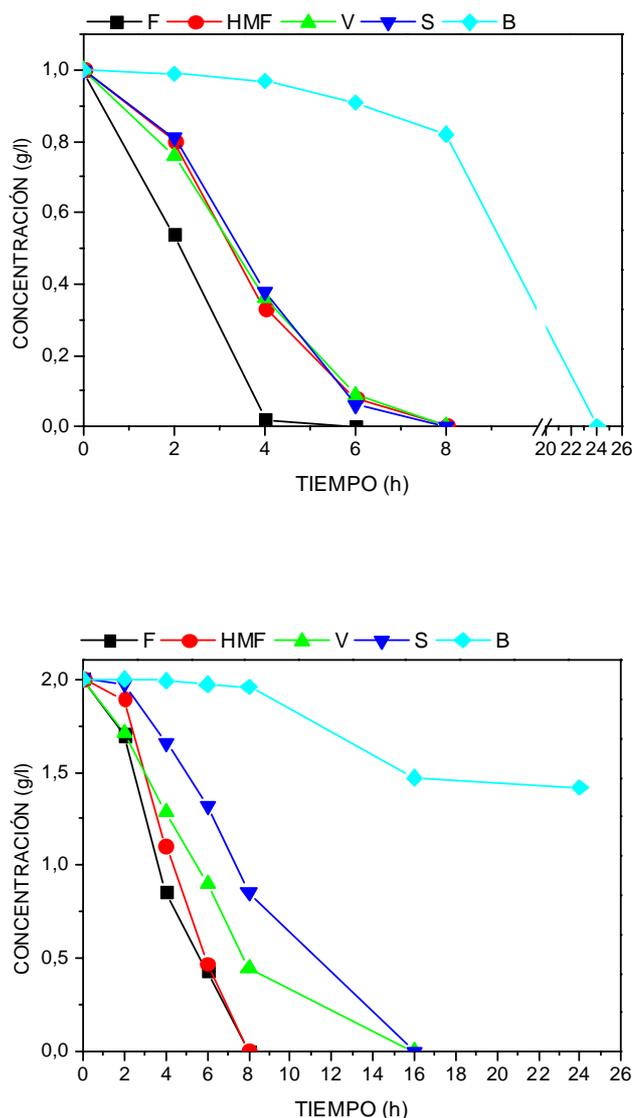


Figura 4.8.- Perfiles de asimilación de los aldehídos, encontrados en la fracción líquida obtenida tras la explosión por vapor de biomasa de chopo, por *K. marxianus* CECT 10875. (F = furfural; HMF = hidroximetilfurfural; V = vainillina; S = siringaldehído; B = 4-hidroxibenzaldehído) (superior 1 g/l; inferior 2 g/l).

La asimilación de furanos (Villa, 1992; Palmqvist, y col 1999; Taherzadeh y col., 2000; Martín y col., 2003), y de aldehídos aromáticos (De Wulf y col., 1986; Nishikawa y col., 1988; Weigert y col., 1988; Delgenes y col., 1996; Larsson y col., 2000) ha sido previamente observada por otros autores, tanto en levaduras como en bacterias. *K. marxianus* CECT 10875 asimila estos compuestos más rápidamente que otros microorganismos descritos en la bibliografía, como por ejemplo, *Klebsiella*

pneumoniae, que necesita un periodo de 2 días para asimilar completamente una concentración inicial de 0,6 g/l de vainillina (Nishikawa y col., 1988). Análogamente, Delgenes y col., (1996) utilizando *S. cerevisiae* muestran periodos de 24 y 30 horas para la completa asimilación de 2 g/l de furfural y vainillina respectivamente. *K. marxianus* CECT 10875 requirió solamente 8 y 16 horas para asimilar completamente esa misma concentración inicial de furfural y vainillina respectivamente.

El furfural es el aldehído que se encuentra en mayor concentración en la fracción líquida obtenida tras la explosión por vapor de madera de chopo (tabla 4.II). Por ello, se ha realizado un estudio más detallado de la asimilación de este compuesto, utilizando un rango de concentración entre 0,5 g/l y 4 g/l.

Los perfiles de asimilación de diferentes concentraciones iniciales de furfural se muestran en la figura 4.9.

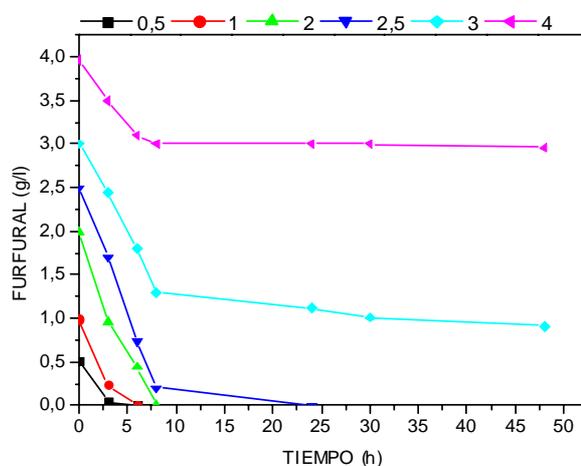


Figura 4.9.- Perfiles de asimilación de diferentes concentraciones iniciales de furfural por *K. marxianus* CECT 10875.

Como puede observarse, la cepa de *K. marxianus* asimila concentraciones inferiores a 2,5 g/l de furfural en menos de 24 horas. Cuando la concentración inicial aumenta a 3 g/l se produce una rápida asimilación durante las primera 8 horas (a este tiempo la concentración en el medio de furfural es de 1,3 g/l), sufriendo una brusca

ralentización a partir de este momento. De esta forma, a las 24 horas se detecta en el medio una concentración de 1,25 g/l, que permanece prácticamente constante hasta el final de la fermentación. *K. marxianus* CECT 10875 es incapaz de asimilar totalmente una concentración inicial de este aldehído superior a 3 g/l, que como se ha visto anteriormente (figura 4.2), inhibe totalmente la fermentación.

4.2.1.3. Efecto de los aldehídos sobre la fermentación de glucosa.

Debido a la capacidad de *K. marxianus* CECT 10875 de asimilar furanos y aldehídos aromáticos se ha estudiado la fermentación de glucosa por el microorganismo en presencia de estos compuestos. Para ello, se realizaron fermentaciones de glucosa a las que se añadieron individualmente 2 g/l de furfural, vainillina y siringaldehído y de 1 g/l de 4-hidroxibenzaldehído. Las concentraciones iniciales de aldehídos fueron elegidas basándose en aquellas concentraciones máximas que, según las curvas dosis-respuesta, permitían alcanzar una concentración final de etanol cercana al 90% de las fermentaciones control (figuras 4.3 y 4.4).

En el caso del furfural (figura 4.10), se observa una rápida asimilación del aldehído y, tras 8 horas de incubación, no se detecta en el medio de fermentación. Simultáneamente a la desaparición del furfural, aparece en el medio alcohol fufurílico cuya concentración a las 8 horas es 1,94 g/l. La reducción de furfural a alcohol fufurílico al comienzo de la fermentación ha sido observada en levaduras por varios autores (Villa, 1992; Palmqvist y col., 1999b; Taherzadeh y col., 2000b). Esta reducción parece estar catalizada por una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH (Weigert y col., 1988). Coincidiendo con la desaparición del furfural del medio, se inicia el crecimiento y la producción de etanol, alcanzándose a las 20 horas una producción de 3,2 g/l de biomasa celular y 12,3 g/l de etanol. Tanto la producción de biomasa como la producción de etanol al final de la fermentación son semejantes a las de fermentaciones control (3,5 g/l y 12,6 g/l respectivamente).

Como puede observarse del análisis de los resultados, aunque una concentración inicial de 2 g/l de furfural no tiene efecto sobre el rendimiento final en etanol, se produce un alargamiento de la fase lag y una disminución de la productividad volumétrica máxima. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en

cultivos de *S. cerevisiae* (Navarro, 1994; Palmqvist y col., 1999b; Martín y col., 2003). El alcohol furfurílico ha sido el único producto identificado como consecuencia del metabolismo del furfural de *K. marxianus* CECT 10875. Otros autores (Taherzadeh y col., 1999; Taherzadeh, 1999) en fermentaciones con *S. cerevisiae* en presencia de furfural, identificaron además de alcohol furfurílico como producto mayoritario, otros productos minoritarios como el ácido furoico y un producto resultante de la condensación de furfural y piruvato.

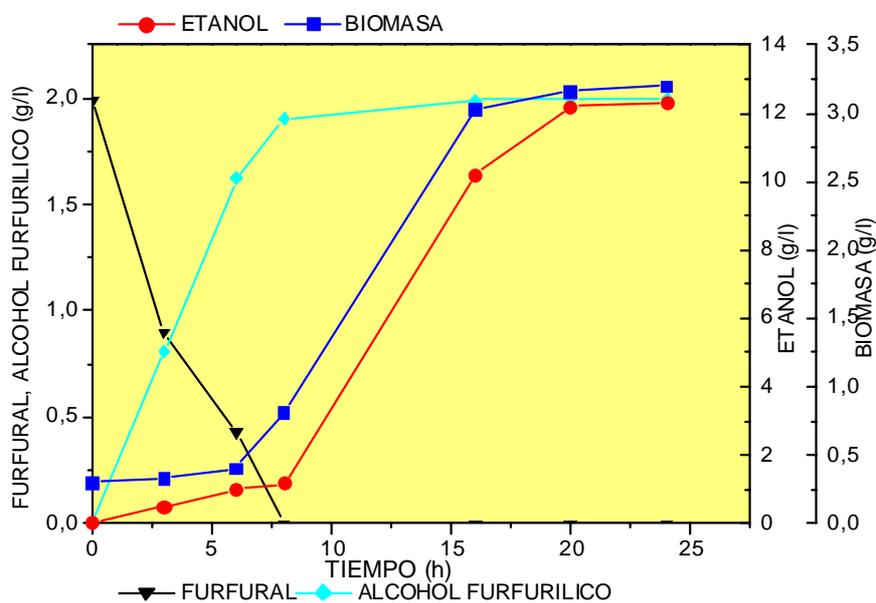


Figura 4.10.- Perfil de fermentación de glucosa de *K. marxianus* CECT 10875 en presencia de una concentración inicial de 2 g/l de furfural.

Los perfiles de fermentación de glucosa de *K. marxianus* CECT 10875 en presencia de vainillina y siringaldehído se muestran en la figura 4.11.

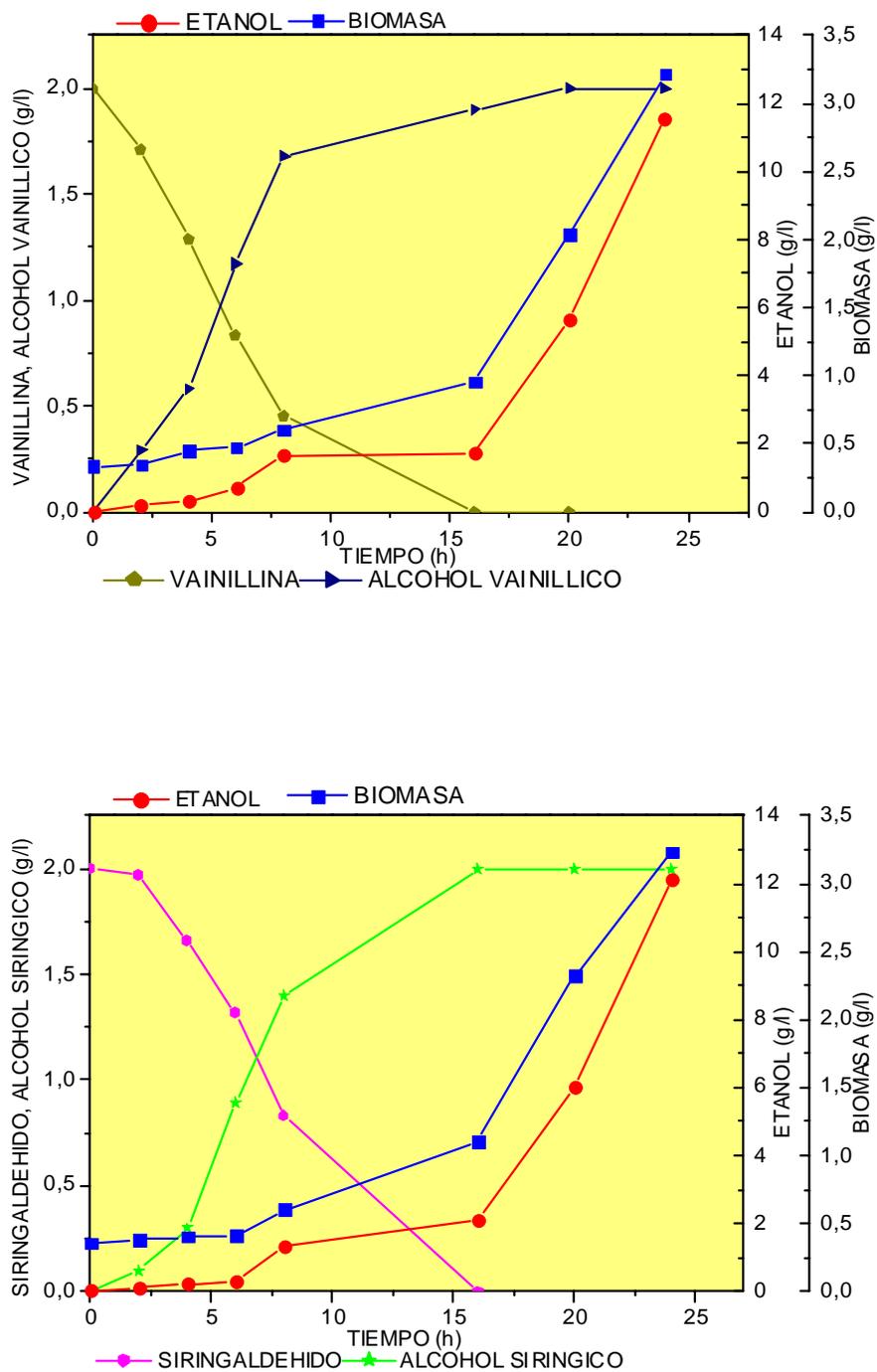


Figura 4.11.- Perfiles de fermentación de glucosa de *K. marxianus* CECT 10875 en presencia de una concentración inicial de 2 g/l de vainillina (superior) y siringaldehído (inferior).

Ambos compuestos muestran un perfil similar, con una fase lag de aproximadamente 16 horas, durante la cual se produce la reducción del aldehído a su correspondiente alcohol. Como en el caso del furfural, es necesaria la asimilación total de la vainillina y el siringaldehído para que se inicie el crecimiento y la producción de etanol. La producción máxima de etanol se alcanza a las 24 horas siendo de 11,5 g/l en el caso de la vainillina y de 12,1 g/l en el caso del siringaldehído. La producción final de biomasa es de 3,2 g/l en ambos experimentos. La presencia de una concentración inicial de 2 g/l de vainillina y siringaldehído origina una ligera disminución del rendimiento en etanol, un alargamiento de la fase lag y una disminución de la productividad volumétrica máxima.

Aunque Nishikawa y col. (1988) identificaron alcohol vainílico y veratrol como productos del metabolismo de la vainillina por *K. pneumoniae*, así como varios productos no identificados cuyo origen podría estar en la autocondensación de estos compuestos, el único producto resultante del metabolismo de la vainillina por *K. marxianus* CECT 10875 es su correspondiente alcohol (alcohol vainílico), (figura 4.12). La concentración de alcohol vainílico al final de la fermentación es similar a la concentración inicial del aldehído. La conversión de vainillina a alcohol vainílico ha sido observada previamente por otros autores tanto en bacterias como en levaduras (Nishikawa y col., 1988; Buchert y Niemela, 1991; Larsson y col., 2000). De Wulf y col. (1986) sugirieron que la reducción a alcohol vainílico no está catalizada por una alcohol deshidrogenasa como en el caso del furfural, sino por una oxido reductasa inducida por vainillina.

Como ocurre con el furfural y vainillina, como consecuencia del metabolismo del siringaldehído, sólo se ha detectado su correspondiente alcohol (alcohol siríngico). Nishikawa y col.(1988), en medios de fermentación a los que se había añadido siringaldehído, detectaron una cantidad de productos menores, como consecuencia del metabolismo de *K. pneumoniae*, que no se han detectado en el metabolismo de *K. marxianus* CECT 10875.

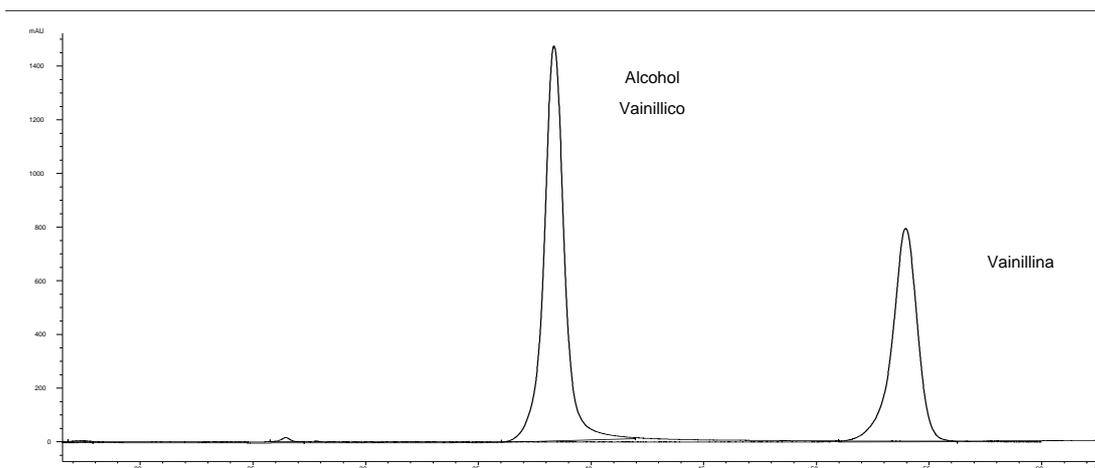


Figura 4.12.- Cromatograma de la evolución de 2 g/l de vainillina durante la fermentación de *K. marxianus* CECT 10875.

(—) Comienzo de la fermentación ($\lambda = 280$ nm).

(---) 24 horas de fermentación ($\lambda = 200$ nm).

En la figura 4.13 se muestra el perfil de fermentación de glucosa de *K. marxianus* CECT 10875 en presencia de una concentración inicial de 1 g/l de 4-hidroxibenzaldehído. En este caso se ha ensayado una concentración inferior a la del resto de los aldehídos ya que, como se vió anteriormente (figura 4.3), una concentración inicial de 2 g/l es demasiado tóxica para este microorganismo, produciendo una inhibición total de la fermentación. Como puede observarse, la asimilación del 4-hidroxibenzaldehído es mucho más lenta que la de los aldehídos estudiados anteriormente. Durante las primeras 8 horas de incubación la concentración del aldehído permanece prácticamente constante. A partir de este momento empieza a asimilarse necesitando un periodo de 24 horas para la desaparición total del compuesto en el medio de fermentación. En este caso, aunque la concentración final de etanol es similar a los anteriores (11,9 g/l), la productividad volumétrica se ve más afectada, ya que el máximo de etanol se alcanza tras un periodo de fermentación de 30 horas. La producción de biomasa al final de la fermentación (2,1 g/l) se reduce en un 40% respecto a la fermentación control (3,6g/l). A diferencia de las fermentaciones anteriormente ensayadas, en presencia de los otros aldehídos, se detectan dos compuestos como consecuencia del metabolismo del 4-hidroxibenzaldehído. Así, aunque se produce una completa asimilación del aldehído, no hay, como en los casos

anteriores, una reducción total a su correspondiente alcohol. La concentración a las 24 horas del alcohol 4-hidroxibencílico es 0,76 g/l. Se ha detectado en los cromatogramas un pico correspondiente a otro compuesto que no ha podido ser identificado. El compuesto no identificado se resalta con un (1) en el cromatograma mostrado en la figura 4.14.

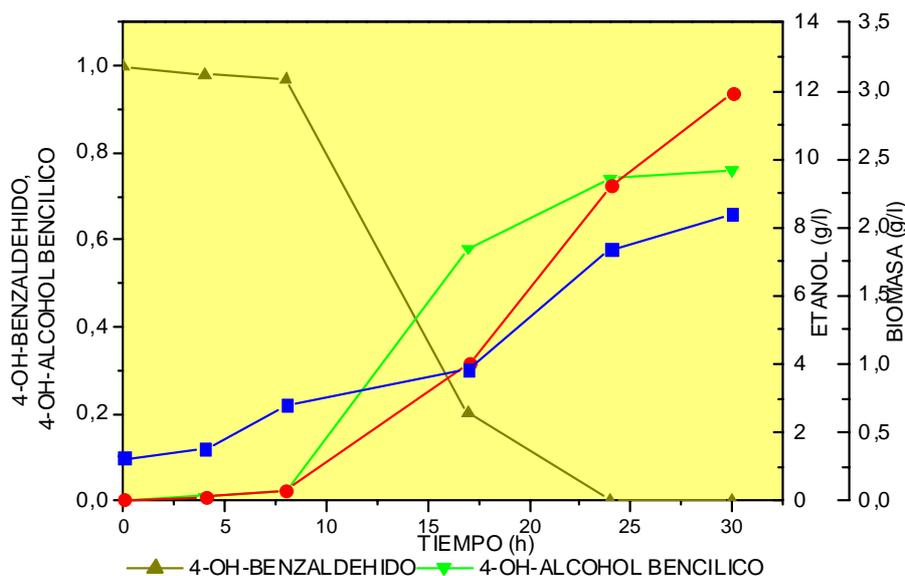


Figura 4.13.- Perfil de fermentación de glucosa de *K. marxianus* CECT 10875 en presencia de una concentración inicial de 1g/l de 4-hidroxibenzaldehído.

Del análisis de los resultados se observa que, la presencia de furfural y aldehídos aromáticos en los medios de fermentación de *K. marxianus* CECT 10875, produce un retraso en el crecimiento y la producción de etanol. La duración de este retraso depende del compuesto presente en el medio, durante la cual se produce la reducción de los aldehídos a sus correspondientes alcoholes, siendo necesaria la desaparición total del aldehído del medio de fermentación para que comience la producción de biomasa y etanol.

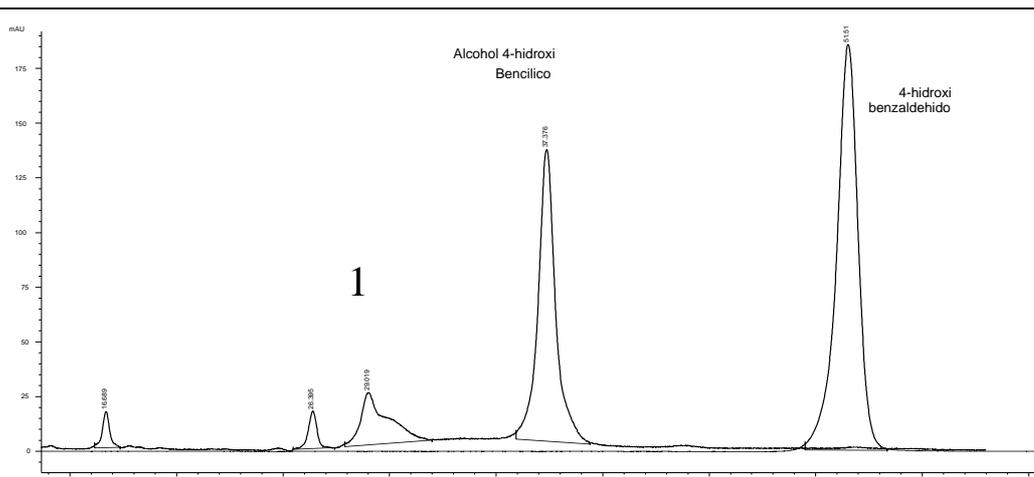


Figura 4.14.- Cromatograma de la evolución de 1 g/l de 4-hidroxibenzaldehído durante la fermentación de *K. marxianus* CECT 10875.

(—) Comienzo de la fermentación ($\lambda = 280$ nm).

