



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Producción de bioetanol: revisión
bibliográfica de procesos.

Autor: Mario Alejandro Marcos Arroyo

Director: Jaime Soler Herrero

Grado de Biotecnología

Facultad de Ciencias

Curso 2023-2024

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	3
2. ABSTRACT.....	3
3. NECESIDAD DE HACER UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y OBJETIVO.....	3
4. METODOLOGÍA.....	4
5. INTRODUCCIÓN.....	4
6. BIOETANOL.....	5
6.1 CLASES DE BIOCOMBUSTIBLES.....	5
7. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	6
7.1. POLÍMEROS QUE COMPONEN LA LIGNOCELULOSA.....	6
7.2. PRETRATAMIENTOS PREVIOS REALIZADOS SOBRE LA MATERIA LIGNOCELULÓSICA.....	7
8. INHIBIDORES.....	9
9. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	11
9.1. ENZIMAS QUE DEGRADAN SELECTIVAMENTE LA CELULOSA.....	11
9.2. ENZIMAS QUE DEGRADAN SELECTIVAMENTE LA HEMICELULOSA.....	12
9.3. ESTRATEGIAS PARA LLEVAR A CABO LA FERMENTACIÓN.....	13
10. FERMENTACIÓN.....	14
10.1. BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN Y ASPECTOS BÁSICOS DE LA GENÉTICA MOLECULAR DE LAS LEVADURAS EN RELACIÓN A LA FERMENTACIÓN.....	15
10.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS LEVADURAS Y PARÁMETROS QUE PERMITEN UNA ÓPTIMA FERMENTACIÓN.....	15
10.3. BACTERIAS CAPACES DE PRODUCIR ETANOL.....	20
10.4. FERMENTACIÓN DE LAS PENTOSAS.....	21
11. RECUPERACIÓN DEL BIOETANOL PRODUCIDO.....	24
12. CONCLUSIONES.....	26
13. CONCLUSIONES.....	27
ANEXOS.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1. Molécula de bioetanol.....	6
FIGURA 2. Esquema general de la conversión biológica de la biomasa lignocelulósica en biocombustible, en nuestro caso bioetanol.....	28
FIGURA 3. Esquema del mecanismo de acción de diferentes técnicas de molienda.....	28
FIGURA 4. Digestor empleado para la explosión de vapor.....	29
FIGURA 5. Diferentes métodos de detoxificación de los hidrolizados lignocelulósicos generados tras su pretratamiento.....	30
FIGURA 6. Esquema de la actuación de las β -glucosidasas (BGL), celobiohidrolasas (CBH) y β -1,4-endoglucanasas (EGL) sobre la celulosa.....	30
FIGURA 7. Esquema de 3 moléculas hemicelulíticas (xilano, galacto(gluco)manano y xiloglucano), con sus respectivas enzimas hemicelulíticas: β -1,4-xilosidasa (BXL), β -1,4-endomananasa (MAN), β -1,4-manosidasa (MND), β -1,4-endoxilanasas (XLN), β -1,4-endoglucanasas (XEG). El resto son enzimas accesorias.....	31
FIGURA 8. Esquema representativo de las reacciones que permiten la conversión de glucosa en etanol en levaduras.....	31
FIGURA 9. Esquema de los efectos tóxicos del etanol sobre las levaduras.....	32
FIGURA 10. Efecto del pH sobre la fermentación llevada a cabo por la bacteria <i>Z. mobilis</i> . Variación de la concentración de etanol producida y la eficiencia de la fermentación en función del pH.....	34
FIGURA 11. Esquema de la ruta de biosíntesis de etanol en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
FIGURA 12. Efecto del tamaño del inóculo de levaduras en la conversión de azúcares a bioetanol durante el proceso de fermentación.....	35
FIGURA 13. Esquema de las dos vías por las que puede ser metabolizada la xilosa para acabar generando etanol. A la izquierda la vía de dos pasos y a la derecha la de un solo paso.....	36
FIGURA 14. Diagrama del proceso de fermentación acoplado a un sistema de separación por pervaporación.....	37
FIGURA 15. Esquema del proceso integrado de extracción in situ-desgasificación.....	38
FIGURA 16. Esquema del proceso de fermentación junto con el sistema de	

extracción al vacío para la recuperación de etanol.....	39
FIGURA 17. Evaluación de los costes de recuperación del bioetanol haciendo uso de diferentes técnicas.....	22
TABLA 1. Degradación bacteriana de lignina a partir de diferentes materias primas.....	30
TABLA 2. Diferentes cepas de levaduras empleadas para la producción de bioetanol en función de la materia prima de partida y las condiciones de fermentación. También se muestran concentraciones de azúcares fermentables y concentración y productividad del etanol producido en cada caso.....	33
TABLA 3. Principales componentes del estilaje resultante de la destilación del etanol formado a partir de la fermentación de jugo de caña de azúcar.....	35
TABLA 4. Productividades de etanol a partir de diferentes procesos de fermentación con cultivos de las levaduras <i>S. stipitis</i> y <i>S.cerevisiae</i>	36

1. RESUMEN:

Debido al crecimiento demográfico y desarrollo humano a escala mundial, resulta imprescindible la búsqueda de nuevos combustibles respetuosos con el medio ambiente y económicos como alternativas de las opciones energéticas más ampliamente utilizadas hasta la fecha. Por eso esta revisión bibliográfica se centra en uno de ellos, como es el bioetanol, abarcando todo su proceso de producción, factores de los que depende y diferentes técnicas o metodologías empleadas hoy en día según la etapa de dicho proceso de la que se trate.

El estudio se focaliza en los procesos de producción a partir de biomasa lignocelulósica por su abundancia y sostenibilidad, la cual será sustrato de diferentes procesos de pretratamiento clasificados según los principios físicos, químicos, físico-químicos o biológicos que los rijan, para facilitar la hidrólisis enzimática posterior que termine de liberar los azúcares que finalmente serán fermentados, por diferentes microorganismos, para generar el bioetanol deseado.

Se dedica especial atención a la etapa de fermentación, mencionándose distintas estrategias para llevarla a cabo, factores operacionales y características intrínsecas de los microorganismos que condicionan la optimización de dicha etapa o situaciones que deben mejorarse para aumentar los rendimientos de producción de bioetanol, como la presencia de inhibidores o de azúcares difícilmente fermentables como las pentosas.

Por último, se mencionan algunas de las técnicas estudiadas e incluso alguna de ellas más comúnmente utilizadas en relación a la recuperación final del bioetanol producido.

2. ABSTRACT

Given the population increase and urbanization, it is essential to search for new environmentally friendly and economical fuels as alternatives to the most widely used energy options to date. Therefore, this literature review focuses on one of them, namely bioethanol, covering its entire production process, the factors it depends on, and the different techniques or methodologies employed today depending on the stage of the process being considered.

Its production is primarily highlighted from lignocellulosic biomass due to its abundance and sustainability. This biomass serves as a substrate for different pretreatment processes classified according to the physical, chemical, physico-chemical, or biological principles that govern them, to facilitate subsequent enzymatic hydrolysis that ultimately releases the sugars which will finally be fermented by various microorganisms to generate the desired bioethanol.

Special attention is given to the fermentation stage, mentioning different strategies to carry it out, operational factors, and intrinsic characteristics of the microorganisms that condition the optimization of this stage or situations that need to be improved to increase bioethanol production yields, such as the presence of inhibitors or sugars that are difficult to ferment like pentoses.

Finally, some of the techniques studied are mentioned, including some of the more commonly used ones in relation to the final recovery of the produced bioethanol.

3. NECESIDAD DE HACER UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y OBJETIVO:

Si realizamos una primera búsqueda en la plataforma ScienceDirect (de la que se ha extraído gran parte de la información adjunta en esta revisión bibliográfica) con la palabra clave "biofuel" encontramos un total de 112.416 resultados distribuidos entre 1966 (primer año del

que se puede encontrar información según esta plataforma) y 2024 (7.239 resultados en total en lo que llevamos de año). Vemos, por lo tanto, como el aparente interés por la población en la búsqueda de nuevas formas de combustibles renovables, sostenibles y más económicos ha ido creciendo con el paso de los años, siendo el año 2022 en el que mayor número de resultados se pueden encontrar con un total de 11.370.

Filtrando las búsquedas con otras palabras clave también encontramos una gran cantidad de resultados, con una misma tendencia que en el caso anterior: "*lignocellulose*" con 27.586; "*bioethanol*" con 26.856; "*pretreatment*" con 318.414 o "*enzymatic hydrolysis*" con 145.371. A tenor de estas búsquedas, vemos que la producción de nuevos biocombustibles toma como dirección prioritaria la del bioetanol, al representar éste un buen porcentaje del total de resultados que abarca la palabra "*biofuel*" e igualmente encontrar una amplia información relacionada con su proceso de producción de acuerdo a los elevados resultados presentes con otras palabras relacionadas con él mismo, como más adelante se verá que son "lignocelulosa, pretratamiento o hidrólisis enzimática", entre otras.

Al ser, la producción de biocombustibles mediante el uso de enzimas y microorganismos, un ámbito novedoso, en pleno auge y desarrollo, y que todavía necesita mucho estudio, se plantea la necesidad de realizar este TFG en el que se pretende abarcar todo el proceso de producción de bioetanol, desde la materia prima de la que se parte hasta su recuperación final del tanque de fermentación; para ello se lleva a cabo una minuciosa y detallada búsqueda de la información que permita también entender las diferentes técnicas o metodologías empleadas hoy en día, según la etapa del proceso en la que nos encontremos.

4. METODOLOGÍA:

Con el objetivo de seleccionar correctamente la información a mencionar a lo largo de la revisión, se realizaron búsquedas usando palabras clave (tanto en castellano como, principalmente, en inglés) relacionadas con la producción de bioetanol y haciendo uso de diferentes plataformas como *Alcorze*, *ScienceDirect* o *Google Scholar*. A partir de ahí, y siguiendo una estructura cronológica de acuerdo a la obtención de bioetanol, se fue eligiendo la información de diferentes artículos o incluso libros, y se fue añadiendo de manera clara, precisa y ordenada para garantizar su correcta comprensión.

5. INTRODUCCIÓN:

Uno de los problemas que acecha a nuestra sociedad es el incremento poblacional que deriva en un aumento del desarrollo, lo que puede suponer un descenso en la disponibilidad de fuentes de energía, como es el caso de las de origen fósil, incrementando sus costos (1). Esto, sumado al elevado calentamiento global derivado de la combustión de esas fuentes fósiles, está impulsando la búsqueda de alternativas energéticas (2).

Es aquí donde ganan importancia nuevas formas de energía renovables, respetuosas con el medio ambiente y más económicas, como son el biodiesel, biometanol, biogás, o el motivo de este trabajo, el bioetanol, todos ellos considerados biocombustibles. Son fundamentalmente utilizados como combustibles alternativos que sustituyen o se combinan con los habituales y que, de igual manera, permiten el funcionamiento de los vehículos. Por ejemplo, el biodiesel se puede mezclar con el diésel normal o usar en estado puro, mientras que el bioetanol, posible sustituto final de la gasolina, se mezcla en diferentes proporciones con ésta dando lugar, por ejemplo, a la E10 (gasolina con un 10% máximo de etanol) (3)

La producción de estos, y más en concreto del bioetanol, ha aumentado mucho en los últimos años, siendo algunos de los mayores productores países como los Estados Unidos o Brasil (4).

6. BIOETANOL:

Centrando la atención en el bioetanol (con fórmula C_2H_5OH), es un combustible líquido incoloro que, en comparación con la gasolina, presenta unos límites de inflamación más altos, mayor calor de vaporización y es biodegradable. Presenta también ventajas como que tiene un bajo punto de ebullición, altera menos el medio ambiente al reducir las emisiones atmosféricas contaminantes, emite menos gases de efecto invernadero y presenta una gran eficiencia energética (5).

