(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 315 272**

(51) Int. Cl.:
C02F 11/08 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **01905633 .2**
(96) Fecha de presentación : **19.02.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1259466**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.11.2002**

(54) Título: **Un procedimiento para procesar material lignocelulósico.**

(30) Prioridad: **17.02.2000 DK 2000 00256**
15.03.2000 DK 2000 00427

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

(73) Titular/es: **Technical University of Denmark**
Anker Engelundsvej 1, Building 101 A
2800 Lyngby, DK
BioGasol IPR A.p.S.

(72) Inventor/es: **Ahring, Birgitte, Kiaer y**
Thomsen, Anne, Belinda

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Un procedimiento para procesar material lignocelulósico.

Campo de la invención

En su aspecto más amplio, la presente invención se refiere a la conversión de materiales de biomasa lignocelulósica en productos carburantes combustibles. En particular, se proporciona un procedimiento continuo para convertir fermentativamente tales materiales de biomasa en etanol usando un diseño de procedimiento que permite que toda o parte del agua de proceso del procedimiento de fermentación etanólica se recircule de manera que se reduzca significativamente el consumo de agua de proceso.

Antecedentes técnicos y técnica anterior

Los crecientes requisitos de energía global y la mayor conciencia medioambiental han dado como resultado una importancia creciente de las alternativas a combustibles fósiles como fuentes de energía. La actividad humana con respecto a la combustión de carburantes fósiles contribuye significativamente a la cantidad total de dióxido de carbono (CO_2) liberado a la atmósfera. Se da a entender que el dióxido de carbono es un denominado "gas de invernadero" y, por tanto, que contribuye al calentamiento global.

A diferencia de la producción de energía mediante la combustión de carburantes fósiles, la producción de energía mediante la combustión de biomasa contemporánea (predominantemente en forma de material vegetal cosechado) o carburantes derivados de tal biomasa se considera como "de CO_2 neutro" ya que la cantidad de CO_2 liberada por la combustión de una cantidad dada de tal biomasa se corresponde con la cantidad de CO_2 que originalmente fue tomada de la atmósfera durante la formación de esa cantidad de biomasa.

Entre los carburantes derivados de biomasa vegetal, el etanol ha recibido una atención particular como un posible sustituto o complemento de los productos de hidrocarburos líquidos derivados del petróleo. Para minimizar el coste de producción de etanol producido a partir de biomasa (también se denomina en lo sucesivo "bioetanol"), es importante usar biomasa en forma de subproductos de bajo coste procedentes de jardinería, agricultura, silvicultura, la industria maderera y similares; por tanto, por ejemplo, materiales tales como paja, tallos de maíz, residuos forestales (restos de corte de troncos, corteza, ramas pequeñas, gajos y similares), serrín y virutas de madera son todos los materiales que pueden emplearse para producir bioetanol.

En general, sin embargo, el precio del bioetanol no ha sido competitivo con el de carburantes fósiles tradicionales y por tanto se necesita sumamente reducir los costes de producción en la medida de lo posible optimizando o mejorando las tecnologías de producción de bioetanol.

Un factor importante en relación con la producción de bioetanol a escala comercial es el coste del agua de proceso empleada. En general, el efluente acuoso de la producción convencional de bioetanol basada en los materiales de biomasa anteriores contiene sustancias a un nivel que, si tal agua de proceso se recircula, será limitante de la velocidad durante el pretratamiento del material lignocelulósico y/o inhibidor durante la posterior hidrólisis del material pretratado y la fermentación de los azúcares allí dentro. Por consiguiente, una práctica habitual en la producción de bioetanol es desechar este efluente de agua y sustituirlo en el procedimiento por nueva agua de proceso.

Por tanto, existe la necesidad industrial de diseñar procedimientos de producción de bioetanol en los que pueda recircularse toda o parte del agua de proceso.

En el documento US 5.221.357 se describe un procedimiento para tratar un material de polisacárido tal como celulosa, hemicelulosa y lignocelulosa mediante una hidrólisis ácida de dos etapas para producir monosacáridos y una oxidación húmeda de los sólidos tales como lignina para producir productos solubles, por ejemplo ácidos orgánicos. Los monosacáridos producidos se someten posteriormente a fermentación para producir etanol. Los residuos de la oxidación húmeda y la fermentación se someten a una etapa de metanización. Sin embargo, con el fin de poder recircular el líquido restante y los sólidos al sistema se necesita una etapa de oxidación húmeda secundaria después de la metanización que es un coste adicional en la producción de etanol.

En el documento US 3.562.319 se describe en más detalle el procedimiento de oxidación húmeda del documento US 5.221.357 y se desvela que el procedimiento de oxidación húmeda es una oxidación ácida y se usa para oxidar material celulósico para obtener ácidos orgánicos.

El documento US 5.932.456 desvela un procedimiento para la producción de etanol a partir de biomasa que contiene material lignocelulósico sólido. El procedimiento comprende un tratamiento de oxidación sin la preparación de una suspensión acuosa del material antes de la oxidación seguido por hidrólisis, fermentación y separación del etanol del líquido de fermentación y metanización del residuo de fermentación.

El documento DE 19637909 desvela un procedimiento para la producción de etanol a partir de madera vieja que comprende inyección de calor, hidrólisis, fermentación, separación del etanol y finalmente una metanización sin la recirculación del efluente obtenido después de la metanización.

Por tanto, la industria no está en posesión de ningún procedimiento comercialmente atractivo para producir en continuo productos carburantes de combustible que permitan recircular el agua de proceso.

Por tanto, un objetivo significativo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para procesar en continuo material lignocelulósico en productos carburantes valiosos en el que el efluente de aguas residuales del efluente de la fermentación etanólica se somete a un tratamiento, tal como una etapa de fermentación anaerobia que genera otro producto carburante de combustible y un efluente de aguas residuales en el que la cantidad de posibles sustancias inhibidoras está a un nivel inferior al inhibidor, que a su vez permite recircular toda o parte del agua del efluente de la etapa de fermentación anaerobia al procedimiento.

Por tanto, el procedimiento de la invención tiene las ventajas de poder 1) dar un grado de conversión muy alto de carbono en la biomasa lignocelulósica de partida para dar productos útiles, 2) reducir el consumo de agua usada en el procedimiento, y 3) minimizar las cantidades de material de residuos remanentes que aparecen del procedimiento.

Por tanto, el procedimiento de la invención no sólo proporciona una mejora de la economía del procedimiento, por ejemplo con respecto a la producción de otro producto carburante de combustible, sino que es más respetuoso con el medioambiente que los procedimientos tradicionales para obtener tales productos.

Breve descripción de la invención

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento para convertir en continuo material de biomasa lignocelulósica sólida en etanol, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(i) proporcionar una suspensión acuosa del material de biomasa,

(ii) someter, en un recipiente de reacción, dicha suspensión acuosa a condiciones neutras o alcalinas y a condiciones de temperatura elevada y/o a una atmósfera enriquecida en oxígeno para obtener una suspensión en la que se ha producido al menos la separación parcial del material de biomasa en celulosa, hemicelulosa y lignina,

(iii) someter la suspensión resultante de la etapa (ii) y/o la fase acuosa de ésta a un tratamiento dando como resultado al menos la hidrólisis parcial de la celulosa y hemicelulosa para obtener una suspensión y/o fase acuosa que contiene una cantidad de azúcares microbiológicamente fermentables que permite usar la suspensión o fase acuosa como un medio de fermentaciónetanólica,

(iv) someter la suspensión y/o fase acuosa de la etapa (iii) a al menos una etapa de fermentaciónetanólica,

(v) separar el etanol del medio de fermentación resultante de la etapa (iv) dando como resultado un efluente de aguas residuales de fermentación que contiene un nivel de sustancias inhibidoras que, si está presente en cualquiera de las etapas precedentes (ii) a (iv), limitaría la velocidad o la inhibiría;

(vi) someter dicho efluente de aguas residuales a un tratamiento por el cual el nivel de las sustancias inhibidoras se reduce a un nivel que, si el efluente de aguas residuales se introduce a cualquiera de las etapas precedentes (ii) a (iv), no es limitante de la velocidad o inhibidor;

(vii) introducir todo o parte del efluente de aguas residuales así tratado en cualquiera de las etapas precedentes (i) a (v), y

(viii) repetir las etapas (i) a (vii).

Como se muestra en este documento, ha sido posible proporcionar un procedimiento completamente operativo para convertir continuamente material de biomasa lignocelulósica sólida, procedimiento que comprende la oxidación húmeda o el tratamiento a una temperatura elevada tal como explosión de vapor, hidrólisis enzimática, fermentación etanólica y finalmente tratamiento del agua residual. Una característica interesante del procedimiento según la invención es que no es necesario incorporar ninguna etapa de destoxificación en el procedimiento ya que todas las sustancias producidas durante cada etapa individual del procedimiento sirvieron de sustrato para los organismos usados en una etapa posterior.

Como se describe anteriormente, el material de biomasa lignocelulósica se somete a un pretratamiento en la etapa (ii), que es la oxidación húmeda o un tratamiento a una temperatura elevada tal como, por ejemplo, explosión de vapor. Si se usa, la cantidad de agente oxidante empleado en esta etapa será en general una cantidad que es eficaz para evitar o minimizar sustancialmente la formación de productos de reducción no deseables, por ejemplo furfural y/o derivados de furfural. Un agente oxidante muy adecuado es oxígeno en sí mismo, y los procedimientos de la invención actualmente preferidos se realizan en presencia de oxígeno introducido en el reactor a una presión parcial inicial de oxígeno igual a o superior a la presión parcial ambiente del oxígeno.

Parece que la celulosa y cualquier hemicelulosa presente en residuo sólido insolubilizado que pueda permanecer después de realizarse un tratamiento oxidativo en húmedo o de explosión de vapor en la etapa (ii) se vuelve más susceptible, respecto a la celulosa y hemicelulosa en material lignocelulósico que no ha sido tratado en el modo de

la invención, a hidrólisis química o enzimática para dar los monosacáridos constituyentes (D-glucosa en el caso de celulosa, y principalmente D-xilosa y/u otras pentosas en el caso de la mayoría de las hemicelulosas), facilitándose así procedimientos tales como la fermentación para convertir glucosa o xilosa en etanol o para convertir xilosa en xilitol o lactosa.

En relación con la aplicación anteriormente mencionada de tratamientos enzimáticos o procedimientos de fermentación, el uso del procedimiento de la invención da como resultado una eliminación sustancial de cualquier sustancia inhibidora de microorganismos y/o enzimas tales como acetato, 2-furfural y/o 5-hidroximetil-2-furfural, además de sustancias fenólicas tales como vainillina, ácido vanílico, ácido homovanílico, acetosiringona, ácido siríngico, siringaldehído, siringol y similares, que de otro modo pueden acumularse en el agua de proceso como consecuencia de la degradación de lignina y otras sustancias en la primera etapa del procedimiento, y que posteriormente pueden inhibir microorganismos y/o inhibir la acción catalítica de enzimas añadidas con el fin de facilitar, por ejemplo, la hidrólisis de celulosa a glucosa o hidrólisis de componentes de hemicelulosa solubilizada, tales como xilanos, mananos o arabinanos, a los monosacáridos correspondientes.

Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, ahora se ha encontrado que, con el fin de evitar una acumulación de sustancias en el agua usada en el procedimiento, tales como ácido carboxílico y otros posibles inhibidores de la fermentación producida durante la interrupción de la estructura de material lignocelulósico por medio de un pretratamiento tal como oxidación húmeda o explosión de vapor y durante una etapa de fermentación etanólica, es posible eliminar o al menos reducir la cantidad de estas sustancias a un nivel inferior al inhibidor mediante la aplicación de una etapa de tratamiento aerobia o anaerobia usando uno o más microorganismos que solos o juntos pueden utilizar los ácidos carboxílicos y otros inhibidores de la fermentación como nutrientes, reduciéndose así el nivel de éstos.

De este modo es posible tratar el efluente de aguas residuales del procedimiento de fermentación etanólica para generar metano u otros biogases combustibles y un agua residual tratada final en la que el nivel de sustancias inhibidoras que, si están presentes en cualquiera de las etapas del procedimiento, es decir, mientras se realiza la oxidación húmeda o explosión de vapor de la biomasa lignocelulósica con el fin de obtener al menos una separación parcial de dicha biomasa, o si están presentes durante la posterior hidrólisis o fermentación de azúcares, limitaría la velocidad o inhibiría dicha separación, hidrólisis y/o fermentación. Por tanto, en el presente contexto, la expresión "sustancias inhibidoras" se refiere a sustancias tales como ácidos carboxílicos que inhiben el pretratamiento del material de biomasa lignocelulósica y a sustancias, tales como furanos y fenoles y ácidos carboxílicos, que inhiben la fermentación etanólica. Parece que un porcentaje muy alto (frecuentemente aproximadamente el 80% o más) de la materia orgánica, también denominada en lo sucesivo demanda química de oxígeno (DQO), que permanece después de la fermentación etanólica puede convertirse en biogás, minimizándose así las cantidades de materiales residuales que aparecen del procedimiento.

Como se menciona anteriormente, la etapa (ii) del procedimiento según la presente invención engloba una oxidación húmeda o tratamiento a temperatura elevada, por ejemplo explosión de vapor del material lignocelulósico. Los términos "oxidación húmeda" y "oxidativo en húmedo" como se usan en este documento se refieren a un procedimiento que tiene lugar en un medio acuoso, es decir, agua líquida o un medio líquido que contiene al menos una proporción sustancial de agua líquida, en presencia de un agente oxidante que reacciona oxidativamente de algún modo y hasta cierto punto con uno o más componentes o especies presentes (como un sólido o sólidos, y/o en forma disuelta) en el medio. El procedimiento normalmente tiene lugar a una temperatura elevada, es decir, a una temperatura significativamente superior a la temperatura ambiente o temperatura ambiente normal (normalmente a una temperatura de al menos 100ºC), y a una presión al menos igual a la presión de vapor del agua por encima del medio acuoso líquido a la temperatura en cuestión más la(s) presión(es) parcial(es) de cualquier otro gas o gases presentes, por ejemplo oxígeno, o (cuando se use aire) oxígeno más -principalmente- nitrógeno. Las condiciones (temperatura, presión) empleadas son de forma que el medio acuoso no hierva. La oxidación húmeda y la explosión de vapor tratada más adelante convierten una gran parte del material de biomasa en CO_2, H_2O y compuestos orgánicos más oxidados, más simples, principalmente ácidos carboxílicos de bajo peso molecular.

Como alternativa a la oxidación húmeda puede usarse satisfactoriamente en el procedimiento según la invención la muy conocida explosión de vapor (Puls, 1993) o vaporización. La explosión de vapor o vaporización funcionan al mismo intervalo de temperatura de 170-220ºC, por ejemplo un intervalo de 180 a 210ºC y tiempo de reacción de 2-20 minutos, pero los productos químicos usados son diferentes y la adición de agua antes del tratamiento mediante empapado de la biomasa en disoluciones alcalinas es sólo opcional. La vaporización funciona con vapor saturado con o sin previa adición de oxígeno o dióxido de carbono como catalizador (Saddler y col., 1993).

Como ya se indica, los procedimientos según la invención emplean material lignocelulósico de origen vegetal, la lignocelulosa, que es el componente principal de tales materiales, estando constituida en general predominantemente por celulosa, hemicelulosa y lignina.

La celulosa, que es un β-glucano constituido por unidades de D-anhidroglucosa, es el componente estructural principal de las paredes celulares de las plantas y normalmente constituye aproximadamente el 35-60% en peso (% p/p) de materiales lignocelulósicos.

Hemicelulosa es el término usado para denotar polisacáridos no celulósicos asociados con celulosa en tejidos vegetales. La hemicelulosa constituye frecuentemente aproximadamente el 20-35% p/p de materiales lignocelulósicos y la mayoría de las hemicelulosas están constituidas predominantemente por polímeros basados en unidades de azúcar pentosa (cinco carbonos), tales como unidades de D-xilosa y D-arabinosa, aunque generalmente también están presentes proporciones más pequeñas de unidades de azúcar hexosa (seis carbonos), tales como unidades de D-glucosa y D-manosa.

La lignina, que es un polímero reticulado complejo basado en unidades de p-hidroxifenilpropano sustituido de forma muy diversa, constituye generalmente aproximadamente el 10-30% p/p de materiales lignocelulósicos. Se cree que la lignina actúa como barrera física a la bioconversión directa (por ejemplo mediante fermentación de microorganismos) de celulosa y hemicelulosa en materiales lignocelulósicos que todavía no se han sometido a ningún tipo de procedimiento de pretratamiento (que puede ser muy adecuadamente un procedimiento oxidativo en húmedo como se describe en relación con la presente invención) para interrumpir la estructura de lignocelulosa.

Para minimizar el coste de producción del etanol producido a partir de biomasa es importante usar biomasa en forma de subproductos de bajo coste de jardinería tales como residuos de jardín, materiales de desecho de la agricultura, silvicultura, la industria maderera y similares. Por tanto, los procedimientos de la invención pueden aplicarse a cualquier tipo de materiales lignocelulósicos que contienen hemicelulosa. Por tanto, materiales relevantes incluyen material vegetal de manera o de no madera en forma de tallo, pedúnculo, arbusto, follaje, corteza, raíz, cáscara de nueces, haba, fruto seco, cascarilla, fibra, parra, paja, heno, césped, bambú o junco, individualmente o en una mezcla.

Materiales lignocelulósicos preferidos en el contexto de la invención incluyen madera (tanto de coníferas como de frondosas), paja, hojas y tallos de maíz y las denominadas cáscaras. La madera empleada en el contexto de la invención es generalmente madera del corazón (duramen) y/o madera exterior (xilema secundario) derivada de troncos, tallos y/o ramas de árboles o arbustos de hoja caduca o de hoja perenne. También puede ser valiosa la madera de las raíces de tales árboles o arbustos.

Fuentes de madera útiles incluyen numerosas especies de diversos géneros de árboles/arbustos coníferos y de hoja ancha. Entre las coníferas pueden mencionarse las siguientes: *Pinaceae*, que incluyen pinos (*Pinus spp*., tal como *Pinus sylvestris*), abetos plateados (*Abies spp*., tal como *Abies alba*), abetos falsos (*Picea spp*., tal como *Picea abies*), alerces (*Larix* y *Pseudolarix spp*., tal como *Larix decidua* y *L. kaempferi*) y abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Entre los de hoja ancha pueden mencionarse los siguientes: *Betulaceae*, que incluyen abedules (*Betula spp*., tal como *Betula pendula*); y *Fagaceae*, que incluyen hayas (*Fagus spp*., tal como *Fagus sylvatica*) y robles (*Quercus spp*., tal como *Quercus robur*).