(---) 24 horas de fermentación ($\lambda = 200$ nm).

4.2.2. Efecto de combinaciones binarias de catecol y aldehídos sobre la producción de biomasa y etanol por *K. marxianus* CECT 10875.

Como se ha visto anteriormente (apartado 4.2.1) ninguno de los compuestos de degradación del material lignocelulósico presentes en la fracción líquida, obtenida tras la explosión por vapor de biomasa de chopo, puede explicar por sí mismo los efectos inhibitorios sobre la producción de biomasa y etanol de *K. marxianus* CECT 10875. Los resultados parecen indicar que el efecto tóxico se debe más, a la suma de los efectos de los compuestos que a la acción de un único compuesto. Por ello, se estudió el efecto de la combinación binaria de alguno de los compuestos presentes en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento, sobre la producción de biomasa y etanol de *K. marxianus* CECT 10875. Los compuestos ensayados (furanos, aldehídos aromáticos y catecol) han sido seleccionados teniendo en cuenta, tanto su grado de toxicidad como su concentración en la fracción líquida. El catecol es el compuesto más tóxico de todos los estudiados, ya que 1 g/l inhibe más del 50% de la producción de biomasa cuando se compara con una fermentación control (figura 4.4). El furfural ha sido seleccionado considerando además de su toxicidad, su concentración, dado que al ser un hidrolizado procedente de maderas duras, es el principal compuesto de degradación de los azúcares

hemicelulósicos. El resto de los compuestos ensayados son todos los aldehídos identificados en la fracción líquida (4-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído e hidroximetilfurfural), ya que como grupo es el que presenta una mayor toxicidad (Zaldivar y col., 1999).

4.2.2.1. Efecto de combinaciones binarias a una concentración inicial de 0,5 g/l.

La producción de biomasa y etanol a las 24 horas de *K. marxianus* CECT 10875, en presencia de combinaciones binarias de furanos, aldehídos aromáticos y catecol a una concentración inicial de cada compuesto de 0,5 g/l se muestra en la figura 4.15.

Se eligió esta concentración inicial de 0,5 g/l ya que no producía efectos inhibitorios destacables, ni sobre la producción de biomasa, ni sobre la producción de etanol cuando se ensayaron individualmente a esa concentración (figuras 4.3; 4.4 y 4.5).

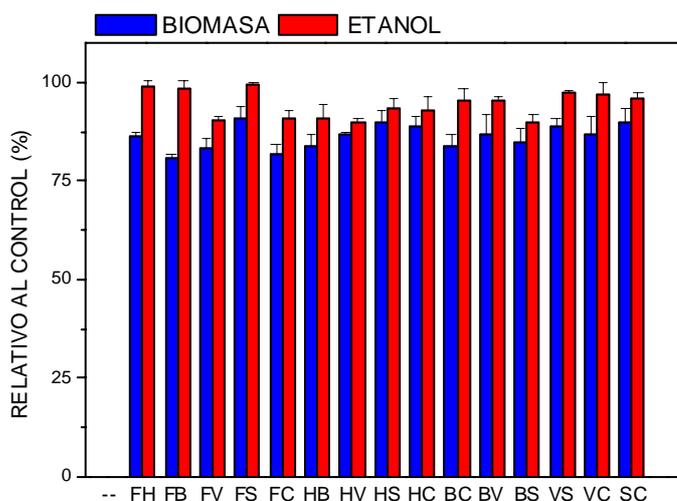


Figura 4.15.- Efecto de las combinaciones binarias a una concentración inicial de 0,5 g/l de furfural (F), hidroximetilfurfural (H), 4-hidroxibenzaldehído (B), vainillina (V), siringaldehído (S) y catecol (C) sobre la producción de biomasa y etanol a las 24 horas de *K. marxianus* CECT 10875. Las barras de error representan la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control sin adición de compuestos tóxicos (100% etanol = $12,6 \pm 0,6$ g/l. 100% biomasa = $3,5 \pm 0,1$ g/l).

Al igual que ocurría en los experimentos que contenían los compuestos de modo individual, la producción de biomasa se ve más afectada que la producción de etanol en todos los casos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Martín y col. (2003) en cultivos de *S. cerevisiae* en presencia de varios compuestos tóxicos.

Aunque se produce una ligera disminución de la producción de biomasa cuando se añaden conjuntamente estos compuestos, comparado con el efecto de la adición individual de 0,5 g/l al medio de fermentación (apartado 4.2.1), ninguna combinación inhibe el crecimiento de manera significativa; obteniéndose en todos los casos crecimientos por encima del 80% del control. La combinación que debería mostrar el grado de inhibición más alto, teniendo en cuenta la toxicidad mostrada por estos compuestos individualmente, es la combinación conjunta de catecol y 4-hidroxibenzaldehído. Sin embargo, no se observa un efecto sumativo en estos ensayos. La producción de etanol, en todas las combinaciones, alcanza rendimientos superiores al 90% del obtenido en las fermentaciones control.

4.2.2.2. Efecto de combinaciones binarias a una concentración inicial de 1 g/l.

Con objeto de evaluar los efectos de las combinaciones binarias de los aldehídos y el catecol se realizaron ensayos utilizando concentraciones iniciales de cada compuesto de 1 g/l. Se excluyen del estudio el siringaldehído y el HMF, ya que, dentro del grupo de los aldehídos se han mostrado como los menos tóxicos para el microorganismo en las fermentaciones en las que se añadían individualmente.

En la figura 4.16 se muestran los efectos sobre la producción de biomasa y etanol a las 24 y 48 horas, de la combinación binaria de los aldehídos seleccionados y el catecol, a una concentración inicial de cada compuesto de 1 g/l.

A las 24 horas de incubación, sólo se observa crecimiento en dos de las combinaciones estudiadas: furfural-vainillina (FV) y catecol-furfural (CF). La combinación FV es la menos tóxica, ya que prácticamente no tiene ningun efecto sobre la producción de biomasa (95% de control). La combinación CF muestra un crecimiento del 30% respecto al control. Aumentando el tiempo de incubación a 48 horas no se

observa prácticamente diferencia en el crecimiento con las dos combinaciones anteriores. Sin embargo, dos combinaciones que no presentan crecimiento a las 24 horas, 4-hidroxibenzaldehído-furfural (BF) y catecol-vainillina (CV), muestran una producción de biomasa del 51% y 42% del control respectivamente tras 48 horas de incubación. En el resto de combinaciones no se observa crecimiento a las 48 horas.

La producción de etanol a las 24 horas en las combinaciones FV y CF es del 96% y 37% respecto al control. Tras 48 horas de fermentación, la combinación FV no muestra diferencias en la producción de etanol, mientras que en la combinación CF se alcanza una producción cercana al 75% del control. Destaca la combinación BF que, a las 24 horas no muestra producción de etanol y tras 48 horas de fermentación alcanza una producción del 87% del control. Un hecho similar ocurre en la combinación CV, cuya producción de etanol a las 48 horas es del 52% del control. La combinación del 4-hidroxibenzaldehído con el catecol (BC) y con la vainillina (BV) se muestra como muy tóxica, ya que tras 48 horas de incubación no se observa crecimiento ni producción de etanol.

Conjuntamente con el estudio del efecto de la adición de las combinaciones binarias de estos compuestos sobre el crecimiento y producción de etanol del microorganismo se estudió la asimilación de los compuestos tóxicos por *K. marxianus* CECT 10875. Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura 4.17.

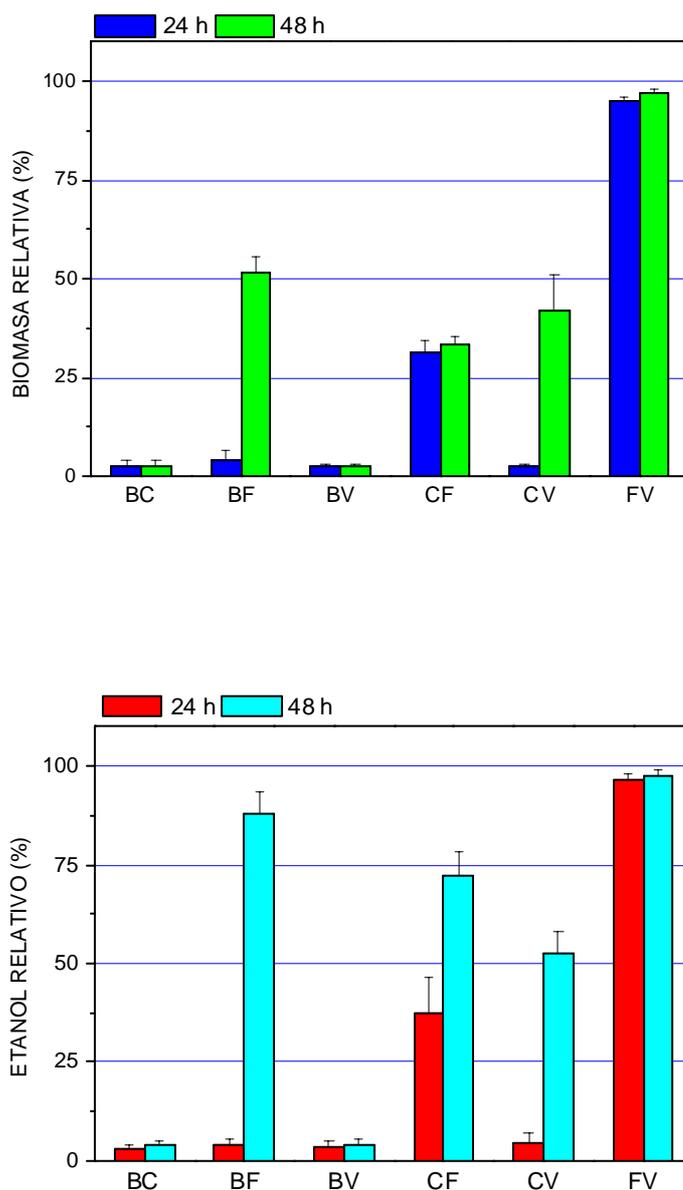


Figura 4.16.- Efecto de las combinaciones binarias, sobre la producción de biomasa y etanol de *K. marxianus* CECT 10875 a las 24 y 48 horas, de furfural (F), vainillina (V), 4-hidroxibenzaldehído (B) y catecol (C) en una concentración inicial de cada compuesto de 1 g/l. Las barras de error representan la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol = $12,6 \pm 0,6$ g/l. 100% biomasa = $3,5 \pm 0,1$ g/l).

La evolución de la combinación furfural-vainillina (FV) se muestra en la figura 4.17.A. Ambos compuestos parecen asimilarse de manera simultánea, aunque con una tasa de asimilación diferente; siendo necesaria la asimilación completa de ambos aldehídos para que se observe producción de biomasa y etanol (figura 4.16). La asimilación simultánea de aldehídos ha sido también descrita previamente en *S. cerevisiae* por otros autores (Martín, y col., 2003).

El furfural es completamente asimilado en las 8 primeras horas de fermentación, mientras que la vainillina presenta una tasa de asimilación más lenta; tardando 16 horas en desaparecer completamente del medio. Como se describió en el apartado 4.2.1.2, los tiempos necesarios para que *K. marxianus* CECT 10875 asimile completamente 1 g/l de furfural y vainillina, cuando se añaden individualmente al medio de fermentación son de 6 y 8 horas respectivamente. De esta forma, la presencia conjunta de ambos compuestos en el medio de fermentación origina un retraso en su asimilación. Por lo tanto, las tasas de asimilación son más lentas cuando se incuban conjuntamente que cuando se ensaya la asimilación de los compuestos individualmente. Ambos compuestos son reducidos a sus respectivos alcoholes, siendo las concentraciones finales de 0,97 g/l para el alcohol furfurílico y 0,98 g/l para el alcohol vainílico.

En la figura 4.17.B se muestra la evolución de la combinación catecol-furfural (CF). Como puede observarse, el catecol no es asimilado por el microorganismo, permaneciendo su concentración constante durante el curso de la fermentación. La presencia del catecol en el medio retrasa sensiblemente la tasa de asimilación del furfural. Así, en presencia de catecol, a las 8 horas de incubación hay una concentración en el medio de fermentación de furfural de 0,67 g/l, no detectándose en el medio tras 24 horas de incubación. Cuando se añade de manera individual 1 g/l de furfural se asimila en 6 horas (figura 4.8). El único producto detectado como consecuencia del metabolismo del furfural ha sido el alcohol furfurílico siendo su concentración de 0,95 g/l a las 48 horas de fermentación.

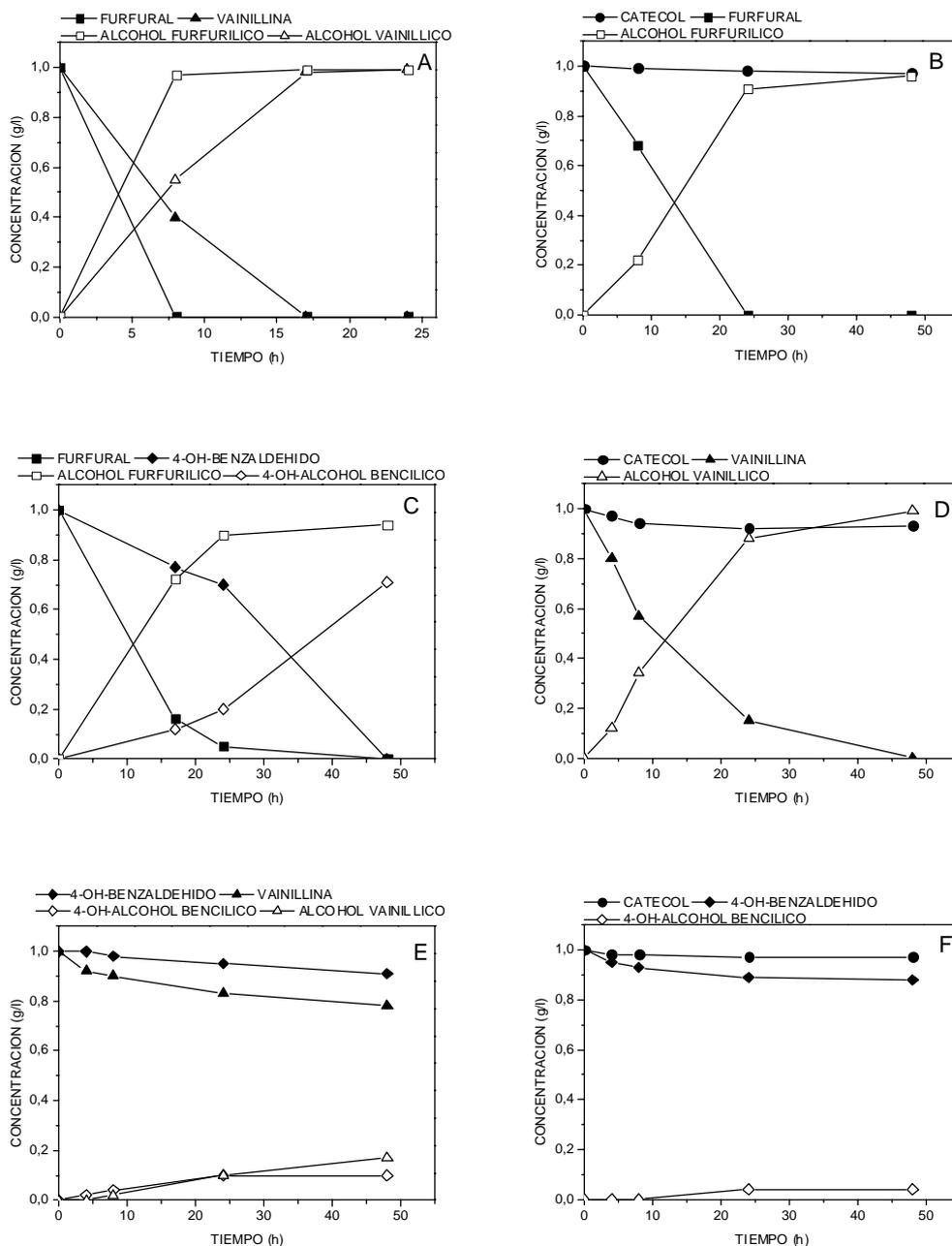


Figura 4.17.- Evolución de la concentración de las combinaciones binarias de 1 g/l de cada compuesto durante la fermentación de *K marxianus* CECT 10875.

Los perfiles de asimilación de la combinación furfural-4-hidroxibenzaldehído (FB), se muestran en la figura 4.17.C. La presencia del 4-hidroxibenzaldehído retarda la asimilación del furfural. Son necesarias más de 24 horas para asimilarse completamente frente a las 6 horas que tarda en asimilarse 1 g/l de furfural añadido de manera individual. A las 24 horas de fermentación aunque la concentración de furfural es muy

baja (menos de 0,05 g/l), la presencia del 4-hidroxibenzaldehído inhibe el crecimiento y la producción de etanol (figura 4.16). Es necesaria la asimilación de ambos compuestos para el crecimiento y la producción de etanol. De esta forma, a las 48 horas, cuando ambos aldehídos han sido completamente asimilados, se obtiene un 51% de crecimiento y un 87% de producción de etanol respecto a las fermentaciones control (figura 4.16). El furfural es completamente reducido a alcohol furfurílico (0,96 g/l a las 48 horas), mientras que el 4-hidroxibenzaldehído sólo es parcialmente reducido a alcohol 4-hidroxibencílico (0,7 g/l a las 48 horas). Al igual que ocurre en las fermentaciones en las que se añade individualmente el 4-hidroxibenzaldehído (apartado 4.2.1.3), aunque se produce una completa asimilación del aldehído, además del alcohol correspondiente, aparece otro compuesto en el cromatograma que no ha podido ser identificado.

En las fermentaciones en las que se combina catecol y vainillina (CV) (figura 4.17.D), la presencia de catecol origina un retraso en la asimilación de la vainillina. A las 24 horas su concentración en el medio es de 0,15 g/l, mientras que cuando se añade 1 g/l individualmente al medio de fermentación se asimila totalmente en 8 horas (figura 4.8). A las 24 horas de fermentación no se observa ni crecimiento ni producción de etanol (figura 4.16). A las 48 horas no se detecta vainillina, ya que ha sido reducida a alcohol vainílico, alcanzándose una producción de etanol del 52% del control (figura 4.16). Aunque se observa crecimiento y producción de etanol a las 48 horas, se producen efectos inhibitorios (50%) que no pueden explicarse por la acción individual de cada uno de los compuestos; puesto que 1 g/l de vainillina no causa inhibición de la fermentación (figura 4.4) y 1 g/l de catecol (figura 4.5) reduce la producción de etanol únicamente un 25%.

Las combinaciones de 4-hidroxibenzaldehído con vainillina (BV) y con el catecol (BC) son las que presentan un mayor efecto tóxico combinado. Cuando se añaden los aldehídos de manera individual ambos son asimilados por el microorganismo y, tras una fase lag más o menos larga, se observa crecimiento y producción de etanol. Cuando se añaden conjuntamente al medio de cultivo, se inhibe la asimilación de ambos compuestos y, sólo una pequeña cantidad de 4-hidroxibenzaldehído (0,2 g/l) y de vainillina (0,8 g/l), son metabolizados tras 48 horas de fermentación (figura 4.17.E). La combinación catecol-4-hidroxibenzaldehído también inhibe la asimilación del aldehído (figura 4.17.F). La presencia de aldehídos en el medio de fermentación a las 48 horas en

ambos casos impide la producción de biomasa y etanol (figura 4.16). El hecho de que no se observe producción de etanol hasta que se produce la asimilación completa de los aldehídos presentes en el medio, concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en el estudio de los efectos de los aldehídos añadidos individualmente sobre *K. marxianus* CECT 10875.

De los resultados anteriores se puede concluir que, en combinaciones binarias a concentraciones iniciales de cada compuesto de 1 g/l, el 4-hidroxibenzaldehído se muestra como el compuesto más tóxico ya que, excepto cuando se combina con el furfural, produce inhibición total del crecimiento y producción de etanol. Probablemente el mayor efecto inhibitorio de este compuesto se deba a que, al tener una tasa de asimilación más lenta que el resto de los aldehídos estudiados, permanece más tiempo en el medio de fermentación por lo que sus efectos tóxicos sobre el microorganismo son más prolongados.

4.2.2.3. Estudio de efectos sinérgicos de las combinaciones binarias de catecol, vainillina, furfural y 4-hidroxibenzaldehído.

Con objeto de identificar los posibles efectos sinérgicos que pueden producirse por la combinación de los distintos compuestos generados durante el pretratamiento de madera de chopo sobre el crecimiento de *K. marxianus* CECT 10875 se ensayaron combinaciones binarias de furfural, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina y catecol. Cada compuesto se añadió a la concentración necesaria para inhibir el crecimiento aproximadamente un 25% respecto al control a las 24 horas (tabla 4.VII). De esta manera, una inhibición superior al 50% puede considerarse debida a la sinergia de las combinaciones de estos compuestos.

Tabla 4.VII.- Concentraciones necesarias para inhibir un 25% del crecimiento a las 24 horas de *K. marxianus* CECT 10875.

| Compuesto | Concentración (g/l) |
|-----------------------|---------------------|
| 4-hidroxibenzaldehído | 0,75 |
| Catecol | 0,75 |
| Vainillina | 2 |
| Furfural | 2 |

El efecto de las combinaciones binarias de los compuestos tóxicos estudiados a las concentraciones ensayadas, sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* CECT 10875 a las 24 y 48 horas se muestra en la figura 4.18.

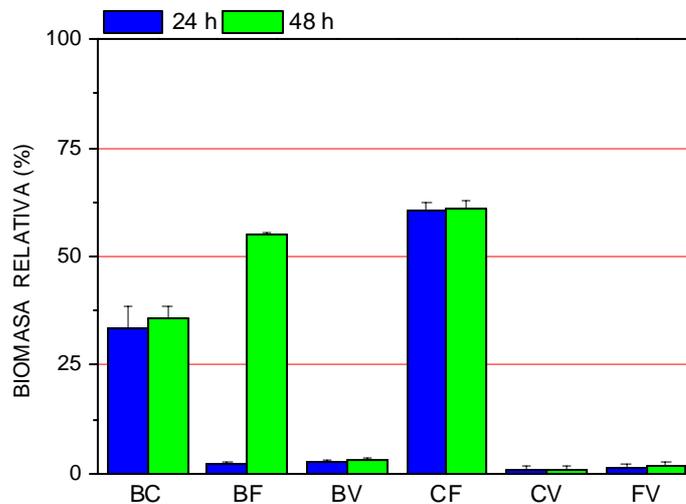


Figura 4.18.- Efecto de las combinaciones binarias de furfural (F), vainillina (V), 4-hidroxibenzaldehído (B) y catecol (C) sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* CECT 10875 a las 24 y 48 horas. Las concentraciones empleadas para compuesto son las que causan un 25% de inhibición de crecimiento. Las barras de error representan la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% biomasa = $3,5 \pm 0,1$ g/l).

Como puede observarse, a las 24 horas sólo hay crecimiento en dos de las combinaciones ensayadas: CF (60% del control) y BC (33% del control). No hay variación la biomasa celular a las 48 horas, excepto en la combinación BF en la que, no se observó crecimiento a las 24 horas, mientras que a las 48 horas se alcanzan valores del 54% del control. En las combinaciones CF y BF los efectos inhibitorios de ambos compuestos son acumulativos, causando aproximadamente 50% de inhibición del crecimiento. En el resto de las combinaciones ensayadas (BC, BV, CV y FV) se produce un efecto sinérgico sobre el crecimiento, es decir el efecto conjunto de los compuestos es superior a la suma de sus efectos individuales y la inhibición del crecimiento es superior al 50%. Sorprendentemente la vainillina, que al añadirla individualmente al medio de fermentación (2 g/l) muestra efectos tóxicos similares a los del resto de compuestos ensayados, cuando se combina, en esta concentración, con el furfural, 4-hidroxibenzaldehído y catecol es el único compuesto que produce inhibición total del crecimiento a las 48 horas. Por el contrario, el furfural que al añadirlo individualmente al medio de fermentación muestra un grado de inhibición semejante a la vainillina (figura 4.3), cuando se combina es menos tóxico. A diferencia de los resultados obtenidos en *E. coli* por Zaldivar y col. (1999), en los que el furfural mostraba efectos sinérgicos al combinarlo con otros aldehídos como la vainillina y el 4-hidroxibenzaldehído, *K. marxianus* CECT 10875 muestra mayor resistencia al furfural. Por el contrario, la vainillina es el compuesto más tóxico para *K. marxianus*, en combinación con los otros compuestos ensayados.