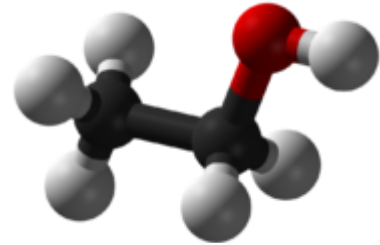


Figura 1: Molécula de bioetanol

Es un compuesto químico obtenido mediante fermentación que realizan un determinado tipo de microorganismos en sustratos de diferentes fuentes de biomasa, entre las que encontramos fundamentalmente material vegetal como maíz, trigo o caña de azúcar, por lo que algunas de sus posibles desventajas, derivadas de esto, son la necesidad de disponer de altas cantidades de enzimas para producirlo a gran escala o de recuperarlo lo más puro posible tras su formación (6). Además, otros aspectos negativos son que presenta una baja densidad de energía volumétrica, por lo que necesitaríamos más volumen/km para conseguir el mismo servicio que con la gasolina y es corrosivo, por lo que podría degradar materiales de los motores. Todo esto deriva en que su producción es bastante cara y por eso la biomasa vegetal gana importancia en el proceso al ser considerada una buena fuente de materia prima por sus bajos costes de adquisición y abundancia.

Así pues y a grandes rasgos, su proceso de producción se puede dividir fundamentalmente en 3 bloques (6), esquematizados en la figura 2 de los anexos:

- Primero se produce la hidrólisis de la biomasa, obteniéndose así los azúcares simples más fácilmente fermentables.
- Fermentación microbiana de los azúcares para obtener etanol.
- Recuperación del etanol producido mediante diversas técnicas como, por ejemplo, la destilación.

6.1 CLASES DE BIOCOMBUSTIBLES:

Encontramos, además, según el tipo de biomasa y procedimiento para obtenerlos, diferentes tipos de biocombustibles, perteneciendo el bioetanol a la segunda de las 4 siguientes categorías (7):

- **Primera generación:** obtenido a partir de biomasa comestible como el maíz, con la ventaja de su sencillo procesamiento y la desventaja fundamental de su competencia con su uso como alimentos.
- **Segunda generación:** obtenido a partir de biomasa lignocelulósica no comestible como residuos forestales. Tienen como ventaja que no compiten con productos alimentarios.
- **Tercera generación:** obtenido a partir de “cultivos energéticos” como son los de algunas algas. Tienen como ventaja menores costes de pretratamiento de la biomasa al no contener lignina y como inconveniente, que están todavía en fase de desarrollo ya que no podrían abastecer a la población mundial por el momento.

- **Cuarta generación:** la totalidad del proceso depende de microorganismos y cultivos modificados genéticamente, por lo que solo se encuentran en fase teórica.

7. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA:

Los productos vegetales mencionados, entre otros, presentan diferentes compuestos azucarados (algunos de ellos no libres, como el almidón o la celulosa) los cuales interesarán que sean fermentables para acabar obteniendo el producto de interés. Aun así, el componente más utilizado en la producción de bioetanol es la lignocelulosa, presente en las paredes celulares de las células vegetales. Presenta una serie de ventajas como que es muy abundante en la naturaleza, barato, sostenible, renovable, no compite con cultivos agrícolas, se encuentra distribuido por todo el planeta y no requiere de una estrategia para su cultivo demasiado sofisticada. Sin embargo, como a continuación veremos, presenta la desventaja de que es muy recalcitrante a la digestión enzimática.

Se basa en el entrecruzamiento de 3 polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina (8). Estos últimos, al presentar estructuras diferentes que a continuación mencionaré, son degradados por distintos tipos de enzimas presentes en los microorganismos, como son las celulasas, hemicelulasas, peroxidadasas y lacasas (9). A pesar de todo, el acceso de las enzimas a sus respectivos sustratos no siempre está todo lo facilitado que nos gustaría, por lo que el material lignocelulósico suele sufrir un proceso de pretratamiento previo que deje más accesible los azúcares de cara a su futura fermentación (10).

7.1 POLÍMEROS QUE COMPONEN LA LIGNOCELULOSA:

Como he mencionado anteriormente, la lignocelulosa está compuesta por 3 diferentes polímeros entrecruzados que hacen que esta biomasa de partida tenga una cierta estabilidad y rigidez. Estos son:

- **Celulosa:** homopolímero lineal formado por glucosas unidas mediante enlaces glucosídicos β -1,4. Debido a este tipo de unión, presenta una estructura muy cristalina y resistente al ataque biológico, vía enzimas, por ejemplo (11).
- **Hemicelulosa:** polímero basado en una cadena corta, lineal y con ramas de diferentes azúcares como D-glucosa, D-manosa o D-xilosa, entre otros. Esta es la principal diferencia que presenta con la celulosa, que solo está formada por unidades de glucosa (12).
- **Lignina:** heteropolímero polifenólico formado a partir de la deshidrogenación de sus 3 principales componentes estructurales, los alcoholes p-cumarílico, p-coniferílico y p-sinapílico (13).

Debido a que los azúcares más abundantes de la materia lignocelulósica son la glucosa y la xilosa (este último es una pentosa difícilmente fermentable, suponiendo un reto biotecnológico en cuanto al mayor aprovechamiento de la materia prima en la producción de bioetanol), se ha visto que es necesario un pretratamiento que elimine, al menos parcialmente, la hemicelulosa y a poder ser toda la lignina, y deje más expuesta la celulosa, facilitando su digestibilidad y el acceso enzimático a los monosacáridos que la forman, fundamentalmente el alto contenido de glucosas que presenta (14).

7.2 PRETRATAMIENTOS PREVIOS REALIZADOS SOBRE LA MATERIA LIGNOCELULÓSICA:

El objetivo fundamental del pretratamiento que se realiza sobre la materia lignocelulósica es aumentar la superficie de acceso al polímero de celulosa, principalmente, para poder facilitar

la hidrólisis posterior de los carbohidratos que la forman, liberando así monosacáridos más sencillos fácilmente fermentables. En otras palabras, se intenta lograr que haya más regiones amorfas, las cuales son más débiles a esa hidrólisis (15). Sin embargo, esta etapa sigue siendo demasiado cara en el proceso de producción de etanol, por lo que se siguen buscando nuevas alternativas.

Hay diferentes métodos que se pueden clasificar en físicos, fisicoquímicos, químicos o biológicos. A continuación, se van a mostrar brevemente algunos de los principales:

Métodos físicos: tratan de reducir el tamaño de partícula y algunos de ellos son:

- **Molienda:** consiste en someter el material lignocelulósico a un cierto estrés mecánico, afectando a las membranas celulares y disminuyendo la cristalinidad y polimerización de las fibras de celulosa, dejándola más expuesta (16). En la figura 3 de los anexos se presentan diferentes sistemas de molienda.
- **Extrusión:** es un proceso continuo que mezcla efectos mecánicos y térmicos en una sola máquina, como es la extrusora. Ésta se basa en una serie de tornillos que giran dentro de un barril hermético a una temperatura regulable y, entre los cuales, pasa la biomasa sufriendo altas fuerzas de cizallamiento (17). Se ha visto que, combinándola con diferentes reactivos, se consigue alterar también la composición química de la biomasa lignocelulósica, solubilizando la lignina o hemicelulosa (18, 19), además de que como elimina el aire y el agua, permite la penetración de los disolventes en las fibras de biomasa (20, 21).

Ultrasonidos: técnica física basada en el efecto de cavitación causado durante la radiación con energía ultrasónica, una onda con frecuencias superiores a los 16 kHz. Se tiene que hacer en medio líquido para que las ondas, al propagarse, generen burbujas que colapsaran entre sí y generaran efectos sobre la biomasa (22, 23). Fundamentalmente permite la eliminación de la lignina por ser el componente externo de la biomasa lignocelulósica y estar en contacto continuo con esas burbujas (24, 25). Además, el reactor puede funcionar a presión atmosférica y temperaturas no muy altas.

Métodos fisicoquímicos: Reducen el tamaño de partícula, pero modifican su estructura mediante los métodos químicos. Dos de los más importantes son:

- **Explosión de vapor o autohidrólisis:** se trata durante poco tiempo la biomasa lignocelulósica con agua calentada (160-260 °C) que forma protones, los cuales al ser liberados como ácido acético (tras atacar los grupos acetilo de las hemicelulosas), degradan casi completamente el material hemicelulósico, parcialmente la lignina y enriquecen el producto final en celulosa. No obstante, se forman productos no deseados como el furfural o hidroximetilfurfural y productos fenólicos derivados de la lignina (26). En la figura 4 de los anexos se puede ver el digestor empelado en esta técnica.
- **Explosión de fibra con amoníaco (AFEX, *Ammonia Fiber Expansion*):** se trata la biomasa con amoníaco en una relación 1:1 y aplicando diferentes temperaturas (60-120°C), de lo que depende la duración del proceso (27). Permite aumentar parcialmente la solubilidad de la hemicelulosa y romper los enlaces lignina-carbohidrato, disminuyendo así la cristalinidad de la celulosa. El problema que se tiene con esta técnica, es que la biomasa de partida debe tener menos de un 15% de lignina para obtener rendimientos a etanol del 90% (26). Además, interesa recuperar parte del amoníaco utilizado, lo que se puede conseguir mediante evaporización.

Métodos químicos: modifican estructuralmente la biomasa lignocelulósica haciendo uso de reactivos, tanto ácidos como básicos. Algunos de los más importantes son:

- **Pretratamiento ácido:** este método se suele usar mucho por la capacidad de hidrolizar la fracción hemicelulósica, permitiendo mejores conversiones de celulosa (28, 29). Se usan ácidos diluidos (1-5%) a temperaturas de 120-160°C o ácidos concentrados (21-60%) a temperaturas de 170-190 °C (30).
Lo más habitual es utilizar ácido sulfúrico (H_2SO_4) por permitir mayores rendimientos en la hidrólisis enzimática posterior y por lo tanto acabar siendo más barato que utilizar otros reactivos (31), aunque también se han realizado tratamientos con ácido nítrico (HNO_3) o clorhídrico (HCl) (32).
Este tratamiento se realiza mezclando, mediante pulverización, el ácido con la biomasa o agitando toda la mezcla en un reactor. Este último se calienta por sus paredes o a través de inyección directa de vapor (33).
No obstante, presenta algunas desventajas como el gran carácter corrosivo de los ácidos (33) o la generación de productos indeseados como el ácido acético que podrían inhibir la futura fermentación de los azúcares (34).
- **Pretratamiento alcalino:** uso de bases diluidas, fundamentalmente hidróxido de sodio (NaOH) por su gran alcalinidad, pero también hidróxido de potasio (KOH) o de calcio (CaOH), para favorecer la eliminación de la lignina mediante la ruptura de los enlaces éster y cadenas laterales glucosídicas de la biomasa, reduciendo así la cristalinidad de la celulosa (35).
El tratamiento se realiza mezclando la base con agua, añadiendo la mezcla a la biomasa y dejando actuar durante un periodo de varias horas o incluso días, pero a presión y temperatura ambiente (36, 37). No obstante, también se pueden mezclar las bases con otros agentes oxidantes como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) que faciliten el ataque al anillo aromático de la lignina, degradándola todavía más (35).
Sin embargo, presenta algunas desventajas como la formación de sales que necesitarían un tratamiento adicional para ser eliminadas (29, 33) o la dificultad de eliminar el NaOH tras el tratamiento y el peligro que supondría para el medio ambiente si los restos se vierten a él. (38)
- **Ozonólisis:** método de ruptura mediante la aplicación de ozono (O_3) sobre la biomasa lignocelulósica a presión y temperatura ambiente. Permite fundamentalmente la degradación de la lignina (39) y tiene ventajas como que los productos derivados del proceso no son tóxicos para la biomasa o que el ozono, una vez acabado el tratamiento, puede ser eliminado mediante un aumento de la temperatura. Aun así, es una técnica no muy rentable ya que se suelen necesitar grandes cantidades de ozono (unos 200 mg del gas por kilo de biomasa lignocelulósica) (40).