Fuentes de paja útiles incluyen en particular cereales (pastos de cereal), es decir, plantas gramíneas que dan grano o semilla comestible. Paja de, por ejemplo, avena (*Avena spp*., tal como *A. sativa*), cebada (*Hordeum spp*., tal como *H. vulgare*), trigo (*Triticum spp*., que incluye *T. durum*), centeno (*Secal cereale*), arroz (*Oryza spp*.), mijo (por ejemplo especies de *Digitaria, Panicum*, *Paspalum, Pennisetum* o *Setaria*), sorgo (*Sorghum spp*., que incluye *S. bicolor var.* durra (también denominado en lo sucesivo "durra") y *milo*), trigo rubión (*Fagopyrum spp*., tal como *F. esculentum*) y maíz (también denominado en lo sucesivo maíz (*Zea mays*), que incluye maíz dulce], es muy adecuada para el tratamiento según el procedimiento de la invención.

Como se emplea en este documento, el término "cáscara" denota generalmente la cubierta exterior, corteza, cáscara de nueces, haba o cascarilla de cualquier fruto o semilla, pero el término como se emplea en este documento también engloba, por ejemplo, la cubierta exterior de una espiga de maíz. Cáscaras relevantes incluyen cáscaras seleccionadas de entre las siguientes: cáscaras de avena (*Avena spp*., tal como *A. sativa*), cebada (*Hordeum spp*., tal como *H. vulgare*), trigo (*Triticum spp*., que incluye *T. durum*), centeno (*Secal cereale*), arroz (*Oryza spp*.), mijo (por ejemplo especies de *Digitaria, Panicum, Paspalum*, *Pennisetum* o *Setaria*), sorgo(*Sorghum spp*., que incluye *S. bicolor var. durra* y *milo*), trigo rubión (*Fagopyrum spp.,* tal como *F. esculentum*), maíz [también conocido como maíz (*Zea mays*), que incluye maíz dulce], mazorca de maíz, semilla de colza (de *Brassica spp*., tal como *B. napus, B. napus* subsp. *rapifera* o *B. napus* subsp. *oleifera*), semilla de algodón (de *Gossypium spp*., tal como *G. heraceum*), almendra (*Prunus dulcis*, que incluye tanto almendra dulce como amarga) y semilla de girasol (*Helianthus spp*., tal como *H. annuus*).

Las cáscaras de cereales que incluyen no sólo aquellos mencionados entre los anteriores, sino también cáscaras de cereales distintos de aquellos mencionados entre los anteriores, son generalmente de interés en el contexto de la invención y a esta categoría pertenecen cáscaras preferidas, tales como cáscaras de avena y cáscaras de cebada. A este respecto puede mencionarse a modo de ejemplo que las cáscaras de avena están frecuentemente disponibles en grandes cantidades a bajo coste como un subproducto de procedimientos de procesamiento de avena para la producción de harina de avena, batidos con avena, copos de avena y similares; por tanto, al año se produce un total de aproximadamente 75000 toneladas de cáscaras de avena como subproducto del procesamiento de avena en Dinamarca, Noruega y Suecia, junto con el norte de Alemania.

Otros tipos de cáscaras de relevancia en relación con los procedimientos de la invención incluyen, por ejemplo, cáscaras de palma, cáscaras de cacahuete, cáscaras de coco, otros tipos de cáscaras de frutos secos y cáscara de la nuez del coco.

Debe observarse que la forma física nativa, masa y/o dimensiones de los materiales lignocelulósicos tales como madera, paja, heno y similares hará generalmente necesario, o al menos hará deseable, llevar a cabo la trituración del material (por ejemplo mediante molienda, erosión, machacado, prensado, corte, cascado o similares) hasta cierto punto con el fin de obtener partículas, trozos, fibras, hebras, láminas, copos o similares de material de tamaño suficientemente pequeño y/o área superficial suficientemente alta respecto a la relación de masa para permitir realizar satisfactoriamente la degradación del material. En el caso de madera, el material de dimensiones adecuadas estará frecuentemente disponible como un producto de desecho en forma de serrín, virutas de madera, astillas de madera, gajos y similares de aserraderos, silvicultura y otras fuentes comerciales.

A diferencia, numerosos tipos de cáscaras, por ejemplo cáscaras de grano o semilla de cereal en general, que incluyen cáscaras de avena como se emplean en los ejemplos operativos notificados en este documento, tienen en su forma nativa dimensiones suficientemente pequeñas y un área superficial suficientemente alta respecto a la relación de masa para permitir que se usen directamente, sin previa trituración, como materiales lignocelulósicos en un procedimiento según la presente invención.

La relación inicial de material lignocelulósico sólido respecto a medio acuoso líquido en el reactor de oxidación húmeda estará generalmente en el intervalo de 0,02-1 kg/litro, frecuentemente 0,05-0,35 kg/litro, tal como 0,05-0,2 kg/litro, dependiendo de la forma, masa y/o dimensiones del material lignocelulósico que se trata. A una escala industrial normalmente será económicamente más ventajoso realizar el procedimiento de la invención a la mayor relación posible de material lignocelulósico respecto a medio acuoso líquido, es decir, a la mayor relación que permita el mezclado adecuado del material lignocelulósico en el medio líquido que comprende el agente oxidante y que lleva a una velocidad de degradación de lignocelulosa satisfactoriamente alta.

Por tanto, usando ciertos materiales de tipos preferidos en el contexto de la presente invención y en el modo desvelado en este documento es posible, a una escala industrial, evitar tener que usar procedimientos de trituración que consumen mucho tiempo y energía -y por tanto caros- que requieren inversión en y mantenimiento del aparato o maquinaria de trituración adecuado.

Sin embargo, además de lo anterior, con ciertos tipos de materiales lignocelulósicos (por ejemplo cáscaras de ciertos frutos secos) entre aquellos de relevancia en relación con la presente invención puede desearse someter el material en cuestión, antes del tratamiento mediante un procedimiento de la invención, a un procedimiento de trituración (por ejemplo mediante molienda, erosión, machacado, prensado, corte, cascado o similares) con el fin de potenciar la reactividad global del material potenciando, por ejemplo, la movilidad física, capacidad de mezclado, relación del área superficial respecto a masa y similares del material.

Pretratamiento del material lignocelulósico (etapas (i) y (ii) del procedimiento según la invención)

Como se describe anteriormente, la primera etapa en el procedimiento para convertir en continuo material de biomasa lignocelulósica sólida en etanol es proporcionar una suspensión acuosa del material de biomasa lignocelulósica. La suspensión así obtenida se somete en la etapa (ii) del procedimiento a condiciones de temperatura elevada y/o a una atmósfera enriquecida en oxígeno para obtener una suspensión en la que al menos se ha producido la separación parcial del material de biomasa en celulosa, hemicelulosa y lignina.

En una realización preferida, la suspensión acuosa de la etapa (ii) se somete a un tratamiento de oxidación húmeda tratado anteriormente en detalle. En otra realización útil del presente procedimiento, la suspensión acuosa de la etapa (ii) se somete a un tratamiento de explosión de vapor como también se trata anteriormente. En el presente contexto, el tratamiento de oxidación húmeda y el tratamiento de explosión de vapor del material de biomasa lignocelulósica se denomina en lo sucesivo pretratamiento. Se entenderá que el tratamiento de explosión de vapor puede realizarse opcionalmente sin proporcionar el material de biomasa lignocelulósica como una suspensión acuosa.

Agentes oxidantes

Como ya se indica, si un agente oxidante está presente durante el pretratamiento, un agente oxidante preferido en el contexto de los procedimientos según la invención es oxígeno en sí mismo.

Otros agentes oxidantes que pueden ser apropiados -a concentraciones adecuadas y bajo condiciones adecuadas de temperatura y tiempo de reacción- para uso en un procedimiento oxidativo en húmedo en el modo de la invención incluyen, en particular, peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es muy soluble en agua, está fácilmente disponible comercialmente como disoluciones acuosas de concentración que oscila de relativamente diluidas (por ejemplo concentraciones de peróxido de hidrógeno de aproximadamente el 3% p/p) a relativamente concentradas (por ejemplo concentraciones de peróxido de hidrógeno de aproximadamente el 30-35% p/p) y es -como el oxígeno- un agente oxidante muy aceptable desde el punto de vista medioambiental.

Por tanto, el peróxido de hidrógeno es generalmente muy adecuado para incluirlo -solo o en combinación con uno o varios agentes oxidantes, por ejemplo oxígeno- como agente oxidante en el medio acuoso líquido empleado y, en tales casos, la concentración inicial de peróxido de hidrógeno en el medio acuoso líquido será normalmente adecuada en el intervalo del 0,5-10% p/p.

Las sustancias oxidantes que no son muy adecuadas como agentes oxidantes en el contexto del procedimiento de la invención incluyen ácidos oxidantes tales como ácido nítrico concentrado o diluido.

Si se emplea oxígeno como agente oxidante, se prefiere -como se menciona previamente- que el procedimiento se realice en presencia de oxígeno introducido a una presión parcial inicial de oxígeno igual a o superior a la presión parcial ambiente del oxígeno (es decir, la presión parcial de oxígeno en el aire circundante, que al nivel del mar es normalmente aproximadamente 0,2 bar, normalmente aproximadamente 0,21 bar), y normalmente serán de interés presiones parciales de oxígeno iniciales que están en el intervalo de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 35 bar. Sin embargo, generalmente se prefiere emplear presiones parciales de oxígeno iniciales de al menos 0,5 bar, normalmente en el intervalo de 0,5-35 bar. Presiones parciales iniciales de oxígeno típicas estarán en el intervalo de 1-15 bar, tal como 3-12 bar, por ejemplo 5-12 bar. La solubilidad del oxígeno en agua a temperaturas de relevancia para el procedimiento de la invención aumenta con la presión parcial de oxígeno y, por tanto, el uso de tales presiones parciales elevadas de oxígeno puede ser ventajoso para asegurar la disponibilidad de suficiente oxígeno en forma disuelta.

El oxígeno empleado puede añadirse en forma de oxígeno sustancialmente puro o en forma de una mezcla de gases que contiene oxígeno (tal como aire atmosférico) que además de oxígeno está constituida por uno o varios gases (por ejemplo nitrógeno y/o un gas inerte tal como argón) que no son perjudiciales para la realización del procedimiento de la invención; sin embargo, frecuentemente será ventajoso emplear oxígeno sustancialmente puro (tal como oxígeno de $\geq$ 99% de pureza que está fácilmente disponible comercialmente en cilindros de gas convencionales a presión).

Si se emplea oxígeno como agente oxidante, una cantidad de oxígeno eficaz apropiada (o mezcla de gases que contiene oxígeno) -particularmente en el caso de procedimientos por lotes en los que una cantidad elegida (lote) de material lignocelulósico apropiado se trata según la invención en un reactor que puede cerrarse y, opcionalmente, presurizarse- puede introducirse en el reactor en cuestión como una única carga a una presión inicial apropiada. Los reactores de este tipo empleados en procedimientos por lotes para tratamiento oxidativo en húmedo en el modo de la invención generalmente encerrarán, además de contener un cierto volumen de fase líquida acuosa en la que está contenida el material lignocelulósico sólido en cuestión, un volumen libre o espacio de cabeza por encima de la fase líquida y, ignorando otras consideraciones, entonces será evidente que cuanto mayor sea la relación del volumen del espacio de cabeza respecto al volumen de la fase líquida, menor será la presión inicial (presión parcial) de oxígeno que será requerida para garantizar la presencia de una cantidad eficaz de gas oxígeno dentro del reactor; la presión parcial de oxígeno en el reactor -medida a la temperatura inicial en el reactor o recipiente de reacción- disminuirá durante el transcurso del procedimiento de la invención debido al consumo de oxígeno en las reacciones de oxidación que se producen.

Sólo a modo de ejemplo, cuando un reactor discontinuo que puede cerrarse y presurizarse (por ejemplo un reactor de circulación del tipo descrito en este documento) opera con una fase líquida acuosa que contiene aproximadamente 60 gramos de material lignocelulósico por litro de fase líquida, normalmente se garantizará una cantidad eficaz apropiada de oxígeno mediante el empleo de una relación del volumen del espacio de cabeza respecto al volumen de la fase líquida de aproximadamente 1:1 y una presión de oxígeno inicial (presión parcial) en el intervalo de 0,2-12 bar. Además, debido a que la solubilidad del oxígeno (y varios otros gases, incluyendo nitrógeno) en agua a presiones parciales de oxígeno de interés en el presente contexto aumenta con temperatura superior a aproximadamente 100ºC, y aumenta rápidamente con temperatura superior a aproximadamente 140ºC, generalmente será ventajoso emplear -no sólo con tales reactores por lotes cerrados, sino también con otros tipos de reactores- temperaturas superiores a esta última temperatura con el fin de garantizar la presencia de una concentración adecuada de oxígeno disuelto; por la misma razón, aumentando más la temperatura será posible emplear presiones parciales de oxígeno relativamente más bajas y todavía alcanzar concentraciones satisfactorias de oxígeno disuelto en el medio acuoso líquido.

Como alternativa (que casi siempre se empleará en el caso de procedimientos continuos o sustancialmente continuos, es decir, procedimientos en los que el material lignocelulósico entra en el reactor de oxidación en húmedo esencialmente en continuo y los productos del procedimiento salen o se retiran del reactor esencialmente en continuo), el oxígeno o una mezcla de gases que contiene oxígeno pueden introducirse esencialmente en continuo (o al menos a intervalos adecuadamente frecuentes) al reactor a una presión adecuada de manera que se garantice la disponibilidad continuada de suficiente agente oxidante.

Recipiente de reacción

Recipientes de reacción útiles para realizar el tratamiento oxidativo en húmedo o explosión de vapor en la etapa (ii) del procedimiento según la presente invención son normalmente depósitos y similares que generalmente están cerrados (no abiertos a la atmósfera circundante) y, opcionalmente, recipientes de reacción presurizables; anteriormente ya se han mencionado algunos tipos de recipientes de reacción presurizables cerrados adecuados para, en particular, el tratamiento oxidativo en húmedo de tipo en lotes en el modo de la invención. En una realización de la presente invención, la etapa (ii) se realiza como un procedimiento por lotes en un recipiente de reacción presurizable cerrado que tiene un volumen libre para contener gas que contiene oxígeno y/o vapor de agua.

Tipos relevantes de recipientes de reacción para realizar procedimientos por lotes o esencialmente continuos tales como oxidación húmeda o explosión de vapor incluyen recipientes de reacción dispuestos sustancialmente verticalmente en los que pueden contenerse el medio acuoso líquido y el material lignocelulósico en cuestión y dentro de los

cuales puede introducirse oxígeno o una mezcla de gases que contiene oxígeno (adecuadamente aire) -continuamente o a intervalos- a presión por una o más entradas, orificios, válvulas o similares situadas en o cerca del fondo de y/o en otras localizaciones a lo largo de la longitud del recipiente de reacción que contiene la suspensión acuosa del material lignocelulósico; tales reactores, que adecuadamente, pero opcionalmente, pueden tener un espacio de cabeza superior o volumen libre, pueden ser esencialmente cilíndricos, tubulares o de cualquier otra forma apropiada. Recipientes de reacción adecuados de tipo torre vertical para uso en el contexto de la invención se describen, por ejemplo, en los documentos GB 706.686 y GB 812.832.

Recipientes de reacción para realizar el tratamiento oxidativo en húmedo continuo o esencialmente continuo o el tratamiento a temperaturas elevadas usando, por ejemplo, explosión de vapor en el modo de la invención, también pueden ser, por ejemplo, recipientes de reacción tubulares o sustancialmente tubulares -muy adecuadamente dispuestos esencialmente horizontalmente- a través de los cuales se bombea la fase líquida o se acciona de otro modo y que en principio tienen poco espacio de cabeza o ninguno (volumen libre) disponible para, por ejemplo, oxígeno en forma gaseosa. Tales recipientes de reacción comprenderán normalmente una o más entradas de inyección, orificios, válvulas posicionadas apropiadamente o similares para admitir gas oxígeno (o, menos preferentemente, una mezcla de gases que contiene oxígeno) o vapor a presión más o menos directamente dentro de la fase líquida -por ejemplo cerca del principio del recipiente de reacción (calculado en la dirección de flujo del líquido dentro del recipiente de reacción) y opcionalmente en una o más otras posiciones a lo largo de la longitud del recipiente de reacción- de forma que al menos una proporción sustancial del oxígeno introducido o vapor de agua calentado se disuelva en el medio líquido, poniéndolo así en contacto íntimo con el material lignocelulósico en cuestión y maximizándose así la eficiencia oxidante del oxígeno introducido o el efecto de degradación del vapor de agua calentado.

Tanto en procedimientos oxidativos en húmedo o a temperatura elevada por lotes como continuos según la invención generalmente es deseable, cuando sea posible, producir el mezclado de la suspensión acuosa y cualquier fase gaseosa en sí misma que pueda estar presente en el recipiente de reacción. Esto puede lograrse adecuadamente mediante agitación mecánica de la suspensión, aunque también puede aplicarse agitación del recipiente de reacción de manera global u otros medios para producir el mezclado. En el caso de procedimientos por lotes que emplean un recipiente de reacción con recirculación del tipo general como se describe más adelante (en el "reactor de circulación" en el que la fase líquida se recircula por una sección tubular del recipiente de reacción por medio de una bomba, rueda impulsora o similares, el mezclado adecuado se garantiza generalmente mediante la recirculación de la fase líquida (que contiene material lignocelulósico) a una velocidad adecuada. Por tanto, una realización preferida de la presente invención es cuando la etapa (ii) se realiza como un procedimiento por lotes en un recipiente de reacción presurizable cerrado con recirculación de la mezcla de reacción. Similarmente, cuando se realiza un procedimiento esencialmente continuo en un recipiente de reacción que es sustancialmente tubular, cilíndrico o similar, el mezclado adecuado se logrará frecuentemente produciendo una velocidad de flujo suficientemente alta de la fase líquida (que contiene material lignocelulósico) a través del (de los) tubo(s), cilindro(s) o similares del recipiente de reacción.