Los efectos de las combinaciones de los compuestos tóxicos, sobre la producción de etanol a las 24 y 48 horas, se muestran en la figura 4.19. Sólo en las combinaciones CF y BC se observan producción de etanol a las 24 horas. La combinación CF es la que presenta menor toxicidad, alcanzando una producción de etanol del 86% y 93% del control a las 24 y 48 horas respectivamente. La producción de etanol en la combinación BC es el 69% y 88% del control a las 24 y 48 horas respectivamente. En la combinación BF, aunque a las 24 horas no se observa producción de etanol, se alcanza un porcentaje del 83% del control a las 48 horas. En el resto de las combinaciones no se observa producción de etanol ni a las 24 ni a las 48 horas.

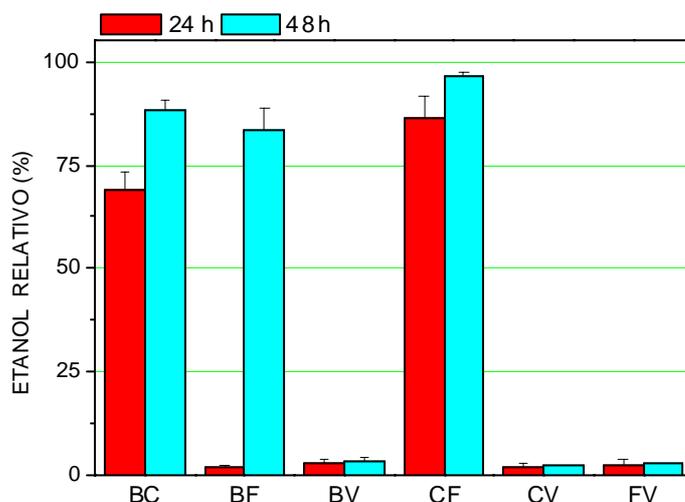


Figura 4.19.- Efecto de las combinaciones binarias de furfural (F), vainillina (V), 4-hidroxibenzaldehído (B) y catecol (C) sobre la producción de etanol de *K. marxianus* CECT 10875 a las 24 y 48 horas. Las concentraciones empleadas para compuesto son a las que causan un 25% de inhibición de crecimiento. Las barras de error representan la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol = $12,6 \pm 0,6$ g/l).

Los perfiles de asimilación de las combinaciones binarias de los compuestos tóxicos, a las concentraciones que individualmente inhiben un 25% de la producción de biomasa, se muestran en la figura 4.20.

En la combinación CF (figura 4.20.A), la presencia de una concentración inicial de 0,75 g/l de catecol parece no afectar a la tasa de asimilación del furfural, ya que, como ocurre en las incubaciones que sólo contienen furfural (figura 4.8) este compuesto es asimilado completamente por el microorganismo en las primeras 8 horas. El furfural es reducido a alcohol furfúrico, siendo su concentración de 1,8 g/l a las 8 horas y de 1,94 a las 24 horas. Como se esperaba, el microorganismo no asimila el catecol, y su concentración no varía en el curso de la fermentación. La rápida asimilación de furfural tiene como consecuencia la alta producción de etanol obtenida en esta fermentación (86% del control) a las 24 horas (figura 4.19).

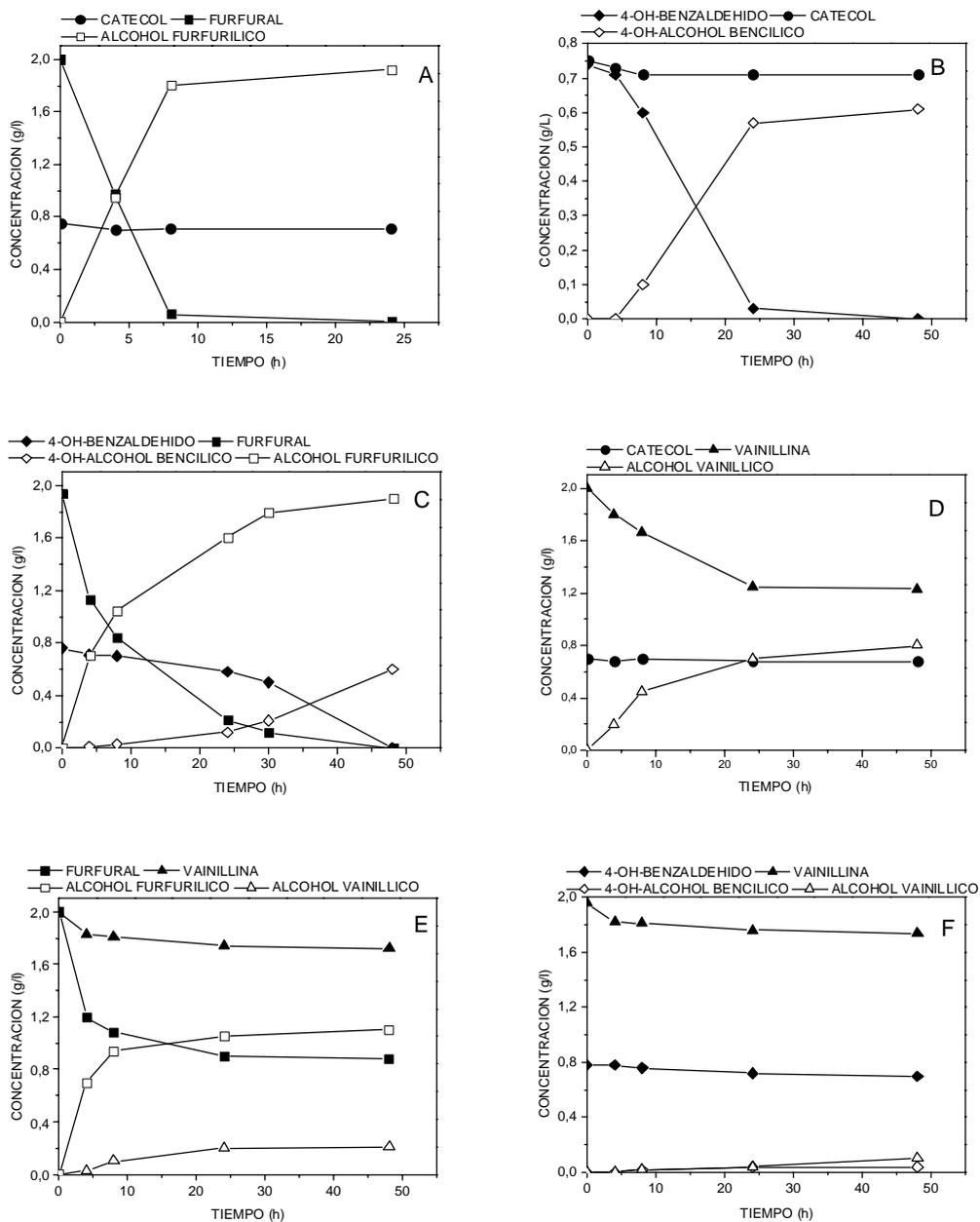


Figura 4.20.- Evolución de la concentración de las combinaciones binarias de catecol, furfural, 4-hidroxibenzaldehído y vainillina durante la fermentación de *K. marxianus* CECT 10875 en presencia de La concentración de cada compuesto es la que individualmente inhibe un 25 % del crecimiento.

En la incubación BC (figura 4.20.B), la presencia de catecol tampoco afecta la asimilación del 4-hidroxibenzaldehído, siendo la producción de etanol a las 24 horas del 69% del control (figura 4.19). Análogamente a los resultados obtenidos en los ensayos en los que el 4-hidroxibenzaldehído se añadió individualmente, aunque es completamente asimilado, sólo es parcialmente reducido a su correspondiente alcohol (0,6 g/l a las 48 horas).

En la figura 4.20.C se muestra la evolución de la combinación BF. Como puede observarse, a las 24 horas permanecen en el medio concentraciones de furfural y 4-hidroxibenzaldehído de 0,12 y 0,6 g/l respectivamente, y no hay crecimiento (figura 4.18) ni producción de etanol (figura 4.19) a las 24 horas. Es necesaria la completa asimilación de los aldehídos para que exista crecimiento y producción de etanol. A las 48 horas, cuando ambos compuestos han sido asimilados, se alcanzan una producción de etanol del 83% del control. Las concentraciones finales de alcohol furfurílico y de alcohol 4-hidroxibencílico son 1,9 g/l de y 0,6 g/l respectivamente.

El perfil de asimilación de la combinación CV se muestra en la figura 4.20.D. La concentración de catecol permanece constante durante toda la incubación. En presencia del catecol se impide la asimilación completa, de la vainillina, permaneciendo en el medio 1,2 g/l a las 48 horas. La concentración de alcohol vainílico a las 48 horas 0,75 g/l. Nuevamente la presencia del aldehído en el medio origina una inhibición total del crecimiento.

En la figura 4.20.E se muestran los perfiles de asimilación de la combinación FV. Aunque en las primeras horas de incubación se produce una rápida asimilación del furfural, a partir de las 6 horas la asimilación cesa, quedando una concentración en el medio de 0,9 g/l de furfural y de 1 g/l de su correspondiente alcohol a las 48 horas. Respecto a la vainillina, sólo se asimilan 0,2 g/l en las primeras horas, permaneciendo su concentración prácticamente constante durante el resto de la incubación. La presencia de furfural y vainillina en el medio tiene como consecuencia la inhibición total de la fermentación. En la incubación conjunta de 1 g/l de cada compuesto (figura 4.17.A), se observó como a las 16 horas ambos aldehídos eran asimilados completamente, no observándose ningún efecto sobre la producción de biomasa ni sobre la producción de etanol. Sin embargo, al aumentar la concentración de ambos compuestos a 2 g/l, la

combinación FV se muestra muy tóxica. La reducción de los aldehídos parece estar catalizada por alcohol deshidrogenasas dependientes de NAD (Weigert y col.,1988; Palmqvist y col. 1999; Taherzadeh y col. 2000). La incapacidad mostrada por *K. marxianus* para asimilar completamente combinaciones binarias de 2 g/l de furfural y vainillina podría deberse al agotamiento del cofactor empleado por estas enzimas (Larsson, 2000).

En la figura 4.20.F se muestra el perfil de asimilación de la combinación BV. Esta combinación es la más tóxica de todas las estudiadas, ya que además de producir una inhibición total de la fermentación, no se observan descensos significativos de la concentración de ninguno de los dos aldehídos. Las concentraciones de sus respectivos alcoholes son inferiores a 0,05 g/l.

La vainillina ha resultado ser el compuesto más tóxico cuando se combina con el resto de los compuestos ensayados. Así, una concentración de vainillina de 2 g/l que sólo causa el 25% de inhibición, impide completamente el crecimiento y la producción de etanol en presencia del resto de los compuestos ensayados. Entre las posibles explicaciones de este comportamiento pueden citarse: (i) su mayor concentración, (ii) su menor tasa de asimilación y (iii) la disminución de la tasa de asimilación en presencia de los otros compuestos ensayados. La combinación de estos factores tiene como resultado un tiempo de permanencia de la vainillina en el medio de fermentación más prolongado, lo que conlleva una mayor exposición del microorganismo al compuesto tóxico.

De los resultados obtenidos en las combinaciones binarias de los aldehídos y catecol, presentes en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor de biomasa de chopo, sobre la producción de biomasa y etanol por *K. marxianus* CECT 10875 se puede concluir que:

Las combinaciones binarias a una concentración inicial de 0,5 g/l no muestran efectos inhibitorios significativos sobre el crecimiento y la producción de etanol.

Al aumenta la concentración a 1 g/l, únicamente la combinación furfural-vainillina no muestra efectos tóxicos, alcanzando rendimientos en biomasa y etanol

cercanos al de las fermentaciones control. El resto de las combinaciones afectan tanto al rendimiento en etanol como a la productividad volumétrica. El 4-hidroxibenzaldehído se muestra como el compuesto más tóxico en estas combinaciones.

Todas las combinaciones estudiadas, a la concentración que causa un 25% de inhibición, muestran efectos sinérgicos a excepción de la combinación catecol-furfural, y 4-hidroxibenzaldehído-furfural, cuyo efecto es aproximadamente acumulativo. La vainillina es el compuesto más tóxico cuando se combina con el resto de compuestos ensayados.

Cuando los aldehídos están presentes de manera conjunta en el medio de fermentación su asimilación se produce de manera simultánea y no secuencial, aunque la tasa de asimilación es diferente para cada compuesto. En todas las combinaciones estudiadas se observa una disminución de la tasa de asimilación en comparación con las incubaciones individuales.

4.2.3. Influencia de la combinación de ácido acético, furfural y catecol sobre la tasa específica de crecimiento, productividad volumétrica, rendimiento en biomasa y rendimiento en etanol de *K. marxianus* CECT 10875.

Tras estudiar el efecto de los tóxicos añadidos individualmente y en combinaciones binarias, se aborda el estudio de combinaciones de tres elementos. El estudio se realizó siguiendo un diseño de composición central modificado (Palmqvist y col., 1999a). El modelo permite estimar, tanto los efectos principales de cada uno de los compuestos estudiados sobre los parámetros de fermentación como las interacciones de estos compuestos. El ácido acético y furfural han sido elegidos por ser los que se encuentran en mayor concentración en la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor, y el catecol por ser el compuesto que individualmente se mostró como el más tóxico de todos los identificados en dicha fracción. Los rangos de concentración estudiados para cada compuesto son de 0-10 g/l para el ácido acético, 0-2 g/l para el furfural y 0-1 g/l para el catecol. Estos rangos se establecieron en base a los resultados obtenidos en los ensayos en los que los distintos componentes se añadieron individualmente (apartado 4.2.1), teniendo en cuenta que la máxima concentración ensayada no inhibiese más del 50 % el crecimiento de *K. marxianus* CECT 10875.

En la tabla 4.VIII, se muestra el diseño de composición central modificado utilizado en este trabajo y los resultados de las variables estudiadas, tasa específica de crecimiento (μ), productividad volumétrica (Q), (calculadas a las 8 horas), rendimiento en biomasa ($Y_{x/s}$), rendimiento en etanol ($Y_{p/s}$), y pH a las 24 horas.

El mayor descenso de pH se obtuvo en los experimentos que no contenían ácido acético. Al aumentar la concentración de ácido acético en el medio se produce un menor descenso de pH a las 24 horas de la fermentación, debido a la capacidad de tamponamiento del ácido acético (Palmqvist y col., 1999a). En las fermentaciones que no contenían acético el descenso de pH fue de 1,8 unidades. En los experimentos con una concentración de acético de 2 g/l el descenso fue de aproximadamente 0,7 unidades. En el resto de ensayos el descenso de pH fue menor de 0,4 unidades.

Por otro las, es necesaria una asimilación completa del furfural para que se lleve a cabo la fermentación. Así, en los experimentos en los que hay producción de etanol (experimentos 2, 3, 4 y 6 del bloque I, y experimentos 2, 4 y 6 del bloque II) se ha producido una completa conversión del furfural a alcohol furfúrico por parte de *K. marxianus* CECT 10875. Por el contrario, los experimentos en los que no hay producción de etanol, no se ha llevado a cabo esta completa asimilación del furfural por la levadura. De esta forma, las concentraciones de furfural a las 24 horas de incubación de los experimentos 5, 7, 8 y 9 del bloque I, son de 0,3, 1,3, 0,9 y 1,4 g/l respectivamente. Del mismo modo, las concentraciones finales de furfural de los experimentos 3, 5, 7, 8, y 9 del bloque II son 0,8; 0,95; 1,6; 0,9 y 0,88 g/l respectivamente.

Tabla 4.VIII.- Parámetros de fermentación obtenidos en el diseño de composición central modificado. Ácido acético (A) furfural(F) y catecol (C); tasa específica de crecimiento (μ), productividad volumétrica (Q), rendimiento en biomasa (Y x/s) y rendimiento en etanol (Yp/s) y pH. μ y Q calculados a las 8 horas. Yp/s, Yx/s y pH calculados a las 24 horas.

| Bloque | Ex p | Compuestos (g/l) | | | Parámetros de fermentación | | | | | | | | | | | | pH 24 h | | |
|--------|------|------------------|-----|-----|----------------------------|------|----------|----------|-------------|------|-------------|-------|------|-------------|-------|-------|---------|------|------|
| | | A | F | C | μ (h ⁻¹) | | | Q (g/lh) | | | Y p/s (g/g) | | | Y x/s (g/g) | | | | | |
| I | 1 | 0 | 0 | 0 | 0,37 | 0,37 | 0,38 | 1,53 | 1,59 | 1,57 | 0,43 | 0,42 | 0,41 | 0,107 | 0,116 | 0,119 | 3,81 | 3,61 | 3,72 |
| | 2 | 2 | 0,4 | 0,2 | 0,32 | 0,34 | 0,35 | 0,59 | 0,75 | 0,81 | 0,43 | 0,43 | 0,39 | 0,068 | 0,081 | 0,081 | 4,84 | 4,77 | 4,74 |
| | 3 | 8 | 0,4 | 0,2 | 0,02 | 0,05 | 0,09 | 0,07 | 0,16 | 0,11 | 0,41 | 0,43 | 0,38 | 0,042 | 0,035 | 0,046 | 5,21 | 5,26 | 5,21 |
| | 4 | 2 | 0,4 | 0,8 | 0,14 | 0,21 | 0,23 | 0,21 | 0,39 | 0,31 | 0,38 | 0,41 | 0,42 | 0,061 | 0,064 | 0,061 | 4,72 | 4,83 | 4,78 |
| | 5 | 8 | 0,4 | 0,8 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,08 | 0,05 | 0,04 | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,002 | 0,005 | 0,004 | 5,15 | 5,22 | 5,29 |
| | 6 | 2 | 1,6 | 0,2 | 0,03 | 0,05 | 0,06 | 0,03 | 0,12 | 0,09 | 0,35 | 0,42 | 0,41 | 0,064 | 0,073 | 0,094 | 4,82 | 4,87 | 4,82 |
| | 7 | 8 | 1,6 | 0,2 | 0,02 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,002 | 0,004 | 0,003 | 5,31 | 5,21 | 5,27 |
| | 8 | 2 | 1,6 | 0,8 | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,03 | 0,06 | 0,08 | 0,002 | 0,011 | 0,016 | 5,13 | 5,31 | 5,24 |
| | 9 | 8 | 1,6 | 0,8 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,02 | 0,001 | 0,003 | 0,003 | 5,33 | 5,21 | 5,32 |
| Bloque | Ex p | Compuestos (g/l) | | | Parámetros de fermentación | | | | | | | | | | | | pH 24 h | | |
| | | A | F | C | μ (h ⁻¹) | | Q (g/lh) | | Y p/s (g/g) | | Y x/s (g/g) | | | | | | | | |
| II | 1 | 0 | 0 | 0 | 0,36 | 0,37 | 1,55 | 1,56 | 0,43 | 0,41 | 0,116 | 0,114 | 3,74 | 3,69 | | | | | |
| | 2 | 0 | 1 | 0,5 | 0,17 | 0,1 | 0,15 | 0,1 | 0,41 | 0,38 | 0,092 | 0,083 | 3,68 | 3,82 | | | | | |
| | 3 | 10 | 1 | 0,5 | 0,03 | 0,02 | 0,07 | 0,05 | 0,03 | 0,03 | 0,002 | 0,002 | 5,19 | 5,27 | | | | | |
| | 4 | 5 | 1 | 0 | 0,12 | 0,1 | 0,21 | 0,12 | 0,43 | 0,42 | 0,051 | 0,058 | 5,17 | 5,19 | | | | | |
| | 5 | 5 | 1 | 1 | 0,03 | 0,02 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,03 | 0,005 | 0,002 | 5,48 | 5,33 | | | | | |
| | 6 | 5 | 0 | 0,5 | 0,24 | 0,19 | 0,87 | 0,51 | 0,42 | 0,42 | 0,051 | 0,046 | 5,12 | 5,14 | | | | | |
| | 7 | 5 | 2 | 0,5 | 0,06 | 0,03 | 0,08 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,005 | 0,003 | 5,26 | 5,25 | | | | | |
| | 8 | 5 | 1 | 0,5 | 0,04 | 0,03 | 0,07 | 0,05 | 0,13 | 0,08 | 0,032 | 0,011 | 5,37 | 5,37 | | | | | |
| | 9 | 5 | 1 | 0,5 | 0,03 | 0,02 | 0,08 | 0,04 | 0,19 | 0,09 | 0,041 | 0,018 | 5,31 | 5,41 | | | | | |

4.2.3.1. Efecto de la combinación de ácido acético, furfural y catecol sobre la tasa específica de crecimiento

Los coeficientes polinómicos, obtenidos por la aplicación del modelo de regresión descrito en el apartado 3.6.3 de materiales y métodos que describen la influencia de los tres compuestos estudiados sobre la tasa específica de crecimiento se muestran en la tabla 4.IX. La justificación estadística del modelo se muestra en el anexo III.

Tabla 4.IX.- Coeficientes polinómicos, valor t, y significación estadística (sig.) obtenidos en el modelo de regresión que describe los efectos del acético (1), furfural (2) y catecol (3) sobre la tasa específica de crecimiento de *K. marxianus* CECT 10875.

| Coeficientes | Valores | Error típico | t | Sig. |
|------------------|---------|--------------|--------|-------|
| b | 0,391 | 0,018 | 21,986 | 0,000 |
| b ₁ | -0,029 | 0,009 | -3,225 | 0,003 |
| b ₂ | -0,262 | 0,045 | -5,792 | 0,000 |
| b ₃ | 0,043 | 0,090 | 0,480 | 0,634 |
| b ₁₁ | -0,0003 | 0,001 | -0,392 | 0,698 |
| b ₂₂ | 0,041 | 0,024 | 1,707 | 0,097 |
| b ₃₃ | -0,087 | 0,095 | -0,916 | 0,366 |
| b ₁₂ | 0,015 | 0,007 | 2,116 | 0,042 |
| b ₁₃ | -0,011 | 0,014 | -0,767 | 0,448 |
| b ₂₃ | -0,046 | 0,072 | -0,639 | 0,527 |
| b ₁₂₃ | 0,015 | 0,013 | 1,167 | 0,251 |

La ecuación que predice la tasa específica de crecimiento se expresa de la siguiente manera:

$$\mu = 0,391 - 0,029 A - 0,262 F + 0,043 C - 0,0003 A^2 - 0,041 F^2 - 0,087 C^2 + 0,015 AF - 0,011 AC - 0,046 FC + 0,015 AFC. \quad [1]$$

Para el cálculo de esta ecuación, y con objeto de no perder varianza explicada, se han incluido todos los términos de la ecuación, independientemente de su significación estadística.

El furfural y el ácido acético son los que muestran una mayor influencia negativa sobre la tasa específica de crecimiento. La significativa interacción del furfural y el ácido acético sobre la μ ya ha sido previamente citada en la literatura (Palmqvist y col., 1999a). El catecol no muestra efectos significativos principales ni de interacción con los otros compuestos.

En la figura 4.21, se representa el efecto de distintas concentraciones de ácido acético y furfural sobre la tasa específica de crecimiento. El diagrama superficie-respuesta se ha elaborado a partir de la ecuación [1], manteniendo fija la concentración de catecol en 0,5 g/l (concentración media del rango estudiado). Como puede observarse, es el furfural el que influye más negativamente sobre la tasa específica de crecimiento, ya que, desde las concentraciones más bajas estudiadas, produce un rápido descenso de μ , aún a bajas concentraciones de ácido acético. El efecto negativo del furfural sobre la tasa específica de crecimiento coincide con los resultados obtenidos anteriormente (apartado 4.2.1.3) en medios suplementados con 2 g/l de furfural, donde no se observa crecimiento hasta que el furfural no es completamente reducido a alcohol furfúrico. A concentraciones altas de acético no se observa crecimiento, independientemente de la concentración de furfural presente en el medio.