Métodos biológicos: se basan fundamentalmente en permitir el crecimiento de microorganismos como hongos (ej: *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata* o *Ceriporiopsis subvermispota*) (36) y bacterias (por ejemplo, de los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*) (41) sobre la biomasa lignocelulósica o directamente la actuación de enzimas (formato preparados enzimáticos) específicas para permitir la descomposición de esa biomasa, dejando más expuestos los azúcares fermentables.

Son una alternativa asequible económicamente hablando y más respetuosa con el medio ambiente que los anteriores tipos de tratamientos, pero dependen de factores como por ejemplo el mantenimiento de un pH y temperatura óptimos, bien sea para el crecimiento de

microorganismos como para el desempeño de la función del preparado enzimático. Algunos de estos últimos son:

- *Pulpzyme HC 2500*: preparado enzimático con actividad xilanasa producido por una cepa de *Bacillus licheniformis* modificada genéticamente. Se aplica en unas condiciones de unos 60°C y a un pH de 6.0.
En numerosos estudios se ha visto que es eficaz reduciendo el contenido de xilano y, por lo tanto, al ser este un componente abundante de la hemicelulosa, ésta también se ve degradada; todo ello manteniendo las cadenas de celulosa (42).
- *Viscozyme® L*: preparado enzimático con actividad β -glucanasa, celulasa, xilanasa y hemicelulasa, que facilita eficazmente la accesibilidad a los azúcares que forman parte de la biomasa lignocelulósica. Se aplica en unas condiciones de 25-55°C y a un pH de 3.3-5.5 (43).

En cuanto a los microorganismos es importante mencionar:

- **Hongos**: fundamentalmente filamentosos y ubicuos. Productores de peroxidasas (44) y lacasas o de radicales hidroxilo (45) que degradan la lignina. También pueden degradarla mediante un mecanismo oxidativo haciendo uso de enzimas como lacasas.
- **Bacterias**: muchas especies se ha visto que participan en la modificación y degradación de lignina mediante, de nuevo, enzimas oxidativas como las mencionadas en el caso de los hongos (46).

A pesar de que las eficiencias en el proceso de descomposición de la lignina no son todo lo satisfactorias que nos gustaría, las bacterias van un paso por delante de los hongos por sus mayores tasas de crecimiento.

En la tabla 1 del apartado de anexos se puede la actuación deslignificadora de las bacterias sobre diferentes materias primas.

8. INHIBIDORES

Uno de los mayores obstáculos en la producción de bioetanol es la generación de productos inhibidores, bien de la hidrólisis enzimática necesaria para generar los azúcares fermentables o de la fermentación llevada a cabo por las levaduras, derivados del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica. Se forman sobre todo cuando los tratamientos incluyen largas duraciones, altas temperaturas, uso de reactivos químicos y los podemos clasificar principalmente en:

- Ácidos orgánicos de cadena corta y aldehídos: se pueden originar a partir de cualquier zona de la biomasa lignocelulósica, como por ejemplo el ácido acético procedente de la hemicelulosa. Otros ejemplos son el ácido láctico, ácido fórmico, acetaldehído o formaldehído (47).
- Aldehídos derivados de azúcares: algunos como por ejemplo el furfural o hidroximetilfurfural (HMF) se forman cuando se degradan pentosas o hexosas (47).
- Compuestos aromáticos: se forman principalmente cuando se degrada la lignina y algunos ejemplos son el ácido benzoico, ácido ferúlico o alcohol bencílico (47).

Se ha visto que el efecto inhibitorio de estas moléculas depende de su concentración, polaridad química y reactividad, así como que se ve pronunciado por la presencia simultánea de varias de ellas en los hidrolizados lignocelulósicos.

Algunos de los mecanismos de inhibición que se llevan a cabo son, por ejemplo, la desactivación de enzimas o la alteración de la estructura de las levaduras, pudiendo afectar a su viabilidad. Para contrarrestar estos efectos, se están aplicando técnicas que podemos clasificar en:

- **Eliminación directa de inhibidores de los hidrolizados lignocelulósicos resultantes tras el pretratamiento:**

Adsorción en fase sólida: depende de varios factores como la superficie del adsorbente, el tamaño de poro, la temperatura y pH del entorno y el tiempo de contacto entre el adsorbente y el inhibidor. Presenta la ventaja de que no se modifica químicamente el inhibidor, por lo que al desorberse del adsorbente, podrá ser utilizado. Se está usando por ejemplo ceniza de bagazo de caña de azúcar para adsorber compuestos aromáticos (47).

Extracción líquido-líquido: como agentes de extracción se están usando surfactantes, que facilitan la eliminación de compuestos aromáticos. Presentan la ventaja de no ser tóxicos para los microorganismos y la desventaja de que no sirven para la eliminación de muchos aldehídos y ácidos (47).

Nanofiltración: el principio físico de esta técnica es que los inhibidores grandes queden retenidos en una membrana mientras los pequeños puedan pasarla. No solamente depende del tamaño de las partículas sino también de su polaridad superficial (47).

- **Degradación química o conversión de los inhibidores a moléculas menos tóxicas:** se puede hacer vía química, añadiendo ozono, por ejemplo, que reduzca los niveles de furfural e HMF (a pesar de que incrementaría la concentración de ácido fórmico) o subiendo el pH en torno a 10 para permitir la degradación casi completa del furfural e HMF (sin embargo, a pHs elevados, muchos azúcares podrían perderse).

También, mediante el uso de enzimas procedentes de microorganismos se pueden convertir los inhibidores en formas menos tóxicas, por ejemplo, aldehídos como el furfural en sus formas alcohólicas (alcohol furfurílico), o el ácido acético a acetaldehído y finalmente etanol mediante la inserción de los genes de la acetaldehído acetilante deshidrogenasa (AADH) de diferentes microorganismos en *Saccharomyces cerevisiae* (47).

- **Uso de microorganismos fermentadores modificados genéticamente que sean más resistentes al efecto tóxico de los inhibidores:** por ejemplo, se consiguió sobreexpresar el gen IrrE de *Deinococcus radiodurans* en *Saccharomyces cerevisiae*, haciendo que la levadura tuviera más resistencia al HMF, furfural, ácido acético y ácido fórmico (47).

- **Optimización de los procesos de pretratamiento para reducir la formación de inhibidores.**

En la figura 5 de los anexos se muestra un esquema que engloba todos los métodos de detoxificación de los hidrolizados lignocelulósicos generados tras su pretratamiento.

Aun así, no solo se debe ver a los inhibidores como productos negativos ya que pueden llegar a ser útiles o valiosos para otras industrias, teniendo siempre en cuenta que su extracción podría encarecer el proceso y, por lo tanto, siendo necesario un estudio de la rentabilidad de la operación.

9. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Tras haber realizado un pretratamiento sobre la materia lignocelulósica y haber eliminado la mayor parte, sino toda, de la lignina que contenía inicialmente, disponemos de un mayor acceso a las cadenas de celulosa y a alguna de hemicelulosa restante. Estas van a ser

hidrolizadas vía enzimática para terminar de liberar los monómeros carbohidratos que las forman y poder, así, dar paso a la etapa de fermentación.

Es un proceso en el que se sigue investigando en búsqueda de enzimas más específicas o que liberen mejor esos azúcares, entre otras cosas porque presenta ventajas como la pequeña producción de productos inhibidores de la fermentación. Sin embargo, existen numerosas enzimas ya que hidrolizan selectivamente la celulosa o hemicelulosa.

Independientemente del polímero que degraden y del corte que produzcan, para que las enzimas puedan llevar a cabo su acción, es importante que se puedan unir correctamente a sus sustratos, por lo que cada una tiene diferentes módulos de unión a carbohidratos (48).

9.1 ENZIMAS QUE DEGRADAN SELECTIVAMENTE LA CELULOSA

Todas estas enzimas, a pesar de que tengan distintos nombres, van a acabar siendo celulasas y se ha visto que ejercen su acción de forma óptima en unas condiciones de temperatura de 40-50°C y un pH de 4-5.

Para que se produzca la hidrolisis completa de la celulosa se necesitan 3 grupos de enzimas: (49):

- Las **β -1,4-endoglucanasas (EGL)** actúan aleatoriamente rompiendo enlaces glucosídicos internos de las cadenas de celulosa (principalmente de las regiones amorfas) y liberan oligosacáridos de diferente número de monosacáridos constituyentes dependiendo del corte realizado.
- Las **celobiohidrolasas/exoglucanasas (CBH)** eliminan moléculas de celobiosa (disacárido formado por dos glucosas unidas por los grupos –OH del carbono 1 en posición β de una glucosa y del 4 de la otra), atacando principalmente la porción cristalina de la celulosa y por los extremos de las cadenas.
- Las **β -glucosidasas (BGL)** hidrolizan los oligosacáridos resultantes de la participación de los dos grupos anteriores de enzimas a sus respectivos monómeros de glucosa. Principalmente hidrolizan residuos de celobiosa ya que pueden ser productos inhibitorios de las β -1,4-endoglucanasas y sobre todo de las celobiohidrolasas (49, 50).

En la figura 6 del apartado de anexos se puede ver un esquema de la actuación de los 3 tipos de enzimas.

Ante el posible problema de no poder hidrolizar algunos oligosacáridos como la celobiosa o que las enzimas no se expresen en los microorganismos productores todo lo suficiente para obtener buenos rendimientos, se están planteando alternativas como la expresión de los genes de dichas enzimas en microorganismos fermentadores (como *S. cerevisiae*), para que, por ejemplo, esos oligosacáridos no hidrolizables sean directamente fermentados y permitan producir bioetanol (48).

Otra estrategia puede ser la mezcla de enzimas procedentes de diferentes microorganismos. Por ejemplo, hongos filamentosos del género *Trichoderma* son buenos productores tanto de celulasas como hemicelulasas; sin embargo, presentan bajos niveles de β -glucosidasas. Debido a esto, se planteó la adición de esta enzima pero del género *Aspergillus* al ser un buen candidato a su producción, y se obtuvieron resultados favorables en cuanto a la liberación de monosacáridos (50).

9.2 ENZIMAS QUE DEGRADAN SELECTIVAMENTE LA HEMICELULOSA

De forma respectiva, el grupo de enzimas que se encarga de esta hidrólisis se denomina hemicelulasas. Es un grupo más heterogéneo que el de las celulasas debido a que la hemicelulosa no está formada únicamente por monómeros de glucosa, sino que está compuesta por diferentes azúcares y ramificaciones.

Algunas de las hemicelulasas dedicadas a hidrolizar los principales componentes estructurales del polímero son: β -1,4-endoxilanasas y β -1,4-xilosidasas para el xilano, β -1,4-endoglucanasa y β -1,4-glucosidasas (xiloglucanasas) para el xiloglucano, y β -1,4-endomananasa y β -1,4-manosidasas (endomananasas) para la manosa (51). También se hace uso de β -xilosidasas para terminar de hidrolizar oligosacáridos liberados tras la actuación de algunas de las anteriores enzimas. En la figura 7 del apartado de anexos se ven representadas estas enzimas en un esquema.