Temperatura

Como ya se menciona, condiciones preferidas en la etapa (ii) del presente procedimiento incluyen el uso de temperaturas en la proximidad de, o superiores a, 100ºC. En general, temperaturas en el intervalo de 120-240ºC, tales como 180-220ºC, más normalmente en el intervalo de 180-210ºC, serán apropiadas para la gran mayoría de tales realizaciones del procedimiento según la invención, y cuando se usan materiales lignocelulósicos de tipos preferidos será usual emplear temperaturas en el intervalo de 160-210ºC, tales como 180-210ºC. Parece que se obtienen buenos resultados con temperaturas de aproximadamente 185-195ºC o 170-190ºC. Como ya se indica, la temperatura empleada debe ser una temperatura a la que no se produzca la ebullición del medio acuoso líquido bajo las condiciones de presión en cuestión. Sin embargo, en realizaciones preferidas, la temperatura a la que la etapa (ii) se realiza es inferior a 220ºC, tal como inferior a 200ºC, por ejemplo inferior a 195ºC que incluye inferior a 190ºC, por ejemplo inferior a 185ºC, tal como inferior a 180ºC que incluye inferior a 175ºC.

Sin embargo, se desea ajustar la temperatura de manera que se obtenga la separación deseada del material de biomasa lignocelulósica en celulosa, hemicelulosa y lignina sin la destrucción de demasiadas moléculas de polisacárido, ya que estas moléculas sirven de nutriente directo para los organismos que producen etanol en la etapa posterior del presente procedimiento. Como se muestra en los ejemplos siguientes, por ejemplo en la tabla 2.2, hay una correlación entre el tiempo de reacción y la temperatura usada en el recipiente de reacción. En general se ha mostrado que cuanto más corto sea el tiempo de reacción aplicado, mayor temperatura se necesitará con el fin de obtener una separación satisfactoria del material de biomasa lignocelulósica.

Puede suministrarse calor a la mezcla de reacción (en particular la fase líquida/material lignocelulósico) mediante cualquier procedimiento adecuado, tal como sumergiendo el recipiente de reacción en un baño de calentamiento apropiado (que comprende, por ejemplo, un aceite, una sal fundida o mezcla de sales fundidas, vapor sobrecalentado, etc.), por medio de tuberías (normalmente de metal) térmicamente conductoras que están enrolladas alrededor del exterior del recipiente de reacción, y/o se sumergen en el propio medio de reacción, y a través de las cuales se pasa aceite adecuadamente caliente, vapor sobrecalentado o similares, o -similarmente- por medio de uno o más elementos de calentamiento por resistencias eléctricas enrollados alrededor del exterior del recipiente de reacción y/o sumergidos en el medio de reacción. Otros procedimientos aplicables para calentar incluyen calentamiento por inducción (por ejemplo de una carcasa del recipiente de reacción metálico) y calentamiento por microondas.

En este momento debe observarse que las reacciones de degradación que tienen lugar en el tratamiento oxidativo en húmedo o tratamiento de explosión de vapor que es una característica preferida del procedimiento de la invención normalmente conducen a la oxidación o degradación efectuada por calor de una cierta proporción del material orgánico, en particular lignina y algo de hemicelulosa, pero también en muchos casos pectina (que frecuentemente está presente hasta cierto punto en materiales lignocelulósicos), en el material lignocelulósico empleado. Estas reacciones oxidativas o generadas por calor son beneficiosas en el sentido en que son, en general, exotérmicas, y el calor así generado contribuye a reducir la cantidad de energía térmica que tiene que suministrarse a la mezcla de reacción en el recipiente de reacción con el fin de mantener la temperatura deseada.

Tiempo de reacción

El calentamiento del (de los) material(es) lignocelulósico(s) en el medio acuoso líquido en un tratamiento oxidativo en húmedo o mediante explosión de vapor en el modo según la invención se llevará normalmente a cabo durante un periodo de tiempo que oscila de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora (es decir, aproximadamente 1-60 minutos), dependiendo no sólo de las otras condiciones de reacción empleadas (por ejemplo la temperatura de reacción y el tipo y concentración de agente oxidante), sino también de la reactividad (velocidad de reacción) del material lignocelulósico. En realizaciones viables del procedimiento de la invención, la etapa (ii) empleará normalmente tiempos de reacción en el intervalo de 5-30 minutos, frecuentemente 5-15 minutos, y cuando otras condiciones de reacción están en intervalos preferidos, tales como una presión (parcial) de oxígeno en el intervalo de aproximadamente 3-12 bar, por ejemplo 3-10 bar, y una temperatura en el intervalo de aproximadamente 160-210ºC, tiempos de reacción adecuados estarán frecuentemente en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 minutos.

Ajuste del pH en la mezcla de reacción

En muchos casos, el tratamiento realizado en la etapa (ii) puede llevarse a cabo con resultados satisfactorios sin ningún ajuste del pH, es decir, neutro, de la suspensión acuosa antes, o durante, la realización del tratamiento. Sin embargo, para algunos tipos de materiales lignocelulósicos de relevancia en el contexto de la invención puede ser ventajoso ajustar el pH de la mezcla de reacción antes y/o durante la realización del tratamiento. En general, el pH de la mezcla de reacción se aumenta (es decir, alcalino) mediante la adición de cantidades apropiadas de un álcali o base (por ejemplo un hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido sódico o potásico, un hidróxido de metal alcalinotérreo tal como hidróxido de calcio, un carbonato de metal alcalino tal como carbonato de sodio o potasio u otra base tal como amoniaco) y/o un sistema tampón. Por tanto, en una realización interesante de la presente invención la suspensión acuosa se somete a condiciones alcalinas en la etapa (ii).

Como se menciona anteriormente, un objetivo fundamental del tratamiento en la etapa (ii) es descomponer el material lignocelulósico en hemicelulosa y celulosa. Debido a que los polisacáridos disueltos, es decir, celulosa y hemicelulosa, y los azúcares y ácidos carboxílicos producidos durante el pretratamiento sirven de fuente directa de nutrientes para los microorganismos usados en las posteriores fermentaciones de etanol y metano, respectivamente, se desea una descomposición suave, es decir, no se desea la destrucción de los polisacáridos. Por tanto, una realización importante del presente procedimiento es en la que al menos el 60% del polisacárido contenido en el material de biomasa lignocelulósica sólida se recupera en la suspensión y/o fase acuosa después de haberse sometido la suspensión acuosa a un pretratamiento en la etapa (ii), se recupera tal como al menos el 60%, por ejemplo al menos el 70% que incluye al menos el 80%, tal como al menos el 90% de los polisacáridos.

Se ha mostrado que el residuo sólido insolubilizado que permanece después de realizar la etapa (ii) del procedimiento de la invención es muy adecuado para uso como pienso o como un complemento para pienso para animales -en particular rumiantes tales como ganado, ovejas, cabras o ciervos- de importancia en ganadería o agricultura. El residuo sólido que permanece en esta fase, que generalmente es rico en fibras de celulosa, también parece tener aplicaciones en las áreas de medios de crecimiento vegetal (por ejemplo en tierras/abonos orgánicos para macetas y en medios orgánicos del tipo serrín de turba y similares), agentes de mejora de la tierra (materiales añadidos a la tierra para mejorar, por ejemplo, la retención de agua, oxigenación de la tierra, penetración en raíz, etc.) y materiales compuestos [materiales estructurales que se producen combinando el residuo sólido con uno o más otros materiales (por ejemplo un plástico tal como polietileno o polipropileno) en relaciones apropiadas, y que tienen propiedades modificadas respecto a las del (de los) último(s) material(es)].

Hidrólisis de la suspensión y/o fase acuosa (etapa iii del procedimiento según la invención)

Posteriormente al tratamiento de la etapa (ii), la suspensión y/o la fase acuosa de aquí se somete a un tratamiento dando como resultado al menos la hidrólisis parcial de la celulosa y hemicelulosa para obtener una suspensión y/o fase acuosa que contiene una cantidad de azúcares microbiológicamente fermentables que permite usar la suspensión o fase acuosa como un medio de fermentaciónetanólica.

El fin de un tratamiento de hidrólisis tal es hidrolizar especies de oligosacáridos y posiblemente polisacáridos producidas durante el tratamiento oxidativo en húmedo o explosión de vapor en la etapa (ii) de origen de celulosa y/o hemicelulosa para formar azúcares fermentables (por ejemplo glucosa, xilosa y posiblemente otros monosacáridos). Tales tratamientos pueden ser o químicos o enzimáticos. Sin embargo, según la invención, la celulosa puede usarse como fibras en la industria papelera en lugar de convertirse en glucosa.

La hidrólisis química puede lograrse normalmente muy adecuadamente de un modo conocido mediante tratamiento con un ácido, tal como tratamiento con ácido sulfúrico acuoso diluido (por ejemplo 2-10% p/p, normalmente 4-7% p/p), a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 100-150ºC, por ejemplo aproximadamente 120ºC, durante un periodo de 5-15 minutos, tal como 5-10 minutos. El tratamiento con aproximadamente el 4% p/p de ácido sulfúrico durante 5-10 minutos a aproximadamente 120ºC es frecuentemente muy adecuado.

Asimismo, la hidrólisis enzimática puede lograrse en un modo conocido mediante tratamiento con una o más enzimas carbohidrasas apropiadas (glucosidasas, EC 3.2). En realizaciones preferidas, la enzima carbohidrasa se selecciona del grupo que está constituido por una celulasa (EC 3.2.1.4) en el caso de hidrólisis de celulosa o fragmentos de celulosa; una xilanasa (tal como una endo-1,4-β-xilanasa, EC 3.2.1.8) en el caso de hidrólisis de xilanos; una β-glucanasa que incluye una glucan-1,3-β-glucosidasa (exo-1,3-β-glucanasa, EC 3.2.1.58) o una endo-1,3(4)-β-glucanasa, EC 3.2.1.6, en el caso de hidrólisis de fragmentos solubles de celulosa a glucosa, una pectinasa (poligalacturonasa, EC 3.2.1.15) en el caso de hidrólisis de pectato y otros galacturonanos. Productos enzimáticos comerciales de relevancia a este respecto incluyen Celluclast™, disponible de Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca, por ejemplo como Celluclast™ 1.5 L (una preparación líquida). Celluclastpresenta tanto actividad celulasa (degradando celulosa a glucosa, celobiosa y polímeros superiores de glucosa) como algún grado de actividad xilanasa.

Los azúcares fermentables, en particular producto(s) de monosacáridos, obtenidos mediante hidrólisis son útiles para la posterior transformación para dar otros productos útiles (por ejemplo etanol o xilitol). Por tanto, la glucosa (derivada de celulosa) y la xilosa (derivada de xilanos en hemicelulosa) pueden transformarse en etanol usando microorganismos fermentadores relevantes como se describen en este documento, y la xilosa puede transformarse alternativamente, por ejemplo, en xilitol mediante procedimientos establecidos (por ejemplo mediante hidrogenación catalítica o mediante fermentación).

Realizaciones preferidas incluyen aquellas en las que la suspensión y/o fase acuosa obtenida en la etapa (iii) contiene, calculado en el contenido total de hidratos de carbono, al menos el 40% de azúcares microbiológicamente fermentables, tales como al menos el 50% de azúcares fermentables, por ejemplo al menos el 60% de azúcares fermentables que incluyen al menos el 70% de azúcares fermentables.

Fermentación etanólica (etapa iv del procedimiento según la invención)

En otra etapa del procedimiento según la invención, la suspensión y/o fase acuosa de la etapa (iii) se somete a al menos una etapa de fermentación empleando uno o más microorganismos fermentadores que pueden degradar oligo y/o monosacáridos presentes en dicha fase líquida para formar etanol.

Se entenderá que es posible, si se desea, combinar la etapa de procedimiento (iii) y (iv) en el mismo recipiente de reacción y así realizar la hidrólisis a azúcares microbiológicamente fermentables y simultáneamente fermentar éstos a etanol utilizando uno o más microorganismos.

Con respecto a la fermentación de, por ejemplo, glucosa para dar etanol, puede usarse cualquier microorganismo que pueda convertir glucosa en etanol en el procedimiento según la invención. Por ejemplo, un microorganismo adecuado incluye un microorganismo mesófilo (es decir, uno que crece óptimamente a una temperatura en el intervalo de 20-40ºC), por ejemplo una levadura también denominada en lo sucesivo “levadura de panadero”, *Saccharomyces cerevisiae*.

Con respecto a la fermentación de, por ejemplo, xilosa para dar etanol, puede usarse cualquier microorganismo que pueda convertir xilosa en etanol en el procedimiento según la invención. Microorganismos útiles incluyen, por ejemplo, ciertos tipos de termófilos (es decir, organismos que crecen óptimamente a una temperatura elevada -normalmente una temperatura superior a aproximadamente 50ºC) y microorganismos genéticamente manipulados derivados de los mismos. En realizaciones preferidas, un organismo adecuado para la fermentación etanólica se selecciona del grupo que está constituido por especies de *Thermoanaerobacter* que incluyen *T. mathranii*, especies de *Zymomonas* que incluyen *Z. mobilis* y especies de levaduras tales como especies de *Pichia*. Un ejemplo de una cepa útil de *T. mathranii* se describe en Sonne-Hansen y col., 1993 o Ahring y col. 1996, en el que dicha cepa se designa cepa A3M4.

Se apreciará que un organismo fermentador para dar etanol útil puede seleccionarse de un organismo genéticamente manipulado de uno de los organismos útiles anteriores que tienen, respecto al organismo del que se deriva, una actividad fermentadora etanólica aumentada o mejorada. Como se usa en este documento, la expresión “bacteria genéticamente modificada” se usa en el significado convencional de ese término, es decir, se refiere a cepas obtenidas sometiendo un organismo a cualquier tratamiento de mutagenización convencionalmente usado que incluye tratamiento con un mutágeno químico tal como sulfonato de etanometano (EMS) o N-metil-N’-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o a mutantes que se producen espontáneamente, incluyendo mutagénesis clásica. Además, debido a que es posible proporcionar la bacteria genéticamente modificada mediante mutagénesis aleatoria o mediante selección de mutantes que se producen espontáneamente, es decir, sin el uso de tecnología de ADN recombinante, se prevé que los mutantes del organismo anteriormente mencionado puedan proporcionarse mediante tal tecnología incluyendo mutagénesis dirigida al sitio y técnicas de PCR y otras modificaciones *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN específicas una vez que tales secuencias se han identificado y aislado.

Por tanto, usando microorganismos con diferentes requisitos de temperatura de crecimiento óptima para fermentar glucosa y xilosa, respectivamente, para dar etanol, puede desearse realizar la etapa de fermentación en cuestión como un procedimiento de dos etapas en el que la suspensión y/o fase acuosa después de la etapa (iii) precedente se pone así primero en contacto con uno de los microorganismos en condiciones apropiadas (por ejemplo *S. cerevisiae* a una temperatura de aproximadamente 30ºC) y posteriormente con el otro microorganismo a sus condiciones apropiadas (por ejemplo *T. mathranii* a una temperatura de aproximadamente 70ºC). Las dos etapas pueden tener lugar adecuadamente en recipientes de reacción de fermentación separados o en el mismo recipiente de reacción en un modo secuencial.

Pueden emplearse recipientes de reacción de fermentación (fermentadores) de cualquier tipo conocido adecuado para realizar una o más etapas de fermentación del tipo en cuestión. Para más detalles sobre recipientes de reacción adecuados puede hacerse referencia, por ejemplo, a J. E. Bailey y D. F. Ollis, 1986. A este respecto son adecuadas la fermentación por lotes y la fermentación continua.

Posterior a la etapa de fermentación etanólica, el etanol se separa del medio de fermentación resultante de la etapa (iv) dando como resultado un efluente de aguas residuales de fermentación que contiene un nivel de sustancias inhibidoras que, si están presentes en cualquiera de las etapas precedentes (ii) a (iv), serían limitantes de la velocidad durante la separación al menos parcial del material de biomasa y/o la liberación de azúcares y fermentación etanólica. Como se usa en este documento, la expresión "sustancias inhibidoras que, si están presentes en cualquiera de las etapas precedentes (ii) a (iv), serían limitantes de la velocidad durante la separación al menos parcial del material de biomasa y/o la liberación de azúcares y fermentación etanólica" se refiere a sustancias producidas durante la oxidación húmeda o explosión de vapor realizada en la etapa (ii) y mediante los organismos fermentadores de etanol usados en la etapa (iv). Tales sustancias incluyen ácidos carboxílicos tales como ácido acético y ácido láctico, y furanos que incluyen 5-hidroximetilfurfural, 2-furfural y ácido 2-furoico y fenoles que incluyen guayacol, siringol, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, 3,4,5-trimetoxibenzaldehído, 4-hidroxiacetofenona, acetovainillona, acetosiringona, 3,4,5-trimetoxiacetofenona, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico.

Además, la expresión "nivel limitante de la velocidad" se usa en el presente contexto para indicar una concentración de las sustancias inhibidoras anteriores que inhibe o reduce la realización del pretratamiento, hidrólisis y/o fermentaciónetanólica. Si la oxidación húmeda o explosión de vapor se realiza en condiciones de concentraciones crecientes de ácidos orgánicos, tales como ácidos carboxílicos, es decir, cuando el agua usada es agua de proceso recirculada del procedimiento que contiene altas concentraciones de ácidos orgánicos, se pone en peligro el fraccionamiento de la celulosa y hemicelulosa. Además, se producen más ácidos carboxílicos y furanos en el pretratamiento que a una posible concentración inhibe el crecimiento microbiano.

Tratamiento del efluente de aguas residuales (etapa vi del procedimiento según la invención)

Como ya se indica, el procedimiento según la invención comprende posteriormente someter el efluente de aguas residuales obtenido en las etapas (v) y (vi) a un tratamiento, tal como un tratamiento biológico, por el cual se reduce el nivel de las sustancias inhibidoras a un nivel que, si el efluente de aguas residuales se introduce en cualquiera de las etapas precedentes (ii) a (iv), no es limitante de la velocidad durante el pretratamiento o inhibidor de la hidrólisis y/o procedimiento de fermentaciónetanólica.

En una realización preferida, tal tratamiento es un procedimiento de fermentación anaerobia que emplea uno o más microorganismos fermentadores anaerobios que pueden degradar o convertir sustancias presentes en dicho efluente de aguas residuales para formar carburante de combustible tal como metano.

Microorganismos

En una realización útil de la presente invención, el tratamiento en la etapa (vi) se realiza usando microorganismos productores de metano (también conocidos como metanógenos) que constituyen un grupo único de procariotas que pueden formar metano a partir de ciertas clases de sustratos orgánicos, sustratos de metilo (metanol, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, metilmercaptano y dimetilsulfuro) o acetato (algunas veces denominado sustrato acetoclástico) en condiciones anaerobias.