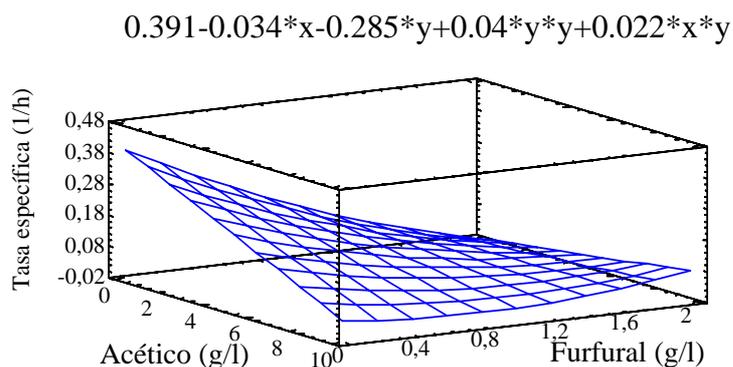


Figura.4.21.- Diagrama superficie-respuesta de la influencia del ácido acético y furfural, a una concentración de 0,5 g/l de catecol, sobre la tasa específica de crecimiento de *K. marxianus* CECT 10875. [x = acético (g/l); y = furfural (g/l)].

4.2.3.2. Efecto de la combinación de acético, furfural y catecol sobre la productividad volumétrica.

Los coeficientes polinómicos que describen la influencia de los tres compuestos estudiados sobre la productividad volumétrica se muestran en la tabla 4.X.

Tabla 4.X.- Coeficientes polinómicos, t, y significación estadística obtenidos en el modelo de regresión que describe los efectos del acético (1), furfural (2) y catecol (3) sobre la productividad volumétrica de *K. marxianus* CECT 10875.

| Coeficientes | Valores | Error típico. | t | Sig. |
|------------------|---------|---------------|---------|-------|
| b | 1,563 | 0,036 | 43,501 | 0,000 |
| b ₁ | -0,144 | 0,018 | -7,912 | 0,000 |
| b ₂ | -1,401 | 0,091 | -15,352 | 0,000 |
| b ₃ | -1,128 | 0,182 | -6,181 | 0,000 |
| b ₁₁ | 0,0001 | 0,002 | 0,066 | 0,948 |
| b ₂₂ | 0,286 | 0,048 | 5,938 | 0,000 |
| b ₃₃ | 0,052 | 0,192 | 0,274 | 0,786 |
| b ₁₂ | 0,089 | 0,015 | 6,132 | 0,000 |
| b ₁₃ | 0,122 | 0,029 | 4,165 | 0,000 |
| b ₂₃ | 0,626 | 0,146 | 4,292 | 0,000 |
| b ₁₂₃ | -0,068 | 0,027 | -2,564 | 0,015 |

La ecuación que predice la productividad volumétrica incluyendo todos los términos es:

$$Q = 1,563 - 0,144 A - 1,401F - 1,128C + 0,0001 A^2 + 0,286 F^2 + 0,052 C^2 + 0,089 AF + 0,122 AC + 0,626 FC - 0,068 AFC. \quad [2]$$

La productividad volumétrica se ve afectada significativamente por los tres compuestos estudiados. El furfural es el compuesto que más peso negativo tiene en el modelo, seguido del acético y el catecol. Las interacciones binarias de todos los compuestos son significativas, siendo positivas en las tres combinaciones. Como en el caso de la tasa específica de crecimiento, los efectos principales son más importantes que las interacciones.

En la figura 4.22 se representa en un diagrama de superficie respuesta la influencia del ácido acético y el furfural sobre la productividad volumétrica a una concentración fija de catecol de 0,5 g/l. La ecuación representada en dicha figura se obtiene sustituyendo en la ecuación [2] el catecol por una concentración de 0,5 g/l. Como se observa, se produce un descenso de la productividad volumétrica aún a las concentraciones más bajas ensayadas, siendo el furfural el que tiene más influencia negativa sobre el descenso de dicha productividad.

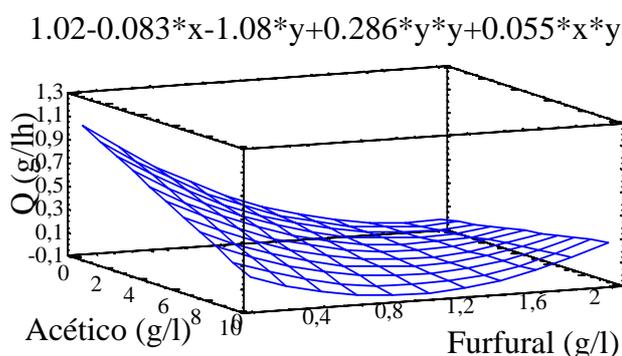


Figura 4.22.- Diagrama superficie-respuesta, de la influencia del ácido acético y furfural, a una concentración de 0,5 g/l de catecol sobre la productividad volumétrica de *K. marxianus* CECT 10875. [x = acético (g/l); y = furfural (g/l)].

4.2.3.3. Efecto de la combinación de acético, furfural y catecol sobre el rendimiento en etanol.

En la tabla 4.XI se muestran los coeficientes polinómicos que describen la influencia de los tres compuestos estudiados sobre el rendimiento en etanol de *K. marxianus*.

Tabla 4.XI.- Coeficiente polinómicos, t, y significación estadística obtenidos en el modelo de regresión que describe los efectos del acético (1), furfural (2) y catecol (3) sobre el rendimiento en etanol de *K. marxianus* CECT 10875.

| Coeficientes | Valores | Error típico. | t | Sig. |
|------------------|---------|---------------|---------|-------|
| b | 0,425 | 0,013 | 33,810 | 0,000 |
| b ₁ | 0,029 | 0,006 | 4,648 | 0,000 |
| b ₂ | 0,089 | 0,032 | 2,812 | 0,008 |
| b ₃ | 0,193 | 0,064 | 3,027 | 0,005 |
| b ₁₁ | 0,003 | 0,001 | 4,078 | 0,000 |
| b ₂₂ | 0,086 | 0,017 | 5,117 | 0,000 |
| b ₃₃ | 0,345 | 0,067 | 5,117 | 0,000 |
| b ₁₂ | -0,086 | 0,005 | -16,964 | 0,000 |
| b ₁₃ | -0,175 | 0,010 | -17,145 | 0,000 |
| b ₂₃ | -0,829 | 0,051 | -16,239 | 0,000 |
| b ₁₂₃ | 0,168 | 0,009 | 17,901 | 0,000 |

La ecuación que predice el rendimiento en etanol se expresa como:

$$Y_{p/s} = 0,425 + 0,029 A + 0,089 F + 0,193 C + 0,003 A^2 + 0,086 F^2 + 0,345 C^2 - 0,086 AF - 0,175 AC - 0,829 FC - 0,168 AFC. \quad [3]$$

A diferencia de lo que ocurría con la tasa específica de crecimiento y la productividad volumétrica, los efectos de los tres compuestos son significativos en todos los casos. Los que tienen más peso en el modelo son las interacciones dobles, siendo todas negativas. Los efectos principales y cuadráticos son todos positivos, lo que no significa que la presencia de estos compuestos en el medio favorezca la producción de etanol, sino que suavizan los efectos negativos de las interacciones.

Se han elaborado gráficos superficie-respuesta (manteniendo constante la concentración de uno de los compuestos) para representar el efecto de las interacciones acético-furfural, acético-catecol y furfural-catecol sobre el rendimiento en etanol. La ecuación resultante de sustituir en la ecuación [3], el catecol por un valor de 0,5 se representa en un gráfico de superficie respuesta (figura 4.23). Como se observa, el efecto negativo de la interacción de ambos compuestos es el que produce el mayor

descenso de la producción de etanol, ya que al aumentar la concentración del ácido acético y del furfural simultáneamente, es cuando el descenso se hace más notable. Sin embargo, a altas concentraciones de ácido acético y bajas de furfural, o viceversa, el descenso del rendimiento en etanol es menor.

$$0.61-0.06*x-0.32*y+0.003*x*x+0.08*y*y-0.01*x*y$$

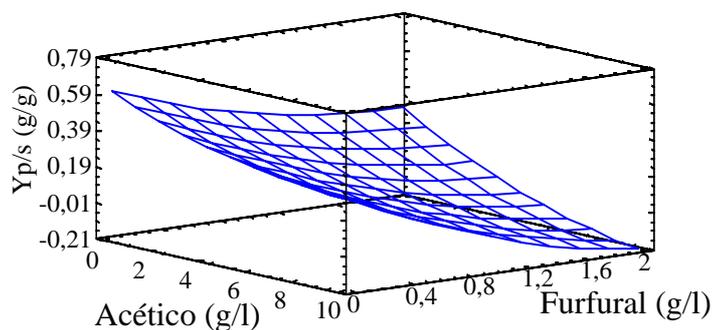


Figura 4.23.- Diagrama superficie-respuesta de la influencia del ácido acético y furfural, a una concentración de 0,5 g/l de catecol, sobre el rendimiento en etanol de *K. marxianus* CECT 10875. [x = acético (g/l); y = furfural (g/l)].

Sustituyendo en la ecuación [3] el ácido acético por un valor de 5 g/l, se obtiene la ecuación cuyo diagrama de superficie-respuesta se muestra en la figura 4.24. Como se observa, a una baja concentración de uno de los compuestos y alta concentración del otro no se observa prácticamente descenso en el rendimiento en etanol. Sin embargo, al aumentar simultáneamente la concentración de furfural y catecol se hace patente el efecto negativo de esta interacción sobre el rendimiento en etanol.

$$0.64-0.34*x-0.68*y+0.086*x*x+0.345*y*y-1.66*x*y$$

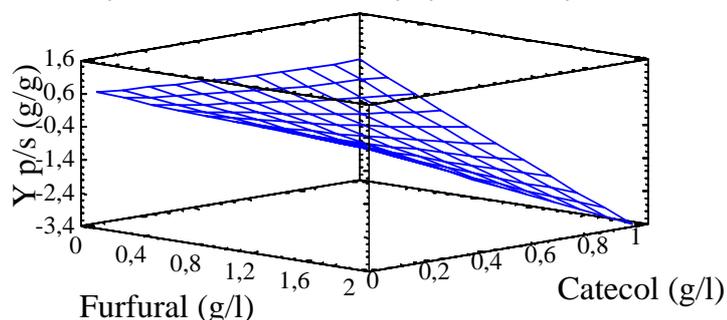


Figura 4.24.- Diagrama de superficie-respuesta de la influencia del furfural y catecol, a una concentración de 5 g/l de ácido acético, sobre el rendimiento en etanol de *K. marxianus* CECT 10875. [x = furfural (g/l); y = catecol (g/l)].

En la figura 4.25 se representa el diagrama superficie-respuesta de la ecuación obtenida al sustituir en la ecuación [3] el furfural por un valor de 1 g/l. Como ocurría en los casos anteriores el efecto negativo de la interacción es el que produce un mayor descenso en el rendimiento en etanol.

$$0.59-0.057*x-0.63*y+0.002*x*x+0.345*y*y-0.34*x*y$$

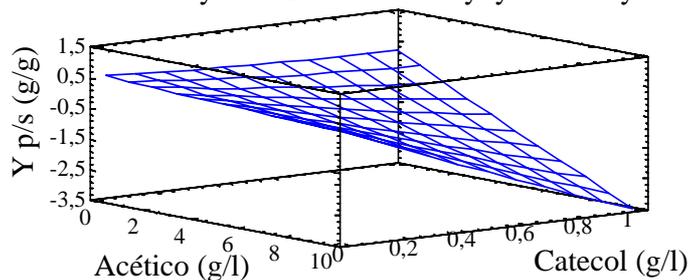


Figura 4.25.- Diagrama superficie-respuesta de la influencia del ácido acético y catecol, a una concentración de 1 g/l de furfural, sobre el rendimiento en etanol de *K. marxianus* CECT 10875. [x = acético (g/l); y = catecol (g/l)].

4.2.3.4. Efecto de la combinación de acético, furfural y catecol sobre el rendimiento en biomasa.

En la tabla 4.XII se muestran los coeficientes polinómicos que describen la influencia del ácido acético, furfural y catecol sobre el rendimiento en biomasa de *K. marxianus* CECT 10875.

Tabla 4.XII.- Coeficiente polinómicos, t, y significación estadística obtenidos en el modelo de regresión, que describe el efecto del acético (1), furfural (2) y catecol (3) sobre el rendimiento en biomasa de *K. marxianus* CECT 10875.

| Coeficientes | Valores | Error típico | t | Sig. |
|------------------|---------|--------------|--------|-------|
| b | 0,113 | 0,003 | 36,792 | 0,000 |
| b ₁ | -0,012 | 0,002 | -7,669 | 0,000 |
| b ₂ | 0,016 | 0,008 | 2,084 | 0,045 |
| b ₃ | -0,010 | 0,016 | -0,664 | 0,511 |
| b ₁₁ | 0,0008 | 0,000 | 5,423 | 0,000 |
| b ₂₂ | 0,003 | 0,004 | 0,937 | 0,355 |
| b ₃₃ | 0,026 | 0,016 | 1,604 | 0,118 |
| b ₁₂ | -0,008 | 0,001 | -6,507 | 0,000 |
| b ₁₃ | -0,011 | 0,003 | -4,768 | 0,000 |
| b ₂₃ | -0,101 | 0,013 | -8,099 | 0,000 |
| b ₁₂₃ | 0,018 | 0,002 | 8,146 | 0,000 |

La ecuación que predice el rendimiento, teniendo en cuenta todos los términos del modelo, es:

$$Y_{x/s} = 0,113 - 0,012 A + 0,016 F - 0,010 C + 0,0008 A^2 + 0,003 F^2 + 0,026 C^2 - 0,008 AF - 0,011 AC - 0,101 FC + 0,018 AFC. \quad [4]$$

Los efectos principales del ácido acético y del furfural son significativos, teniendo más peso en el modelo el ácido acético. El acusado efecto tóxico mostrado por el ácido acético sobre la producción de biomasa de *K. marxianus* CECT 10875 ya había sido observado previamente (apartado 4.2.1). El furfural por el contrario, en el modelo muestra un efecto positivo sobre la producción de biomasa lo que podría deberse, como en el caso de la productividad volumétrica, no a que la presencia de furfural favorezca el crecimiento sino a una disminución de la formación de subproductos (Palmqvist, 1998).

El catecol no muestra efectos principales significativos. Todas las interacciones dobles son significativas, mostrando un efecto negativo sobre el rendimiento en biomasa en los tres casos.

Sustituyendo en la ecuación [4] el catecol por un valor de 0,5 se obtiene una ecuación representada mediante un diagrama de superficie respuesta en el que se muestra la influencia del ácido acético y del furfural sobre el rendimiento en biomasa a una concentración fija de catecol de 0,5 g/l (figura 4.26).

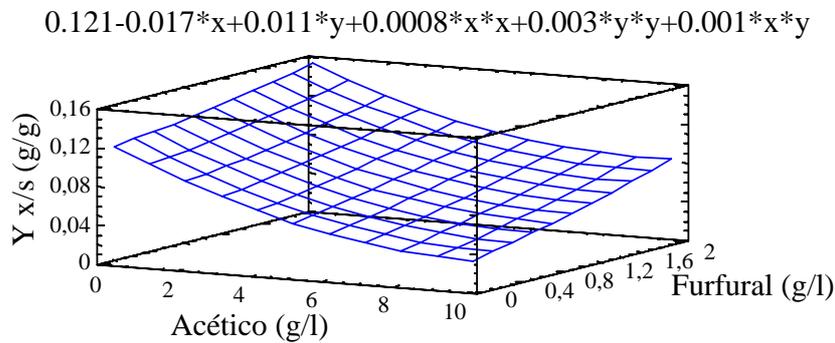


Figura 4.26.- Diagrama de superficie-respuesta de la influencia del ácido acético y furfural, a una concentración de 0,5 g/l de catecol, sobre el rendimiento en biomasa de *K. marxianus* CECT 10875. [x = acético (g/l); y = furfural (g/l)].

Los valores pronosticados de la tasa específica de crecimiento (μ), productividad volumétrica (Q), rendimiento en biomasa (Y p/x) y rendimiento en etanol (Y p/s), obtenidos mediante las ecuaciones [1], [2], [3] y [4] del modelo de regresión se muestran en la tabla 4.XIII.

Para explicar la bondad del ajuste del modelo de regresión se calculó la R cuadrado corregida. Adicionalmente, la independencia de los residuos en el modelo de regresión se realizó mediante el test de Durbin-Watson (DW), en el que un valor esperado para que los residuos sean incorrelados es 2. En la tabla 4.XIV se muestran los valores de R cuadrado corregida y de Durbin-Watson para cada una de las variables dependientes estudiadas. Como puede observarse, en todos los casos el porcentaje de varianza explicada está por encima del 90%, con lo que se puede determinar que los

ajustes son buenos. Se comprobó gráficamente el correcto comportamiento de los residuos, alternándose sobre el eje cero (datos no mostrados).

Tabla 4.XIII.- Valores pronosticados por el modelo de regresión para cada una de las variables estudiadas.

| Bloque | Exp. | μ (h ⁻¹) | Q (g/h) | Y p/s (g/g) | Y x/s (g/g) |
|--------|------|--------------------------|---------|-------------|-------------|
| I | 1 | 0,39121 | 1,56295 | 0,42513 | 0,11331 |
| | 2 | 0,24501 | 0,69591 | 0,41884 | 0,08263 |
| | 3 | 0,07857 | 0,16482 | 0,42439 | 0,03947 |
| | 4 | 0,2017 | 0,31389 | 0,41315 | 0,06264 |
| | 5 | 0,01768 | 0,12127 | 0,03037 | 0,00353 |
| | 6 | 0,06157 | 0,03265 | 0,40716 | 0,07661 |
| | 7 | 0,02755 | 0,04669 | 0,03105 | 0,00183 |
| | 8 | 0,00734 | 0,00243 | 0,04647 | 0,01067 |
| | 9 | 0,02272 | 0,05769 | 0,00828 | 0,00087 |
| II | 1 | 0,39121 | 1,56295 | 0,42513 | 0,11331 |
| | 2 | 0,14691 | 0,2102 | 0,36927 | 0,08425 |
| | 3 | -0,00688 | -0,0625 | 0,03947 | 0,00639 |
| | 4 | 0,09153 | 0,17653 | 0,38503 | 0,05516 |
| | 5 | 0,0235 | -0,0088 | 0,05871 | 0,00398 |
| | 6 | 0,2083 | 0,59729 | 0,38725 | 0,0473 |
| | 7 | 0,03173 | 0,11544 | 0,05649 | 0,00634 |
| | 8 | 0,07935 | 0,07069 | 0,1357 | 0,02296 |
| | 9 | 0,07935 | 0,07069 | 0,1357 | 0,02296 |

Tabla 4.XIV.- Valores de R cuadrado corregida y de Durbin-Watson obtenidos en el modelo de regresión para cada una de las variables dependientes estudiadas.

| Variable dependiente | R cuadrado corregida | Durbin-Watson |
|-------------------------------|----------------------|---------------|
| Tasa específica (μ) | 0,897 | 1,905 |
| Productividad volumétrica (Q) | 0,972 | 2,085 |
| Rendimiento etanol (Y p/x) | 0,975 | 1,992 |
| Rendimiento biomasa (Y x/s) | 0,967 | 1,561 |

Con objeto de comprobar la bondad del ajuste en el rango de concentraciones estudiado, en la figura 4.27 se muestran los gráficos de dispersión para cada variable que compara el parámetro observado frente al pronosticado tipificado. Como puede observarse, hay una buena relación entre los valores predichos y observados, ajustándose a una línea recta en todo el rango de concentraciones estudiado.

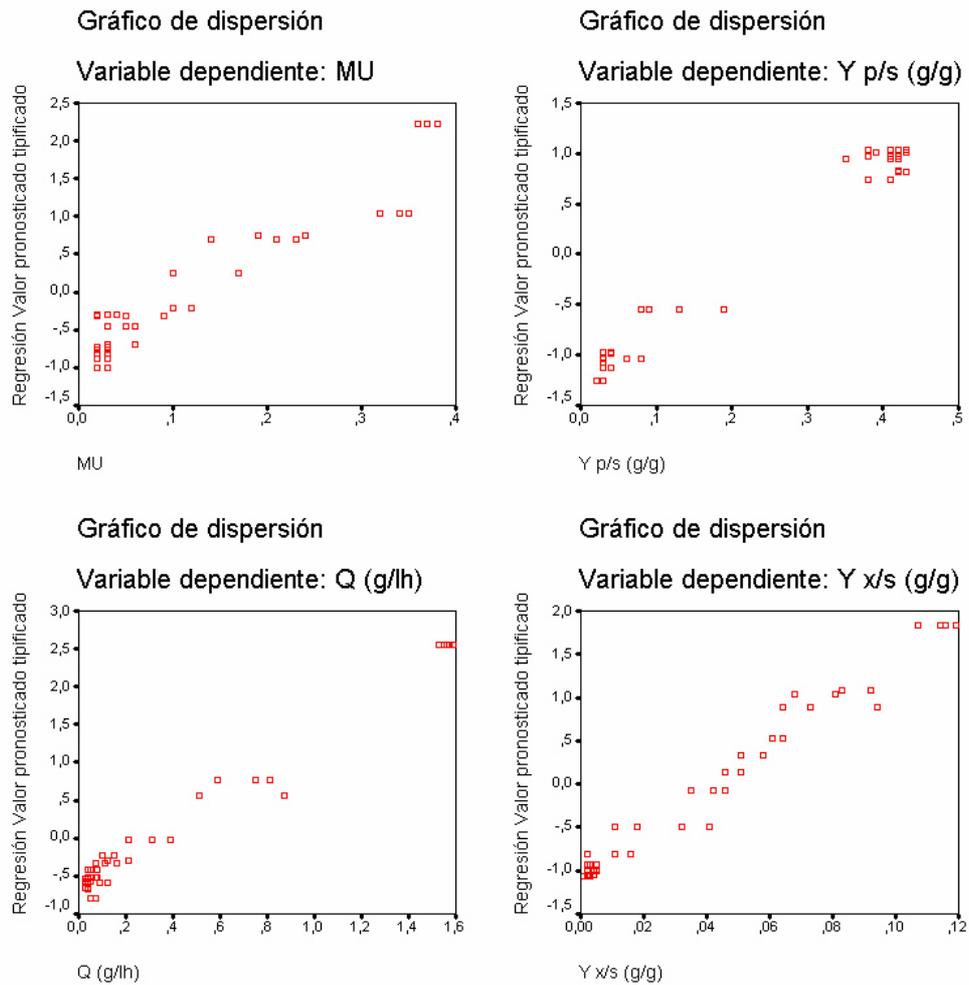


Figura 4.27.- Gráficos de dispersión de valores observados frente a pronosticados para la tasa específica de crecimiento (μ), productividad volumétrica (Q), rendimiento en etanol (Y p/s) y rendimiento en biomasa (Y x/s).

Como resumen general de los resultados obtenidos en los experimentos de fermentaciones de *K. marxianus* CECT 10875 en presencia conjunta de ácido acético, furfural y catecol se puede concluir que:

El furfural y el ácido acético tienen una influencia negativa sobre la tasa específica de crecimiento, siendo el furfural el que muestra un mayor efecto negativo. Hay una interacción positiva significativa entre el furfural y ácido acético que suaviza los efectos negativos de los efectos principales sobre la tasa específica de crecimiento. El catecol no muestra efectos significativos principales ni de interacción sobre la tasa específica de crecimiento.

Los tres compuestos ensayados muestran un efecto significativo sobre la productividad volumétrica. Como ocurría con la tasa específica de crecimiento, el furfural es el compuesto que tiene un mayor efecto negativo sobre la productividad volumétrica. En este caso, los tres compuestos muestran interacciones dobles significativas con un efecto positivo que suaviza los efectos negativos de los efectos principales.