- Dentro de las **β -1,4-endoxilanasas** fúngicas, éstas pertenecen a las familias GH (glucósido hidrolasas) 10 y 11 (52) y, aunque tienen una especificidad de sustrato diferente, el rango de las de la familia 10 es más amplio por lo que permiten una mayor degradación de los xilanos. Aun así, y a pesar de que no requieren un gran uso de enzimas accesorias que mejoren los rendimientos, no se conoce del todo la correlación entre la genética que gobierna la producción de estas enzimas y la necesidad por tanto de añadir otras accesorias (48).
- Por su parte, las **β -xilosidasas** se encargan de hidrolizar esos oligosacáridos mencionados anteriormente desde sus extremos no reductores liberando definitivamente monómeros de xilosa (48).
- Por su parte, las **xiloglucanasas** pertenecen a las familias GH 12 y 74 (53), presentando mecanismos de acción diferentes. Por ejemplo, se ha visto que una xiloglucanasa de la familia 12 procedente de *A. niger* no corta sobre residuos de glucosa ramificados (a diferencia de la perteneciente a la familia 74 procedente de *Trichoderma reesei*) y que prefiere glucosas no ramificadas o xilogluco-oligosacáridos que tengan al menos 6 glucosas (48).
- En cuanto a las **endomananasas**, las de origen fúngico pertenecen fundamentalmente a la familia GH 5 y tienen alta especificidad por mano-oligosacáridos con más de 3 residuos de manosa (54, 55). Las posibles moléculas de manotriosa y manobiosa liberadas serán todavía más degradadas posteriormente por β -1,4-manosidasas.

Algunas de esas enzimas accesorias mencionadas anteriormente, que se añaden con el objetivo de mejorar los rendimientos en el proceso de sacarificación (50) son: α -L-arabinofuranoxidasas que liberan L-arabinosas, un residuo monosacárido muy común en la hemicelulosa; α -glucoronidasas que liberan ácido D-glucorónico procedente de polímeros de xilano; α -galactosidasas que liberan residuos de D-galactosa unidos mediante enlaces tipo α ; acetil xilano esterasas que liberan residuos de acetilo procedentes de polímeros de xilano, siendo muy útiles para permitir la correcta degradación de las cadenas de xilano en combinación con las endoxilanasas; y ácido ferúlico esterasas que permiten eliminar el ácido ferúlico presente en cadenas de xilano (48).

9.3 ESTRATEGIAS PARA LLEVAR A CABO LA FERMENTACIÓN

Antes de dar paso a la, probablemente, etapa principal en la síntesis de bioetanol como es la fermentación, es importante mencionar algunas estrategias que se pueden llevar a cabo

relacionadas con la hidrólisis enzimática mencionada y que se basan en la simultaneidad o separación de ambos procesos fundamentalmente. Cada una tendrá sus ventajas e inconvenientes en cuanto a la cantidad de etanol que permiten producir, los inhibidores que pueden formarse o los azúcares que se fermentarán y por tanto los que quedarán sin aprovecharse (normalmente pentosas).

Hidrólisis y fermentación separadas (SHF del inglés *Separate hydrolysis and fermentation*): en este caso la hidrólisis y fermentación se llevan a cabo en dos tanques diferentes, separando también la fermentación de hexosas de la de pentosas. De esta forma, se permite que tanto las enzimas primero como los microorganismos fermentadores después trabajen en condiciones de pH y temperaturas óptimas (56).

Se obtienen altas cantidades de etanol, pero además de poderse formar inhibidores, las altas concentraciones de glucosa o celobiosa pueden frenar la acción de celulasas en la fase de hidrólisis (56).

Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF del inglés *Simultaneous saccharification and fermentation*): la hidrólisis y fermentación se llevan a cabo de forma simultánea y en el mismo tanque, por lo que los azúcares liberados por las enzimas son directamente convertidos a etanol por los microorganismos fermentadores (esto evitará la inhibición de las enzimas por altas concentraciones de azúcares como la glucosa que sucedía en la SHF) (56).

Presenta una mayor productividad de etanol y tasa de sacarificación que la estrategia SHF, a pesar de que solo se fermenten hexosas (las pentosas se fermentarían en otro tanque en todo caso), y reduce mucho la formación de inhibidores. Además, el etanol ayudará a controlar la presencia de contaminaciones microbiológicas indeseadas (56).

Sacarificación y co-fermentación simultáneas (SSCF del inglés *Simultaneous saccharification and co-fermentation*): igual que en la estrategia SSF, la hidrólisis y fermentación se llevan a cabo en el mismo tanque, pero, en este caso, se hace uso de un cocultivo para poder fermentar tanto hexosas como pentosas, obteniéndose así más etanol todavía a coste y tiempo menores (56).

Estas dos últimas estrategias presentan la clara ventaja con respecto a la SHF de que reducen el número de tanques necesarios, abaratando el proceso (56).

Procesamiento biológico consolidado (CBP del inglés *Consolidated bioprocessing*): también se realiza todo en el mismo tanque pero haciendo uso de microorganismos normalmente modificados genéticamente para que incorporen todas las características que nos interesan a lo largo del proceso; aun así es una estrategia que está en vías de desarrollo (56).

Por ejemplo, *Ruminiclostridium thermocellum* es una bacteria ampliamente utilizada en estos CBP (57) por características como su capacidad celulolítica, ser termófila y permitir la fermentación de azúcares con buenos rendimientos y sobre todo bajo unas condiciones óptimas de cultivo variadas.

Aun así, hay diferentes formas de conseguir cepas de microorganismos útiles para CBP basadas en:

1. Estrategia nativa: muchos microorganismos han visto reducidos sus rendimientos al etanol que producen por la gran ramificación de sus rutas de fermentación, generando productos que no son los buscados. Por eso esta estrategia se basa en la inactivación de genes responsables de la formación de esos productos o la activación de otros relacionados con un aumento de la tolerancia al etanol de los microorganismos (58).
2. Microorganismos celulolíticos recombinantes: mediante técnicas de recombinación se ha conseguido convertir cepas no celulolíticas (*Saccharomyces cerevisiae* es la más común), en celulolíticas mediante la expresión de genes de celulasas (β -1,4-endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas), permitiendo su presencia a lo largo de la superficie de los microorganismos, facilitando su contacto con la celulosa (58).
3. Consortio microbiano: esta estrategia se basa en el uso de una comunidad microbiana, en la cual pueda haber tanto microorganismos celulolíticos como etanogénicos. El principal problema que puede haber con esta técnica es alcanzar las condiciones en las que todos los microorganismos de la comunidad lleven a cabo su función de forma óptima y es que, los microorganismos etanogénicos preferirán ambientes anaerobios frente a los celulolíticos que prefieren aeróbicos; también la temperatura óptima de estos últimos suele ser mayor que la de los etanogénicos (58).

10. FERMENTACIÓN:

Llegados a este punto, nos encontramos con la posiblemente etapa más importante del proceso de formación de bioetanol, que es la fermentación. En ella, una serie de microorganismos fermentadores permitirán la conversión de los azúcares que se hayan ido acumulando hasta ahora tras todo el procedimiento en etanol (estos microorganismos pueden ser muchas levaduras, entre las que destacamos las del género *Saccharomyces* y concretamente *S.cerevisiae*, pero también algunas bacterias, entre las que destaca *Zymomonas mobilis*. Estas dos especies ofrecen rendimientos en la producción de etanol de entre 90-97%).

No obstante, uno de los principales problemas ante el que se exponen estos microorganismos es la incapacidad de fermentar todos los azúcares liberados tras las etapas de pretratamiento e hidrólisis enzimática, y es que, un grupo de ellos son las pentosas (entre las que hay que destacar la xilosa por ser la pentosa más abundante derivada de la hemicelulosa que había en la materia prima de partida (59)), difícilmente fermentables por los microorganismos más habituales.

Por tanto, en este apartado se van a tratar puntos como las características que debería tener un microorganismo fermentador ideal junto con parámetros ambientales y operacionales necesarios para una óptima fermentación, el uso de bacterias como alternativa a las levaduras en la formación de bioetanol, o la problemática del tratamiento de las pentosas.

10.1 BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN Y ASPECTOS BÁSICOS DE LA GENÉTICA MOLECULAR DE LAS LEVADURAS EN RELACIÓN A LA FERMENTACIÓN:

Se ha mencionado que tanto levaduras como bacterias pueden fermentar azúcares para producir bioetanol, pero debido a la relevancia, amplio estudio sobre ellas y las características que poseen, las levaduras son las más empleadas sobretodo *S.cerevisiae*; es por esto que salvo que se haga una aclaración en particular, todo lo mencionado en este punto se referirá a levaduras.

La producción de bioetanol por fermentación se basa fundamentalmente en la conversión de azúcares, principalmente hexosas como glucosa, en moléculas de dos átomos de carbono como el etanol sin terminar de oxidar este último a CO_2 . A grandes rasgos, lo que ocurre es la oxidación de glucosa a dos moléculas de piruvato a través de la glucólisis, en la que se hace uso de hasta 10 enzimas, 2 moléculas de ADP que se convierten en ATP y 2 de NAD^+ que se convierten en NADH necesario más adelante. A continuación, esas dos moléculas de piruvato se descarboxilan a 2 de acetaldehído, liberándose otras 2 de CO_2 . Por último, las dos moléculas de acetaldehído se reducen a 2 de etanol, convirtiendo las 2 de NADH formadas antes en 2 de NAD^+ de nuevo, gracias a la alcohol deshidrogenasa (ADH), siendo esta la enzima más importante en el proceso de formación de etanol por fermentación en levaduras y sujeto de muchos estudios de biología sintética donde se trata de mejorar su especificidad y su capacidad de conversión (60).

En la figura 8 del apartado de anexos se puede ver un esquema general de la conversión de glucosa a bioetanol.

Por lo tanto, será importante saber cómo utiliza la levadura esa glucosa (se incluyen otros azúcares que pueda fermentar) de partida, y esto lo puede determinar el efecto Crabtree: este efecto se basa en la formación de etanol por las levaduras ante altas concentraciones de glucosa y aun en presencia de oxígeno en vez de llevar a cabo un metabolismo respiratorio para la obtención de energía mediante el ciclo de Krebs. En base a ello tenemos:

- **Levaduras Crabtree positivas:** como *S. cerevisiae*, acumulan etanol en presencia de oxígeno y obtienen la energía que necesitan de la glucólisis excesiva por los altos niveles de glucosa presentes.
- **Levaduras Crabtree negativas:** como *Candida albicans*, convierten los azúcares en CO_2 principalmente y no producen grandes cantidades de etanol. (60).

10.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS LEVADURAS Y PARÁMETROS QUE PERMITEN UNA ÓPTIMA FERMENTACIÓN

En este subapartado se hablará de las características que debería tener una levadura ideal para producir bioetanol y de algunos de los parámetros ambientales u operacionales de los que depende la optimización del proceso de fermentación.

Amplio rango de utilización de sustrato: la materia prima de la que se parte puede ser muy variada, incluyendo maíz, caña común, almidón de cualquier especie vegetal, sorgo o hasta posos de café entre otros, por lo que la variedad de azúcares liberados para su fermentación posterior y cantidad de cada uno de ellos va a ser muy diferente en cada caso. En la tabla 2 del apartado de anexos se pueden ver diferentes cepas de levaduras empleadas para la producción de bioetanol según la materia prima de partida, condiciones de fermentación y concentración y productividad de etanol (60).