Los metanógenos se encuentran dentro de diversos géneros de bacterias, y bacterias metanogénicas de relevancia en el contexto de la presente invención incluyen especies de *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter, Methanothermus, Methanococcus, Methanomicrobium, Methanogenium, Methanospirillum, Methanoplanus, Methanosphaera, Methanosarcina, Methanolobus, Methanoculleus, Methanothrix, Methanosaeta, Methanopyrus* o *Methanocorpusculum*; algunas de éstas, en particular especies de *Methanopyrus*, son sumamente termófilas y pueden crecer a temperaturas superiores a 100ºC. Sólo tres géneros de bacterias metanogénicas, concretamente *Methanosarcina, Methanosaeta* y *Methanothrix*, parecen contener especies que pueden llevar a cabo la reacción acetoclástica, es decir, conversión de acetato en metano (y dióxido de carbono). Se apreciará que bacterias metanogénicas útiles pueden seleccionarse de una bacteria genéticamente modificada de uno de los organismos útiles anteriores que tienen, respecto al organismo del que se deriva, una actividad productora de metano aumentada o mejorada. Un organismo genéticamente modificado tal puede obtenerse mediante los procedimientos tratados anteriormente.

En el contexto de la presente invención generalmente será más apropiado aplicar, además de uno o más metanógenos, otros tipos de microorganismos que, solos o en combinación, puedan degradar sustancias orgánicas presentes en el material que va a tratarse en la etapa de fermentación anaerobia del procedimiento de la invención, pero que no son directamente adecuados como sustratos para el (los) metanógeno(s) empleado(s) en la etapa de fermentación anaerobia. Tales otros tipos de microorganismos incluyen ciertas bacterias anaerobias fermentativas que pueden convertir, por ejemplo, glucosa en productos tales como acetato, propionato, butirato, hidrógeno y CO_2, y las denominadas bacterias acetogénicas, que convierten sustancias orgánicas tales como propionato, butirato y etanol en acetato, formiato, hidrógeno y CO_2.

Sin embargo, el tratamiento del efluente de aguas residuales también puede realizarse como un tratamiento aerobio usando organismos aerobios que pueden utilizar las sustancias inhibidoras anteriormente mencionadas de manera que reducen tales sustancias hasta un nivel que, si el efluente de aguas residuales se introduce en el recipiente de reacción de la etapa (ii) o en cualquier otra etapa del procedimiento, no es limitante de la velocidad.

Tipos de recipientes de reacción

El procedimiento de tratamiento en la etapa (vi) del procedimiento de la invención se lleva a cabo adecuadamente usando un recipiente de reacción de un tipo conocido como reactor "anaerobio de manto de fangos de flujo ascendente" (reactor UASB) como se describe, por ejemplo, en Schmidt y Ahring (1996). Un dibujo esquemático de un reactor de este tipo, que normalmente tiene la forma general de un cilindro orientado sustancialmente verticalmente, se muestra en la figura 1.

Recirculación del efluente de aguas residuales tratado (etapas vii y viii del procedimiento según la invención)

Como ya se indica anteriormente, una característica muy importante de la invención es que todo o parte del efluente de aguas residuales así tratado que permanece después de completarse el tratamiento en la etapa (vi) se recircula para reutilización como fase líquida acuosa en el procedimiento de la invención reduciéndose así el consumo de agua y minimizándose la cantidad de material de desecho que se produce del procedimiento. Usando el efluente de aguas residuales tratado para cualquier etapa del procedimiento según la invención, es decir, para obtener la suspensión acuosa en la etapa (i) y/o mediante introducción del efluente de aguas residuales tratado en el recipiente de reacción de la etapa (ii) y/o en el recipiente de reacción de las etapas (iii) a (iv) es posible repetir en continuo las etapas (i) a (vii) y así convertir en continuo material lignocelulósico sólido en etanol y metano.

Por consiguiente, en realizaciones preferidas, al menos el 5% del efluente de aguas residuales resultante de la etapa (v) se introduce en cualquier etapa del procedimiento según la invención, tal como al menos el 10%, por ejemplo al menos el 20% que incluye al menos el 30%, tal como al menos el 40%, por ejemplo al menos el 50% que incluye al menos el 60%, tal como al menos el 70%, por ejemplo al menos el 80% que incluye al menos el 90% o incluso el 100%. La introducción del agua residual tratada a las etapas de procedimiento precedentes puede producirse sustancialmente sin disminuir la producción de etanol o metano en dichas etapas.

Por tanto, el fin del tratamiento del agua residual en la etapa (vi) del presente procedimiento es reducir la materia orgánica (DQO), es decir, las sustancias inhibidoras, tales como ácidos carboxílicos, furanos y compuestos fenólicos, presentes en el agua residual con el fin de que, cuando el efluente de aguas residuales tratado se vuelva a introducir al procedimiento, se asegure que la concentración de sustancias inhibidoras no esté a un nivel limitante de la velocidad o inhibidor para la separación parcial del material de biomasa y/o para la hidrólisis y/o fermentación etanólica. Por consiguiente, un porcentaje muy alto de la materia orgánica (DQO) que permanece después de la fermentación etanólica se convierte en biogás. Por tanto, en realizaciones preferidas, al menos el 50% de DQO que permanece después de la fermentación etanólica se convierte en biogás, tal como al menos el 60%, por ejemplo al menos el 70% que incluye al menos el 80%, tal como al menos el 85%. Como se muestra en los ejemplos de más abajo, es posible realizar la etapa (vi) para reducir el nivel de sustancias inhibidoras en el efluente de aguas residuales de fermentación presente en la etapa (vi) a al menos el 80%, tal como al menos el 85%, por ejemplo al menos el 90% que incluye al menos el 95% o incluso al 100%.

La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes que se llevaron a cabo a una escala piloto de laboratorio y que ilustran realizaciones del procedimiento según la invención y los dibujos en los que

la fig. 1 muestra un dibujo esquemático de un reactor "anaerobio de manto de fangos de flujo ascendente" (reactor UASB) útil para el procedimiento de fermentación anaerobia en la etapa (b) del procedimiento de la presente invención. El reactor UASB emplea biomasa inmovilizada en forma de una capa de partículas de fango (1) en el fondo del reactor. La fase líquida que va a tratarse entra en el reactor por una o más aberturas (A) en el fondo del mismo y pasa a través de la capa de partículas de fango de biomasa. Cerca de la parte superior del reactor hay una criba o tamiz (3) por el que puede pasar la fase líquida tratada que fluye hacia arriba y el (los) gas(es) generado(s) por el procedimiento de fermentación anaerobia, pero que evita el paso de gránulos. Algo del gas generado en el procedimiento de fermentación anaerobia resultante (por ejemplo metano y, posiblemente, dióxido de carbono en el caso de la presente invención) se une temporalmente a algunas de las partículas de fango de microorganismos, aumentando su flotabilidad de manera que las partículas en cuestión (2) suben a través de la fase líquida. Cuando estas partículas golpean la criba o tamiz (3), el gas que las mantiene a flote desaparece, por lo que las partículas en cuestión vuelven a sedimentar en el fondo del reactor. La fase líquida tratada que ha pasado a través de la criba o tamiz (3) se extrae por una o más salidas de

líquido (L), y la fase gaseosa se extrae en una o más salidas de gas (G). En el caso de la generación de gas que contiene metano (como en el procedimiento de la presente invención), el gas puede almacenarse, por ejemplo, en tanques o extraerse de forma esencialmente continua para la producción de calor o electricidad;

la fig. 2 muestra un dibujo esquemático de un recipiente de reacción de oxidación húmeda ("reactor de circulación") útil para el pretratamiento del material lignocelulósico según la presente invención. Una descripción detallada del "reactor de circulación" en cuestión puede encontrarse en Bjerre y col., 1996. El reactor comprende un depósito de acero en forma de un cilindro que tiene un diámetro interno de aproximadamente 11 cm y una altura de 18 cm, y un tubo de acero situado externamente con una longitud de 160 cm y un diámetro interno 22 mm. Un extremo del tubo está soldado al exterior del fondo del depósito, y el otro extremo está soldado al exterior de la parte inferior del lado del depósito. En el fondo del depósito, justo encima de la conexión de tubos, hay una rueda impulsora centrífuga que proporciona el flujo de recirculación de la suspensión/disolución que va a tratarse. La rueda impulsora es accionada por un motor eléctrico mediante un acoplamiento magnético estando situado el motor eléctrico fuera del depósito. La parte superior del depósito está equipada con una tapa de acero que puede estar fuertemente atornillada a una junta de brida. La tapa está equipada con una válvula de entrada para admitir aire, oxígeno o cualquier otro gas que contenga oxígeno apropiado (normalmente de un cilindro de gas a alta presión) u otro gas/vapor para el espacio de aire (volumen libre) por encima de la fase líquida en el reactor de circulación. El reactor de circulación tiene una capacidad de 1 litro de suspensión líquida y el volumen del espacio de aire (volumen libre) es 1 litro;

la fig. 3 muestra un dibujo esquemático del recipiente de reacción de vidrio a escala de laboratorio usado en el ejemplo 1. El recipiente de reacción tiene una capacidad de 200 ml y está rodeado por una camisa de calentamiento (1) por la que puede circularse agua de un baño de agua termostático. Un tubo de entrada que se abre dentro del recipiente de reacción, y que pasa por la parte inferior de la camisa de calentamiento, comprende una parte de espiral (2) para evitar que la biomasa inmovilizada se exponga a un choque de temperatura del material entrante que va a tratarse permitiendo que el material entrante alcance más rápidamente sustancialmente la temperatura del medio de calentamiento en la camisa de calentamiento. Una bola (3) se ajusta de forma sellada en la boca de la entrada en el fondo del recipiente de reacción y funciona como una válvula anti-retorno para evitar que el contenido del recipiente de reacción escape del recipiente de reacción por el tubo de entrada. El sistema de reactor como un todo está aislado con una camisa de neopreno de 12 mm. La parte superior del recipiente de reacción está equipada con tubos (4) que permiten la extracción de muestras de gas y de líquido del recipiente de reacción en la proximidad inmediata de la salida. En la parte superior del recipiente de reacción se proporciona un tamiz o red (5) con un ancho de malla de 1 mm para evitar que cualquier biomasa inmovilizada suspendida escape del recipiente de reacción; y

la fig. 4 muestra la producción de metano. El ácido acético, posibles inhibidores de la fermentación y carbohidratos sin fermentar se convierten en metano mediante un consorcio de *Archaea* metanogénicas en una etapa de tratamiento anaerobio termófilo del agua residual a 55ºC.

Ejemplo 1

Evaluación de los resultados obtenidos de cada etapa individual en el procedimiento para procesar material lignocelulósico

1.1. *Materiales y procedimientos*

1.1.1 *Reactivos*

A menos que se indique lo contrario, los reactivos empleados como se describen a continuación están disponibles de proveedores establecidos de reactivos de laboratorio.

1.1.2 *Material lignocelulósico de partida*

El material lignocelulósico empleado en los experimentos descritos a continuación fue paja de trigo cosechada en Forskningscenter Risø (Risø National Laboratory) en 1997.

1.1.3 *Recipiente de reacción para el pretratamiento oxidativo en húmedo de material lignocelulósico*

El recipiente de reacción de oxidación en húmedo empleado fue un reactor a escala de laboratorio con recirculación (en lo sucesivo denotado el "reactor de recirculación") que puede presurizarse con gas (figura 2). El reactor de circulación en cuestión, que se ha descrito previamente por Bjerre y col., 1996.

El reactor de circulación se calentó sumergiéndolo en un baño termostático de sal fundida que estaba constituida, por ejemplo, por una mezcla 1:1 (p/p) de nitrato de sodio anhidro y nitrito de sodio anhidro, y posteriormente se enfrió mediante inmersión en agua fría. Con respecto al calentamiento, la temperatura deseada se alcanza normalmente dentro de aproximadamente 3 minutos; con respecto al enfriamiento se requiere aproximadamente 1 minuto para alcanzar el equilibrio térmico.

Con la tapa ajustada y la válvula cerrada, el reactor de circulación constituye así un sistema de circulación cerrado en el que una mezcla de reacción -en el presente caso en forma de una suspensión de biomasa lignocelulósica (paja de

trigo) en un medio acuoso a una presión de oxígeno- introducida en el depósito puede recircularse durante un tiempo elegido a una temperatura elegida.

1.1.4 *Pretratamiento oxidativo en húmedo de paja de trigo*

Antes de realizar la oxidación húmeda, la paja se secó y se trituró mediante molienda para dar fragmentos con una longitud máxima de 5 mm. La paja triturada se mezcló con agua desionizada (60 g de paja por litro de agua) y se añadió carbonato sódico (6,5 g por litro de agua). Un litro de la mezcla se transfirió al reactor de circulación, que entonces se cerró y se presurizó con gas oxígeno (pureza >99,9%) de un cilindro de gas comercial a una presión (presión inicial) de 12 bar (1200 kPa). Entonces, la mezcla de reacción se sometió a oxidación húmeda con recirculación a una temperatura de 195ºC durante un periodo de 10 minutos. Después de enfriarse, el contenido del reactor se vertió en un depósito de plástico de 5 litros y se almacenó a -20ºC.

1.1.5 *Medios de crecimiento*

1) *Medio BA* (medio sintético): para preparar un litro de medio BA, los siguientes componentes se mezclaron primero en un matraz cónico:

Agua desionizada (Milli-Q)	916 ml
Disolución A	10 ml
Disolución B	2 ml
Disolución C	1 ml
Disolución D	1 ml
Disolución de bicarbonato sódico	50 ml
Extracto de levadura	1 g

Entonces, la mezcla se hizo anaerobia mediante burbujeo con una mezcla de gases constituida por 80% en volumen de nitrógeno y 20% en volumen de dióxido de carbono durante 10 minutos. El pH medido fue 6,9-7,0. Entonces, la mezcla anaerobia se sometió a autoclave a 140ºC durante 20 minutos, a la cual se añadieron en condiciones anaerobias lo siguiente:

Disolución de vitaminas (0,1 ml disolución por 10 ml de medio)

Disolución de sulfuro de sodio (0,1 ml de disolución por 10 ml de medio).

Las composiciones de las diversas disoluciones empleadas fueron del siguiente modo:

Disolución A (en gramos por litro de disolución, en agua desionizada): cloruro de amonio (100 g/l); cloruro sódico (10 g/l); cloruro de magnesio hexahidratado (10 g/l); cloruro de calcio dihidratado (5 g/l).

Disolución B (en agua desionizada): hidrogenofosfato de dipotasio trihidratado (200 g/l).

Disolución C (en agua desionizada): sal sódica de resazurina (0,5 g/l)

Disolución D: los siguientes componentes se introdujeron en las cantidades dadas, añadidos en el orden dado, a un matraz volumétrico de 1000 ml:

agua desionizada (500 ml); ácido bórico (50 mg); cloruro de cinc (50 mg); cloruro de cobre (II) dihidratado (38 mg); cloruro de manganeso (II) dihidratado (41 mg); molibdato de amonio tetrahidratado (50 mg); cloruro de aluminio hexahidratado (90 mg); cloruro de cobalto (II) hexahidratado (50 mg); cloruro de níquel (II) hexahidratado (92 mg); sal sódica de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA sódico; 500 mg); selenito de sodio pentahidratado (100 mg).

Luego se añadió al matraz volumétrico una disolución preparada mezclando agua redestilada (1 ml), ácido clorhídrico concentrado (1 ml) y cloruro ferroso tetrahidratado (2000 mg) y dejando reposar la mezcla hasta que el cloruro ferroso se haya disuelto. Entonces, el matraz volumétrico se llenó hasta la marca con agua desionizada.

Disolución de bicarbonato sódico (en agua desionizada): bicarbonato sódico anhidro (52 g/l).

Disolución de vitaminas (en miligramos por litro de disolución, en agua desionizada) (materiales comprados de Sigma): biotina (vitamina H; 2 mg/l); ácido fólico (2 mg/l); clorhidrato de piridoxina (vitamina B_6; 10 mg/1); riboflavina (vitamina B_2; 5 mg/l); clorhidrato de tiamina (vitamina B_1; 5 mg/l); cianocobalamina (vitamina B_{12}; 0,1 mg/l); ácido nicotínico (5 mg/l); ácido p-aminobenzoico (5 mg/l); ácido lipoico (ácido tióctico; 5 mg/l); ácido DL-pantoténico (5 mg/l). Debido a que esta disolución no es estable al someterse a autoclave a 140ºC, se desoxigenó mediante burbujeo con gas nitrógeno y luego se filtró estéril a viales sometidos a autoclave anaerobios para almacenamiento hasta uso.

Disolución de sulfuro de sodio: un litro de agua desionizada en un matraz Erlenmeyer se desoxigenó mediante burbujeo con gas nitrógeno. Se pesó una parte de 25 g de sulfuro de sodio ($Na_2S_7 \cdot 9H_2O$) y se añadió al matraz (en una campana) a burbujeo continuo con nitrógeno. Luego se transfirieron anaeróbicamente alícuotas de 20 ml de la disolución a viales de 100 ml que luego se sometieron a autoclave a 140ºC.

2) *Medio de crecimiento de levadura* (ML): éste estuvo constituido por medio BA al que se añadieron vitaminas adicionales, metales traza, extracto de levadura y disolución de Tween™ 80/ergosterol. Las disoluciones madre de vitaminas, oligoelementos y ergosterol/Tween™ 80 se prepararon del siguiente modo:

Disolución de vitaminas (100 ml):

(i) disolver 5 mg de biotina en 1 ml de NaOH 0,1 M;

(ii) añadir la disolución de (i) a aproximadamente 80 ml de agua;

(iii) ajustar el pH de la disolución de (ii) a 6,5 mediante adición de HCl 1 M/NaOH 1 M;

(iv) disolver las siguientes vitaminas de manera individual en el orden dado en la disolución de (iii) y ajustar el pH a 6,5 después de cada adición, como antes:

pantotenato de calcio	0,1 g
ácido nicotínico	0,1 g
mioinositol	2,5 g
clorhidrato de tiamina	0,1 g
clorhidrato de piridoxina	0,1 g
ácido p-aminobenzoico	0,02 g

(v) añadir agua hasta un volumen total de 100 ml;

(vi) ajustar el pH a 6,5, como antes;

(vii) filtrar estéril y dividir en partes de 5-10 ml, que luego se almacenan en un refrigerador.