Al contrario de lo que ocurre en los dos casos anteriores, son las interacciones dobles de los tres compuestos las que tiene un mayor efecto negativo sobre el rendimiento en etanol de la levadura. En este caso, los efectos principales suavizan el efecto negativo de las interacciones sobre el modelo predicho de rendimiento en etanol por *K. marxianus* CECT 10875.

El ácido acético es el compuesto que más influencia negativa tiene sobre la producción de biomasa. Hay interacciones dobles significativas entre los tres compuestos ensayados que tienen una notable influencia negativa sobre el modelo predicho del rendimiento en biomasa de *K. marxianus* CECT 10875.

4.3. UTILIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LÍQUIDA OBTENIDA TRAS EL PRETRATAMIENTO COMO MEDIO DE FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL.

En un proceso industrial de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, sería deseable la reutilización de las diferentes corrientes líquidas generadas en el proceso, con objeto de minimizar los requerimientos de agua y reducir la cantidad efluentes generados (Larsson y col., 1997; Stenberg y col., 2000b). Este último aspecto es fundamental si se tiene en cuenta que, uno de los principales motivos que inducen a la utilización de bioetanol como combustible son sus ventajas medioambientales, y por lo tanto las tecnologías de producción también deben considerarse desde el punto de vista de su impacto ambiental (Zaldivar y col., 2001).

En este contexto, se ha realizado un estudio del aprovechamiento de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor de biomasa de chopo

como medio de fermentación en el proceso de producción de etanol. El objetivo es reducir la cantidad de agua residual generada en el pretratamiento y disminuir la necesidad de agua en el proceso de obtención de etanol a partir de biomasa. Para ello, la fracción líquida se sometió a distintos tratamientos (dilución, neutralización, procesos de oxidación avanzada, evaporación y adición de zeolitas) con objeto de aumentar su fermentabilidad. Se analizó su composición y se realizó un seguimiento de la evolución de determinados compuestos tóxicos identificados en dicha fracción (furfural, HMF, ácidos alifáticos y fenoles). Posteriormente, a la fracción líquida una vez tratada, se le añaden glucosa (30 g/l) y sales minerales en la composición del medio líquido basal (MLB), se ajusta el pH a 5,5 y se realizan los ensayos de fermentación siguiendo el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos

4.3.1. Tratamientos de la fracción líquida.

4.3.1.1. Efecto de la dilución sobre la fermentabilidad de la fracción líquida.

Como se comentó en el apartado 4.1, la relación materia prima/fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor (210 °C y 4 minutos) de biomasa de chopo es de 1/10 (p/v) y el porcentaje de recuperación de la fracción sólida tras la explosión es de un 60%. En un proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS) la carga de sustrato que permite obtener los mejores resultados es del 10% (Ballesteros, 2000). Esto supondría que, sí se utilizara esta corriente líquida como medio del proceso de SFS, podría aprovecharse en un 60%, teniendo en cuenta la relación materia prima/fracción líquida, el porcentaje de recuperación de sólidos en el pretratamiento y la concentración de sustrato empleada en la SFS (figura 4.28). La fracción líquida no puede utilizarse directamente, ya que debido a que contiene productos de degradación de la biomasa lignocelulósica generados en el pretratamiento resulta tóxica para el microorganismo (apartado 4.2.1). Con objeto de aumentar la fermentabilidad de esta fracción se ensayaron diferentes diluciones de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor de biomasa de chopo.

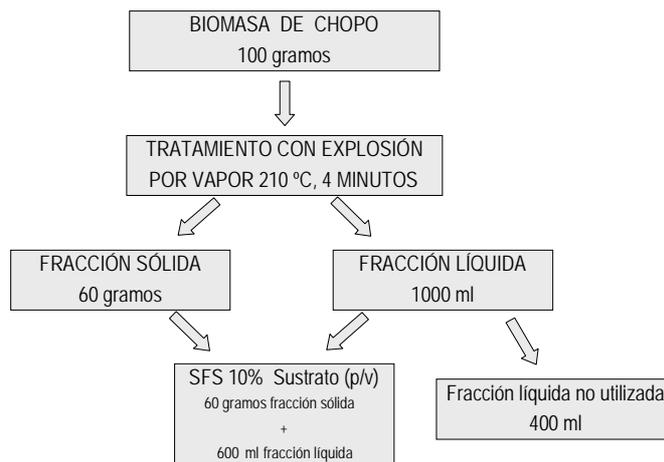


Figura 4.28.- Relación materia prima/fracción líquida obtenida en el pretratamiento de explosión por vapor (210 °C 4 minutos) de biomasa de chopo.

La fracción líquida se suplementó con glucosa y sales minerales, se añadió un 4% de inóculo y se incubó a 42 °C durante 24 horas. Como control se utilizó medio líquido basal (MLB) con 30 g/l de glucosa.

En la figura 4.29 se muestra el efecto de diferentes diluciones de la fracción líquida sobre la producción de etanol de *K. marxianus* CECT 10875. Como puede observarse, la producción de etanol aumenta con la dilución. Ni en la fracción sin diluir ni en la dilución 1:1,2 se observa producción de etanol. Esta fracción no podría emplearse como medio de fermentación, ya que muestra efectos tóxicos sobre la levadura. Cuando se diluye 1,5 veces se alcanza una producción de etanol a las 24 horas de un 15 % la del control. En la dilución 1,8 la concentración final de etanol alcanzada está por encima de 90% del control. En los ensayos de fermentación utilizando la fracción líquida diluida 2 veces, no se observa efectos inhibitorios sobre la producción de etanol, alcanzándose rendimientos semejantes al de las fermentaciones control

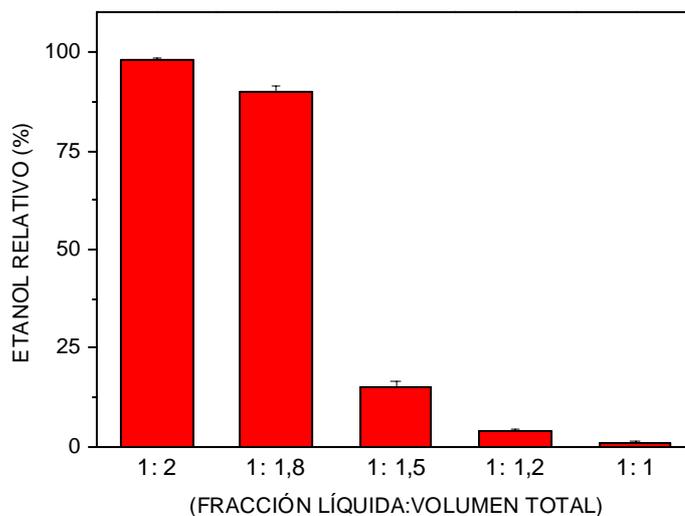


Figura 4.29.- Efecto de diferentes diluciones de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor de biomasa de chopo sobre la producción de etanol a las 24 horas (pH 5,5). Las barras de error muestran la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol= $12,6 \pm 0,6$ g/l).

A la vista de los resultados anteriores, es posible la utilización de la fracción líquida diluida 2 veces como medio de fermentación en el proceso de SFS. Esto supondría un aprovechamiento del 30% de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento, teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación del material pretratado (60%) y la relación sólido/líquido obtenida en el pretratamiento (1/10).

4.3.1.2. Efecto de la neutralización sobre la fermentabilidad de la fracción líquida.

La fracción líquida se neutralizó con hidróxido cálcico ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) o hidróxido sódico (NaOH), hasta alcanzar un pH de 10, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de materiales y métodos (apartado 3.8.1).

En la figura 4.30 se muestran los porcentajes de etanol alcanzados con respecto al control a las 24 horas de fermentación, tras el tratamiento con hidróxido sódico y cálcico. Como control se ha utilizado el medio líquido basal con 30 g/l de glucosa. Como puede observarse, en el tratamiento con ambos hidróxidos se consiguen

rendimientos en etanol similar a los del control, 96% y 97% para los tratamientos con hidróxido sódico y cálcico respectivamente.

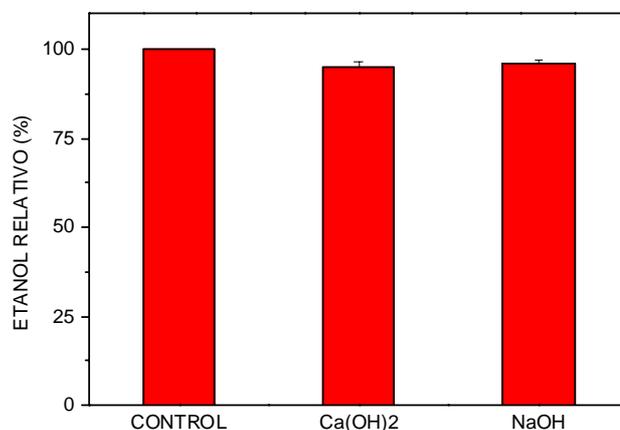


Figura 4.30.- Efecto de la neutralización de la fracción líquida con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y NaOH sobre la producción de etanol a las 24 horas de *K. marxianus* CECT 10875 (pH 5,5). Las barras de error muestran la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol= $12,6 \pm 0,6$ g/l).

Algunos autores (van Zyl y col., 1988; Larsson y col., 1999) han obtenido mejores resultados de fermentabilidad empleando hidróxido cálcico en lugar de hidróxido sódico, debido al efecto negativo que sobre la producción de etanol ejercen los iones monovalentes como el Na^+ . La neutralización con hidróxido cálcico puede producir precipitados de oxalato cálcico lo que puede originar problemas en fermentaciones en continuo con recirculación celular (Palmqvist, 1998). En los ensayos utilizando *K. marxianus* CECT 10875 prácticamente no hay diferencias en la fermentabilidad de la fracción líquida neutralizada con uno u otro hidróxido, por lo que podría utilizarse cualquiera de ellos con buenos resultados.

A modo de ejemplo, en la figura 4.31 se muestran los cromatogramas de la fracción líquida antes y después del tratamiento con hidróxido cálcico. Como puede observarse, no se produce una eliminación de los compuestos tóxicos analizados. Los porcentajes de eliminación de furfural, HMF y compuestos fenólicos (4-

hidroxibenzaldehído, catecol, vainillina y siringaldehído) son aproximadamente del 10%. Este mismo porcentaje de eliminación se ha obtenido en el tratamiento con hidróxido sódico.

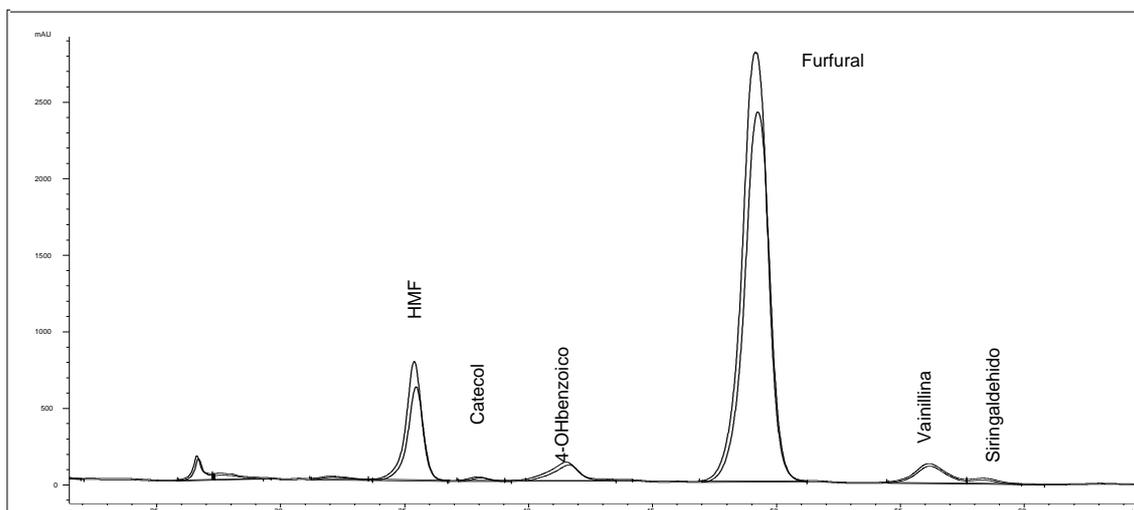


Figura 4.31.- Cromatogramas de la fracción líquida obtenidos antes (---) y después del tratamiento (—) con hidróxido cálcico ($\lambda = 280 \text{ nm}$)

En cuanto a la eliminación de ácidos alifáticos (acético y fórmico) varía entre el 10% y el 15% para los tratamientos con hidróxido cálcico y sódico respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Larsson y col. (1999) y Martínez y col. (2000) en los que la neutralización no eliminó los ácidos alifáticos. Sin embargo, otros autores han conseguido una eliminación total del ácido acético en el tratamiento con hidróxido cálcico (Perego y col., 1990; Amarte y Jeffries, 1996).

Aunque el tratamiento con álcalis de hidrolizados de lignocelulosa con objeto aumentar su fermentabilidad ha sido ampliamente estudiado obteniéndose buenos resultados (Larsson, 2000), los experimentos realizados en este trabajo muestran que la neutralización no provoca cambios importantes en la composición de la fracción líquida tras la destoxificación. Sin embargo, sí se observa un aumento de la fermentabilidad de la misma, por lo que puede ser aplicado como método de destoxificación. El mecanismo por el que aumenta la fermentabilidad de los medios aún no se conoce debido a la cantidad de productos originados en el pretratamiento y a la complejidad de su análisis.

Podría deberse a la eliminación mediante precipitación de compuestos tóxicos no identificados que contribuyen a la toxicidad mostrada por dicha fracción

4.3.1.3. Efecto de la oxidación avanzada sobre la fermentabilidad de la fracción líquida.

Consiste en la aplicación a la fracción líquida de un proceso de oxidación avanzada (reacción de Fenton) en dos condiciones de tiempo (1 y 2 h) y concentración de agua oxigenada (0,07 y 0,14 M). La temperatura del proceso fue de 70 °C y una concentración de 70 mg/l de Fe^{+2} .

En la figura 4.32 se muestran los porcentajes de etanol obtenidos en la fermentación de la fracción líquida una vez tratada con la reacción de Fenton en las condiciones estudiadas. Como se observa, a 1 h de tiempo de reacción y una concentración 0,07 M de H_2O_2 , se alcanza un rendimiento en etanol del 65% del control. En este caso permanece en el medio una concentración de glucosa residual de 3 g/l. Cuando se aumenta la concentración de agua oxigenada a 0,14 M y el tiempo de reacción a dos horas se alcanza un rendimiento en etanol próximo al del control (95%).

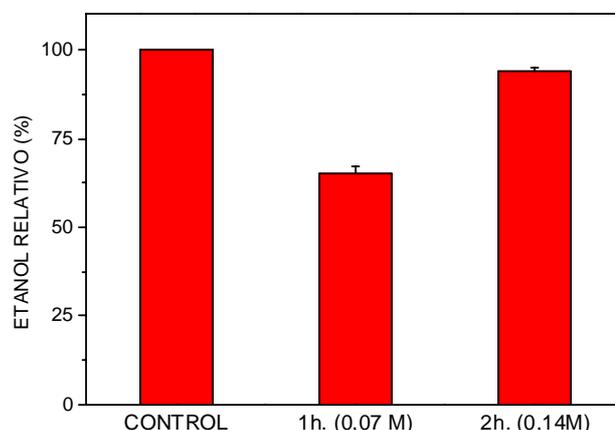


Figura 4.32.- Efecto de la oxidación avanzada mediante la reacción de Fenton sobre la producción de etanol a las 24 horas de *K. marxianus* CECT 10875, (pH 5,5). Las barras de error muestran la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol= $12,6 \pm 0,6$ g/l).

En la figura 4.33 se muestran los cromatogramas obtenidos antes y después de dos horas de tratamiento de oxidación avanzada con una concentración de agua oxigenada de 0,14 M. Como puede observarse se produce una eliminación casi total del fufural, HMF y derivados fenólicos. La eliminación de estos compuestos estaría en la base del aumento de fermentabilidad de la fracción líquida observado tras este pretratamiento, ya que se reduce su concentración más de un 95%.

La oxidación avanzada mediante la reacción de Fenton, aunque es muy eficiente en la eliminación de furanos y derivados fenólicos, no produce eliminación de los ácidos alifáticos, debido probablemente a su gran estabilidad en condiciones oxidantes (Vidal y col., 2002). Los resultados de fermentabilidad de la fracción líquida tras el tratamiento de oxidación avanzada indican que los ácidos alifáticos (acético y fórmico) no son responsables de la toxicidad mostrada por la fracción líquida. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en fermentaciones a las que se añadía individualmente los ácidos alifáticos en los que el efecto tóxico de estos compuestos a pH de 5,5, es menor que el del resto de compuestos identificados en la fracción líquida (apartado 4.2.1).

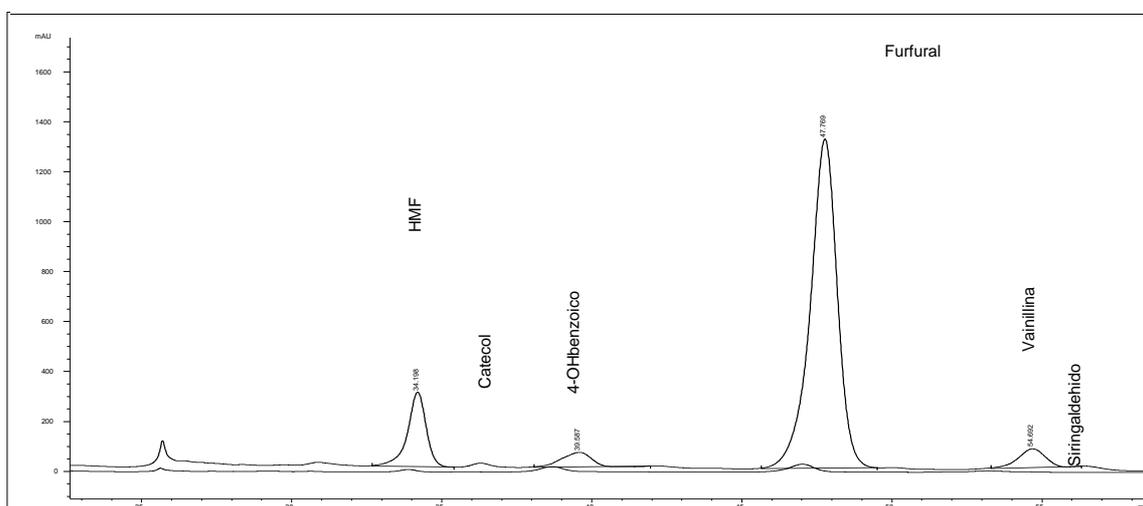


Figura 4.33.- Cromatogramas de la fracción líquida obtenidos antes (—) y después de (- -) 2 h de tratamiento con agua oxigenada (0,14 M) ($\lambda = 280$ nm).

4.3.1.4. Efecto de la evaporación sobre la fermentabilidad de la fracción líquida.

La fracción líquida obtenida tras el pretratamiento se sometió a un proceso de evaporación para concentrar el líquido un 25%, 50% y 75% del volumen inicial (ver apartado 3.8.3 de materiales y métodos). Los rendimientos en etanol obtenidos a las 24 horas de fermentación de la fracción líquida tras el proceso de evaporación se muestran en la figura 4.34. Como puede observarse, la concentración de un 25% no tiene ningún efecto sobre la fermentabilidad de la fracción líquida, ya que no hay producción de etanol. Sin embargo, tras la concentración al 50% y 75 % del volumen inicial los rendimientos en etanol alcanzados a las 24 horas son prácticamente iguales al de fermentaciones control (93% y 95% del control respectivamente). Los resultados obtenidos indican que la evaporación hasta la mitad del volumen inicial de la fracción líquida sería suficiente para aumentar la fermentabilidad de dicha fracción y obtener una concentración final de etanol semejante a la de fermentaciones control (12,6 g/l).

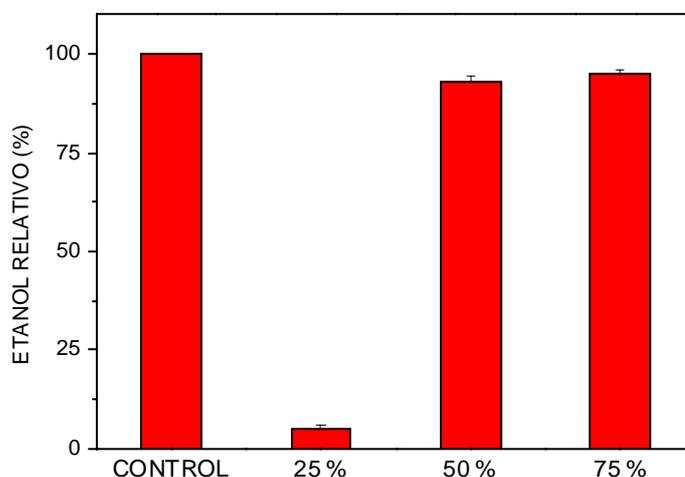


Figura 4.34.- Efecto de diferentes porcentajes de evaporación de la fracción líquida (25%, 50% y 75%) sobre producción de etanol a las 24 horas de *K. marxianus* CECT 10875 (pH 5,5). Las barras de error muestran la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol= 12,6 ± 0,6 g/l).

La concentración del 25% produce una eliminación de sólo un 60% del furfural, lo que no es suficiente para aumentar la fermentabilidad de la fracción líquida. El contenido en furfural, HMF y ácido 4-hidroxibenzoico de la fracción líquida antes y después del 50% de evaporación se muestran en la figura 4. 35. La evaporación al 50% del volumen inicial origina unos porcentajes de eliminación del 100% del furfural. El HMF y los derivados fenólicos no son eliminados por el tratamiento de evaporación.

El tratamiento de evaporación hasta alcanzar un 50% del volumen inicial produce una eliminación de aproximadamente un 20% de ácidos alifáticos. La evaporación se realizó a un pH de 3,8 que es el que originariamente tiene la fracción líquida ya que compuestos como el ácido acético y fórmico sólo son volátiles cuando se encuentran en la forma protonada (Larsson, 2000). La eliminación parcial de los ácidos alifáticos, junto con el elevado porcentaje de eliminación del furfural que se obtiene al someter la fracción líquida a un proceso de evaporación hasta un 50% del volumen inicial es suficiente para aumentar la fermentabilidad de esta fracción y obtener producciones de etanol (93%) muy cercanas a las de fermentaciones control.

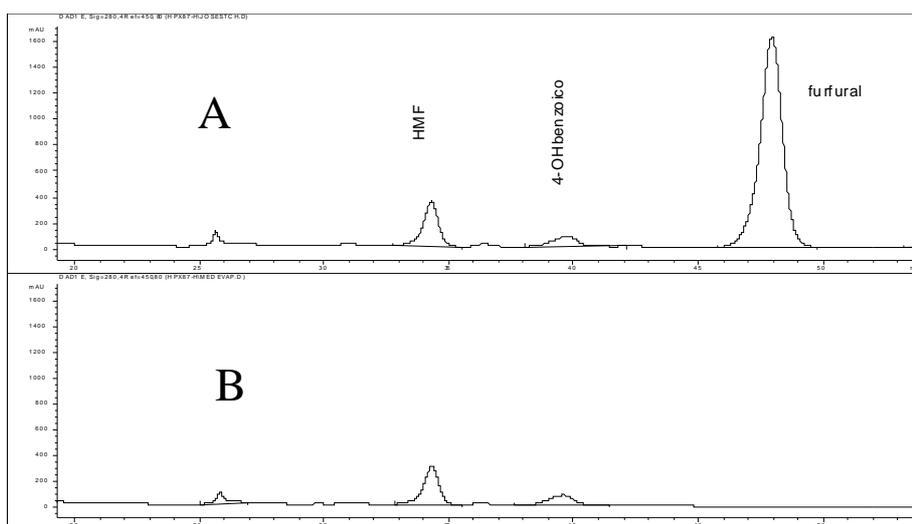


Figura 4.35.- Cromatogramas de la fracción líquida obtenidos antes (A) y después de la evaporación al 50% del volumen inicial (B).

4.3.1.5. Efecto de la utilización de productos de naturaleza zeolítica (PNZs) sobre la fermentabilidad de la fracción líquida.