Por lo anterior mencionado, interesa usar una levadura que sepamos que va a poder fermentar la mayor cantidad y variedad de estos azúcares para aprovechar mejor la materia prima, y para ello, se ha visto que la especie *S. cerevisiae* es una clara candidata (usando diferentes cepas según la materia prima de la que se parta para garantizar mayores rendimientos), a pesar de presentar una cierta incapacidad para fermentar pentosas y algunos oligosacáridos liberados durante la hidrólisis enzimática de celulosa y hemicelulosa.

Mencionar también, que ante una mezcla de diferentes hexosas que van a ser fermentadas, las levaduras tienden a consumir cada una de ellas de una en una, teniendo preferencia por la glucosa, y cuando esta se agota, pasan a la siguiente (esto se encuentra gobernado genéticamente).

Alto rendimiento en la producción de etanol: obviamente por ser nuestro producto de interés, será importante que la concentración, y por tanto productividad, sea elevada para abaratar los costes posteriores de destilación por litro de etanol en su recuperación. Las levaduras presentan buenos valores tanto de rendimiento a etanol (> 90%) como de productividad (> 1.0 g/L/h) (61).

De la tabla 2 anterior se puede ver que, lógicamente, cuanto más pura sea la mezcla que contiene los azúcares fermentables, mayores serán la concentración y productividad del etanol obtenido (por eso utilizar como materia prima azúcares directamente, mejora los resultados) (60).

Además, algunos estudios han demostrado que, para la producción de etanol a nivel industrial, son más eficientes las levaduras *wild-type* sin modificar que las levaduras comerciales (62).

Tolerancia a las altas concentraciones de etanol: el etanol, como otros muchos compuestos, a altas concentraciones puede generar efectos tóxicos inhibiendo el crecimiento y reduciendo la viabilidad de las levaduras, a pesar de presentar éstas buenos valores de tolerancia (> 40.0 g/L) (61).

El etanol es una molécula anfipática que puede atravesar libremente la membrana de las levaduras sin necesidad de un transportador específico, lo que hace que su concentración en los medios intra y extracelular sea la misma, por lo que un aumento del etanol en el medio extracelular haría que la levadura acumularse internamente más también y por lo tanto se generasen esos efectos tóxicos. Estos se suelen dar a concentraciones de etanol de 8-18% (63).

Las membranas de las levaduras poseen altos niveles de ergosterol y lípidos insaturados que sintetizan en presencia de oxígeno para mantener su correcto espesor cuando la concentración de etanol aumenta y por lo tanto hacer frente a su toxicidad, pero algunos efectos que se producen cuando las cantidades ascienden mucho son:

- Aumento de especies reactivas del oxígeno en la mitocondria.
- Pérdida de aminoácidos y nucleótidos.
- Desnaturalización de proteínas.
- Aumento del transporte de protones a través de la membrana y, por tanto, desbalance del gradiente electroquímico.
- Desestabilización de la membrana, con la formación incluso de huecos.

Estos efectos se pueden ver esquematizados en la figura 9 del apartado de anexos.

Tolerancia a los inhibidores: como se ha mencionado anteriormente, durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica se liberan compuestos inhibidores de diferente naturaleza química para los que nuestra levadura fermentadora interesará que sea resistente

Resistencia a elevadas presiones osmóticas, temperaturas y diferentes rangos de pH: estos 3 parámetros ambientales pueden ser determinantes en la actividad de las levaduras, ya que es relativamente sencillo que se desajusten y aparten de sus rangos óptimos para el

proceso de fermentación, poniendo en peligro la integridad de los microorganismos o produciendo la desnaturalización de enzimas implicadas en el proceso, entre otros.

- Presión osmótica: su aumento se suele deber a una mayor concentración de azúcares fermentables en el caldo de fermentación (medio extracelular para la levadura), generando una ralentización en el metabolismo de las levaduras y una reducción en la cantidad total de etanol producido. Además, se ha visto que en proporción más etanol se va a retener intracelularmente, lo que produce una disminución de la viabilidad celular debido a sus efectos tóxicos. Esto se suele contrarrestar con un “giro metabólico”, dirigiendo la producción de etanol hacia la de glicerol, cuya importancia biológica se mencionará más adelante (64).

- Temperatura: es otro de los parámetros físicos que condicionan el proceso de fermentación. Se ha visto que la tasa de crecimiento de las levaduras y su metabolismo aumentan con la temperatura hasta que se alcanza un óptimo (aproximadamente a los 35°C) y poco a poco, a medida que se va aumentando más, comienzan a decaer ambos (aproximadamente a los 45°C) (60). Sin embargo, los valores óptimos de temperatura para llevar a cabo la fermentación están algo por debajo, entre 20-35°C (60), y es que, cada 5°C que sube la temperatura del medio de fermentación, se produce un aumento de la pérdida de etanol por evaporación del 1.5%.

Por ello, y teniendo en cuenta que la fermentación es un proceso exotérmico que libera calor pudiendo aumentar todavía más el estrés térmico, interesa trabajar con levaduras termotolerantes que sigan manteniendo su capacidad fermentadora a temperaturas elevadas. Este es el caso de *Kluyveromyces marxianus*, capaz de sobrevivir a temperaturas de 42-45°C (65). Otra alternativa pasaría por aumentar el tiempo de fermentación cuando se trabaja a bajas temperaturas, pero esto reduciría los rendimientos a etanol (66).

También se está promoviendo, en *S. cerevisiae*, su uso en estado inmovilizado en vez de libre ya que se ha visto que tiene una mejor tolerancia a temperaturas más altas por su capacidad de transferir calor del medio externo a su interior (67).

- pH: es importante que la levadura elegida tolere un amplio rango de pH, y es por eso, por lo que *S. cerevisiae* es la más comúnmente seleccionada para la producción de bioetanol (68).

En cierto modo, de este pH depende la no contaminación del medio de fermentación por microorganismos indeseados como bacterias, el crecimiento y supervivencia de las propias levaduras (viéndose ambos comprometidos en valores de pH cercanos a 2.75) (60), la tasa de fermentación, la cual para *S. cerevisiae* tiene su óptimo de pH entre 4.0-5.0 (68) y la formación de otros productos. Además, se ha visto que la concentración de protones en el medio de fermentación puede determinar la mejor o peor permeabilidad de ciertos nutrientes, que necesita la levadura, de cara a entrar a su interior; esto es así ya que estos protones van a ser capaces de alterar la carga de la membrana plasmática de estas levaduras (66).

En definitiva, se ha visto que a pH inferiores a 4 se necesitan periodos de incubación para el desarrollo de las levaduras más largos, no viéndose muy reducida la cantidad de etanol generada, en comparación con pH superiores a 5 donde, además, la cantidad de etanol sí que se ve reducida (69).

En la figura 10 del apartado de anexos se puede ver cómo afecta el pH a la fermentación, concretamente de la bacteria *Zymomonas mobilis*.

Generación de pocos subproductos o utilización de los mismos: a lo largo de la fermentación, no solo se convierten los azúcares fermentables en etanol, sino que también se

generan otros subproductos a partir de otras reacciones que tienen lugar en el fermentador. Algunos de estos son por ejemplo el CO₂, glicerol, ácido láctico, ácido acético, lactato, acetato o 2,3-butanediol (70), los cuales se pueden ver esquematizados, según cuándo se producen, en la figura 11 del apartado de anexos. Algunos de estos, como el lactato o acetato, se forman en las condiciones aeróbicas que necesitan las levaduras al principio de la fermentación para permitir su crecimiento.

Por su parte el glicerol puede ser bastante útil para las levaduras: se forma a partir de la ruta gliceropirúvica en la que la dihidroxiacetona fosfato de la glucólisis se convierte en glicerol 3P y este finalmente a glicerol. Su cantidad es elevada sobre todo al inicio de la fermentación, cuando la presión osmótica es muy elevada por la alta concentración de azúcares y se acumula en el interior de la levadura para intentar equilibrar esa diferencia entre la osmolaridad interna y externa (71).

Aun así, será importante que estos subproductos se formen en la menor cantidad posible para no alterar la productividad de etanol, además de que se puedan extraer fácilmente a bajos costes para poderlos separar del etanol producido, ya que pueden tener un cierto valor añadido y por lo tanto utilidad.

Buena capacidad de recuperación celular y reciclaje: se ha visto que la concentración de las levaduras empleadas afecta a la tasa de consumo de los azúcares y a la producción de etanol. Dicha producción aumenta en el rango de 10⁴-10⁷ células/ml, pero a partir de ahí, la producción se detiene considerablemente (66). Además, el tamaño del inóculo de levaduras óptimo para esta producción de etanol se ha demostrado en diferentes estudios que está entre el 5-10% (72). En la figura 12 del apartado de anexos se puede ver la dependencia de la concentración de etanol producida en función del tamaño del inóculo de levaduras.

Por ello, y con el objetivo de aprovechar durante mas ciclos de fermentación las levaduras que se utilizan, es importante recuperarlas y reciclarlas de alguna manera (será imprescindible, por lo tanto, que la viabilidad de las levaduras sea elevada para que permitan su uso continuado). Se pueden recuperar mediante filtración y posterior centrifugación, pero es un proceso costoso a nivel de tiempo y de dinero. La solución pasa por la aplicación de 2 técnicas diferentes:

- Aprovechamiento de la tendencia natural de las levaduras a flocular: la floculación es una propiedad que les permite a las levaduras quedar retenidas en el tanque de fermentación, viéndose facilitada su recuperación sin necesidad de centrifugación al quedar separadas del medio de fermentación (73). Aun así, se tendrá que tener en cuenta que cuando las levaduras floculan, tienden a la agregación, perdiendo así capacidad fermentativa y siendo por eso importante una cierta agitación durante el proceso. Esta floculación depende de la expresión de los genes de la familia *flo*, que codifican para una serie de floculinas (*FLO1*, *FLO5* y *FLO11*), unas lectinas de la superficie celular de las levaduras que interaccionan con residuos de manosa presentes en levaduras adyacentes, permitiendo su agregación y posterior sedimentación o formación de un biofilm en la parte superior del tanque, facilitando en cualquier caso su recuperación (74).
- Inmovilización de las levaduras: supone el confinamiento físico de las levaduras en un soporte inerte en el que mantengan su actividad habitual. Presenta una serie de ventajas con respecto al uso de levaduras libres como permitir mayores densidades celulares por volumen de reactor, mayor facilidad de separación de las levaduras del medio de fermentación, mayores conversiones de los azúcares, menor inhibición por la formación

de productos y menores tiempos de reacción (75). Aun así, es una técnica que depende de muchos factores como la superficie del soporte, el tamaño de poro o la hidrofiliidad. (76).

Hay diferentes métodos de inmovilización como atrapamiento en gel, encapsulación o adsorción, siendo este último el más común en la producción de bioetanol (60). En esta adsorción se usa fundamentalmente una matriz porosa de alginato de calcio por su buena biocompatibilidad, bajo costo y disponibilidad (75).

Estilaje: es el residuo que se forma tras la destilación del fermentado en la recuperación del etanol que se ha producido, siendo su mayor componente la materia orgánica, como se puede ver en la tabla 3 del apartado de anexos. Se ha visto que, por ejemplo, a partir de caña de azúcar se producen hasta 12 litros de estilaje por litro de etanol producido, por lo que interesa darle un uso a este residuo.

Sin embargo, dependiendo de cómo sea tratado, puede ser considerado como un contaminante del agua o una fuente de valiosos productos; por eso, lo que se suele hacer es separar la parte líquida, para reciclar el agua que contiene, de la sólida, que se utiliza para elaborar pienso normalmente.

Además, a nivel industrial, una relación *volumen de estilaje/volumen de etanol* producidos baja, da lugar a un abaratamiento del costo del proceso (63).