Disolución de elementos traza (100 ml):

(i) disolver 1,5 g de EDTA sódico en 50 ml de agua;

(ii) añadir 0,45 g de sulfato de cinc tetrahidratado a la disolución de (i);

(iii) ajustar el pH de la disolución de (ii) a 6,0 y luego añadir sucesivamente lo siguiente, ajustando el pH a 6,0 después de cada adición:

$MnCl_2.2H_2O$	0,1 g
$CoCl_2.6H_2O$	0,03 g
$CuSO_4.5H_2O$	0,03 g
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,04 g
$CaCl_2.2H_2O$	0,45 g

$FeSO_4.7H_2O$	0,3 g
H_3BO_3	0,1 g
KI	0,01 g

(iv) añadir agua hasta un volumen total de 100 ml;

(v) ajustar el pH a 4,0;

(vi) filtrar estéril y dividir en partes de 5-10 ml, que luego se almacenan en un refrigerador.

Disolución de ergosterol/Tween™ 80 (200 ml):

(i) disolver 1,5 g de ergosterol en 64 ml de etanol absoluto en ebullición;

(ii) añadir 67,2 g de Tween™ 80 a la disolución de (i) y ajustar el volumen a 200 ml mediante la adición de etanol absoluto;

(iii) filtrar estéril.

1.1.6 *Hidrólisis enzimática*

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en botellas de infusión de 1 litro con un volumen de líquido total de 500 ml. Con el fin de proporcionar condiciones de crecimiento óptimas para los microorganismos en los posteriores tratamientos de fermentación (que se realizaron en las mismas botellas), la paja de trigo oxidada en húmedo (en lo sucesivo denominada algunas veces POH) se mezcló con los diversos componentes de medio BA de una forma tal que el líquido de POH tomó el lugar del agua desionizada que de otro modo se empleó para preparar el medio BA. Cada botella se cerró herméticamente con un tapón de goma y un anillo obturador de aluminio y las botellas se sometieron luego a autoclave a 120ºC durante 1 hora. Las adiciones posteriores a y extracciones de las botellas tuvieron lugar en condiciones anaerobias y estériles usando agujas hipodérmicas insertadas a través del tapón de goma.

Para la hidrólisis enzimática se añadieron 3,5 ml de Celluclast™ 1.5 L (Novo Nordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca; un folleto que proporciona más información sobre Celluclast™ está disponible a petición de Novo Nordisk) por 500 ml de POH a las botellas, que luego se incubaron a pH 6,1 y 40ºC durante 9 días.

1.1.7 *Fermentación de azúcares*

Después del tratamiento de hidrólisis, el extracto de levadura, las vitaminas adicionales, los elementos traza y la disolución de ergosterol/Tween™ 80 se añadieron a todas las botellas para proporcionar condiciones óptimas para los microorganismos fermentadores de azúcares que iban a usarse en el procedimiento de fermentación (concretamente, *Saccharomyces cerevisiae* y *Thermoanaerobacter mathranii* A3M4).

Microorganismos: se empleó la levadura *S. cerevisiae* (un mesófilo) para fermentar glucosa. Las células de *S. cerevisiae* se tomaron del centro de un paquete de levadura de panadero y se incubaron en botellas de suero de 20 ml con medio ML a 30ºC durante 24 horas; las células se transfirieron luego a placas de agar habituales. Después de la incubación, las placas se almacenaron a 5ºC hasta que las colonias se eliminaron y se usaron para los experimentos de fermentación.

Para fermentar xilosa se empleó una cepa adaptada de las bacterias termófilas *T. mathranii*, concretamente *T. mathranii* A3M4 (Ahring y col. 1996).

Fermentación: se añadió *S. cerevisiae* a las botellas, que luego se incubaron a 30ºC durante 14 días; las botellas se calentaron luego hasta 70ºC, se añadió *T. mathranii* A3M4 y las botellas se incubaron a 70ºC durante 10 días. Con el fin de controlar el procedimiento de fermentación, la presión en las botellas se midió manométricamente cada día. La fermentación por el microorganismo en cuestión se tomó por completa cuando la presión en las botellas fue estable. Las muestras se tomaron cuando se completó la fermentación de levadura y la fermentación de A3M4, respectivamente, con el fin de determinar el contenido de ácidos grasos volátiles (AGV), el contenido de etanol y el contenido de azúcares totales (mediante procedimientos habituales).

Después de completarse los procedimientos de fermentación y de tomarse las muestras apropiadas, las botellas se abrieron y el contenido [paja oxidada en húmedo fermentada (POHF)] se centrifugó (en varios lotes) a 13200 x g durante 20 minutos a 4ºC para eliminar la paja sin degradar y otro material suspendido. Los sobrenadantes de los diversos lotes de centrifugación se combinaron, se mezclaron, se vertieron en botellas de plástico de 1 litro y

se almacenaron congeladas a -20ºC; esta fase de sobrenadante se refiere algunas veces en lo sucesivo $POHF_S$. Las fases precipitadas (gránulos) de los diversos lotes de centrifugación se trataron del mismo modo (producto denotado $POHF_p$).

1.1.8 *Experimentos en reactor "anaerobio de manto de fangos de flujo ascendente" (UASB)*

Éstos se llevaron a cabo usando un reactor de vidrio a escala de laboratorio con una capacidad de 200 ml ilustrándose la construcción del reactor en la figura 3. El reactor en sí mismo está rodeado por una camisa de calentamiento (1) por la que puede circularse, por ejemplo, agua de un baño de agua termostático. En los experimentos descritos en este documento se empleó agua con una temperatura de 37ºC. Un tubo de entrada que se abre dentro del reactor, y que pasa a través de la parte inferior de la camisa de calentamiento, comprende una parte de espiral (2) para evitar que la biomasa inmovilizada [que contiene los organismos anaerobios que dan como resultado la formación de metano según la etapa (b) de un procedimiento de la invención] se exponga a un choque de temperatura del material entrante que va a tratarse permitiendo que el material entrante alcance más rápidamente sustancialmente la temperatura del medio de calentamiento en la camisa de calentamiento. Una bola (3) se ajusta de forma sellada en la boca de la entrada en el fondo del reactor en sí mismo y funciona como una válvula anti-retorno para evitar que el contenido del recipiente de reacción escape del reactor por el tubo de entrada. El sistema de reactor como un todo está aislado con una camisa de neopreno de 12 mm.

El efluente (material tratado) que abandona el reactor se recoge en un depósito de almacenamiento intermedio del que se recircula al reactor en una relación de 4: 1 respecto al material fresco que va a tratarse. Se emplea una bomba peristáltica (Watson-Marlow) equipada con tubos de bomba de diferente diámetro (y por lo tanto diferente capacidad de bombeo) para bombear tanto el material tratado recirculado como el material entrante fresco y para garantizar una relación constante de material recirculado respecto a material fresco independientemente de la velocidad de rotación de la bomba peristáltica.

La parte superior del reactor está equipada con tubos (4) que permiten la extracción de muestras de gas y de líquido del reactor en la proximidad inmediata de la salida (mostrándose la salida en la figura 3 como un remanente del tubo inclinado hacia abajo en la parte superior derecha de la figura). Se proporciona un tamiz o red (5) con un ancho de malla de 1 mm en la parte superior del reactor en sí mismo para evitar que cualquier biomasa inmovilizada suspendida escape del reactor.

La biomasa inmovilizada (gránulos) empleada en estos experimentos se suministró por Eerbeek BV en Holanda y se tomó de un reactor a escala completa mesófilo que se usa para purificar agua residual de una fábrica de papel. La biomasa se almacenó a 5ºC antes de uso en el reactor en los presentes experimentos.

La presión del gas presiona el exceso de efluente del reactor al depósito de efluentes en el que se separan gas y líquido. El volumen de gas puede medirse usando un metro basado en el principio de desplazamiento de líquidos (Angelidaki y col., 1992). El gas no se recoge. Las muestras de gas para determinar la composición del gas producido en el reactor se toman de un tubo de extracción de gas (4) inmediatamente por encima del nivel de líquido en la parte superior del reactor. Esto se hace ya que debe esperarse que algo de la producción de metano también se produzca en el receptor de efluente.

Antes de poner en funcionamiento el reactor, el sistema de reactor se llenó con medio SA desoxigenado. Se introdujeron 100 ml de biomasa inmovilizada en el reactor y se añadieron 3 ml de disolución de sulfuro de sodio (25 g/l) para reducir cualquier oxígeno en el reactor. Para evitar la inhibición de la biomasa inmovilizada, el reactor se puso en funcionamiento usando $POHF_S$ diluida con medio BA al 25% (v/v) (véase más adelante) y con un tiempo de residencia de 100 ml/día. La adaptación de los microorganismos en la biomasa se controló principalmente midiendo las concentraciones de AGV en la parte superior del reactor. Una vez se había estabilizado el contenido de AGV, la concentración de $POHF_S$ en el material entrante se aumentó gradualmente por etapas del 20% (relativo) hasta que se obtuvo el 100% de $POHF_S$. Entonces, el tiempo de residencia de redujo gradualmente -basándose asimismo en las concentraciones de AGV- hasta que se obtuvo un tiempo de residencia en el reactor de 200 ml/día.

Preparación de $POHF_s$ para la puesta en funcionamiento y el funcionamiento del reactor. El material para el tratamiento se preparó en botellas de infusión de 1 litro sometidas a autoclave con tubos de bombeo. Las diluciones de $POHF_S$ se prepararon mediante dilución con medio BA hasta la concentración deseada; la $POHF_S$ se descongeló y el etanol se eliminó mediante calentamiento a 85ºC. El líquido se burbujeó con aire durante 4 horas a reflujo para reducir la evaporación. Durante la eliminación del etanol, la concentración restante se midió a intervalos; la evaporación se detuvo cuando la concentración restante de etanol en el líquido era 5-10 mM. La evaporación se estimó basándose de la pérdida de peso y el volumen de líquido perdido se sustituyó mediante la adición de agua desionizada (Milli-Q™). La $POHF_S$ agotada de etanol, cuando se diluyó pertinentemente con medio BA, se filtró estéril a través de un filtro de 0,2 μm en una botella de infusión sometida a autoclave. Entonces, el contenido de la botella se desoxigenó mediante burbujeo con 80/20 (v/v) de mezcla de gases nitrógeno/dióxido de carbono durante 15 minutos. Se extrajo una muestra de 40 ml, en condiciones estériles, para determinar AGV, contenido de etanol, demanda química de oxígeno (DQO) y nitrógeno total, y se midió su pH. Cuando se sustituyó una botella de infusión casi vacía por una botella nueva, el medio restante en la botella sustituida también se extrajo para análisis. Las muestras tomadas de las botellas de infusión se almacenaron a -20ºC hasta que se analizaron.

Control: durante la puesta en marcha y posterior funcionamiento del reactor se midieron la producción de gas, composición del gas y la disminución en DQO, además de los niveles de AGV. Además, las muestras se tomaron -después de un mínimo de 4 periodos de residencia con carga orgánica máxima- de la entrada y la parte superior del reactor para la determinación por cromatografía de gases de la degradación de diversos compuestos aromáticos. Las muestras se almacenaron a -20ºC hasta que se analizaron.

Procedimientos analíticos: la determinación del contenido de materia seca, materia orgánica, DQO y nitrógeno total Kjeldahl se realizaron según Greenberg y col., 1992. Las concentraciones de metano se determinaron mediante cromatografía de gases usando un detector de FID. Las concentraciones de nitrógeno, dióxido de carbono y metano en el biogás producido en el reactor se determinaron mediante cromatografía de gases usando un detector de conductividad térmica.

Las concentraciones de etanol y AGV (acetato, propionato, butirato e isobutirato) se determinaron mediante cromatografía de gases usando un detector de FID; las muestras para las determinaciones de AGV se acidificaron primero mediante adición de 30 μl de ácido fosfórico (17%) por ml de muestra y luego se centrifugaron a 11000 rpm durante 10 minutos.

Los compuestos aromáticos y pseudoaromáticos de relevancia como posibles inhibidores de microorganismos (por ejemplo microorganismos fermentadores de azúcares), tales como ácido 2-furanoico, fenol, ácido vanílico, ácido homovanílico, acetovainillona, ácido 4-hidroxibenzoico y otros se determinaron mediante extracción en fase sólida y cromatografía de gases usando un detector de FID; las extracciones en fase sólida se llevaron a cabo a pH 2 y pH 7. El límite inferior de detección para los compuestos aromáticos/pseudoaromáticos era 1-2 ppm.

Las determinaciones de azúcares totales se realizaron de un modo habitual después de llevar a cabo la hidrólisis con ácido fuerte (ácido sulfúrico al 72%); las concentraciones de azúcares reductores se determinaron luego mediante el procedimiento muy conocido de ácido dinitrosalicílico (DNS) usando xilosa como calibrador.

Los niveles de potasio, nitrato N y fosfato P se determinaron en el laboratorio de la Danish Commercial Growers Association ("Dansk Erhvervsgartnerforening").

1.2 *Resultados*

1.2.1 *Resultados de la fermentación de azúcares*

En el pretratamiento oxidativo en húmedo de paja de trigo descrito anteriormente, la paja se empleó a una concentración de 60 g de paja seca por litro de agua, correspondiéndose a un contenido de materia seca teórica del 6% en peso (p/p). Antes de realizarse los experimentos de fermentación, las muestras se tomaron con el fin de caracterizar la POH. Los resultados fueron del siguiente modo:

TABLA 1.1

Caracterización de POH usada en experimentos de fermentación

Azúcares totales*	31,8 ± 0,5 g/l
Materia seca	55,4 ± 0,9 g/l
Materia orgánica	44,5 ± 0,9 g/l
pH	7,3 ± 0,2
DQO**	61,4 ± 1,6 g/l
N Kjeldahl**	0,12 ± 0,01 g/l
Acetato	2,0 ± 0,1 g/l

*Determinado tras la hidrólisis con ácidos fuertes y con xilosa como patrón.

** Desviación estándar determinada basándose en dos mediciones.

Aunque claramente se produce acetato, su concentración es demasiado baja para producir inhibición apreciable de levadura, que se ha notificado (Taherzadeh y col., 1997) que puede crecer a una concentración de acetato de 10 g de acetato por litro a valores de pH de tan sólo 4,5.

Basándose en el contenido de glucosa y xilosa en POH puede calcularse un rendimiento (estequiométrico) "teórico" de etanol del siguiente modo:

Glucosa: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_6O + 2\ CO_2$ (relación molar 1:2)

Xilosa: $3\ C_5H_{10}O_5 \rightarrow 5\ C_2H_6O + 5\ CO_2$ (relación molar 3:5)

Expresado en gramos de etanol por gramo de azúcar esto se corresponde con un rendimiento de etanol "teórico" de 0,51 g de etanol/g de glucosa y 0,51 g de etanol/g de xilosa, es decir, 0,51 g de etanol/g de azúcar total. Con una concentración inicial de azúcares totales de 31,80 ± 0,5 g/l (tabla 1.1), esto se corresponde con un rendimiento máximo teórico de 16,2 ± 0,3 g de etanol/litro de POH.

La tabla 1.2 muestra las concentraciones promedio de etanol después de la fermentación de POH con los dos microorganismos fermentadores de azúcares en cuestión.

TABLA 1.2

Formación de etanol durante la fermentación de paja de trigo oxidada en húmedo (POH)

	Fermentación con *S. cerevisiae*		Fermentación con *T. mathranii* A3M4		Total
	g/l	% del total	g/l	% del total	g/l
Promedio	5,3 ± 1,0	94%	0,3 ± 0,2	6%	5,6 ± 1,0

Una comparación de los resultados en la tabla 1.2 con el rendimiento de etanol "teórico" muestra que aproximadamente el 35% del azúcar total en la POH se convirtió en etanol en los presentes experimentos. El etanol (bioetanol) producido de este modo puede aislarse, como ya se ha tratado, para uso como carburante, como disolvente o para otros fines.

1.2.2 *Degradación del material orgánico en el reactor UASB*

La tabla 1.3 muestra los resultados obtenidos con 4 muestras diferentes (denotadas R1-R4) de $POHF_S$ después del funcionamiento del reactor a escala de laboratorio durante un periodo superior a 70 días.

TABLA 1.3

Resultados obtenidos con 4 muestras diferentes de paja de trigo oxidada en húmedo fermentada ($POHF_S$) después del funcionamiento del reactor a escala de laboratorio

Muestra	Tomada (días) *	Tiempo de residencia (días)	Flujo (ml/día)	DQO de entrada (g/l)	DQO de salida (g/l)	Reducción de DQO (% en p/p)
R1	76	2,0	100	27, 2	4,5	84
R2	102	1,3	159	25,7	4,9	81
R3	107	1,0	200	26,7	5,7	79
R4	110	1,0	200	28,9	5,4	81

*Días después de la puesta en marcha del reactor.

Puede verse que la degradación de la materia orgánica (expresada como reducción de DQO) en el reactor no se afecta duplicando la carga orgánica (de R1 a R4) como se expresa por la relación entre DQO de entrada (en g/l) y el tiempo de residencia (en días); esta relación se denota OLR en lo sucesivo.

También se controló la evolución del gas (biogás) en el reactor. En una serie de mediciones hechas durante aproximadamente los últimos 60 días de funcionamiento del reactor (días 53-110) se observó una correlación bastante estrecha entre la cantidad de biogás producida por día y la OLR; por tanto, la cantidad de biogás producida por día (litro/día) por unidad de DQO introducida en el reactor por día (es decir, g de DQO/l/día) fue aproximadamente 0,1. El contenido de metano del gas producido era razonablemente constante durante todos los experimentos, siendo el promedio 58,6 ± 0,8% (v/v) de metano.

1.2.3 *Degradación de sustancias inhibidoras de microorganismos*

Con el fin de investigar la degradación de diversas sustancias aromáticas o pseudoaromáticas que se había encontrado que eran posibles inhibidores de microorganismos productores de etanol, las muestras R1-R4 mencionadas a propósito de la tabla 3 se analizaron antes y después del tratamiento en el reactor UASB con respecto a la concentración de varias de tales sustancias.

TABLA 1.4

Eliminación de inhibidores en la etapa de purificación en UASB

Inhibidor	**Entrada (ppm)**	**Salida (ppm)**	**Reducción (%)**
Ácido 2-furoico	5,61	0,00	100
4-Hidroxibenzaldehído	3,46	0,35	90
Ácido 4-hidroxibenzoico	15,72	0,4	97
Ácido vanílico	60,74	0,62	99
Ácido homovanílico	25,08	0,69	97
Ácido siríngico	45,53	0,00	100
Siringol	7,43	0,96	87
Acetovainillona	5,40	1,13	79
Acetosiringona	28,11	0,97	97

Como se muestra en la tabla 1.4, en el caso de ácido vanílico, ácido homovanílico y acetovainillona se encontraron concentraciones promedio iniciales de aproximadamente 60 ppm, aproximadamente 25 ppm y aproximadamente 5 ppm, respectivamente. Después del tratamiento en el reactor, las concentraciones de las tres especies se redujeron a un nivel aproximadamente o inferior al límite de detección (1-2 ppm) para el análisis. Resultados similares se obtuvieron para ácido siríngico, acetosiringona y siringol, para los que se encontraron concentraciones promedio iniciales de aproximadamente 45 ppm, aproximadamente 28 ppm y aproximadamente 7 ppm, respectivamente, mientras que las concentraciones después del tratamiento en el reactor fueron todas aproximadamente o inferiores al límite de detección analítico de 1-2 ppm.