Se realizaron ensayos añadiendo a la fracción 10 g/l de los PNZs estudiados (Clinoptilolita, Zecer-56 y Zesep-56) e incubando los medios en agitación durante 24 horas. Posteriormente, se eliminan los PNZs mediante filtración y se añade a la fracción líquida glucosa y sales minerales, un 4% de inóculo y se incuban durante 24 horas.

En ninguno de los tratamientos con los PNZs se consigue un aumento de la fermentabilidad de la fracción líquida (no se muestran los datos), ya que no hay producción de etanol a las 24 horas de fermentación. El análisis de la composición de la fracción líquida una vez sometida al tratamiento con PNZs no muestra variación en la composición de los compuestos tóxicos estudiados (furfural, HMF, ácidos alifáticos y fenoles).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se realizaron ensayos manteniendo los pNZs en el medio de fermentación. Para ello se añade a la fracción líquida glucosa y sales minerales en la concentración del MLB, y se procede a la adición de cada uno de los PNZs en una concentración de 10 g/l al comienzo de las fermentaciones. Sólo fue necesario ajustar el pH inicial a 5,5 en los ensayos con Clinoptilolita, ya que en los experimentos con Zesep-56 y Zecer-56 fueron de 5,45 y 5,65 respectivamente.

Los rendimientos en etanol alcanzados a las 24 horas se muestran en la figura 4.36. Como puede observarse, la adición de zeolitas aumenta la fermentabilidad de la fracción líquida. Aunque los rendimientos a las 24 horas son similares con los tres PNZs, los mejores resultados se obtienen con Zesep-56 alcanzándose un rendimiento final de etanol del 97% del control. En los tres casos hay una utilización total de la glucosa por la levadura, no quedando glucosa en el medio tras 24 horas de fermentación.

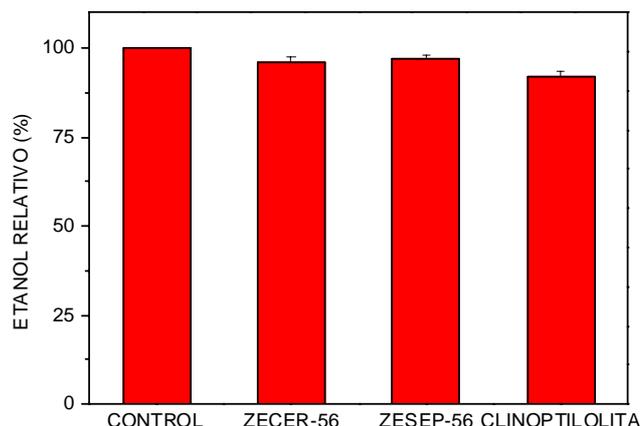


Figura 4.36.- Efecto de la adición de 10 g/l de PNZs (Zecer-56, Zesep-56 y Clinoptilolita) sobre la producción de etanol por *K. marxianus* CECT 10875 a las 24 horas. Las barras de error muestran la desviación estándar. Los datos se muestran como porcentaje de un control (100% etanol= $12,6 \pm 0,6$ g/l).

El aumento de fermentabilidad de hidrolizados de chopo (Ballesteros y col., 1998) y de melazas de caña de azúcar (Roque-Malherbe y col., 1987; SivaRaman y col., 1994) por la adición de zeolitas ha sido observado previamente. Se ha sugerido que, el aumento de la fermentabilidad puede deberse a una disminución de los niveles inhibitorios de los iones Na^+ al intercambiarse con los iones K^+ de las zeolitas, en el caso de la fermentación de melazas, o a una eliminación parcial de los compuestos tóxicos del medio de fermentación, tanto en el caso de las melazas como en el chopo. Sin embargo, el análisis de la composición de la fracción líquida una vez tratada con los PNZs, tanto separadamente como añadidas al comienzo de la fermentación, no muestra cambios en la composición de los compuestos estudiados. Por lo tanto, el aumento de la fermentabilidad observado al añadir PNZs al medio de fermentación tiene difícil explicación, pudiendo deberse a la eliminación de otros compuestos tóxicos presentes en el hidrolizado pero que no ha sido posible identificar debido a su complejidad o a efectos de los PNZs sobre la levadura, ya que es necesaria la presencia de los PNZs en el medio de fermentación para que se produzca el aumento de fermentabilidad.

A modo de resumen se muestra en la tabla 4.XV el porcentaje de eliminación de los compuestos tóxicos estudiados y el rendimiento en etanol (Y p/s) (como porcentaje de fermentaciones control), alcanzado tras los diferentes métodos de detoxificación. Aunque con todos los métodos estudiados es posible alcanzar unos rendimientos en etanol cercanos al de las fermentaciones control, los únicos tratamientos que muestran una variación en la concentración de los compuestos estudiados que puedan explicar este aumento de fermentabilidad son la oxidación avanzada y la evaporación (50 y 75% del volumen inicial). La reacción de Fenton (2 horas de tratamiento) causa una eliminación casi total de todos los compuestos (excepto los ácidos alifáticos). La evaporación (50% y 75% del volumen inicial) produce una eliminación de los compuestos volátiles como el furfural y en menor medida de los ácidos alifáticos, no viéndose afectada la concentración de los compuestos fenólicos.

Como puede observarse a la vista de los resultados, la eliminación de los compuestos tóxicos identificados en la fracción líquida, no es el único responsable del aumento de la fermentabilidad. En los tratamientos de neutralización con NaOH y Ca(OH)_2 , aunque el porcentaje de eliminación de los furanos, ácidos alifáticos y derivados fenólicos no es muy alto, se obtiene prácticamente el mismo rendimiento en etanol que en las fermentaciones control. La fracción líquida obtenida tras el pretratamiento tiene una composición muy compleja, y durante la neutralización se produce un precipitado que podría arrastrar otros compuestos tóxicos que, aunque no ha sido posible su identificación, están presentes en la fracción líquida. La acción conjunta de todos estos compuestos, y no sólo los identificados, sería la responsable de los efectos inhibitorios sobre el microorganismo. Para comprobar este hecho, se han realizado ensayos de fermentación con medio sintético al que se le añadieron los compuestos tóxicos en la misma concentración determinada en la fracción líquida. No se observó variación en la producción de etanol frente a la fermentación control (no se muestran los datos), indicando la existencia, de compuestos no identificados que contribuyen a la falta de fermentabilidad de dicha fracción.

La adición de PNZs no afecta a la concentración de los productos tóxicos en el hidrolizado, pero aumenta en gran medida a la fermentabilidad de estos. Este hecho parece indicar que los PNZs actúan mejorando la capacidad fermentadora de la levadura.

Tabla 4.XV.- Porcentaje de eliminación de furfural, HMF, ácidos alifáticos (acético y fórmico), fenoles (catecol, vainillina, siringaldehído y 4-hidroxibenzoico) y rendimiento etanol (Y p/x), tras los métodos de destoxificación a los que se ha sometido la fracción líquida.

| Método | Compuestos (% de eliminación) | | | | Y p/x (% control) |
|----------------------------|-------------------------------|-----|-------------------|---------|-------------------|
| | Fufural | HMF | Ácidos alifáticos | Fenoles | |
| Dilución (2 veces) | 50 | 50 | 50 | 50 | 98 |
| Ca (OH) ₂ pH 10 | 10 | 8 | 10 | 9 | 97 |
| Na OH pH 10 | 9 | 9 | 15 | 10 | 96 |
| Fenton (1 h) | 60 | 70 | 0 | 60 | 65 |
| Fenton (2 h) | 96 | 100 | 0 | 90 | 95 |
| Evaporación (25 %) | 60 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| Evaporación (50 %) | 100 | 0 | 18 | 0 | 93 |
| Evaporación (75 %) | 100 | 0 | 30 | 0 | 95 |
| Zecer-56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 96 |
| Zesep-56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 97 |
| Clinoptilolita | 0 | 0 | 0 | 0 | 93 |

4.3.2. Utilización de la fracción líquida destoxificada como medio de fermentación en un proceso de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS).

Con objeto de determinar la factibilidad de la utilización de la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento de explosión por vapor como medio de fermentación en el proceso de SFS, se realizaron ensayos sustituyendo el Medio Líquido Basal por la fracción líquida sometida a distintos tratamientos de destoxificación. Para este estudio se utilizaron los tratamientos de destoxificación que proporcionaron los mejores resultados de fermentabilidad: dilución 1:2, reacción de Fenton (2 horas), evaporación al 50% del volumen inicial y adicción de 10 g/l de Zesep-56. En todos los casos se añade a la fracción líquida sales minerales hasta alcanzar la concentración del medio líquido basal (MLB) sustituyendo la glucosa por una concentración de biomasa de chopo explotado del 10% (p/v).

En la figura 4.37 se muestra los rendimientos en etanol a las 48 horas obtenidos en ensayos de SFS. Los resultados se expresan como porcentaje de un control en el que se utilizó MLB sin glucosa en lugar de la fracción líquida. Como puede observarse, en todos los casos se alcanzan rendimientos superiores al 85% del control, obteniéndose los mejores resultados (91% del control) al utilizar la fracción líquida neutralizada con hidróxido cálcico.

Del análisis de los resultados puede concluirse que la aplicación de un tratamiento de destoxificación a la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento hace posible la utilización de esta fracción como medio del proceso de SFS, con el consiguiente ahorro de agua y la reducción de efluentes. La elección del tratamiento de destoxificación dependerá de la composición de la fracción líquida (que a su vez dependerá del tipo de biomasa y del pretratamiento) y de la sensibilidad del microorganismo empleado a los tóxicos.

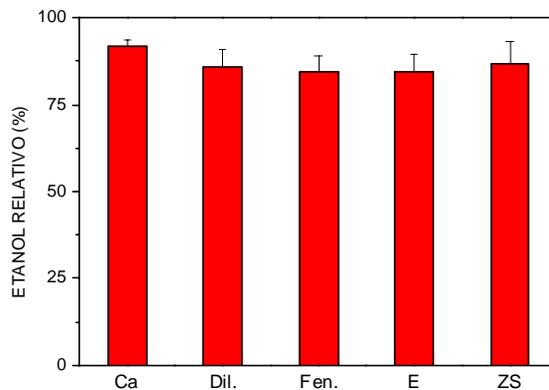


Figura 4.37.- Rendimiento en etanol a las 48 horas de los procesos de SFS en los que se utiliza la fracción destoxificada con diferentes métodos. Los datos se muestran como porcentaje de un control en el que se utilizó agua en lugar de la fracción líquida (100% = 19 g/l de etanol). (Ca = destoxificación con $\text{Ca}(\text{OH})_2$; Dil. = fracción líquida diluida dos veces; Fen. = reacción de Fenton 2 horas; E = evaporación 50%; ZS = Zesep-56 10 g/l).

5. CONCLUSIONES

1. La fracción líquida, obtenida tras el pretratamiento de biomasa de chopo con explosión por vapor a 210 °C y 4 minutos, inhibe el crecimiento y la producción de etanol de la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875.
2. Los compuestos identificados en la fracción líquida pertenecen a tres grupos: ácidos alifáticos, furanos y derivados fenólicos. El ácido acético y el furfural han sido los compuestos mayoritarios como corresponde a un hidrolizado típico de maderas duras.
3. La producción de biomasa de *K. marxianus* CECT 10875 se ve más afectada por la presencia de los compuestos tóxicos identificados en la fracción líquida que la producción de etanol. El catecol y el 4-hidroxibenzaldehído se muestran como los más tóxicos. Concentraciones de 1,75 g/l inhiben totalmente la fermentación en ambos casos.
4. *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, cepa termotolerante seleccionada por su resistencia a la temperatura, es más tolerante a los productos de degradación originados en el pretratamiento que la mayoría de los microorganismos etanologénicos citados en la bibliografía.
5. *K. marxianus* CECT 10875 es capaz de reducir los furanos y aldehídos aromáticos a sus correspondientes alcoholes, siendo necesaria la desaparición total del aldehído del medio de fermentación para que se observe producción de biomasa y etanol.
6. A la concentración en la que se encuentran estos compuestos en la fracción líquida, ninguno muestra efectos tóxicos sobre *K. marxianus* CECT 10875. Las combinaciones binarias de los compuestos estudiados muestran efectos inhibitorios sinérgicos, a excepción de la combinación catecol-furfural, cuyo efecto es acumulativo.
7. La asimilación de los aldehídos en combinaciones binarias se produce de manera simultánea, aunque se observa una reducción de la tasa de asimilación en comparación con las mostradas en los ensayos en presencia de un único aldehído.
8. La interacción del ácido acético, furfural y catecol muestra efectos negativos sobre la tasa específica de crecimiento, la productividad volumétrica, el rendimiento en

etanol y el rendimiento en biomasa. El furfural muestra la mayor inhibición de la tasa específica de crecimiento y la productividad volumétrica. La producción de biomasa se ve más afectada por el ácido acético. Las interacciones dobles de los compuestos estudiados presentan el mayor efecto negativo sobre el rendimiento en etanol.

9. Todos los métodos de destoxificación estudiados (dilución, neutralización, reacción de Fenton, evaporación y aplicación de zeolitas) permiten alcanzar rendimientos en etanol semejantes a los de las fermentaciones control.
10. La aplicación de un tratamiento de destoxificación, a la fracción líquida obtenida tras el pretratamiento, hace posible su utilización como medio para la producción de etanol en el proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SFS). Con el consiguiente ahorro de agua y reducción de efluentes.
11. Mediante el proceso de SFS, utilizando *K. marxianus*, es posible obtener 1 litro de etanol a partir de 7 kg de biomasa de chopo y 40 litros de agua. El tratamiento de destoxificación de la fracción líquida obtenida tras la explosión por vapor, permitirá un ahorro de entre el 30 y 60% del agua utilizada en el proceso.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adler E. (1977) Lignin chemistry: past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11: 169-218
- Ahring B. K., Jensen K. T., Bjerre A. B., & Schimdt A. S. (1996) Pretreatment of wheat straw and xylose and xylan into ethanol by thermophilic anaerobic bacteria. *Bioresource Technol.* 58: 107-113
- Albers E., Larsson C., Lidén G., Niklasson K., & Guftasson L. (1996) Influence of nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation *Appl. Environ. Microb.* 62(9): 3187-3195
- Allen S. G., Schulman D., Lichwa J., Antal M. J., Laser M., & Lynd L. R. (2001) A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. *Ind. Eng. Chem. Res.* 40: 2934-2941.
- Amarthey S., & Jeffries T. (1996) An improvement in *Pichia stipitis* fermentation of acid-hydrolysed hemicellulosic achieved by overliming (calcium hydroxide treatment) and strain adaptation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 281-283.
- Ando S., Arai I., Kiyoto K., & Hanai S. (1986) Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.* 64: 567-570.
- Argyropoulos D. S., & Menachem S. B. (1997) Lignin. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 57: 128-158.
- Asghari A., Bothast R. J., Doran J. B., & Ingram L. O. (1996) Ethanol production from hemicellulose hydrolysates of agricultural residues using genetically engineered *Escherichia coli* strain KO11. *J. Ind. Microbiol.* 16: 42-47.
- Azhar A. F., Bery M. K., Colcord A. R., Roberts R. S., & Corbitt G. V. (1981) Factors affecting alcohol fermentation of wood acid hydrolysate. *Biotechnology Bioengineering Symp.* 11: 293-300.
- Ballesteros I., Ballesteros M., Cabañas A., Carrasco J., Martín C., Negro M. J., Saez F., & Saez R. (1991) Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29: 307-315.
- Ballesteros I., Oliva J. M., Ballesteros M., & Carrasco J. (1993) Optimization of the simultaneous saccharification and fermentation process using thermotolerant yeasts. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39/40: 201-211.
- Ballesteros I., Oliva J. M., Carrasco J., & Ballesteros M. (1994) Effect of media supplementation on ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45/46: 283-293.
- Ballesteros M., Ballesteros I., Oliva J. M., Carrasco J. E., Cabañas A., & Navarro A. A. (1998) Effects of surfactants and Zeolites on Simultaneous Saccharification and

- Fermentation of Steam-Exploded Poplar Biomass to Ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70/72: 369-381
- Ballesteros I., Oliva J. M., Navarro A. A., González A., Carrasco J. E., & Ballesteros M. (2000) Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84/86: 97-110
- Ballesteros I. (2000) Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica mediante un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS). Tesis doctoral. Universidad de Alcalá de Henares.
- Ballesteros I., Oliva J. M., Saez F., & Ballesteros M. (2001) Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of olive oil extraction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91/93: 237-252.
- Ballesteros I., Oliva J. M., Negro M. J., Manzanares P., & Ballesteros M. (2002) Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochem.* 38: 187-192.
- Ballesteros M. (2001) Biocombustibles para el transporte. En: Tecnologías Energéticas e Impacto Ambiental. JEN-CIEMAT 1951-2001 pp. 357-369. McGraw-Hill.
- Ballesteros M., Oliva J. M., Manzanares P., Negro M. J., & Ballesteros I. (2002) Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 559-561.
- Banat I. M., Nigam P., & Marchant R. (1992) Isolation of thermotolerant fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 259-263.
- Banat I. M., Nigam P., Singh D., Marchant R., & McHale A. P. (1998) Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I-Yeasts in general. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 809-821.
- Banerjee N., Bhatnagar R., & Viswanathan L. (1981) Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11: 226-228.
- Barbosa M., Beck M. J., Fein J. E., Potts D., & Ingram L. O. (1992) Efficient fermentation of *Pinus sp.* acid hydrolysates by an ethanologenic strain of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1382-1384.
- Barron N., Marchant L., McHale L., & McHale A. P. (1995) Studies on the use of a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* in simultaneous saccharification and ethanol formation from cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 518-520.
- Beall D. S., Ingram L. O., Ben-Bassat A., Doran J. B., Fowler D. E., Hall R. G., & Wood B. E. (1992) Conversion of hydrolysates of corn cobs and hulls into ethanol by recombinant *Escherichia coli* B containing integrated genes for ethanol production. *Biotechnol. Lett.* 14: 857-862.

- Bjerre A. B., Olesen A. B., & Fernqvist T. (1996) Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 568-577.
- Björklund L., Larsson S., Jönsson L. J., Reimann A., & Nilvebrant N. O. (2002) Treatment with lignin residue. A novel method for detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100: 563-575.
- Bollók M., Reczey K., & Zacchi G. (2000) Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86: 69-80.
- Boominathan K. & Reddy C. A. (1992) cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 12: 5586-5590.
- Bowen R. W., Pugh S. Y. R. & Schomburgk N. J. D. (1986) Inhibition of horse liver and yeast alcohol dehydrogenase by aromatic and aliphatic aldehydes. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 36: 191-196
- Boyer L. J., Vega J. L., Klasson K. T., Clausen E. C., & Gaddy J. L. (1992) The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biomass Bioenergy* 3: 41-48.
- Boyle M., Barron N., & McHale A. P. (1997) Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Biotechnol. Lett.* 19: 49-51.
- Buchert J., Puls J., & Poutanen K. (1989) The use of steamed hemicellulose as substrate in microbial conversions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20-21: 300-318.
- Buchert J., Niemelä K., Puls J., & Poutanen K. (1990) Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolysate by ion exclusion. *Proc. Biochem. Int.* 25: 176-180.
- Buchert J. & Niemelä K. (1991) Oxidative detoxification of wood-derived inhibitors by *Gluconobacter oxydans*. *J. Biotechnol.* 18: 103-116.
- Cadoche L. & López G. D. (1989) Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biol. Wastes.* 30: 153-157.
- Casal M., Cardoso H., & Leao C. (1996) Mechanism regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 142: 1385-1390.
- Clark T. A. & Mackie K. L. (1984) Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34: 101-110.
- Clark T. A., Mackie K. L., Dare P. H., & McDonald A. G. (1989) Steam explosion of the softwood *Pinus radiata* with sulfur dioxide addition.II. *J. Wood Chem. Technol.* 9: 135-166.

Comisión Europea (2001). Libro Verde: Hacia una estrategia europea de seguridad en el abastecimiento energético. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, Luxemburgo.

COM 2001.Directiva 547. Resolución del Parlamento Europeo del 12 Marzo de 2003.

Converti A., Domínguez J. M., Perego P., Da Silva S. S., & Zilli M. (2000) Wood hydrolysis and hydrolysate detoxification for subsequent xylitol production. *Chem. Eng. Technol.* 23: 1013-1020.

Dai Z. Y., Hooker B. S., Andersson D. B., & Thomas S. R. (2000) Improved plant-based production of E1 endoglucanase using potato expression optimization and tissue targeting. *Mol. Breed.* 6: 277-285

De Wulf O., Thonart P., Gagnage P., Marlier M., Paris A., & Paquot M. (1986) Bioconversion of vanillin to vanillyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 17: 605-616.

Dekker R. F. H., Barbosa A. M., & Sargent K. (2002) The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. *Enzyme Microbiol. Technol.* 30: 374-380.

Delgenes J. P., Moletta R., & Navarro J. M. (1996) Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 19: 220-225.

Delneri D., Gardner D. C. J., Bruschi C. V. & Oliver S. G. (1999) Disruption of seven hypothetical aryl-alcohol dehydrogenase genes from *Saccharomyces cerevisiae* and construction of a multiple knock-out strain. *Yeast* 15: 1681-1689

Diaz de Villegas D., Villa M. E., Guerra M., Rodriguez E., Redondo D., & Martínez A. (1992) Conversions of furfural into furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae* 354. *Acta Biotechnol.* 12: 351-354.

Dien B. S., Nichols N. N., O'Bryan P. J., & Bothast R. J. (2000) Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84/86: 191-196.

Duff S. J. B. & Murray W. D. (1996) Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol. *Bioresour. Technol.* 55: 1-33.

Dunlop A. (1948) Furfural formation and behaviour. *Ind. Eng. Chem.* 40: 204-209.

Ehrman T. (1994) Standard method for ash in biomass. *NREL*.

Ekman R. & Holmbom B. (2000) The chemistry of wood resin. En: Pitch control, wood resin and deresination. ED. E. Back, Allen L. Atlanta. 37-76.

El Bassam N. (1996) Products energy crops. En: Renewable energy crops for Europe and the Mediterranean region. Ren. Technicals Series 46, FAO (Roma, Italia). 142-154.

Energy project NNE5-2001-00729. Integrated biomass utilisation for production of biofuels.

Ergun M. & Mutlu S.F. (2000) Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 73: 251-255.

Erken-Saraçoglu N. & Arslan Y. (2000) Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Biotechnol. Letters*. 22: 855-858.

Excoffier G., Toussaint B., & Vignon M. R. (1991) Saccharification of steam-exploded poplar wood. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 1308-1317.

Fan L. T., Gharpuray M. M., & Lee Y. H. (1987) Cellulose hydrolysis biotechnology monographs 57. Springer, Berlin.

Farrel E. A., Bustard M., Gough S., McMullan P., Singh D., & McHale A. P. (1998) Ethanol production at 45 °C by *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on molasses pretreated with amberlite and non-living biomass. *Bioprocess Engineering*. 19: 217-219.

Fenske J. J., Griffin D. A., & Penner M. H. (1998) Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 364-368.

Fernández J. (1995) La biomasa como fuente de energía y productos no alimentarios. En: La biomasa como fuente de energía y productos para la agricultura y la industria. Serie ponencias. Editorial CIEMAT. Madrid.

Fernández-Bolaños J., Felizón B., Brenes M., Guillén R., & Heredia A. (1998) Hydroxytyrosol and Tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of steam-exploded olive stones. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 75: 1643-1649.

Fernández-Bolaños J., Felizón B., Heredia A., Rodríguez R., Guillén R., & Jimenez A. (2001) Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresour. Technol.* 79: 53-61.

Ferrari M. D., Neiroti E., Alborno C., & Saucedo E. (1992) Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 753-759.

Fontes N., Partridge J., Halling P. J., & Barreiros S. (2002) Zeolite molecular sieves have dramatic acid-base effects on enzymes in nonaqueous media. *Biotechnol. Bioeng.* 77: 296-302.

Galbe M. & Zacchi G. (2002) A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 618-628.