Otros parámetros operacionales: además de todos estos puntos anteriores, hay otros parámetros que pueden afectar al crecimiento de los microorganismos fermentadores como son el tiempo de fermentación (si es corto se produce una ineficiente fermentación por no haber dado tiempo suficiente a los microorganismos para crecer, mientras que si es largo, el crecimiento también será afectado por los efectos tóxicos de las altas concentraciones de etanol acumuladas en el caldo de fermentación (66)) o la tasa de agitación (sin llegar a ser excesiva y que pueda limitar la actividad metabólica de las levaduras, una correcta agitación va a facilitar la entrada de nutrientes a las células y la salida de etanol de estas, por eso la tasa de agitación habitual para la fermentación llevada a cabo por levaduras se encuentra entre 150-200 rpm (66)).

10.3 BACTERIAS CAPACES DE PRODUCIR ETANOL:

Hasta ahora se ha referenciado todo el proceso de fermentación a las levaduras pero, como ya se ha mencionado anteriormente, también algunas bacterias son capaces de realizarla. Entre ellas fundamentalmente destaca *Zymomonas mobilis* (que junto con *S. cerevisiae* constituyen los dos microorganismos más conocidos por la producción de bioetanol a partir de hexosas (77)) pero otras como algunas de las del género *Clostridium*, también se han estudiado.

Z. mobilis es una bacteria anaerobia Gram (-) que fue aislada por primera vez en 1912 como un posible responsable de la “enfermedad de la sidra”, que consistía en el deterioro de jugo de manzana fermentado. Presenta una serie de características importantes como que produce etanol 3-4 veces más rápido que las levaduras, no necesita oxígeno para su crecimiento como si lo necesitan las levaduras, muchas cepas crecen a temperaturas un poco más altas (38-40°C), tiene una gran osmotolerancia (viable en medios de hasta un 40% de glucosa), es capaz de tolerar un amplio rango de pH, tiene buena tolerancia al alcohol (de hasta el 13%) y produce pocos subproductos (63).

No obstante, *Z. mobilis* no ha conseguido reemplazar a las levaduras como principales productoras de etanol a gran escala y esto, en gran medida, depende del metabolismo de los azúcares que presenta esta bacteria y es que solo es capaz de utilizar como sustratos glucosa, fructosa y sacarosa. La glucosa, como azúcar predominante en la mayoría de los medios de fermentación, es convertida en glucosa-6-fosfato y, en vez de seguir la ruta glucolítica habitual que seguirían las levaduras, *Z. mobilis* pone en marcha la ruta de Entner-Doudoroff que acabará dando lugar a la producción de una sola molécula de ATP por molécula de glucosa fermentada, frente a las dos moléculas de ATP que permitía obtener la glucólisis normal de las levaduras. Esta menor producción de ATP limita el crecimiento de *Z. mobilis* pero permite obtener unos rendimientos a etanol mayores que las levaduras cuando utilizan glucosa como sustrato, ya que se ha visto que el aumento de biomasa producido por estas cuando llevan a cabo la glucólisis, actúa como factor competidor de la producción de bioetanol (63).

Además, *Z. mobilis* presenta una serie de desventajas como que no puede fermentar pentosas si no es modificada genéticamente (al igual que *S. cerevisiae*), no tiene una buena tolerancia a inhibidores tóxicos procedentes de los hidrolizados lignocelulósicos como por ejemplo ácido acético (cuya concentración puede alcanzar el 1.5%, siendo muy elevada para la bacteria) o compuestos fenólicos (este impacto se ha visto reducido cuando la producción de etanol por *Z. mobilis* la realiza creciendo a modo de biofilm en vez de suspendida en el medio de fermentación (78)) y da lugar a la formación de un polisacárido de alto peso molecular llamado levan, cuando crece en un medio rico en sacarosa, que aumenta considerablemente la viscosidad del medio de fermentación (79).

Las otras de las bacterias mencionadas que pueden llevar a cabo la fermentación pertenecen al género de ***Clostridium***. Este grupo de bacterias anaerobias estrictas, Gram (+) y termófilas, permite realizar una hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa y posterior fermentación por el mismo microorganismo, abaratando mucho los costes en comparación con tener que usar microorganismos productores de las enzimas hidrolíticas y posteriores levaduras fermentadoras. Esto es así porque son capaces de producir enzimas celulasas y hemicelulasas, que van a acoplar en un complejo multienzimático denominado celulosoma, y que va a permitir convertir la celulosa y hemicelulosa a etanol en un solo paso (63).

Las 3 principales especies estudiadas de este género son *C. thermocellum* (T^a ópt. crecimiento: 60°C), *C. thermosaccharolyticum* (T^a ópt. crecimiento: 55-60°C) y *C. thermohydrosulfuricum* (T^a ópt. crecimiento: 65-70°C), siendo la primera la más caracterizada y presentando resultados de su actividad celulasa similares a los de *T. reesei*, considerado como mejor productor de esta enzima (63).

Sin embargo, este género de bacterias no está logrando sustituir a *Z. mobilis* y mucho menos a las levaduras como principales microorganismos fermentadores por tener una menor tolerancia al etanol, generar grandes cantidades de subproductos como ácidos orgánicos o ácido sulfhídrico (H₂S) y tampoco poder fermentar pentosas (63).

10.4 FERMENTACIÓN DE LAS PENTOSAS:

Como se ha ido mencionando a lo largo de toda la revisión, uno de los principales problemas ante el que se encuentran los microorganismos fermentadores de cara a la producción de bioetanol es la incapacidad que presentan, muchos de ellos, de fermentar los azúcares de 5C o pentosas. Una de estas pentosas es la xilosa (la más abundante de ellas dentro de la materia lignocelulósica (80)), siendo el segundo carbohidrato más abundante de la naturaleza (80),

por lo que su correcto tratamiento nos permitirá obtener mayores rendimientos a etanol y aprovechar mejor la materia prima de partida.

El metabolismo de la xilosa se divide en dos vías en las que se acaba formando xilulosa que se fosforilará a xilulosa-5-P, la cual ya entrará en la ruta de las pentosas fosfato para acabar produciendo etanol (80):

- Vía de un solo paso: la xilosa se isomeriza directamente a xilulosa por una xilosa isomerasa (*XI*).
- Vía de dos pasos: la xilosa es reducida a xilitol por una xilosa reductasa (*XR*) dependiente de NAD(P)H. Luego el xilitol es oxidado a xilulosa por una xilitol deshidrogenasa (*XDH*) dependiente de NAD⁺.

Ambas vías se pueden ver esquematizadas en la figura 13 del apartado de anexos.

Estudiando cuál de las dos vías consume mejor la xilosa, se ha visto que parece ser la de un solo paso. Esto es porque en muchas ocasiones, la vía de dos pasos se detiene en la formación de xilitol (que comienza a ser excretado como subproducto por las levaduras fermentadoras) debido a un desequilibrio redox intracelular que se produce entre los cofactores utilizados por las enzimas *XR* (NADH) y *XDH* (NAD⁺) (81). Este desequilibrio viene de las altas cantidades de NADH acumuladas que, al no entrar en la fosforilación oxidativa en condiciones anaeróbicas, no dan lugar a niveles suficientes de NAD⁺ necesario para la segunda reacción de esta vía, por lo que se detiene.

Los genes de las enzimas *XI*, *XR* y *XDH* se encuentran como tal en el genoma de *S. cerevisiae*, pero sus niveles de expresión son demasiado bajos como para permitir a esta levadura utilizar la xilosa para producir etanol (82). En su lugar, hay una serie de levaduras no convencionales capaces de fermentar esta xilosa y otras pentosas como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus* (83) pero presentan bajos rendimientos y tolerancia a etanol (84).

Por ello, la solución a la problemática general de la fermentación de pentosas pasa por el uso de levaduras modificadas genéticamente, híbridos de levaduras o co-cultivos de dos levaduras que completen esa fermentación:

Levaduras modificadas genéticamente: mediante técnicas del DNA recombinante, se consigue modificar el conjunto de genes que las levaduras tienen de forma natural, normalmente mediante la introducción de genes de otras especies, para que cumplan con los propósitos que nos interesan (en este caso la fermentación de pentosas), y hagan frente mejor a las situaciones inhibitorias a las que pueden estar expuestas (obteniendo así levaduras más termoresistentes o tolerantes al etanol, por ejemplo). Persiguiendo nuestro objetivo y en *S. cerevisiae*, se han conseguido cepas en las que se ha sobreexpresado el gen de la xiluloquinasa nativa de la levadura (*ScXK*) e integrado en el cromosoma los genes de la *XR* y *XDH* de *P. stipitis* (85), sin embargo, y tras muchos estudios, se ha visto que la excesiva sobreexpresión de la *XK* reduciría la conversión de xilosa a etanol, porque se acumularían grandes cantidades de xilulosa-5-P y se agotaría el ATP, por lo que la sobreexpresión debe ser muy finamente ajustada (86).

Otro punto de modificación es el transporte de xilosa y es que *S. cerevisiae* carece de transportadores específicos para este azúcar, tomándolo por difusión facilitada a través de canales no específicos y transportadores de hexosas (87), pudiendo ser este el motivo por el

que la levadura consume la xilosa después de agotar la glucosa presente en el medio. Aunque todavía se necesita identificar las proteínas esencialmente responsables de este transporte, se ha conseguido, por ejemplo, expresar en *S. cerevisiae* el transportador por difusión facilitada de glucosa/xilosa de *Candida intermedia* (codificado por el gen *GXF1*) (88), obteniendo una cepa recombinante que consume y produce más rápidamente la xilosa y el etanol, respectivamente (89).

Por último, otra vía sobre la que se puede actuar es la ruta de las pentosas fosfato, sobreexpresando alguna de las enzimas implicadas en ella y permitiendo un metabolismo más rápido de la xilulosa hacia su conversión a etanol. Tenemos así, que la generación de una cepa modificada de *S. cerevisiae* en la que se ha sobreexpresado el gen de la transaldolasa de *P. stipitis* (*TAL1*) permite su mejor crecimiento sobre xilosa (90), a diferencia de cuando se obtiene una cepa pero sobreexpresando el gen de la transketolasa de *P. stipitis* (*TKL1*), que entonces el crecimiento se ve reducido (91). También se han realizado estudios, siendo menos comunes, sobre otras enzimas de la ruta como la ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa o la ribosa-5-fosfato isomerasa (80).

Híbridos de levaduras: se obtienen a partir de la eliminación de la pared celular de *S. cerevisiae*, principalmente, generando así su protoplasto (el citoplasma de la levadura solo estará rodeado de la membrana plasmática), haciendo a la levadura algo más vulnerable y facilitando su fusión con levaduras fermentadoras de xilosa como *P. stipitis*, *C. shehatae* o *P. tannophilus*, generando así el híbrido final (92).

Con esta técnica se ha conseguido obtener cepas que fermentan hexosas y pentosas simultáneamente, como por ejemplo la cepa de *S. cerevisiae* RPRT90, pero también para otras finalidades como mejorar su capacidad de floculación, obteniéndose así la cepa de *S. cerevisiae* CHFY0321 (esta se generó mediante la fusión del protoplasto de la cepa no floculante *S. cerevisiae* CHY1011 con la cepa floculante y poco fermentadora *Saccharomyces bayanus* KCCM12633) (73).

Co-cultivos: como su nombre indica, implica el crecimiento y la actuación conjunta de 2 levaduras diferentes en el mismo tanque de fermentación. Aunque con esta técnica se han llegado a obtener rendimientos en la producción de etanol mayores que en el caso de cultivos puros con una sola levadura (93), presenta una gran desventaja que es la posible incompatibilidad entre las dos cepas de levaduras, ya que una de ellas puede inhibir el crecimiento de la otra (94). Por ello, el principal reto a cumplir en el co-cultivo de levaduras es la búsqueda y aportación de las condiciones ambientales óptimas para la correcta actuación simultánea de ambas levaduras (95) (por eso, a nivel industrial, se suele seguir prefiriendo el uso de una sola levadura).