Por tanto, es evidente que el procedimiento anaerobio que tiene lugar en un reactor del tipo en cuestión puede lograr (i) un grado de degradación muy alto de sustancias que, con la recirculación de la fase líquida para reutilizarla en un procedimiento según la invención, pueden conducir por lo demás a la inhibición de la fermentación de azúcares en el modo descrito en este documento, y (ii) un alto grado de eliminación de DQO (materia orgánica en general) presente en el material que entra al reactor y formación de biogás que puede explotarse, por ejemplo, como carburante.

Por tanto, los experimentos y resultados de los mismos descritos anteriormente ilustran la capacidad de trabajo y eficacia de realizaciones de un procedimiento según la presente invención.

Aunque el ejemplo anterior ilustra el uso de un tratamiento de oxidación húmeda como un pretratamiento del material de biomasa lignocelulósica, la presente invención también engloba el uso de explosión de vapor como un pretratamiento. La tabla 1.5 muestra el cálculo del potencial teórico de metano en hidrolizados de paja de trigo oxidada en húmedo (PTOH) y de paja de trigo explotada con vapor (PTEV) después de la etapa de fermentación etanólica.

TABLA 1.5

Potencial teórico de metano - cálculos y suposiciones

ENTRADA			
Hidrolizado	PTEV	PTOH	
Paja de trigo conc. en hidrolizado	60	60	g/l
Relación DQO/SS	1,1	1,1	g/g
Pérdida de SS en pretratamiento	2%	8%	g/g
Grado de conversión de DQO	82%	85%	g/g
Producción específica de metano	0,35	0,35	l-CH_4/g de DQO
Hemicelulosa en paja de trigo	28%	28%	g/g
Celulosa en paja de trigo	37%	37%	g/g
Recuperación de hemicelulosa	60%	70%	g/g
Recuperación de celulosa	90%	80%	g/g
Relación glucosa/celulosa	1,11	1,11	g/g
Relación xilosa/hemicelulosa	1,14	1,14	g/g
CÁLCULOS			
Glucosa producida	22,2	19,7	g/l
Xilosa producida	11,5	13,4	g/l
Pérdida de DQO (azúcares convertidos en etanol)	36	35	g-DQO/l
DQO inicial en hidrolizado	65	61	g-DQO/l
DQO que queda para el metano	29	25	g-DQO/l
Producción de metano	8,28	7,58	l-CH_4/l-hidrolizado
Producción específica de metano	138	126	m^3-CH_4/t-paja

Estos cálculos se basan en lo siguiente: punto de partida es 60 g de paja de trigo por litro. La relación DQO/SS y la tasa de eliminación de DQO para PTOH han sido determinadas por BioCentrum, DTU. El valor para la tasa de eliminación de DQO para PTEV se ha interpolado a partir de experimentos por lotes llevados a cado en BioCentrum, DTU. La producción específica de metano, hemicelulosa a xilosa y celulosa a glucosa son valores estequiométricos fijados. Las composiciones y recuperaciones de azúcares se han determinado por RIS∅.

Los cálculos de la producción de metano se han basado en la fracción de DQO restante después de las fermentaciones etanólicas que pueden convertirse en metano según los rendimientos de conversión determinados (tabla 1.5). Basándose en los rendimientos de azúcares, la pérdida de DQO en la fermentación etanólica se determina y se resta de la DQO total presente en los hidrolizados. Entonces, la producción de metano se basa en la DQO restante y las conversiones determinadas de los efluentes específicos.

Ejemplo 2

Evaluación de los productos de degradación de la oxidación húmeda de material lignocelulósico

2.1 *Introducción*

Este ejemplo muestra un estudio de la identificación y cuantificación del rendimiento de azúcares y productos de degradación de la oxidación húmeda de material lignocelulósico y para evaluar el fraccionamiento de la celulosa y hemicelulosa.

2.2 *Resumen de los experimentos*

La oxidación húmeda de paja de trigo se realizó con ocho combinaciones de los cuatro parámetros; temperatura, tiempo, carbonato y oxígeno. Dos de los experimentos fueron superiores en obtener la solubilización de hemicelulosa y lignina a partir de la fracción sólida, con altas recuperaciones de la hemicelulosa (52,0-56,5%) y la celulosa (99,7-99,8%). Las fracciones sólidas estuvieron constituidas por 67,5-65,8% de celulosa, 7,6-10,4% de hemicelulosa y 4,8-5,6% de lignina. La convertibilidad enzimática de celulosa en glucosa fue del 62,1-67,7%. Las fracciones líquidas estuvieron constituidas por hemicelulosa solubilizada y productos de degradación de bajo peso molecular tales como ácidos carboxílicos, fenoles monoméricos y furanos. Los productos de degradación en las fracciones sólidas y líquidas se relacionaron con las condiciones de oxidación húmeda: tiempo de reacción, temperatura y adición de carbonato y oxígeno. La oxidación húmeda alcalina, por ejemplo la adición de oxígeno y carbonato, fue importante para la solubilización de lignina y hemicelulosa a partir de la fracción sólida. Una alta convertibilidad enzimática de la celulosa se correlacionó con un bajo contenido de lignina en la fracción sólida.

2.3 *Materiales y procedimientos*

2.3.1 *Materiales*

Se cultivó trigo (*Triticum aestivum L.*) cv. Husar y se cosechó en Risø National Laboratory en 1997. La paja de trigo se secó y se molió a 5 mm. Todos los disolventes y productos químicos fueron de calidad analítica y se compraron de Fischer, Merck, Aldrich y Fluka.

2.3.2 *Pretratamiento de oxidación húmeda*

La oxidación húmeda se llevó a cabo en el mismo reactor de circulación que se describe anteriormente. La paja de trigo molida (60 g) se mezcló con 1 l de agua y Na_2CO_3 antes de añadir presión de oxígeno y calentar la suspensión. Después de enfriarse a aproximadamente 25-30ºC, la paja de trigo pretratada se dividió mediante filtración en una fracción de fibra sólida y una fracción líquida.

2.3.3 *Análisis de la fracción de fibra sólida*

La fracción sólida se secó hasta peso constante a 20ºC y 65% de humedad relativa. La fracción sólida y el material de partida se analizaron para su contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina y material sin pared celular (MSPC) según Goering y Soest (1970).

La convertibilidad enzimática de la celulosa en glucosa se determinó mediante una mezcla de celulasas Celluclast y Novozym 188 (ambas de Novo Nordisk, Bagsværd) (Schmidt y Thomsen, 1998).

2.3.4 *Análisis de la fracción líquida*

El filtrado se analizó fresco (pH, COT y furanos) y luego se almacenó congelado (-20ºC) hasta análisis posteriores. El carbono orgánico total se midió en un TOC-5000 de Shimadzu con detección IR después de la combustión a 680ºC (catalizador de Pt). La compensación por el carbono inorgánico se hizo mediante acidificación con HCl. Se determinaron 5-hidroxi-2-metilfurfural (5-HMF) y 2-furfural en el filtrado fresco (filtrado en 0,45 μm) mediante HPLC (columna de 25 mm Nucleosil 5C-18) con un gradiente de eluyente lineal de metanol (10-90%) a pH 3 usando compuestos auténticos como patrones de calibración (Bjerre y col., 1996a). La hemicelulosa se determinó como los azúcares solubles; glucosa, xilosa y arabinosa después de la hidrólisis con ácido sulfúrico (H_2SO_4 al 4%, 121ºC, 10 min), filtración y purificación por intercambio iónico mediante HPLC (Aminax HPX87H) con H_2SO_4 4 mM como eluyente y flujo de 0,6 ml min^{-1} a 63ºC (Bjerre y col., 1996b). Los ácidos carboxílicos se determinaron mediante cromatografía iónica en un sistema Dionex 4000 i IC con columna Ionpac ICE-AS-6 y ácido heptafluorobutírico 0,4 mM como eluyente a 1,0 ml min^{-1} con conductividad combinada y detección UV (204 nm). El ácido oxálico se determinó en el mismo sistema pero con columna Ionpac AS12A y eluyente de Na_2CO_3 2,7 mM y $NaHCO_3$ 0,3 mM a 1,5 ml min^{-1}.

2.3.5 *Análisis de fenoles en la fracción líquida*

La fracción líquida o el caldo de fermentación se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4ºC. El sobrenadante se ajustó a pH 6,9-7,1 con NaOH 1 M y a pH 1,9-2,1 con HCl 1 M, respectivamente. Los fenoles y el ácido 2-furoico se aislaron de la fracción líquida mediante extracción en fase sólida a pH 7 y pH 2, respectivamente, y se eluyeron con acetato de etilo (Isolute ENV+ 100 mg/1 ml, IST). Los fenoles, aldehídos fenólicos y cetonas fenólicas se cuantificaron a partir del extracto de pH 7. Los ácidos de fenol y el ácido 2-furoico se cuantificaron como sus derivados trimetilsililados a partir del extracto de pH 2. Las muestras de la extracción de pH 7 se diluyeron con acetonitrilo. Las muestras de la extracción de pH 2 se diluyeron con acetonitrilo y se secaron con Na_2SO_4. El sobrenadante se sililó en una mezcla de BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) y acetonitrilo (1:5) a 70ºC durante 30 minutos. Los fenoles se cuantificaron mediante análisis por CG-EM y CG-FID en una columna capilar de sílice fundida recubierta con una película de 0,25 μm de Crossbond de fenilo al 5% (HP-5, Agilent Technologies, EE.UU., o XTI-S, Restek Corp., EE.UU.) usando patrones auténticos.

2.4. *Resultados y discusión*

Oxidación húmeda

Este estudio se basa en 8 experimentos (un diseño factorial 2^{4-1}) para la optimización de la oxidación húmeda alcalina de paja de trigo (60 gl^{-1}) en relación con el rendimiento de azúcares y con fraccionar la celulosa y hemicelulosa. La temperatura, tiempo de reacción, carbonato sódico y oxígeno fueron los parámetros de reacción probados a dos niveles (tabla 2.1). Cada hidrolizado derivado de la oxidación húmeda se dividió mediante filtración en dos fracciones, una fracción soluble líquida y una fracción de fibra sólida. La fracción líquida comprende hemicelulosa y productos de degradación tales como fenoles monoméricos, ácidos carboxílicos y furanos, mientras que la fracción de fibra sólida comprende celulosa, hemicelulosa, lignina y material sin pared celular.

TABLA 2.1

El diseño factorial 2^{4-1} estadístico para la oxidación húmeda aplicada para paja de trigo (60 gl^{-1} de paja)

Factor	Parámetro	Nivel bajo	Nivel alto	Unidades
A	Temperatura	185	195	°C
B	Na_2CO_3	6,5	2	g l^{-1}
C	Oxígeno	6 (600)	12 (1200)	bar (kPa)
D	Tiempo de reacción	10	15	minutos

Respecto al material de partida, paja, las fracciones de fibra sólida contuvieron 84-95,9% de celulosa, 5,5-45,5% de hemicelulosa, 28,1-67,5% de lignina y 25,9-44,7% de material sin pared celular (MSPC) (tabla 2.2). Las condiciones experimentales fueron óptimas cuando se produjo una fracción sólida con alto contenido de celulosa, bajos contenidos de lignina y hemicelulosa y alta convertibilidad enzimática. También deben ser altas las recuperaciones de hemicelulosa y celulosa. Las recuperaciones de celulosa fueron superiores al 90% en todos los experimentos, pero las recuperaciones de hemicelulosa variaron del 42 al 70%. Así se obtuvo un buen fraccionamiento de celulosa y hemicelulosa con alta convertibilidad de celulosa en glucosa en cuatro de los experimentos. Pero con respecto a las recuperaciones de azúcares, sólo dos experimentos fueron óptimos a las condiciones de oxidación húmeda: 15 minutos a 185ºC y 10 minutos a 195ºC con adición de 12 bar de oxígeno y 6,5 gl^{-1} de Na_2CO_3. La cantidad total de azúcares solubles no varió mucho y no se correspondió con la reducción de hemicelulosa en la fracción sólida.

Tabla 2.2 Composición química, azúcares solubilizados, celulosa convertible y recuperaciones de azúcares de la paja de trigo oxidada en húmedo (60 gL^{-1} de paja).

Productos iniciales o de reacción	Temperatura: Tiempo: Presión de O_2: Na_2CO_3:	185°C 10 min 6 bar 6,5 gL^{-1}	185°C 10min 12 bar 2 gL^{-1}	185°C 15 min 6 bar 2 gL^{-1}	185°C 15 min 12 bar 6,5 gL^{-1}	195°C 10 min 6 bar 2 gL^{-1}	195°C 10 min 12 bar 6,5 gL^{-1}	195°C 15 min 6 bar 6,5 gL^{-1}	195°C 15 min 12 bar 2 gL^{-1}	Paja
Fracción sólida	(g)	31,7	38,2	36,3	30,5	36,2	29,3	28,4	28,6	60
MSPC	(% p/p)	13,9	17,1	16,1	14,7	18,6	15,7	13,7	21,8	25,1
Hemicelulosa	(% p/p)	13,8	20,0	14,7	10,4	12,3	7,6	8,0	3,2	27,9
Lignina	(% p/p)	8,4	8,0	9,0	4,8	9,7	5,6	7,7	7,1	8,7
Celulosa	(% p/p)	61,8	53,5	58,6	67,5	58,0	67,8	67,4	65,1	37,0
Convertibilidad	(% p/p)	53,7	38,1	38,1	62,1	39,3	67,7	63,2	66,3	14,1
Fracción líquida										
Glucosa	(g/100 g)	3,6	4,3	4,0	2,9	3,8	2,6	2,8	3,2	-
Xilosa	(g/100 g)	8,7	6,3	8,7	9,6	10,2	9,9	10,1	10,5	-
Arabinosa	(g/100 g)	2,0	1,3	1,6	2,3	1,5	2,3	2,5	1,0	-
Azúcares totales	(g/100 g)	14,3	11,9	14,2	14,8	15,5	14,8	15,4	14,7	-
pH	-	7,7	4,7	4,8	6,0	4,7	5,9	6,1	3,8	-

Recuperación										
Hemicelulosa	(%)	59,2	69,6	64,1	56,5	63,6	52,0	53,2	41,6	100
Celulosa	(%)	94,3	102,4	105,7	99,7	103,	99,8	93,3	91,7	100
Total	(%)	79,2	88,3	87,8	81,2	9	76,9	76,1	70,1	100
						86,5				

Las fracciones solubles de paja de trigo oxidada en húmedo estuvieron constituidas por una mezcla de azúcares hidrolizables (7,1-9,2 gl^{-1}), ácidos carboxílicos (1,9-7,2 gl^{-1}), fenoles (aproximadamente 0,14-0,20 gl^{-1}) y furanos (0-0,09 gl^{-1}) (tabla 2.3). Los fenoles principales fueron vainillina, siringaldehído, acetosiringona (4-hidroxi-3,5-dimetoxiacetofenona), ácido vanílico y ácido siríngico, que se producen a niveles de 10-90 mgl^{-1}. En condiciones térmicas y ácidas, la xilosa se descompondrá en 2-furfural y la glucosa en 5-HMF. Experimentos con un bajo nivel de adición de carbonato produjeron estos dos furanos, mientras que no los experimentos con un alto nivel de carbonato. El experimento a las condiciones: 15 minutos a 195ºC con 12 bar de oxígeno y 2 gl^{-1} de carbonato produjo un alto nivel de furanos y también tuvo el pH final más bajo (tabla 2.3). Los resultados indicaron que los productos de degradación de azúcares 2-furfural y 5-HMF estuvieron favorecidos cuando el pretratamiento se realizó a bajos niveles de adición de carbonato, mayor temperatura y tiempos de reacción más largos, siendo el carbonato el factor más importante.

La formación de ácidos carboxílicos fue alta en todos los experimentos, siendo el ácido fórmico y el ácido acético los ácidos carboxílicos principales. La formación de ácidos carboxílicos se correlacionó con la eliminación de hemicelulosa y lignina de la fracción sólida (tablas 2.2 y 2.3). Por tanto, la producción de ácidos carboxílicos pareció ser un resultado de la degradación de lignina y hemicelulosa (Bjerre y col., 1996). También se identificaron muchos ácidos carboxílicos no volátiles como sus derivados de trimetilsililo mediante CG-EM a partir de las fracciones líquidas liofilizadas: ácido succínico, glicólico, láctico, málico, maleico, fumárico, 2,3-dihidroxipropanoico y 2,4-dihidroxibutírico.

No se observaron fenoles con grupos de alcohol alifático excepto 4-hidroxi-3-metoxifenetilenglicol. De los extractos sililados pudieron identificarse varios compuestos: fenol, guayacol, siringol, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, ácido 2-furoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico y 4-hidroxi-3-metoxifenetilenglicol se verificaron mediante espectros de masas y (cuando estuvieron disponibles) patrones auténticos. Debido a la isomerización cetoenólica de las cetonas fenólicas y la formación del éter de TMS enólico con el tratamiento con BSTFA, los extractos de SPE a pH 7 se analizaron mediante CG-EM sin derivatización. Por tanto, se identificaron 4-hidroxiacetofenona, acetovainillona y 4-hidroxi-3,5-dimetoxiacetofenona. No se identificaron 3,4,5-trimetoxiacetofenona y 3,4,5-trimetoxibenzaldehído.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 2.3 Compuestos cuantificados (g o mg/100 g de paja) en la fracción líquida de paja de trigo oxidada en húmedo (60 gL^{-1}).