Gera R., Dhamija S. S., Gera T., & Singh D. (1997) Intergeneric ethanol producing hybrids of thermotolerant *Kluyveromyces* and non thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*. 19: 189-193.

- Ghose T. K. (1987) Measurements of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59: 257-268.
- Ghose T. K., Roychoudhury P. K., & Ghosh P. (1984) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosic to ethanol under vacuum cycling and step feeding. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 377-381.
- González de Buitrago J. M., Fernández B., Lizarbe M. A., Mejías A., & Rodríguez R. (1982) pH de los medios biológicos. En: Problemas de bioquímica. Ed. Alhambra.
- Gutiérrez T., Buszko M. L., Ingram L. O., & Preston J. F. (2002) Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanologenic strains of bacteria and its effect on ethanol production from xylose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98/100: 327-340.
- Hacking A. J., Taylor I. W. F., & Hanas C. M. (1984) Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40 °C. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 361-363.
- Hahn-Hägerdal B. (1996) Ethanolic fermentation of lignocellulosic hydrolysates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57/58: 195-199.
- Heipieper H. J., Weber F. J., Sikkema J., Keweloh H., & de Bont J. A. M. (1994) Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* 12: 409-415.
- Hernández M. (1997) Decoloración de efluentes alcalinos de industrias papeleras por *Streptomyces* spp.: aspectos químicos y enzimáticos. Tesis doctoral. Universidad de Alcalá de Henares.
- Higuchi T. (1990) Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24: 23-63.
- Ho N. W. Y., Chen Z., & Brainard A. P. (1998) Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1852-1859.
- Holtzapple M. T., Humphrey A. E., & Taylor J. D. (1989) Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood. *Biotechnol. Bioeng.* 33: 207-210.
- Holtzapple M. T., Jun J. H., Ashok G., Patibandla S. L., & Dale B. E. (1991) The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose treatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29: 59-74.
- Holtzapple M. T., Lundeen J. E., & Sturgis R. (1992) Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34/35: 5-21.
- Hooker B. S., Dai Z. Y., Andersson D. B., Quesenberry R. D., Ruth M. F., & Thomas S. R. (2001) Production of microbial cellulases in transgenic crop plants. Himmel, M.E., Baker, J.O., Saddler, J.N. (Eds.), *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*. American Chemical Society. 55-90

- Hughes D. B., Tudroszen N. J., & Moye C. J. (1984) The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* 6: 1-6.
- Imai T. & Ohono T. (1995) The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3604-3608.
- Ingram L. O. & Doran J. O. (1995) Conversion of cellulosic materials to ethanol. *FEMS Microbiology Reviews* 16: 235-241.
- Isken S. & de Bont J. A. M. (1998) Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles* 2: 229-238.
- Jönsson L. J., Palmqvist E., Nilvebrant N. O., & Hahn-Hägerdal B. (1998) Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 691-697.
- Kadam K. L., Wooley R. J., Aden A., Nguyen Q. A., & Ferraro F. M. (2000) Softwood forest thinnings as a biomass source for ethanol: a feasibility study for California. *Biotechnol. Prog.* 16: 947-957.
- Katzen R. A. (1997) 60 year journey through conversion of biomass to ethanol. In: Ramos LP (ed) *Proceedings of the Fifth Brazilian Symposium on the chemistry of lignins and other woods components*. Curitiba, Brasil 6: 334-339.
- Keller F. A. (1996) Integrated bioprocess development for bioethanol production. In: Wyman CE (ed) *Handbook on bioethanol: production and utilization*. Taylor and Francis, Bristol. 351-357.
- Khan A. W., Labrie J. P., & McKewn J. (1986) Effect of electron-beam irradiation pretreatment on the enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol Bioeng.* 28: 1449-1453.
- Kim H. K., Tucker M. P., & Nguyen Q. A. (2002) Effect of pressing lignocellulosic biomass on sugar yield in two-stage dilute-acid hydrolysis process. *Biotechnol. Prog.* 18: 489-494.
- Kiran Sree N., Sridhar M., Suresh K., Banat I. M., & Venkateswar Rao L. (2000) Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Bioresurce Technology.* 72: 43-46.
- Klinke H. B., Thomsen A. B., & Ahring B. K. (2001) Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on growth and ethanol production by *Thermoanaerobacter mathranii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 631-638.
- Klinke H. B., Ahring B. K., Schmidt A. S., & Thomsen A. B. (2002) Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Biores. Technol.* 82: 15-26.
- Kuhn A., van Zyl C., van Tonder A. & Prior B. A. (1995) Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1580-1585

- Lapierre C., Rolando C., & Monties B. (1983) Characterization of poplar lignins acidolysis products: capillary gas-liquid and liquid-liquid chromatography of monomeric compounds. *Holzforschung* 37: 189-198.
- Lark N., Xia Y., Qin C. G., Gong C. S., & Tsao G. T. (1997) Production of ethanol from recycled paper sludge using cellulase and yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Biomass Bioenergy* 12: 135-143.
- Larsson S., Galbe M., & Zacchi G. (1997) Recirculation of process water in the production of ethanol from softwood. *Biores. Technol.* 60: 143-151.
- Larsson S., Reimann A., Nilvebrant N. O., & Jönsson L. J. (1999a) Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77-79: 91-103.
- Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., & Zacchi G. N. N. O. (1999b) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microbiol. Technol.* 24: 151-159.
- Larsson S. (2000) Ethanol from lignocellulose-Fermentation inhibitors, detoxification and genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced resistance. Tesis doctoral. Lund. Suecia.
- Larsson S., Quintana-Sáinz A., Reimann A., Nilvebrant N. O., & Jönsson L. J. (2000) The influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86: 617-632.
- Larsson S., Cassland P., & Jönsson L. J. (2001) Development of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1163-1170.
- Laser M. S., Schulman D., Allen S. G., Lichwa J., Antal M. J., & Lynd L. R. (2002) A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresour. Technol.* 81: 33-44.
- Lawford H. G. & Rousseau J. D. (1992) Effect of acetic acid on xylose conversion to ethanol by genetically engineered *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34-35: 185-204.
- Lawford H. G., Rousseau J. D., Mohagheghi A., & McMillan J. D. (1999) Fermentation performance characteristics of a prehydrolyzate adapted xylose-fermenting recombinant *Zymomonas* in batch and continuous cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77/79: 191-204.
- Lee C. Y., Wen J., Thomas S., Delgass W. N., Grutzner J. B., & Tsao G. T. (1995) Conversion of biomass to ethanol. Isomerization of xylose over HY zeolite. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52: 29-41.
- Lee W. G., Lee S. J., Shin C. S., Park S. C., Chang H. N., & Chang Y. K. (1999) Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77-79: 547-559.

- Legrini O., Oliveros E., & Braun A. M. (1993) Photochemical processes by water treatment. *Chem. Rev.* 93: 671-698.
- Linden T., Peetre J., & Hahn-Hägerdal B. (1992) Isolation and characterization of acetic acid-tolerant galactose-fermenting strains *Saccharomyces cerevisiae* from a spent sulfite liquor fermentation plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1661-1669.
- López J., Pérez J., & López J. M. (2000) La participación de las zeolitas en la conservación de las aguas. *AquaTIC* 9.
- Luo C., Brink D. L., & Blanch H. W. (2002) Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. *Biomass Bioenergy.* 22: 125-138.
- Maddox I. S. & Murray A. E. (1983) Production of n-butanol by fermentation of wood hydrolysate. *Biotechnol. Lett.* 5: 175-178.
- Maiorella B., Blanch H. W., & Wilke C. R. (1983) By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 103-121.
- Marchesault R. M., Malhotra S. L., Jones A.V., & Perovic A. (1983) The wood explosion process: Characterization and uses of lignin/cellulose products. In: Wood and agricultural residues. Soltes (eds). Academic Press, Nueva York. 401-413.
- Martinez A., Rodriguez M. A., Wells M. L., York S. W., Preston J. F., & Ingram L. O. (2001) Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulosic with lime. *Biotechnol. Prog.* 17: 287-293. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98/100: 699-716.
- Martín C., Galbe M., Nilvebrant N. O., & Jönsson L. J. (2002) Comparisson of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretrated by steam explosion using different impregnating agents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98/100: 699-716
- Martín C. & Jönsson L. J. (2003) Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Enzyme Microbiol. Technol.* 32: 386-395.
- Martín C. & Manzanares P. (1994) Biomasa lignocelulósica. Polímeros constitutivos. Procesos biológicos de degradación de la lignina. Informes Técnicos Ciemat N° 754. 1-29.
- Martínez A., Rodriguez M. E., York S. W., Preston J. F., & Ingram L. O. (2000) Effects of Ca(OH)₂ treatments (overliming) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 526-536.
- McMillan J. D. (1994) Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Enzymatic conversion of biomass for fuel production (eds M. E. Himmel, J. O. Baker, and R. P. Overend) pp. 292-324. American Chemical Society, Washinton.
- Mes-Hartree M., Dale B. E., & Craig W. K. (1988) Comparison of steam and amonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 462-468.

- Mikulášová M., Vodný S., & Pekarovicová A. (1990) Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. *Biomass* 23: 149-154.
- Millet M. A., Baker A. J., & Scatter L. D. (1976) Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 125-153.
- Miyafuji H., Danner H., Neureiter M., Thomasser C., Bvochora J., Szolar O., & Braun R. (2003) Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. *Enzyme. Microbiol. Technol.* 32: 396-400.
- Modig T., Lidén G., & Taherzadeh J. (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.* 363: 769-776
- Moniruzzaman M. (1995) Saccharification and alcohol fermentation of steam-exploded rice straw. *Bioresour. Technol.* 55: 111-117.
- Moniruzzaman M. & Ingram L. O. (1998) Ethanol production from dilute acid hydrolysate of rice hulls using genetically engineered *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 943-947.
- Montenecourt B., & Eveleigh D. E. (1979) Production and characterization of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. TAPPI Annual Meeting Proceeding, Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Atlanta.. 101-108.
- Montgomery D. C. (1997) Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Morimoto S., Hirashima T., & Oashi M. (1969) Studies on fermentation products from furfural by yeasts. *J. Ferment. Technol.* 47: 486-490.
- Navarro A. R. (1994) Effects of furfural on ethanol formation by *Saccharomyces cerevisiae*: mathematical models. *Current Microbiol.* 29: 87-90.
- Negro M. J., Manzanares P., Ballesteros I., Oliva J. M., Cabañas A., & Ballesteros M. (2002) Sugars utilization by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 for ethanol production. 12th European conference on biomass for energy, industry and climate protection.1: 516-519.
- Negro M. J., Manzanares P., Ballesteros I., Oliva J. M., Cabañas A., & Ballesteros M. (2003 a) Changes in various physical/chemical parameters of *Pinus radiata* wood after steam explosion pretreatment. *Biomass Bioenergy* (En prensa).
- Negro M. J., Manzanares P., Ballesteros I., Oliva J. M., Cabañas A., & Ballesteros M. (2003 b) Study of pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (En prensa).
- Ng T., Bassat A. & Zeikus J. G. (1981) Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 6:1337-1343.

- Nguyen Q. A., Tucker M. P., Boynton B. L., Keller F. A., & Schell D. J. (1998) Dilute acid pretreatment of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70/72: 77-87.
- Nguyen Q. A., Tucker M. P., Keller F. A., Beaty D. A., Connors K. M., & Eddy F. P. (1999) Dilute acid hydrolysis of softwoods. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77-79: 133-142.
- Nguyen Q. A., Tucker M. P., Keller F. A., & Eddy F. P. (2000) Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86: 561-576.
- Nilsson U., Barron N., McHale L., & McHale A. P. (1995) The effects of phosphoric acid pretreatment on conversion of cellulose to ethanol at 45°C degrees using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Biotechnol. Lett.* 17: 985-988.
- Nilvebrant N.-O., Reimann A., Larsson S., & Jönsson L. J. (2001) Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-93: 35-49.
- Nishikawa N. K., Sutcliffe R., & Saddler J. N. (1988) The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 549-552.
- O'Boyle A., Good D., Potts D., Fein J. E., Griffith R., Beck M. J., Dahlgren D., & Wallin T. (1991) The CASH process. *The Swedish Ethanol Foundation (Bioalcohol Fuel Foundation)*.
- Olsson L. & Hahn-Hägerdal B. (1993) Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulosic hydrolysates. *Process Biochem.* 28: 249-257.
- Olsson L., Hahn-Hägerdal B., & Zacchi G. (1995) Kinetics of ethanol production by recombinant *Escherichia coli* KO11. *Biotechnol. Bioeng.* 45: 356-365.
- Olsson L. & Hahn-Hägerdal B. (1996) Fermentation of lignocellulosehydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microbiol. Technol.* 18: 312-331.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Galbe M., & Zacchi G. (1996a) The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzyme Microbiol. Technol.* 19: 470-476.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Stenberg K., Szengyel Z., Tenborg C., & Zacchi G. (1996b) Design and development of a bench-scale process development unit for the production of ethanol from lignocellulosics. *Biores. Technol.* 58: 171-179.
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Szengyel Z., Zacchi G., & Réczey K. (1997) Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme Microbiol. Technol.* 20: 286-293.
- Palmqvist E. (1998) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates: Inhibition and detoxification. Tesis doctoral. Lund. Suecia.
- Palmqvist E., Grage H., Meinander N. Q., & Hahn-Hägerdal B. (1999a) Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* 63: 46-55.

- Palmqvist E., Almeida J. S., & Hahn-Hägerdal B. (1999b) Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 62: 447-454.
- Palmqvist E. & Hahn-Hägerdal B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Biores. Technol.* 74: 17-24.
- Pampulha M. E. & Lourero-Dias M. C. (1989) Combined effect of acetic acid, pH, and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 547-550.
- Parajó J. C., Dominguez H., & Domínguez J. M. (1997) Improved xylitol production with *Debaromyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme Microbiol. Technol.* 21: 18-24.
- Perego P., Converti A., Palazzi E., Del Borghi M., & Ferraiolo G. (1990) Fermentation of hardwood hemicellulose hydrolysate by *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *J. Ind. Microbiol.* 6: 157-164.
- Pfeifer P. A., Bonn G., & Bobleter O. (1984) Influence of biomass degradation products on the fermentation of glucose to ethanol by *Saccharomyces calshbergensis* W 34. *Biotechnol. Lett.* 6: 541-546.
- Phowchinda O., Delia-Dupuy M. L., & Strehaiano P. (1995) Effects of acetic acid on growth and fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 17: 237-242.
- Pinto R. A. (2002) HPLC of humic model hydroxylated aromatic compounds for experiments with induced oxidative coupling. [http:// www-personal.enging.umich.edu](http://www-personal.enging.umich.edu).
- Piper P. (1997) The heat shock response. S. Hohmann and W.H. Manger (Eds). Yeast stress response. 75-99. Springer Verlag, Heidelberg.
- Piper P. N., Ortiz-Calderon C., Holyoak C., Coote C. O. & Cole M. (1997) Hsp30, the integral plasma membrane heat-shock in *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress inducible regulator of plasma membrane H⁺-ATPase. *Cell Stress Chaperones.* 2. 12-24.
- Popoff T. & Theander O. (1972) Formation of aromatic compounds from carbohydrates. Part I. Reaction of D-glucuronic acid, D-galacturonic acid, D-xylose and L-arabinose in slightly acidic, aqueous solution. *Carbohydr. Res.* 22: 135-149.
- Popoff T. & Theander O. (1976) Formation of aromatic compounds from carbohydrates. Part III. Reaction of D-glucose and D-fructose in slightly acidic, aqueous solution. *Acta Chem. Scand.* B 30: 397-402.
- Prabhune A. A., Baliga S. A., Chandwadkar A., & SivaRaman H. (1996) Acceleration of ethanolic fermentation by zeolites. *Biotechnology Techniques.* 10: 589-594.
- Quereshi N. & Manderson G. J. (1994) Bioconversion of renewable resources into ethanol: an economic evaluation of selected hydrolysis, fermentation and membrane technologies. *Energy Sources* 17: 241-265.

- Ramos L. P., Breuil C., & Saddler J. N. (1992) Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34/35: 37-48.
- Ranatunga T. D., Jervis J., Helm R. F., McMillan J. D., & Hatzis C. (1997) Identification of inhibitory componets toxic toward *Zymomonas mobilis* CP4(pZB5) xylose fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 67: 185-198.
- Reid M. F., Fewson C. A. (1994) Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.* 20: 13-56
- Roque-Malerbe R., Delgado R., Contreras O., & Lago A. (1987) Behaviour of yeast fermentation in the presence of zeolite. *Biotechnol. Lett.* 9: 640-642.
- Ruiz R. & Ehrman T. (1996) Determiration of carbohydrates in biomass by high performance liquid chromatography. LAP-002. *NREL*.
- Russel J. B. (1992) Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 363-370.
- Safarzadeh-Amiri A., Bolton J. R., & Carter S. R. (1997) Ferrioxalate-mediated photodegradation of organic pollutants in contaminated water. *Wat. Res.* 31: 787-798.
- San Martin R., Perez C., & Briones R. (1995) Simultaneous production of ethanol and kraft from pine using steam explosion. *Bioresour. Technol.* 53: 217-223.
- Sanchez B. & Bautista J. (1988) Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guillierimondii* . *Enzyme Microbiol. Technol.* 10: 315-318.
- Schmidt A. S. & Thomsen A. B. (1998) Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 64: 139-151.
- Shukla R., Verykios X. E., & Mutharasan R. (1985) Isomerization and hydrolysis reactions of important disaccharides over inorganic heterogeneous catalysts. *Carbohydrate Research.* 143: 97-106.
- Singh N. P., & Khan A. (1995) Acetaldehyde:Gonotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 337:9-17
- SivaRaman H., Chandwadkar A., Baliga S. A., & Prabhune A. A. (1994) Effect of synthetic zeolite on ethanolic fermentation of sugarcane molasses. *Enzyme Microbiol. Technol.* 16: 719-722.
- Sjöström E. (1993) Wood chemistry. Fundamentals and applications. Academic Press, San Diego.
- Soni M. L., Meehrotra R. N., & Kapoor R. C. (1982) Dissociation constant and some thermodynamic parameters of levulinic acid. *Indian J. Chem.* 21:196-197.

Stenberg K., Tenborg C., Galbe M., Zacchi G., Palmqvist E., & Hahn-Hägerdal B. (1998a) Recycling of process stream in ethanol production from softwood based on enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70-72: 697-708.

Stenberg K., Tenborg C., Galbe M., & Zacchi G. (1998b) Optimisation of steam pretreatment of SO₂ impregnated mixed softwood for ethanol production. *J. Chem. Tech Biotechnol.* 71: 299-308.

Stenberg K. (1999) Ethanol from softwood. Process development based on steam pretreatment and SSF. Tesis doctoral. Lund. Suecia.

Stenberg K., Bollók M., Reczey K., Galbe M., & Zacchi G. (2000a) Effect of substrate and cellulose concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 68: 204-210.

Stenberg K., Galbe M., & Zacchi G. (2000b) The influence of lactic acid formation on the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of softwood to ethanol. *Enzyme Microbiol. Technol.* 26: 71-79.

Sun Y. & Cheng J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresurce Technology.* 83: 1-11.

Taherzadeh M. J., Niklasson C., & Lidén G. (1997a) Acetic acid-friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering Science.* 52: 2653-2659.

Taherzadeh M. J., Eklund R., Gustafsson L., Niklasson C., & Lidén G. (1997b) Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Ind. Eng. Chem. Res.* 36: 4659-4665.

Taherzadeh M. J. (1999) Ethanol from lignocellulose: Physiological effects of inhibitors and fermentation strategies. Tesis doctoral. Goteborg. Suecia.

Taherzadeh M. J., Niklasson C., & Lidén G. (1999) Conversion of dilute-acid hydrolyzates of spruce and birch to ethanol by fed-batch fermentation. *Biores. Technol.* 69: 59-66.

Taherzadeh M. J., Gustafsson L., Niklasson C., & Lidén G. (2000a) Physiological effects of 5-hydroxymethyl-furfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 701-708.

Taherzadeh M. J., Gustafsson L., Niklasson C., & Lidén G. (2000b) Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosc. Bioeng.* 87: 169-174.

Templeton D. & Ehrman T. (1995) Determination of acid-insoluble lignin in biomass. LAP-003. NREL.

Tenborg C., Stenberg K., Galbe M., Zacchi G., Larsson S., & Hahn-Hägerdal B. (1998) Comparison of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70/72: 3-15.

- Tenborg C., Galbe M., & Zacchi G. (2001) Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam pretreated softwood. *Enzyme Microbiol. Technol.* 28: 835-844.
- Tengerdy R. P. & Nagy J. G. (1988) Increasing the feed value of forestry waste by ammonia freeze explosion treatment. *Biol. Wastes.* 25: 149-153.
- Thring R. W., Chornet E., & Overend R. P. (1990) Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ratio, acid concentration and temperature. *Biomass* 23: 289-305.
- Torget R., Werdene P., Himmel M., & Grohmann K. (1990) Dilute acid pretreatment of short rotation woody and herbaceous crops. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25: 115-126.
- Torget R., Walter P., Himmel M., & Grohmann K. (1991) Dilute acid pretreatment of corn residues and short rotation woody crops. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29: 75-86.
- Torget R., Hatzis C., Hayward T. K., & Philippidis G. P. (1996) Optimization of reverse-flow, two-temperatures dilute-acid pretreatment to enhance biomass conversion to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57/58: 85-101.
- Tran A. V. & Chambers R. (1985) Red oak derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Biotechnol. Lett.* 7: 841-846.
- Tran A. V. & Chambers R. (1986) Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776. *Enzyme Microbiol. Technol.* 8: 439-444.
- Tran A. V. & Chambers R. P. (1986) Lignin and extractives derived inhibitors in the 2,3-butanediol fermentation of mannose-rich prehydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 191-197.
- Ulbricht R. J., Sharon J., & Thomas J. (1984) A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam. Appl. Toxicol.* 4: 843-853.
- van Walsun G. P., Allen S. G., Spenser M. J., Laser M. S., Antal M. J., & Lynd LR. (1996) Conversion of lignocelulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57/58: 157-170.
- van Zyl C., Prior B. A., & Du Preez J. C. (1988) Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 17: 357-369.
- van Zyl C., Bernard A., & Du Preez J. C. (1991) Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Enz. Microbiol. Technol.* 13:82-86.
- Varga E., Schmidt A. S., Reczey K., & Thomsen A. B. (2003) Pretreatment of corn stover using wet oxidation to enhance enzymatic digestibility. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 104: 37-50.
- Verduyn C., Postma E., Scheffers W. A., & van Dijken J. P. (1992) Effect of benzoic acid on metabolism fluxes in yeasts: continuous culture study of the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8: 501-517.

- Vidal A., Malato S., & Blanco J. (2002) Procesos solares fotocatalíticos en el tratamiento de efluentes. *Ingeniería Química* 386: 106-111
- Vidal P. F. & Molinier J. (1988) Ozonolysis of lignin- improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass* 16: 1-17.
- Villa G. P., Bartroli R., López R., Guerra M., Enrique M., Penas M., Rodriguez E., Redondo D., Iglesias I., & Díaz M. (1992) Microbial transformation of furfural to furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biotechnol.* 12: 509-512.
- Vlasenko E. Y., Ding H., Labavitch J. M., & Shoemaker S. P. (1997) Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Biores. Technol.* 59: 109-119.
- Voltolina D., Nieves M., & López J. (1997) Zeolitic products as enrichment for cultures of a marine microalga. *Aquacultural Engineering* 16: 1-5.
- von Sivers M., Zacchi G., Olsson L., & Hahn-Hägerdal B. (1994) Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 10: 555-560.
- Weast R.C. (1975-76) Handbook of chemistry and physics. CRC Press, Cleveland.
- Weigert B., Klein K., Rizzi M., Lauterbach C., & Dellweg H. (1988) Influence of furfural on the aerobic growth of the yeast *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* 10: 895-900.
- Wilson J. J., Deschatelets L., & Nishikawa N. K. (1989) Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Appl. Microbiology Biotechnology* 31: 592-596.
- Wood B. E., Beall D. S., & Ingram L. O. Production of recombinant bacterial endoglucanase as a co-product with ethanol during fermentation using derivatives of *Escherichia coli* KO11. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 547-555. 1997.
- Wooley R. J., Ruth M. F., Glassner D., & Sheenan J. (1999) Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development. *Biotechnol. Prog.* 15: 794-803.
- Wyman C. E. (1996). Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview. Wyman, C. E. 1-18. Bristol, Taylor and Francis. Handbook on bioethanol: production and utilization.
- Wyman C. E. (1999). Production of low cost sugars from biomass: progress, opportunities and challenges. Overend, R. P. and Chornet, E. 1, 867-872. Pergamon, Oxford, Proceeding of the 4th Biomass Conference of the Americas. Biomass-a growth opportunity in green energy and value-added products.
- Zacchi G. & Axelsson A. (1989) Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 223-232.
- Zaldivar J., Martinez A., & Ingram L. O. (1999) Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 24-33.