Una estrategia para garantizar este ambiente óptimo pasa por la co-inmovilización de las levaduras, ya que permitirá generar ciertos espacios en los que diferentes condiciones (según la levadura) podrán ser alcanzadas y mantenidas (96). Sin embargo, aspectos como la transferencia de nutrientes y sustratos o la competencia microbiana por estos, son aspectos que habrá que optimizar en estas fermentaciones por co-cultivo de levaduras co-inmovilizadas (97).

En última instancia, se depende también del método de fermentación elegido (SHF, SSF, SSCF, etc.) que dependerá de los rendimientos a etanol y la duración del proceso, comparados siempre con la fermentación llevada a cabo por una sola levadura para poder

deducir si es rentable económicamente o no. Además, la productividad de etanol según la diferente configuración de los reactores va a aumentar conforme aumentamos el caudal de estos, notándose más el aumento de la productividad cuando se emplea un co-cultivo que cuando no (96).

En la tabla 4 se presentan las productividades de etanol obtenidas en un estudio de la fermentación realizado con las levaduras *Scheffersomyces stipitis*, *S. cerevisiae* o el co-cultivo de ambas, según el método de fermentación empleado.

En vista del objetivo general de fermentar las pentosas correctamente mediante el uso de estos co-cultivos, lo que se suele hacer es utilizar una levadura con una buena capacidad fermentativa de base como es *S. cerevisiae* (o incluso la bacteria *Zymomonas mobilis* (98)) junto con otra que tenga la capacidad de fermentar las pentosas de forma más eficiente que éstas dos primeras, como por ejemplo *Scheffersomyces stipitis* o *P. stipitis*.

11. RECUPERACIÓN DEL BIOETANOL PRODUCIDO:

En este último apartado de la memoria se van a explicar diferentes métodos utilizados para la recuperación de la fracción líquida del caldo de fermentación, en la que se encontrará el bioetanol producido durante el proceso.

El método más comúnmente utilizado es la destilación, que va a permitir separar el alcohol (bioetanol) del agua aprovechando los diferentes puntos de ebullición de ambas sustancias. Por ello, la mezcla se calienta hasta los 78.2°C (temperatura de ebullición del etanol) y así se consigue recuperar etanol al 95.6% (63); sin embargo, necesitaremos una etapa final de deshidratación que nos permita obtener el etanol anhidro (al 99,5%), que es el que realmente se busca. Este proceso de destilación tiene una serie de ventajas como la eficiencia energética aún a concentraciones de alimentación moderadas o la capacidad de simular el proceso utilizando el software de simulación adecuado (99). Sin embargo, presenta otras importantes desventajas como el elevado consumo energético que precisa (consume la mayor parte de la energía necesaria hasta ahora en todo el proceso de producción de bioetanol (63)), incrementando los costes pero siendo estos menores cuanto mayor sea la concentración de etanol en el caldo de fermentación resultante; además, al trabajar a elevadas temperaturas, puede provocar la muerte de muchos microorganismos o la desnaturalización de proteínas (100).

Es por todo esto que se están desarrollando nuevas técnicas para la recuperación de bioetanol y se dividen en convencionales o sistemas convencionales modificados (sistema de destilación) y sistemas no convencionales (no sistemas de destilación) (101). Estas últimas permiten un mayor ahorro energético y económico, pero su puesta en acción a nivel industrial todavía está limitada. Algunas de estas técnicas son:

Pervaporación: es un proceso de separación por membranas selectivas no porosas que permite separar mezclas azeotrópicas (mezclas de dos o más líquidos que al ser destilada se comporta como un único compuesto, es decir, en fase líquida o gaseosa mantienen la misma composición) o disolventes orgánicos de soluciones acuosas. La separación depende, además de las características de la propia membrana, de la difusividad a través de ésta de los componentes de la mezcla a separar (99).

En esta pervaporación, el gradiente de concentración generado por la presión de vacío en el lado de salida de la membrana es la fuerza que permite la separación de forma eficaz. Al estar

el lado de entrada a la membrana a presión atmosférica, el componente selectivo disuelto en este lado pasa a su través al lado de salida (102).

En la figura 14 se puede ver un esquema de un proceso de fermentación acoplado a un sistema de separación por pervaporación.

Desgasificación (*gas stripping*): mediante la introducción de un gas anaeróbico como el N_2 en el tanque de fermentación, se permite la evaporación del bioetanol presente que después, junto con ese gas añadido inicialmente, pasará a un sistema de condensadores para recuperarlo en estado líquido (99). En la figura 15 del apartado de anexos se puede ver un esquema del proceso integrado de desgasificación.

Además, el aumento del factor de desgasificación (N_2) permite un aumento de la concentración celular y consecuente mejora de la productividad de etanol, por el aprovechamiento de ese gas. También reduce el efecto inhibitorio del etanol producido (103).

Fermentación al vacío: consiste en llevar a cabo la fermentación en condiciones de vacío, permitiendo la evaporación del bioetanol formado a la temperatura de la propia fermentación para posteriormente convertirlo en estado líquido mediante un sistema de refrigeración por condensación o haciendo uso directamente de agua de refrigeración. Esta técnica permite además mantener los niveles de etanol bajos en el tanque de fermentación, reduciendo así la inhibición del metabolismo de las levaduras y de la fermentación, por tanto (104).

En la figura 16 del apartado de anexos se puede ver un esquema del proceso de fermentación junto con el sistema de extracción al vacío para la recuperación de etanol.

En este método, la temperatura de ebullición de la mezcla etanol-agua del caldo de fermentación (que suele estar entre los 78.2-100°C) disminuye a una temperatura que se encuentre en el rango al que se puede llevar a cabo la fermentación.

Sin embargo, estas técnicas alternativas no se suelen tener tan en cuenta como la destilación clásica a nivel industrial por la dificultad de mantener las condiciones que requieren, el aporte de energía que necesitan o la mayor complejidad de los equipos necesarios para llevarlas a cabo. Además, si queremos evaluar los costes totales tendremos que tener en cuenta muchos factores desde la naturaleza de la materia lignocelulósica de partida, pasando por el método de pretratamiento empleado, las enzimas usadas durante la hidrólisis enzimática o parámetros operacionales de la fermentación, por lo que a la hora de determinar qué método de recuperación de bioetanol es el mejor, el estudio se complica en exceso.

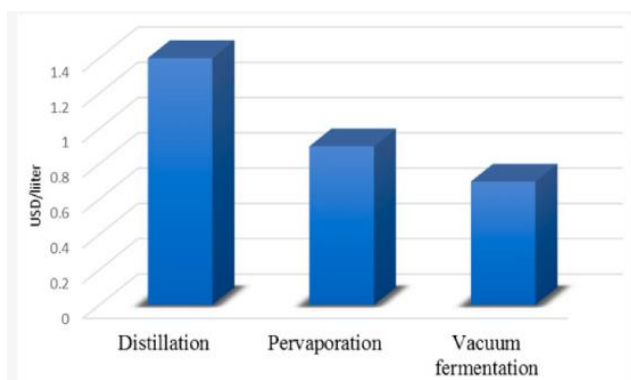


Figura 17: Evaluación de los costes de recuperación del bioetanol haciendo uso de diferentes técnicas (99).

Se puede ver como los métodos de pervaporación y fermentación al vacío son económicamente más viables que la destilación con valores de 0.9 USD/litro, 0.7 USD/litro y 1.4 USD/litro. Sin embargo, estos valores se han obtenido a partir de estudios a pequeña escala y por eso se

siguen considerando altos en comparación con el valor final del etanol en el mercado (99).

12. CONCLUSIONES:

El bioetanol se posiciona como una alternativa energética, sostenible, respetuosa con el medio ambiente y económica, que ofrece una solución viable para reducir la dependencia de combustibles fósiles. Se clasifica como un biocombustible de segunda generación, adaptado a las diversas fuentes de biomasa y condiciones de producción, siendo su principal fuente de materia prima la biomasa lignocelulósica compuesta por materiales vegetales no comestibles.

Esta lignocelulosa es ampliamente utilizada por ser muy abundante en el planeta, renovable y no competir directamente con los productos destinados a la alimentación, convirtiéndose en una opción ética para la producción de bioetanol. Sin embargo, presenta desafíos significativos en su digestión enzimática debidos a su estructura compleja y resistente, siendo necesaria una etapa de pretratamiento previo que ayude a romper ciertas barreras que protegen a los azúcares fermentables. Este pretratamiento ayuda a mejorar la eficiencia enzimática durante su hidrólisis posterior que permita liberar esos azúcares, que posteriormente, serán fermentados por diferentes microorganismos, permitiendo así mejorar el rendimiento de bioetanol producido y reduciendo los costos de producción.

En definitiva, los avances en los estudios relacionados con el pretratamiento de la biomasa, la hidrólisis enzimática y las técnicas de fermentación, como la inmovilización de microorganismos, entre otras, están allanando el camino para una producción de bioetanol cada vez más económica, eficiente y sustentable. Además, aportan conocimiento de cara al cumplimiento de retos biotecnológicos como la mejor fermentación de pentosas, la reducción de la producción de sustancias inhibitorias o el establecimiento de un proceso general estandarizado para la producción de bioetanol que, a pesar del auge en el que se encuentra el mundo de los biocombustibles hoy en día, todavía no se ha alcanzado.

13. CONCLUSIONS:

Bioethanol is positioned as an energy alternative that is sustainable, environmentally friendly, and economical, offering a viable solution to reduce dependence on fossil fuels. It is classified as a second-generation biofuel, adaptable to various biomass sources and production conditions, with its primary raw material source being lignocellulosic biomass composed of non-edible plant materials.

This lignocellulose is widely used because it is abundant on the planet, renewable, and does not directly compete with food products, making it an ethical option for bioethanol production. However, it presents significant challenges in its enzymatic digestion due to its complex and resistant structure, necessitating a pretreatment stage that helps break down certain barriers protecting the fermentable sugars. This pretreatment helps improve enzymatic efficiency during subsequent hydrolysis, allowing the release of those sugars, which will then be fermented by different microorganisms. This process improves the yield of bioethanol produced and reduces production costs.

In conclusion, advancements in studies related to biomass pretreatment, enzymatic hydrolysis, and fermentation techniques, such as the immobilization of microorganisms, among others, are paving the way for increasingly economical, efficient, and sustainable bioethanol production. Additionally, they provide knowledge to meet biotechnological challenges such as better pentose fermentation, the reduction of inhibitory substance production, and the establishment of a standardized general process for bioethanol production. Despite the current boom in the world of biofuels, such a standardized process has not yet been achieved.

ANEXOS

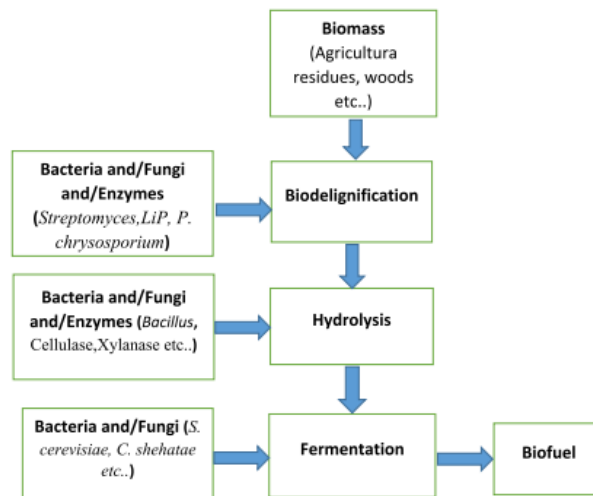


Figura 2: Esquema general de la conversión biológica de la biomasa lignocelulósica en biocombustible, en nuestro caso bioetanol.