Tipo	Compuesto	Temperatura: Tiempo: Presión de O_2: Na_2CO_3:	185°C 10 min 6 bar 6,5 gL^{-1}	185°C 10 min 12 bar 2 gL^{-1}	185°C 15 min 6 bar 2 gL^{-1}	185°C 15 min 12 bar 6,5 gL^{-1}	195°C 10 min 6 bar 2 gL^{-1}	195°C 10 min 12 bar 6,5 gL^{-1}	195°C 15 min 6 bar 6,5 gL^{-1}	195°C 15 min 12 bar 2 gL^{-1}
Azúcares	Glucosa	(g/100 g)	3,56	4,26	4,01	2,87	3,75	2,57	2,84	3,23
	Xilosa	(g/100 g)	8,71	6,31	8,66	9,58	10,19	9,94	10,06	10,51
	Arabinosa	(g/100 g)	2,04	1,33	1,56	2,32	1,51	2,33	2,52	0,98
Ácidos	Ácido fórmico	(g/100 g)	2,19	3,61	0,72	7,12	3,04	5,77	6,22	6,45
	Ácido acético	(g/100 g)	1,92	1,68	1,52	2,57	1,61	2,12	2,60	2,27
	Ácido glicólico	(g/100 g)	0,49	0,58	0,59	1,51	0,73	1,45	2,02	1,16
	Ácido láctico	(g/100 g)	0,43	n.d.[a]	0,17	n.d.	0,22	n.d.	3,29	n.d.
	Ácido málico	(g/100 g)	0,10	0,21	0,19	0,31	0,17	0,27	0,24	0,23
	Ácido cítrico	(g/100 g)	0,07	0,00	0	0,09	0	0,03	0,07	0,07
	Ácido oxálico	(g/100 g)	0,03	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01	0,01

	Ácido succínico	(g/100 g)	0,83	0,26	0,24	0,40	0,25	0,38	0,47	0,41
Furanos	5-Hidroximetil-furfural	(mg/100 g)	0	0	0	0	0	0	0	15
	2-Furfural	(mg/100 g)	0	3	0	0	32	0	0	135
	Ácido 2-furoico	(mg/100 g)	0	3	5	5	6	11	7	16
Fenoles	Fenol	(mg/100 g)	2	1	1	3	1	5	5	2
	Guayacol	(mg/100 g)	17	3	6	5	9	19	32	8
	Siringol	(mg/100 g)	15	1	2	0	6	6	13	5
	4-Hidroxibenzaldehído	(mg/100 g)	12	35	36	22	39	35	25	55
	Vainillina	(mg/100 g)	7	59	66	15	74	54	28	89
	Siringaldehído	(mg/100 g)	1	23		1	50	41	3	69
	4-Hidroxiaceto-	(mg/100 g)	2	3	4	5	5	7	6	8

fenona											
Acetovainillona	(mg/100 g)	6	7	8	8	10	15	14	14	66	
Acetosiringona	(mg/100 g)	45	40	46	31	56	65	70	6	11	
Ácido 4-hidroxibenzoico	(mg/100 g)	1	10	6	18	4	16	6			
Ácido vanílico	(mg/100 g)	3	39	37	46	28	112	40	78		
Ácido siríngico	(mg/100 g)	5	12	23	8	28	37	48	46		
Ácido p-cumárico	(mg/100 g)	12	18	24	6	24	18	6	12		
Ácido ferúlico	(mg/100 g)	8	5	12	5	16	17	6	14		
CANTIDAD TOTAL	(g/100 g)	20,49	18,52	17,97	26,95	21,86	25,31	30,63	25,97		

Pueden hacerse importantes observaciones comparando los dos experimentos a las condiciones: 10 minutos a 195ºC con oxígeno y adición de carbonato a bajos niveles y altos niveles, respectivamente. El contenido de hemicelulosa y lignina en la fracción sólida fue bajo cuando se añadió oxígeno y carbonato al nivel alto, y alto cuando el oxígeno y el carbonato se añadieron al nivel bajo (tabla 2.2). El contenido total de fenoles fue aproximadamente el mismo, pero con altos niveles de oxígeno y carbonato el contenido total de ácidos carboxílicos fue muy alto. Esto indicó que los fenoles se convirtieron hasta cierto punto en ácidos carboxílicos durante el procedimiento de oxidación húmeda. La oxidación húmeda de compuestos aromáticos modelo como fenol y quinolina dieron como resultado degradación cuantitativa a ácidos carboxílicos.

Ejemplo 3

Evaluación de los posibles inhibidores en diversas etapas del procedimiento para convertir material de biomasa lignocelulósica

3.1 *Material y procedimientos*

3.1.1 *Pretratamiento - oxidación húmeda*

La oxidación húmeda (OH) se llevó a cabo en un reactor de circulación de 2 l construido en Risø National Laboratory (Bjerre y col., 1996). Las condiciones de pretratamiento para el sustrato de fermentación fueron 10 minutos de oxidación húmeda a 195ºC, 6,5 g/l de Na_2CO_3 y 12 bar (1200 kPa) de O_2. La paja de trigo molida (5 mm) (60 g) se mezcló con 1 l de agua y Na_2CO_3 antes de añadir presión de oxígeno y calentar la suspensión. Después de enfriarse hasta por debajo de 30ºC, toda la suspensión de paja de trigo pretratada se eliminó del reactor mediante succión. La composición de la paja de trigo se determinó como se describe previamente (Ahring y col., 1996). La paja de trigo pretratada estuvo constituida por 34,6 g/l de celulosa, de la que 20,8 g/l pudieron convertirse en glucosa (67% de convertibilidad enzimática) mediante una mezcla de celulasas Celluclast® y Novozym 188 (Schmidt y col., 1998) proporcionada amablemente por Novo Nordisk A/S, Dinamarca. No se vio xilosa monomérica después de la oxidación húmeda. Con la hidrólisis con ácido débil de la paja de trigo pretratada (realizada como se describe por (Ahring y col., 1996)), la concentración de xilosa monomérica fue 6 g/l.

3.1.2 *Hidrólisis enzimática*

Previamente se mostró (Ahring y col., 1998) que el hidrolizado de hemicelulosa tratado con Celluclast® aumentaba la disponibilidad del sustrato de hemicelulosa. De este modo aumentó en gran parte la producción de etanol con *Thermoanaerobacter mathranii* A3. En el medio de paja de trigo oxidada en húmedo, el pH se ajustó a 7,0 antes de someter a autoclave. Entonces al medio se añadió 1% v/v de Celluclast (correspondiente a 17,5 UPF/g de celulosa, UPF unidades de papel de filtro), una celulasa bruta de amplio espectro comercialmente disponible con algo de actividad xilanasa de *Trichoderma reesei*. Esta mezcla se incubó durante 24 horas a 40ºC y pH 7,0.

3.1.3 *Microorganismos de fermentación etanólica y medio usado*

Thermoanaerobacter mathranii A3M4

En los experimentos se usó un mutante de la cepa de *Thermoanaerobacter mathranii* A3 originalmente aislado de una fuente termal islandesa como se describe por (Sonne-Hansen y col., 1993). *T. mathranii* A3 se ha descrito por (Larsen y col., 1997). Todas las fermentaciones se realizaron a 70ºC y pH 7,0. A3M4 se obtuvo esencialmente como se describe por (Ahring y col., 1996).

Saccharomyces cerevisiae

Se compró levadura de panadero de The Danish Alcohol Producer. Las células se tomaron del centro del paquete y se transfirieron a una botella de suero de 20 ml que contenía ML, se incubaron durante 24 horas y se sembraron en placa en placas de agarosa habituales. Todos los cultivos de levadura se realizaron a 30ºC y pH 6,0.

Medio para Saccharomyces cerevisiae

La composición del medio de levadura básica (ML) fue del siguiente modo: todos en g/l $(NH_4)_2SO_4$ 5,0, $MgSO_4$, $7H_2O$ 0,5, KH_2PO_4 3,0. Todos en mg/l vitaminas biotina 0,050, pantotenato de Ca 1,0, mioinositol 25,0, tiamina, HCl 1,0, piridoxina, HCl 1,0, ácido para-aminobenzoico 0,2. Todos en mg metales traza EDTA 15,0, $ZnSO_4$, $7H_2O$ 4,5, $MnCl_2$, $2H_2O$ 1,0, $CoCl_2$, $6H_2O$ 0,3, $CuSO_4$, $5H_2O$ 0,3, Na_2MoO_4, $2H_2O$ 0,4, $CaCl_2$, $2H_2O$ 4,5, $FeSO_4$, $7H_2O$ 3,0, H_3BO_3 1,0, KI 0,1. *Ergosterol* 10 mg/l, *Tween* 80 84 mg/l. El medio básico se gaseó durante 20 min con una atmósfera de N_2/CO_2 (4:1) y el pH se ajustó a 6,0 antes de someterse a autoclave.

Disoluciones madre

Las disoluciones de vitaminas y metales traza se prepararon como 1000x disoluciones madre. El ergosterol y Tween 80 se prepararon como 1250x disolución madre disueltas en etanol al 96%. Todas las disoluciones madre se gasearon durante 20 min con una atmósfera de N_2/CO_2 (4:1), se filtraron estéril y se añadieron después de someterse a autoclave.

Para la inoculación se seleccionó una colonia fresca y se transfirió a una botella de suero que contenía ML, la botella se cerró y se incubó durante la noche a 30ºC en un agitador horizontal a 200 rotaciones/min. Entonces, el 10% del cultivo durante la noche se transfirió a ML anaerobio y se incubó de nuevo durante la noche. El cultivo se usó como inóculo en los experimentos de fermentación. La densidad óptica DO578 en las botellas usadas para el inóculo era 2,0.

Medio para Thermoanaerobacter mathranii A3M4

El medio BA como se describe previamente por (Angelidaki y col., 1990) corregido con 1 g/l de extracto de levadura (Difco), pero sin cisteína, se usó para el cultivo de la cepa de *Thermoanaerobacter mathranii* A3M4. El medio se redujo con 0,25 g/l de sulfuro de sodio. La concentración inicial de D-xilosa fue 5 g/l y la incubación fue a 70ºC y pH 6,8. En los experimentos de fermentación se usó un cultivo durante la noche cultivado en BA con 5 g/l de xilosa como inóculo. La DO_{578} en las botellas usada para el inóculo era 0,8.

Medios combinados

El medio sintético combinado (para el cultivo de tanto *S. cerevisiae* como *T. mathranii*), MSC, estuvo constituido por medio BA más disoluciones madre como se usan para el medio de levadura: metales traza, vitaminas y ergosterol/tween80. El medio se complementó con 12 g/l de glucosa y 5 g/l de xilosa. La densidad óptica (DO_{578}) se usó para evaluar el crecimiento. El medio de paja de trigo combinado, MPTC, contuvo paja de trigo oxidada en húmedo complementada con las mismas concentraciones de sales, metales traza, vitaminas y ergosterol/tween80 que MSC, pero sin adición de glucosa y xilosa.

Fermentación etanólica

La fermentación etanólica se realizó en botellas de suero de 300 ml que contenían 100 ml de medio. El medio de paja de trigo oxidada en húmedo combinado (MPTC) se incubó previamente con CelluClast como se describe anteriormente. El pH se ajustó a 6,0, se inoculó con *Saccharomyces cerevisiae* hasta una DOS78 calculada de 0,05 y se incubó a 30ºC en un agitador horizontal a 200 (rotaciones/min) durante cinco días. Después de terminarse la fermentación de la levadura, la suspensión se ajustó a pH 6,8, con NaOH al 1%, añadido de una disolución madre anaerobia estéril antes de añadirse cultivo de inoculación de *Thermoanaerobacter mathranii* A3M4 al 5% (concentración final). La fermentación termófila se realizó a 70ºC sin agitación durante cinco días.

3.1.4 *Destilación*

Después de la fermentación con *Thermoanaerobacter mathranii* A3M4, el etanol de las botellas que contenía MPTC hidrolizado enzimáticamente con CelluClast se eliminó por destilación. Se montó un sistema refrigerador de agua vertical de 30 cm, se calentó hasta 70ºC y se lavó con N_2/CO_2 (4:1) durante 1,5 horas para garantizar que se eliminara el etanol.

3.1.5 *Producción de metano*

El *inóculo metanogénico* usado se tomó de un reactor tipo tanque en continuo agitado anaerobio que funcionaba a 55ºC con residuos domésticos como sustrato.

La suspensión restante se inoculó entonces con 10% v/v de inóculo anaerobio y se incubó a 55ºC sin agitación.

3.1.6 *Procedimientos analíticos*

Las muestras (1 ml) del caldo de fermentación se acidificaron mediante 30 μl de ácido fosfórico al 17% para la cuantificación del etanol y el ácido acético. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases HP5890 Series II con detección por ionización de llama y una columna capilar de sílice (polietilenglicol reticulado-TPA, 30 m, 0,53 mm). El metano se midió como se describe por (Angelidaki, L, 1990). La DQO se midió según normas americanas. Las mediciones de DO_{578} se realizaron en un espectrofotómetro (Milton Ron) a 578 nm. La productividad volumétrica del etanol se determinó como EtOH mM producido por hora mediante regresión lineal por puntos de datos a crecimiento semilogarítmico (entre 4 y 12 horas).

3.1.7 *Análisis del hidrolizado de fenoles*

La fracción líquida o caldo de fermentación se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4ºC. El sobrenadante se ajustó a pH 6,9-7,1 con NaOH 1 M y a pH 1,9-2,1 con HCl 1 M, respectivamente. Los fenoles y el ácido 2-furoico

se aislaron de la fracción líquida mediante extracción en fase sólida a pH 7 y pH 2, respectivamente, y se eluyeron con acetato de etilo (Isolute ENV+ 100 mg/1 ml, IST). Los fenoles, aldehídos fenólicos y cetonas fenólicas se cuantificaron a partir del extracto de pH 7. Los ácidos fenólicos y el ácido 2-furoico se cuantificaron como sus derivados trimetilsililados a partir del extracto de pH 2. Las muestras de la extracción de pH 7 se diluyeron con acetonitrilo. Las muestras de la extracción de pH 2 se diluyeron con acetonitrilo y se secaron con Na_2SO_4. El sobrenadante se sililó en una mezcla de BSTFA (N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida) y acetonitrilo (1:5) a 70ºC durante 30 minutos. Los fenoles se cuantificaron mediante análisis por CG-EM y CG-FID en una columna capilar de sílice fundida recubierta con una película de 0,25 μm de Crossbond de fenilo al 5% (HP-5, Agilent Technologies, EE.UU., o XTI-S, Restek Corp., EE.UU.) usando patrones auténticos.

3.3 *Resultados*

La fermentación de paja de trigo oxidada en húmedo para dar etanol dio como resultado etanol 138,7 mM producido a partir de 60 g/l de paja de trigo. Se produjo etanol 110 mM por *S. cerevisiae* y 28,7 mM producido por *T. mathranii*. Además, se produjo ácido acético 10,1 mM durante la etapa de fermentación de xilosa termófila. El efluente de la producción de etanol, después de la destilación, se convirtió en metano mediante un consorcio de *Archaea* metanógenas termófilas. Se produjeron 77,6 m^3 de metano/tonelada de paja de trigo (figura 4) y durante la etapa metanogénica se eliminó el 71% del contenido de DQO.

La suerte de los posibles inhibidores de fermentación producidos durante la oxidación húmeda de paja de trigo se controló en momentos clave en el procedimiento de etanol. De la tabla 3.1 puede verse que los aldehídos fenólicos 4-hidroxibenzaldehído y vainillina se metabolizaron los dos casi completamente por *S. cerevisiae*. El ácido siríngico también se metabolizó parcialmente por *S. cerevisiae*. Sin embargo, la concentración de ácido siríngico revertió a su nivel inicial después de la fermentación de xilosa por *T. mathranii* indicando la formación de ácido siríngico por el termófilo. Además, hubo un aumento en la concentración de ácido 4-hidroxibenzoico después de la etapa de fermentación termófila. Ninguno de los otros compuestos fenólicos alcoholes, aldehídos, productos de degradación de pentosas, cetonas o ácidos se metabolizaron por *S. cerevisiae* o *T. mathranii*. Como consecuencia de la conversión de 4-hidroxibenzaldehído y vainillina por *S. cerevisiae*, la concentración total de compuestos fenólicos medida disminuyó durante la etapa de fermentación de hexosas mesófila. De los ácidos carboxílicos pequeños se controló el ácido acético, del que se produjo 23,5 mM durante el pretratamiento de paja de trigo y un 10,1 mM adicional se formó durante la fermentación de ácidos mixtos por *T. mathranii*. En la etapa de tratamiento de agua residual anaerobia termófila, todos los compuestos fenólicos, productos de degradación de pentosas y ácido acético se convierten en metano. De los inicialmente 158,8 mg/l de compuestos fenólicos, 4,0 mg/l todavía permanecen después del tratamiento del agua residual y del ácido acético 33,2 mM, 1,8 mM quedó sin metabolizar. Esto se corresponde con el 97% de eliminación de fenoles y el 94% de eliminación de ácido acético.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 3.1

Posibles inhibidores de fermentación medidos en momentos clave en el procedimiento

Fenoles mg/l	*S. cerevisiae*, inicio	*S. cerevisiae*, final, *T. mathranii*, inicio	*T. mathranii*, final, tratamiento de agua residual, inicio	Tratamiento de agua residual, final
fenol	4,5	3,9	3,8	0,9
guayacol	8,5	8,0	8,2	0,0
siringol	2,3	2,8	3,6	0,0
4-hidroxibenzal-dehído	13,7	0,9	0,6	0,0
vainillina	10,6	1,9	1,1	0,1
siringaldehído	3,6	3,2	2,6	0,3
4-hidroxiaceto-fenona	2,8	2,5	2,7	0,2
Acetovaini-llona	5,0	5,0	4,9	0,2
acetosiringona	17,4	19,0	20,0	1,9
ácido 2-furoico	7,2	6,2	6,5	0,0
ácido 4-hidroxibenzoico	23,7	22,8	26,0	0,0
ácido vanílico	32,3	31,2	30,6	0,1
ácido siríngico	20,2	16,1	19,0	0,1
ácido p-cumárico	5,0	5,1	4,7	0,0
ácido ferúlico	2,1	3,4	3,0	0,2
Fenoles TOTALES	158,8	131,9	137,4	4,0
Ácido acético	23,5	23,0	33,2	1,8

Estos resultados muestran claramente que es posible reducir el nivel de sustancias inhibidoras en el agua residual obtenida de una fermentación etanólica hasta un nivel que permita recircular toda o parte del agua residual en el procedimiento sin ninguna inhibición sustancial del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica o de la posterior hidrólisis o la fermentación de azúcares.

Referencias

Ahring, B. K., **Jensen**, K., **Nielsen**, P., **Bjerre**, A. B. y **Schmidt**, A. S. 1996. Pretreatment of wheat straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria. **58**: 107-113.

Angelidaki y col., 1992, *Biotechnology and Bioengineering* **39**: 351-353.