- Zaldivar J. & Ingram L. O. (1999) Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol. Bioeng.* 66: 203-210.
- Zaldivar J., Martinez A., & Ingram L. O. (2000) Effect of alcohols compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 68: 524-530.
- Zaldivar J., Nielsen J., & Olsson L. (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 17-34.
- Zeikus J. G., NG T. K., Ben-Bassat A., & Lamed R. J. (1983) Use of co-cultures in the production of ethanol by the fermentation of biomass. U.S. Patent 4.400.470
- Zeikus J. G. (1980) Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34:423-464.
- Zhang M., Eddy C., Deanda K., Finkelstein M., & Picataggio S. (1995) Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in a ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267: 240-243.
- Zheng Y. Z., Lin H. M., & Tsao G. T. (1998) Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnol. Prog.* 14: 890-896.
- Ziegler M. T., Thgomas S. R., & Danna K. J. (2000). Accumulation of a thermostable endo-1,4- β -D glucanase in the apoplast of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Mol. Breed.* 6:37-46.

ANEXO I.

DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA PILOTO DE EXPLOSIÓN POR VAPOR.

La planta piloto en la que se han llevado a cabo los pretratamientos con explosión a vapor está constituida por tres unidades: reactor de explosión por vapor, acumulador de vapor y ciclón de descarga, cuyas características se describen a continuación (figura 1).

Reactor de explosión por vapor

Es la cámara donde la biomasa lignocelulósica es comprimida y despresurizada súbitamente. Consiste en una tubería de 3'' de diámetro nominal de acero inoxidable 316, montado verticalmente y limitado por dos válvulas de paso reducido de 3'' de diámetro en acero inoxidable 316. La válvula situada en el extremo superior se abre y cierra manualmente y a su través se efectúa la carga de la biomasa lignocelulósica en el reactor. La válvula del extremo inferior de la cámara se abre mediante un dispositivo de disparador y muelle con el fin de lograr una apertura en menos de 1 segundo. De esta manera, la mezcla de vapor y biomasa se descarga violentamente, pasando a través de la tubería que la conduce al ciclón. La cámara del reactor, válvulas y tubería de descarga están aisladas con lana mineral, de 70 mm de espesor, con el fin de disminuir al máximo razonable la condensación del vapor en el proceso de compresión-expansión

La cámara del reactor está provista de la siguiente instrumentación y elementos de seguridad:

- a) Dos termómetros, uno en la parte superior de la cámara, cerca de la válvula de carga y otro en la parte inferior, cerca de la válvula de descarga, de modo que puedan comprobarse la temperatura del vapor y de la biomasa independiente.
- b) Válvula de seguridad tarada a la presión máxima del acumulador de vapor.
- c) Un manómetro.

d) Conexión de ventilación para despresurización después de los precalentamientos, con el fin de permitir, a continuación, la apertura de la válvula de carga.

Existen, además, dos entradas de vapor, una en la parte superior de la cámara y otra en la inferior.

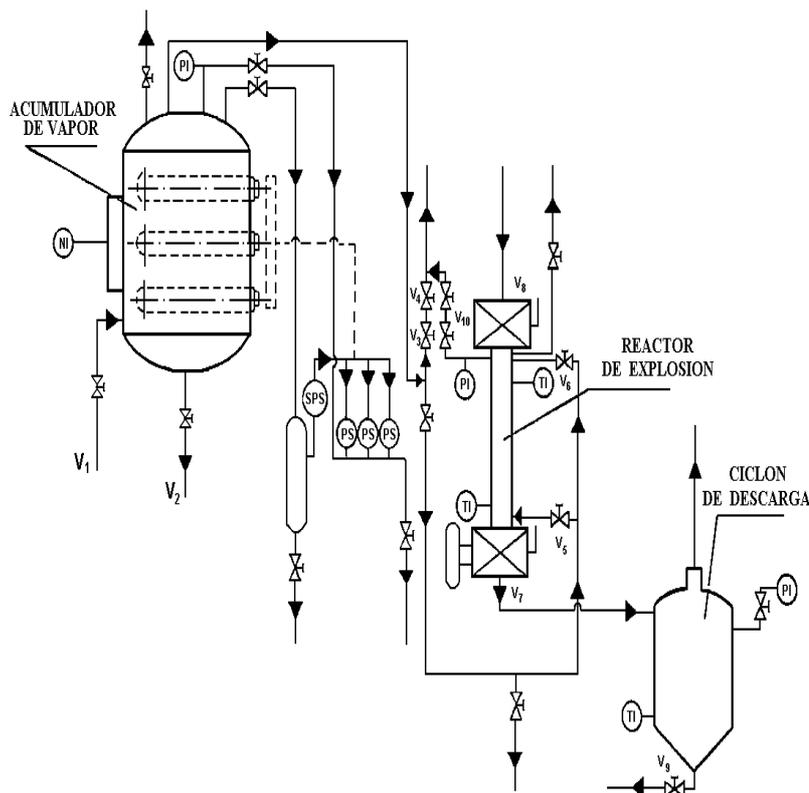


Figura 1.- Esquema de la planta piloto de pretratamiento por explosión con vapor.

Ciclón de descarga

La mezcla vapor y material lignocelulósica expulsado en cada disparo entra en el ciclón de descarga, horizontal y tangencialmente. El ciclón está construido en acero inoxidable 316 y tiene una parte cilíndrica de 16'' de diámetro y una parte troncocónica que partiendo de la cilíndrica, hacia abajo y con un ángulo de 60°, acaba en cuello de brida DN-80 y PN-16, sobre la que se monta una válvula tipo tajadera por la que se extrae el material expansionado en el reactor. El borde superior de la parte cilíndrica del ciclón

acaba en una brida de 16'' provista de orejetas y pasadores que sujetan los 16 pernos de ojo que fijan la brida ciega, que hace de tapadera del ciclón. El ciclón incorpora un termómetro y un manómetro.

Acumulador de vapor

El acumulador ha de suministrar vapor al reactor de explosión por vapor. Consiste en un recipiente a presión provisto de 3 resistencias eléctricas de 9 KW de potencia cada una. El recipiente tiene un diámetro de 1000 mm y una altura, entre líneas de tangencia, de 930 mm. Está construido en acero al carbono y posee las siguientes conexiones, instrumentos y elementos de seguridad:

- Conexión de 1'' de diámetro para el indicador de nivel.
- Drenaje de 3/4'' de diámetro.
- Válvula de seguridad de 2''x 3'' de diámetro.
- Manómetro.
- Termómetro.
- Presostatos de control de las resistencias eléctricas.

En la salida de vapor además de una placa de orificio limitadora de caudal, se dispone de una derivación de venteo a la atmósfera, cerrada por dos válvulas, con el fin de permitir la salida de aire en los llenados iniciales y en la puesta en presión y temperatura de servicio. Los presostatos que actúan sobre las resistencias están tarados a presiones escalonadas y actuará uno sobre cada resistencia apagándola o encendiéndola según se alcance o no el nivel de consigna.

En la figura 2 se puede ver la planta piloto en la que se ha llevado a cabo los pretratamientos de explosión a vapor de la biomasa de chopo.

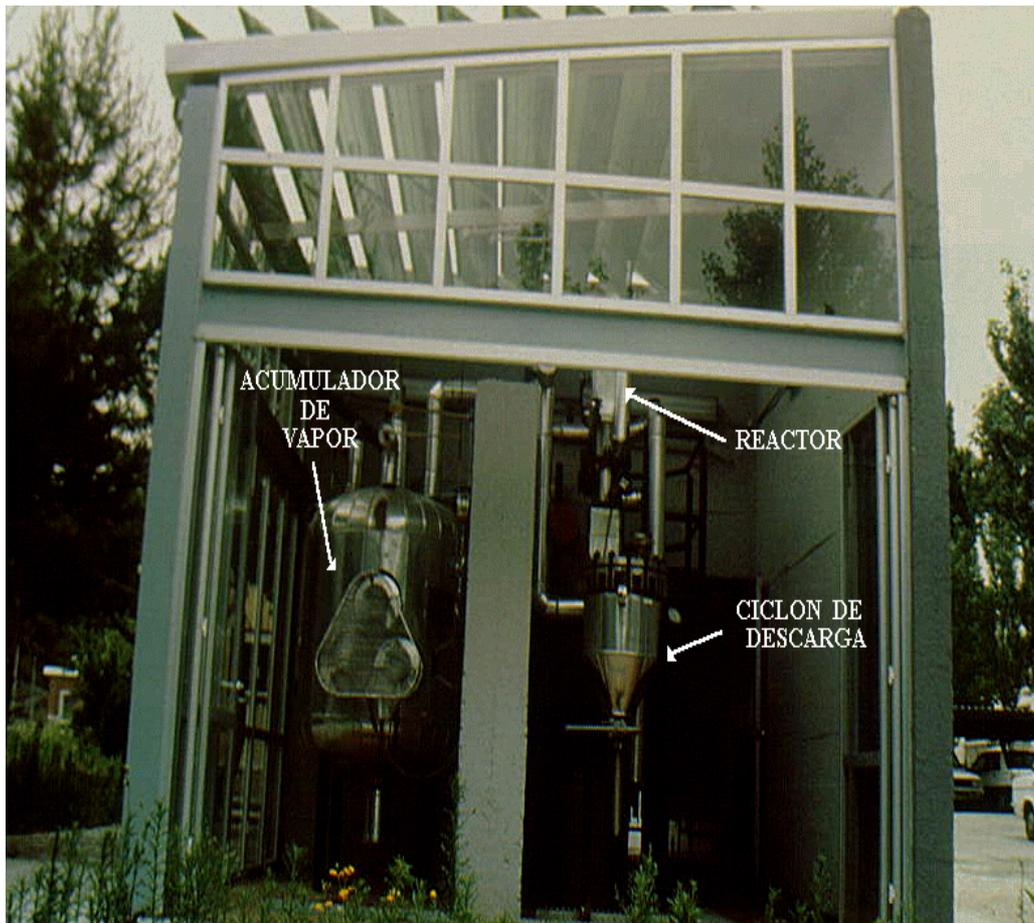


Figura 2.- Vista de la planta piloto de explosión a vapor situada en las instalaciones del CIEMAT.

ANEXO II.**COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.****Medio líquido basal (MLB).**

Composición: (g/l)

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Extracto de levadura | 5 |
| NH ₄ Cl | 2 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,3 |
| Glucosa | 30 |

Todos los componentes fueron disueltos en agua desionizada y esterilizados en autoclave a 120° C durante 20 minutos.

Medio sólido.

Composición: (g/l)

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Extracto de levadura | 5 |
| NH ₄ Cl | 1 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 |
| Agar | 20 |
| Glucosa | 20 |

Estos componentes se disuelven en agua desionizada, calentándose hasta ebullición. Con el se rellenan tubos de cultivo hasta 1/4 de su volumen y se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a 120° C. Una vez esterilizados y en caliente se inclinan y se dejan enfriar hasta que se solidifiquen. Posteriormente se incuban durante 24 horas a 37 °C para comprobar contaminaciones.

ANEXO III.

JUSTIFICACIÓN ESTADÍSTICA DEL MODELO DE REGRESIÓN.

Modelo de regresión
Resumen del modelo(b)

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación | Durbin-Watson |
|--------|---------|------------|----------------------|-----------------------------|---------------|
| 1 | ,960(a) | ,921 | ,897 | ,04103 | 1,905 |

a Variables predictoras: (Constante), AFC, C2, Acético (g/l), Furfural (g/l), AF, AC, F2, A2, Catecol (g/l), FC

b Variable dependiente: MU

ANOVA(b)

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|--------|---------|
| 1 | Regresión | ,665 | 10 | ,066 | 39,492 | ,000(a) |
| | Residual | ,057 | 34 | ,002 | | |
| | Total | ,722 | 44 | | | |

a Variables predictoras: (Constante), AFC, C2, Acético (g/l), Furfural (g/l), AF, AC, F2, A2, Catecol (g/l), FC

b Variable dependiente: MU

Coeficientes(a)

| Modelo | | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|--------|----------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|--------|------|
| | | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 | (Constante) | ,391 | ,018 | | 21,986 | ,000 |
| | Acético (g/l) | -2,914E-02 | ,009 | -,709 | -3,225 | ,003 |
| | Furfural (g/l) | -,262 | ,045 | -1,273 | -5,792 | ,000 |
| | Catecol (g/l) | 4,340E-02 | ,090 | ,106 | ,480 | ,634 |
| | A2 | -3,735E-04 | ,001 | -,086 | -,392 | ,698 |
| | F2 | 4,066E-02 | ,024 | ,375 | 1,707 | ,097 |
| | C2 | -8,735E-02 | ,095 | -,201 | -,916 | ,366 |
| | AF | 1,529E-02 | ,007 | ,516 | 2,116 | ,042 |
| | AC | -1,109E-02 | ,014 | -,187 | -,767 | ,448 |
| | FC | -4,617E-02 | ,072 | -,156 | -,639 | ,527 |
| | AFC | 1,551E-02 | ,013 | ,332 | 1,167 | ,251 |

a Variable dependiente: MU

Estadísticos sobre los residuos(a)

| | Mínimo | Máximo | Media | Desviación típ. | N |
|-------------------------|--------|--------|-------|-----------------|----|
| Valor pronosticado | -,0069 | ,3912 | ,1167 | ,12292 | 45 |
| Residuo bruto | -,0617 | ,1050 | ,0000 | ,03607 | 45 |
| Valor pronosticado tip. | -1,005 | 2,234 | ,000 | 1,000 | 45 |
| Residuo tip. | -1,504 | 2,559 | ,000 | ,879 | 45 |

a Variable dependiente: MU

Variables introducidas/eliminadas(b)

| Modelo | Variables introducidas | Variables eliminadas | Método |
|--|--|----------------------|--------------|
| 1 | AFC, C2, Acético (g/l), Furfural (g/l), AF, AC, F2, A2, Catecol (g/l), FC(a) | | , Introducir |
| a Todas las variables solicitadas introducidas | | | |
| b Variable dependiente: Q (g/lh) | | | |

Resumen del modelo(b)

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación | Durbin-Watson |
|--------|---------|------------|----------------------|-----------------------------|---------------|
| 1 | ,989(a) | ,978 | ,972 | ,08284 | 2,085 |

a Variables predictoras: (Constante), AFC, C2, Acético (g/l), Furfural (g/l), AF, AC, F2, A2, Catecol (g/l), FC

b Variable dependiente: Q (g/lh)

ANOVA(b)

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|---------|---------|
| 1 | Regresión | 10,380 | 10 | 1,038 | 151,249 | ,000(a) |
| | Residual | ,233 | 34 | ,007 | | |
| | Total | 10,614 | 44 | | | |

a Variables predictoras: (Constante), AFC, C2, Acético (g/l), Furfural (g/l), AF, AC, F2, A2, Catecol (g/l), FC

b Variable dependiente: Q (g/lh)

Coeficientes(a)

| Modelo | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | | t | Sig. |
|--------|--------------------------------|------------|-----------------------------|--------|---------|------|
| | B | Error típ. | Beta | | | |
| 1 | (Constante) | 1,563 | ,036 | | 43,501 | ,000 |
| | Acético (g/l) | -,144 | ,018 | -,916 | -7,912 | ,000 |
| | Furfural (g/l) | -1,401 | ,091 | -1,777 | -15,352 | ,000 |
| | Catecol (g/l) | -1,128 | ,182 | -,716 | -6,181 | ,000 |
| | A2 | 1,270E-04 | ,002 | ,008 | ,066 | ,948 |
| | F2 | ,286 | ,048 | ,687 | 5,938 | ,000 |
| | C2 | 5,270E-02 | ,192 | ,032 | ,274 | ,786 |
| | AF | 8,948E-02 | ,015 | ,787 | 6,132 | ,000 |
| | AC | ,122 | ,029 | ,534 | 4,165 | ,000 |
| | FC | ,626 | ,146 | ,551 | 4,292 | ,000 |
| AFC | -6,881E-02 | ,027 | -,384 | -2,564 | ,015 | |

a Variable dependiente: Q (g/lh)

Diagnósticos por caso(a)

| Número de caso | Residuo tip. | Q (g/lh) |
|----------------|--------------|----------|
| 33 | 3,292 | ,87 |

a Variable dependiente: Q (g/lh)

Estadísticos sobre los residuos(a)

| | Mínimo | Máximo | Media | Desviación típ. | N |
|--------------------------------|--------|--------|-------|-----------------|----|
| Valor pronosticado | -,0625 | 1,5629 | ,3213 | ,48571 | 45 |
| Residuo bruto | -,1102 | ,2727 | ,0000 | ,07282 | 45 |
| Valor pronosticado tip. | -,790 | 2,556 | ,000 | 1,000 | 45 |
| Residuo tip. | -1,330 | 3,292 | ,000 | ,879 | 45 |

a Variable dependiente: Q (g/lh)

Regresión

Notas

Variables introducidas/eliminadas(b)

| Modelo | Variables introducidas | Variables eliminadas | Método |
|----------|--|----------------------|--------------|
| 1 | AFC, C2, Acético (g/l), Furfural (g/l), AF, AC, F2, A2, Catecol (g/l), FC(a) | | , Introducir |

a Todas las variables solicitadas introducidas

b Variable dependiente: Y p/s (g/g)

Resumen del modelo(b)

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación | Durbin-Watson |
|----------|---------|------------|----------------------|-----------------------------|---------------|
| 1 | ,990(a) | ,981 | ,975 | ,02899 | 1,992 |

a Variables predictoras: (Constante), AFC, C2, Acético (g/l), Furfural (g/l), AF, AC, F2, A2, Catecol (g/l), FC

b Variable dependiente: Y p/s (g/g)

ANOVA(b)

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|----------|------------------|-------------------|----|------------------|---------|---------|
| 1 | Regresión | 1,454 | 10 | ,145 | 173,016 | ,000(a) |
| | Residual | ,029 | 34 | ,001 | | |
| | Total | 1,483 | 44 | | | |

a Variables predictoras: (Constante), AFC, C2, Acético (g/l), Furfural (g/l), AF, AC, F2, A2, Catecol (g/l), FC

b Variable dependiente: Y p/s (g/g)

Coeficientes(a)

| | | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|--------|----------------|--------------------------------|-------|-----------------------------|---------|------|
| Modelo | B | Error típ. | Beta | | | |
| 1 | (Constante) | ,425 | ,013 | | 33,810 | ,000 |
| | Acético (g/l) | 2,968E-02 | ,006 | ,504 | 4,648 | ,000 |
| | Furfural (g/l) | 8,980E-02 | ,032 | ,305 | 2,812 | ,008 |
| | Catecol (g/l) | ,193 | ,064 | ,328 | 3,027 | ,005 |
| | A2 | 2,747E-03 | ,001 | ,442 | 4,078 | ,000 |
| | F2 | 8,617E-02 | ,017 | ,554 | 5,117 | ,000 |
| | C2 | ,345 | ,067 | ,554 | 5,117 | ,000 |
| | AF | -8,663E-02 | ,005 | -2,038 | -16,964 | ,000 |
| | AC | -,175 | ,010 | -2,060 | -17,145 | ,000 |
| | FC | -,829 | ,051 | -1,951 | -16,239 | ,000 |
| AFC | ,168 | ,009 | 2,508 | 17,901 | ,000 | |

a Variable dependiente: Y p/s (g/g)

Estadísticos sobre los residuos(a)

| | Mínimo | Máximo | Media | Desviación típ. | N |
|-------------------------|--------|--------|-------|-----------------|----|
| Valor pronosticado | ,0083 | ,4251 | ,2356 | ,18180 | 45 |
| Residuo bruto | -,0572 | ,0543 | ,0000 | ,02549 | 45 |
| Valor pronosticado típ. | -1,250 | 1,043 | ,000 | 1,000 | 45 |
| Residuo típ. | -1,971 | 1,873 | ,000 | ,879 | 45 |

a Variable dependiente: Y p/s (g/g)

Regresión

| | | |
|----------|--|------------|
| Recursos | Memoria necesaria | 4548 bytes |
| | Memoria adicional requerida para los diagramas de residuos | 168 bytes |
| | Tiempo transcurrido | 0:00:00,08 |

Variables introducidas/eliminadas(b)

| Modelo | Variables introducidas | Variables eliminadas | Método |
|--------|--|----------------------|--------------|
| 1 | AFC, C2, Acético (g/l), Furfural (g/l), AF, AC, F2, A2, Catecol (g/l), FC(a) | | , Introducir |

a Todas las variables solicitadas introducidas

b Variable dependiente: Y x/s (g/g)

Resumen del modelo(b)

| Modelo | R | R cuadrado | R cuadrado corregida | Error típ. de la estimación | Durbin-Watson |
|--------|---------|------------|----------------------|-----------------------------|---------------|
| 1 | ,987(a) | ,975 | ,967 | ,007101 | 1,561 |

a Variables predictoras: (Constante), AFC, C2, Acético (g/l), Furfural (g/l), AF, AC, F2, A2, Catecol (g/l), FC

b Variable dependiente: Y x/s (g/g)

ANOVA(b)

| Modelo | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|--------|-----------|-------------------|----|------------------|---------|---------|
| 1 | Regresión | ,066 | 10 | ,007 | 130,802 | ,000(a) |
| | Residual | ,002 | 34 | ,000 | | |
| | Total | ,068 | 44 | | | |

a Variables predictoras: (Constante), AFC, C2, Acético (g/l), Furfural (g/l), AF, AC, F2, A2, Catecol (g/l), FC
b Variable dependiente: Y x/s (g/g)

Coeficientes(a)

| Modelo | | Coeficientes no estandarizados | | Coeficientes estandarizados | t | Sig. |
|--------|----------------|--------------------------------|------------|-----------------------------|--------|------|
| | | B | Error típ. | Beta | | |
| 1 | (Constante) | ,113 | ,003 | | 36,792 | ,000 |
| | Acético (g/l) | -1,200E-02 | ,002 | -,953 | -7,669 | ,000 |
| | Furfural (g/l) | 1,630E-02 | ,008 | ,259 | 2,084 | ,045 |
| | Catecol (g/l) | -1,038E-02 | ,016 | -,082 | -,664 | ,511 |
| | A2 | 8,946E-04 | ,000 | ,673 | 5,423 | ,000 |
| | F2 | 3,865E-03 | ,004 | ,116 | ,937 | ,355 |
| | C2 | 2,646E-02 | ,016 | ,199 | 1,604 | ,118 |
| | AF | -8,140E-03 | ,001 | -,896 | -6,507 | ,000 |
| | AC | -1,193E-02 | ,003 | -,657 | -4,768 | ,000 |
| | FC | -,101 | ,013 | -1,116 | -8,099 | ,000 |
| AFC | 1,874E-02 | ,002 | 1,309 | 8,146 | ,000 | |

a Variable dependiente: Y x/s (g/g)

Estadísticos sobre los residuos(a)

| | Mínimo | Máximo | Media | Desviación típ. | N |
|-------------------------|---------|--------|--------|-----------------|----|
| Valor pronosticado | ,00087 | ,11331 | ,04222 | ,038718 | 45 |
| Residuo bruto | -,01463 | ,01804 | ,00000 | ,006242 | 45 |
| Valor pronosticado típ. | -1,068 | 1,836 | ,000 | 1,000 | 45 |
| Residuo típ. | -2,060 | 2,541 | ,000 | ,879 | 45 |

a Variable dependiente: Y x/s (g/g)