Angelidaki, I., **Petersen**, S. P. y **Ahring**, B. K. 1990. Effects of lipids on the anaerobic digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite. *Applied Microbiology Biotechnology* **33**: 469-472.

Bailey y **Ollis**. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill, International Edition, *Chemical Engineering Series*.

Goering y **Soest**. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and som applications). pp. 1-20. En: Agricultural handbook nº 379. *Agricultural Research Services*, USDA, Washington DC.

Larsen, L., **Nielsen**, P., y **Ahring**, B. K. 1997. Thermoanaerobacter mathranii sp. nov., an ethanol producing extremely thermophilic bacterium from a hot-spring in Iceland. *Arch Microbiol* **168**: 114-119.

Puls, J. 1993. Substrate analysis of forest and agricultural wastes, pp. 13-32. En: J. N. Saddler (ed.), Bioconversion of forest and agricultural plant residues. *CAB International*, Wallingford, UK.

Saddler, J. N., **Ramos**, L. P., **Breul**, C. 1993. Steam pre-treatment of lignocellulosic residues, pp. 73-91. En: J. N. Saddler (ed.), Bioconversion of forest and agricultural plant residues. *CAB International*, Wallingford, UK.

Schmidt, A. S. y **Ahring**, B. K. 1996. *Biotechnology and Bioengineering* **49(3)**: 229-246.

Schmidt, A. S. y **Thomsen**, A. B. 1998. Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. *Biores. Biotechnol*. **64**: 139-151.

Sonne-Hansen, J., **Mathrani**, I. M. y **Ahring**, B. K. 1993. Xylanolytic anaerobic thermophiles from Icelandic hot-springs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38**: 537-541.

Taherzadeh, M. J., **Niklasson**, C., y **Liden**, G. 1997. Acetic acid-friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae. Chem Eng Sci* **52**: 2653-2659.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para convertir en continuo material de biomasa lignocelulósica sólida en etanol en el que toda o parte del agua de proceso se recircula, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(i) proporcionar una suspensión acuosa del material de biomasa,

(ii) someter, en un recipiente de reacción, dicha suspensión acuosa a condiciones neutras o alcalinas y a condiciones de temperatura elevada y/o a una atmósfera enriquecida en oxígeno para obtener una suspensión en la que se produce al menos la separación parcial del material de biomasa en celulosa, hemicelulosa y lignina,

(iii) someter la suspensión resultante de la etapa (ii) y/o la fase acuosa de ésta a un tratamiento dando como resultado al menos la hidrólisis parcial de la celulosa y hemicelulosa para obtener una suspensión y/o fase acuosa que contiene una cantidad de azúcares microbiológicamente fermentables que permite usar la suspensión o fase acuosa como un medio de fermentación etanólica,

(iv) someter la suspensión y/o fase acuosa de la etapa (iii) a al menos una etapa de fermentación del etanólica,

(v) separar el etanol del medio de fermentación resultante de la etapa (iv) dando como resultado un efluente de aguas residuales de fermentación que contiene un nivel de sustancias inhibidoras que, si está presente en cualquiera de las etapas precedentes (ii) a (iv), sería limitante de la velocidad o inhibidor;

(vi) someter dicho efluente de aguas residuales a un tratamiento por el cual el nivel de las sustancias inhibidoras se reduce a un nivel que, si el efluente de aguas residuales se introduce en cualquiera de las etapas precedentes (ii) a (iv), no es limitante de la velocidad o inhibidor;

(vii) introducir todo o parte del efluente de aguas residuales así tratado en cualquiera de las etapas precedentes (ii) a (v), y

(viii) repetir en continuo las etapas (i) a (vii).

2. Un procedimiento según la reivindicación 1 en el que el tratamiento de la etapa (vi) es un procedimiento de fermentación anaerobia.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2 en el que el tratamiento de la etapa (vi) se realiza usando un microorganismo productor de metano.

4. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicho microorganismo productor de metano se selecciona del grupo que consiste en especies de *Methanobacterium, Methanobrevibacter, Methanothermus, Methanococcus, Methanomicrobium, Methanogenium, Methanospirillum, Methanoplanus, Methanosphaera, Methanosarcina, Methanolobus, Methanoculleus, Methanothrix, Methanosaeta, Methanopyrus* y *Methanocorpusculum*.

5. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que el tratamiento de la etapa (vi) se realiza por un microorganismo acetogénico.

6. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que se usa una enzima carbohidrasa (EC 3.2) en la hidrólisis parcial de la etapa (iii).

7. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicha enzima carbohidrasa se selecciona del grupo que consiste en celulasas (EC 3.2.1.4); β-glucanasas, que incluyen glucan-1,3-β-glucosidasas (exo-1,3-β-glucanasas, EC 3.2.1.58) y endo-1,3(4)-β-glucanasas (EC 3.2.1.6); xilanasas, que incluyen endo-1,4-β-xilanasas (EC 3.2.1.8); y pectinasas (EC 3.2.1.15).

8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la suspensión y/o fase acuosa obtenida en la etapa (iii) comprende, calculada respecto al contenido total de hidratos de carbono, al menos el 40% de azúcares fermentables.

9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la fermentación etanólica de la etapa (iv) se realiza por un microorganismo fermentador seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae, Pichia spp., Thermoanaerobacter spp* y *Zymomonas spp*.

10. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho material de biomasa lignocelulósica se selecciona del grupo que está constituido por residuos de jardín, madera triturada, paja, heno, cáscaras de frutos y cáscaras de semillas.

11. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho material de biomasa lignocelulósica se selecciona del grupo que consiste en paja de avena, paja de cebada, paja de trigo, paja de

centeno, cáscaras de avena, cáscaras de cebada, cáscaras de trigo, cáscaras de centeno, cáscaras de arroz, cáscaras de mijo, cáscaras de sorgo, cáscaras de maíz, cáscaras de semilla de colza, cáscaras de semilla de algodón y cáscaras de semilla de girasol.

12. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que en la etapa (ii) la suspensión acuosa se somete a un tratamiento de oxidación húmeda.

13. Un procedimiento según la reivindicación 1 a 11, en el que en la etapa (ii) la suspensión acuosa se somete a un tratamiento de explosión de vapor.

14. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa (ii) se realiza como un procedimiento por lotes en un recipiente de reacción presurizable cerrado que tiene un volumen libre para contener gas que contiene oxígeno o vapor de agua con o sin otros gases.

15. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la etapa (ii) se realiza como un procedimiento por lotes en un recipiente de reacción presurizable cerrado con recirculación de la mezcla de reacción.

16. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la etapa (ii) se realiza como un procedimiento continuo en un reactor esencialmente tubular.

17. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el recipiente de reacción empleado en la etapa (ii) tiene una presión parcial inicial de oxígeno en el intervalo de 0,5-35 bar.

18. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa (ii) se realiza a una temperatura que es superior a 100ºC.

19. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa (ii) se realiza a una temperatura en el intervalo de 120-240ºC.

20. Un procedimiento según la reivindicación 19, en el que la etapa (ii) se realiza como un tratamiento de oxidación húmeda a una temperatura que es inferior a 200ºC.

21. Un procedimiento según la reivindicación 19, en el que la etapa (ii) se realiza a una temperatura en el intervalo de 180-210ºC.

22. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa (ii) se realiza durante un periodo de tiempo en el intervalo de 1 minuto a 1 hora.

23. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos el 60% de la hemicelulosa, celulosa y lignina contenida en la suspensión acuosa de la etapa (i) se recupera después de oxidarse la suspensión acuosa en la etapa (ii).

24. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nivel de sustancias inhibidoras en el efluente de aguas residuales de fermentación de la etapa (vi) se reduce en al menos el 80%.

25. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos el 5% del efluente de aguas residuales tratado en la etapa (vi) se introduce en cualquiera de las etapas precedentes (i) a (v).

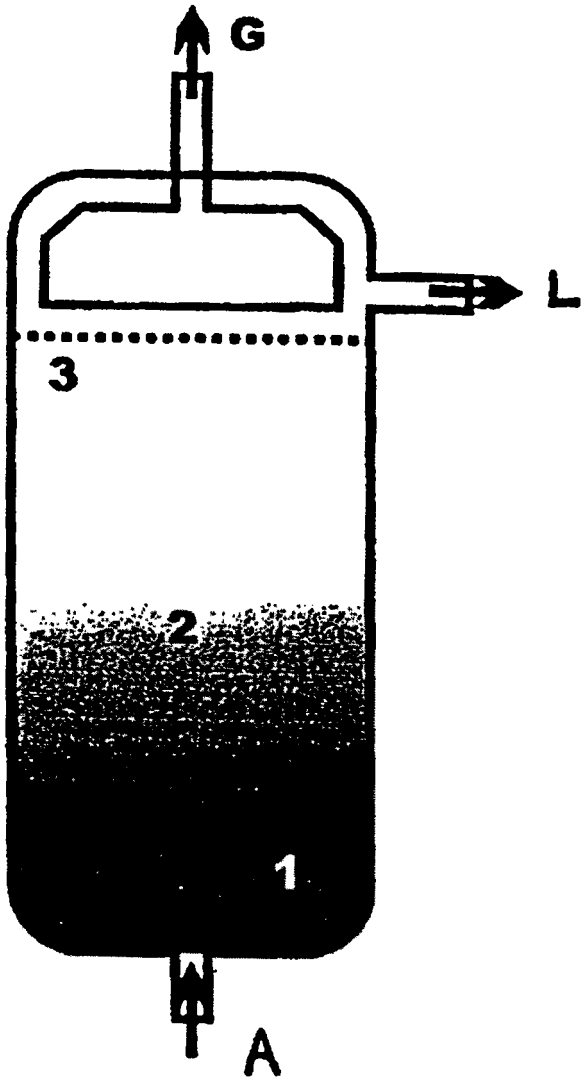

Fig. 1

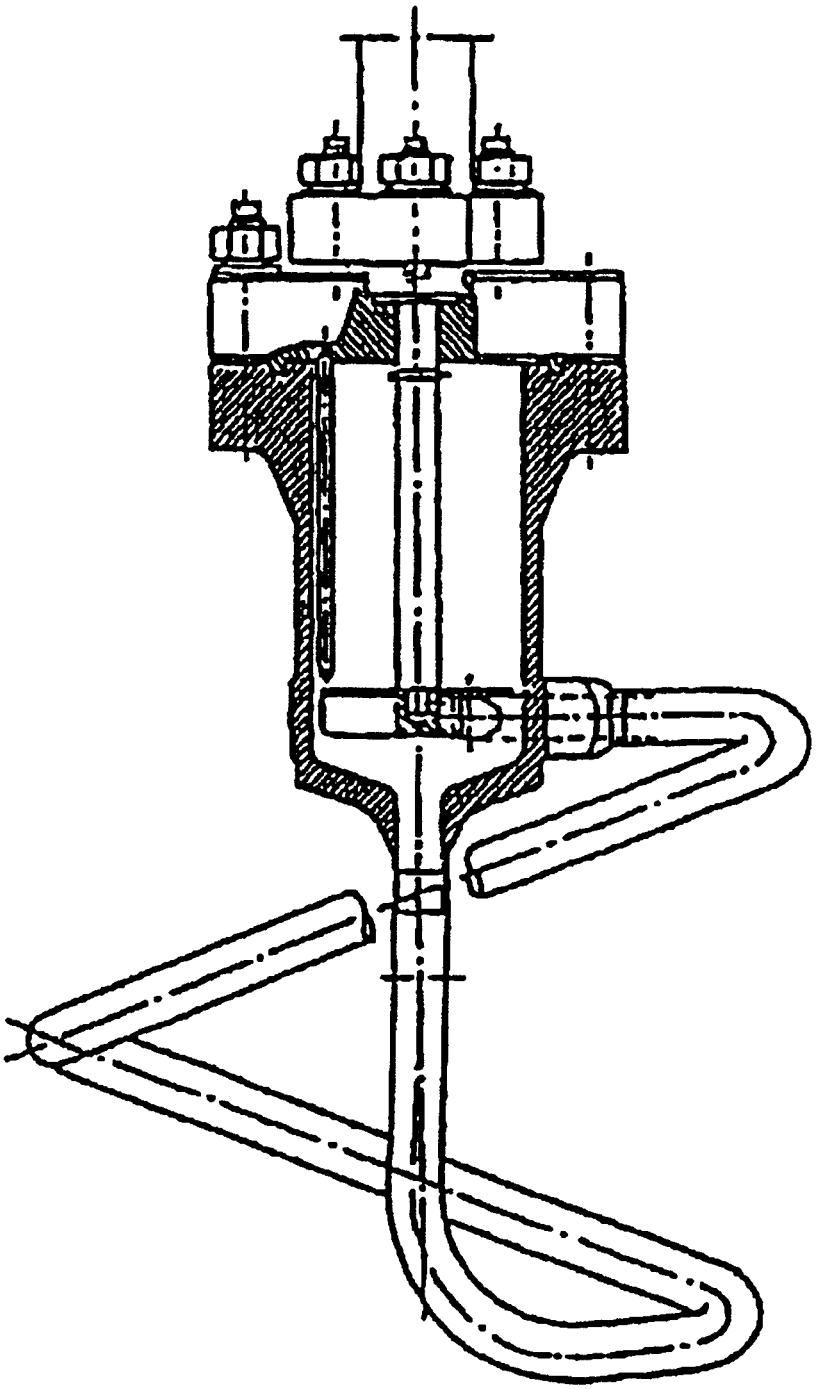

Fig. 2

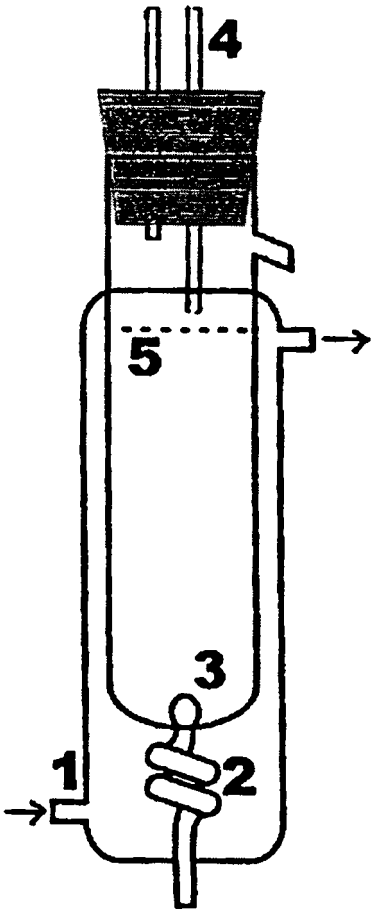

Fig. 3

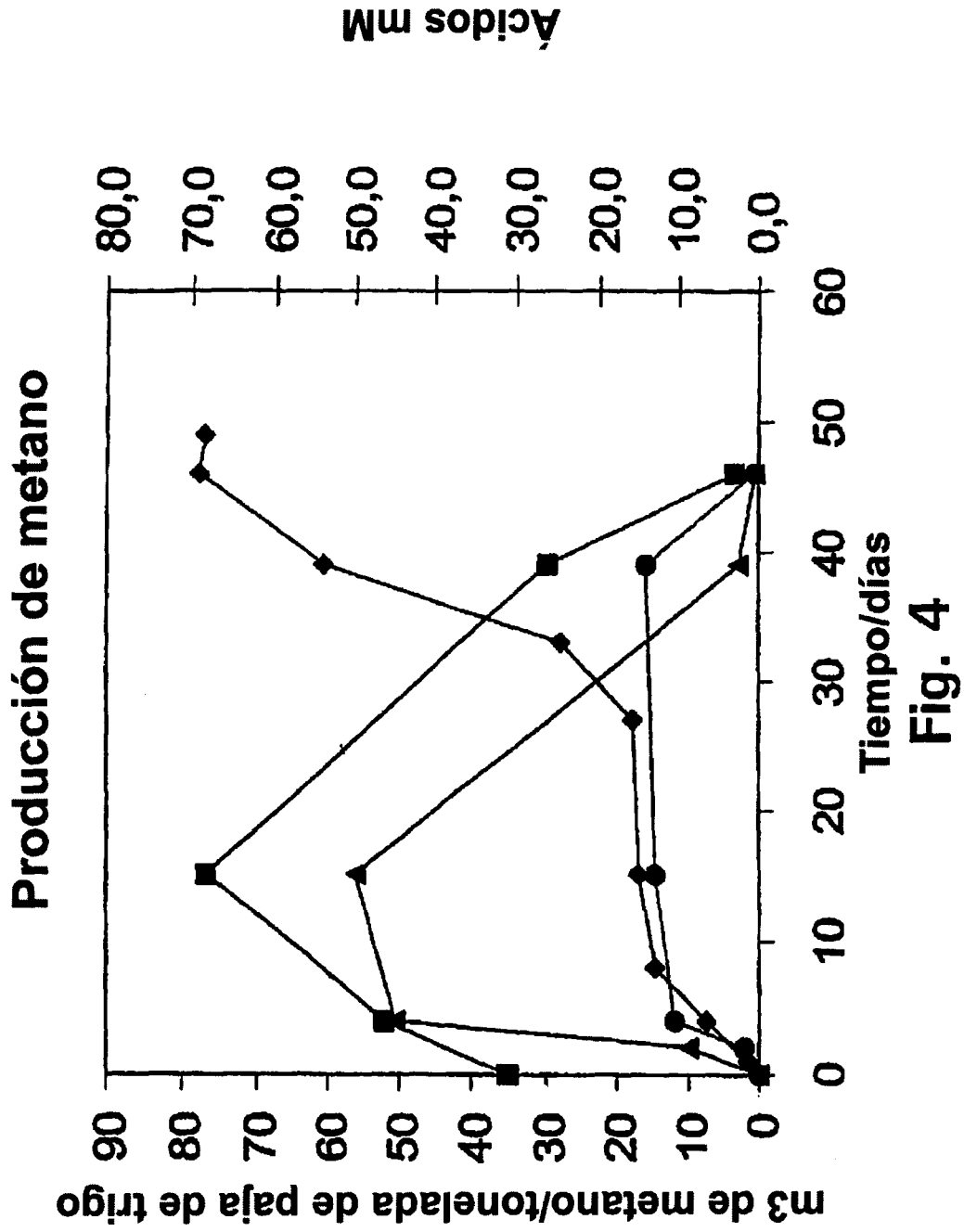
Producción de metano
m3 de metano/tonelada de paja de trigo
Ácidos mM
Tiempo/días
0
10
20
30
40
50
60
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
70,0
80,0

Fig. 4