Fuente: Tsegaye, B., Balomajumder, C., & Roy, P. (2019). Microbial delignification and hydrolysis of lignocellulosic biomass to enhance biofuel production: an overview and future prospect. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1).

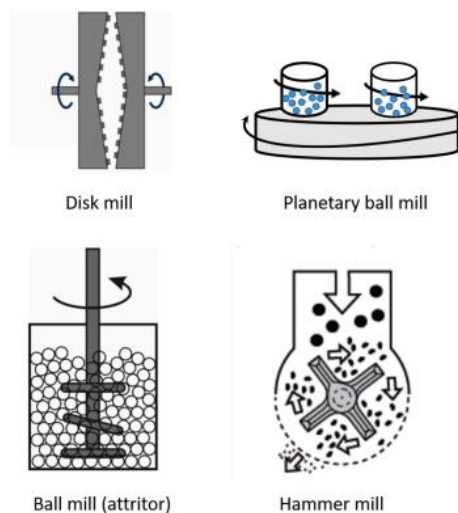


Figura 3: Esquema del mecanismo de acción de diferentes técnicas de molienda.

Fuente: Gallego-García, M., Moreno, A. D., Manzanares, P., Negro, M. J., & Duque, A. (2023). Recent advances on physical technologies for the pretreatment of food waste and lignocellulosic residues. *Bioresource Technology*, 369(128397), 128397.

Se pueden observar diferentes configuraciones de técnicas basadas en la molienda como son el molino de discos, el molino de bolas planetario, el molino de bolas clásico o el molino de martillos.



Figura 4: Digestor empleado para la explosión de vapor.

Fuente: Barroso Casillas, M. (2010). PRETRATAMIENTO DE BIOMASA CELULÓSICA PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL EN EL MARCO DE UNA BIORREFINERIA. Universidad Politécnica de Madrid. https://oa.upm.es/10559/1/MIGUEL_BARROSO_CASILLAS.pdf

Bacteria species	Availability	Gram stain	Feedstock used	Lignin degradation (%)	Culturing time (days)	Reference
<i>Pseudomonas</i> spp.	Water, plant seeds	Gram negative	Kraft lignin	39	52	Shi et al. 2008
<i>Acinetobacter</i> spp.	soil	Gram negative	Poplar wood	47–57	30	Odier et al. 1981; Dionisi et al. 2014
<i>Pseudomonas</i> spp.	Water, plant seeds	Gram negative	Poplar wood	40–52	30	Dionisi et al. 2014
<i>Xanthomonas</i> spp.	Plants	Gram negative	Poplar wood	39–48	30	Odier et al. 1981; Dionisi et al. 2014
<i>Pseudomonas</i> spp.	Water, plant seeds	Gram negative	Kraft lignin	20	40–60	Shi et al. 2008
<i>Streptomyces badius</i>	Soil	Gram positive	Indulin lignin	3–4	35	Giroux et al. 1988
<i>Streptomyces viridosporus</i>	Soil and decays	Gram positive	Indulin lignin	3–4	35	Giroux et al. 1988
<i>Streptomyces cyaneus</i>	Soil and decays	Gram positive	Barley straw	29–52	21	Zimmermann and Broda 1989
<i>Thermomonospora mesophila</i>	Decays	Gram positive	Barley straw	36–48	21	Zimmermann and Broda 1989; Dionisi et al. 2014

Tabla 1: Degradación bacteriana de lignina a partir de diferentes materias primas.

Fuente: Tsegaye, B., Balomajumder, C., & Roy, P. (2019). Microbial delignification and hydrolysis of lignocellulosic biomass to enhance biofuel production: an overview and future prospect. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1).

Se puede ver como diferentes especies bacterianas clasificadas según sean Gram +/-, según de dónde se puedan obtener, según la materia prima que degradan o según el tiempo de cultivo que necesitan, pueden llevar a cabo un proceso de deslignificación con un % mayor o menor de degradación total.

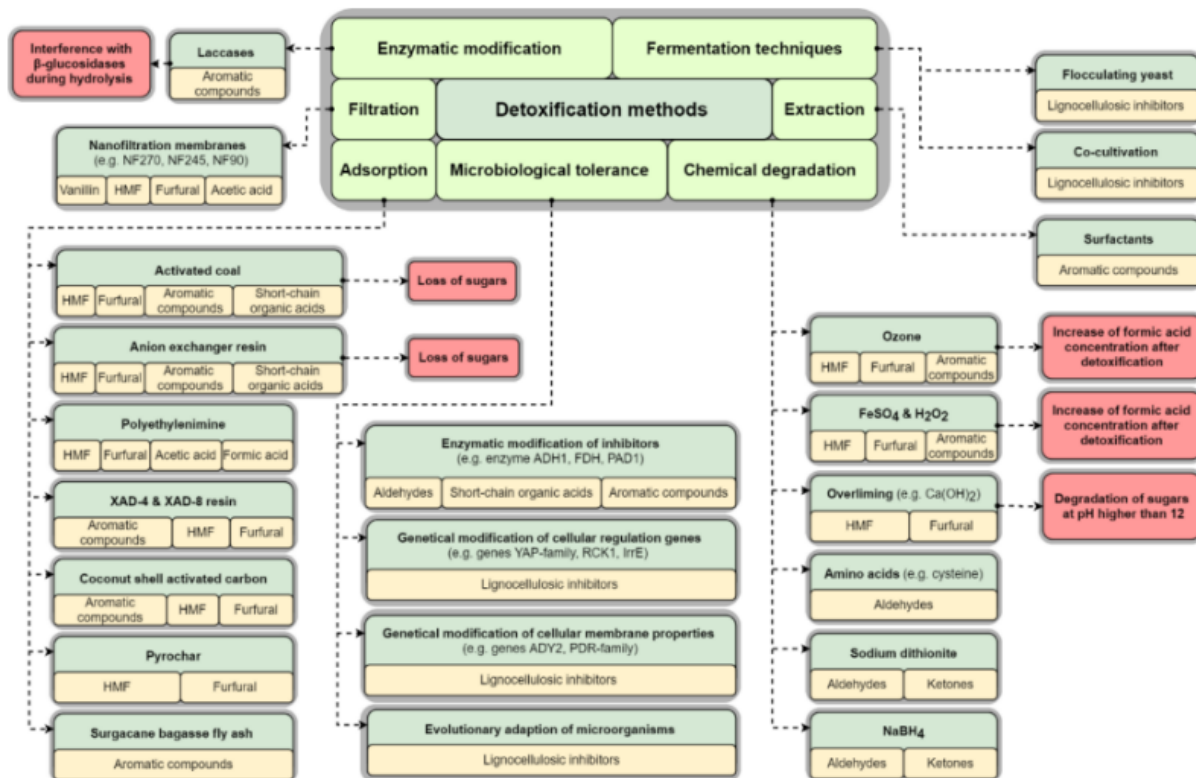


Figura 5: Diferentes métodos de detoxificación de los hidrolizados lignocelulósicos generados tras su pretratamiento.

Fuente: Sjulander, N., & Kikas, T. (2020). Origin, impact and control of lignocellulosic inhibitors in bioethanol production—A review. *Energies*, 13(18), 4751.

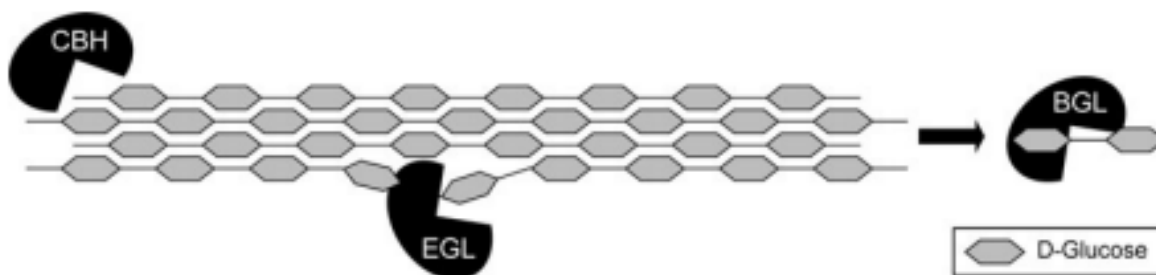


Figura 6: Esquema de la actuación de las β-glucosidasas (BGL), celobiohidrolasas (CBH) y β-1,4-endoglucanasas (EGL) sobre la celulosa.

Fuente: van den Brink, J., de Vries, R.P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 1477–1492 (2011).

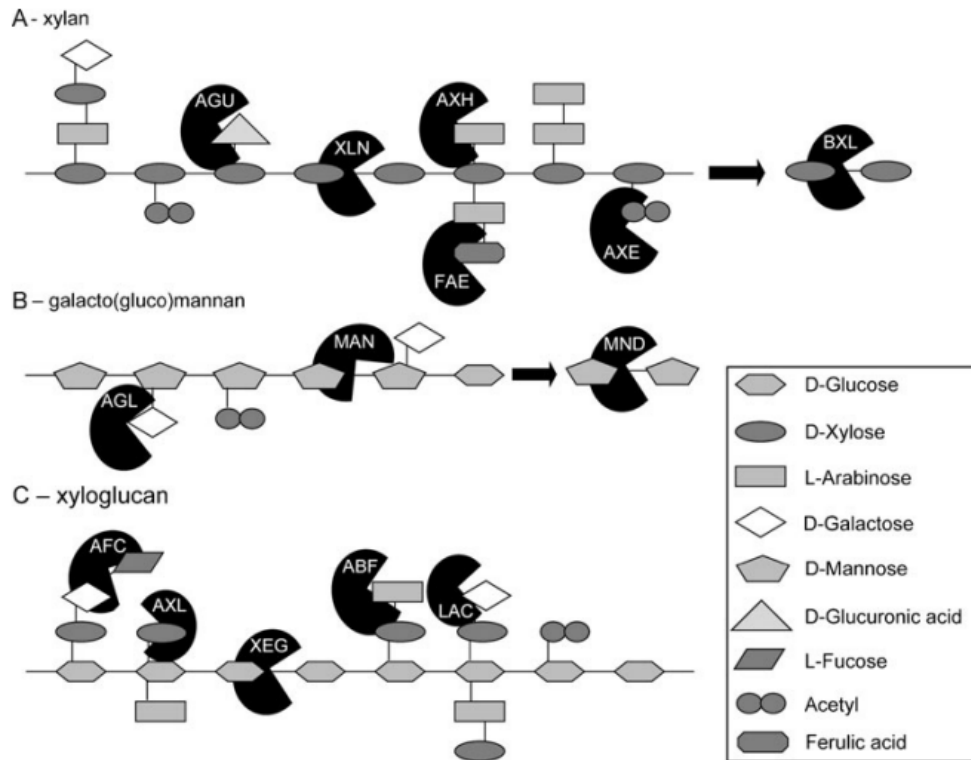


Figura 7: Esquema de 3 moléculas hemicelulíticas (xilano, galacto(gluco)manano y xiloglucano), con sus respectivas enzimas hemicelulíticas: β -1,4-xilosidasa (BXL), β -1,4-endomananasa (MAN), β -1,4-manosidasa (MND), β -1,4-endoxilanasas (XLN), β -1,4-endoglucanasa (XEG). El resto son enzimas accesorias.

Fuente: van den Brink, J., de Vries, R.P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 1477–1492 (2011).

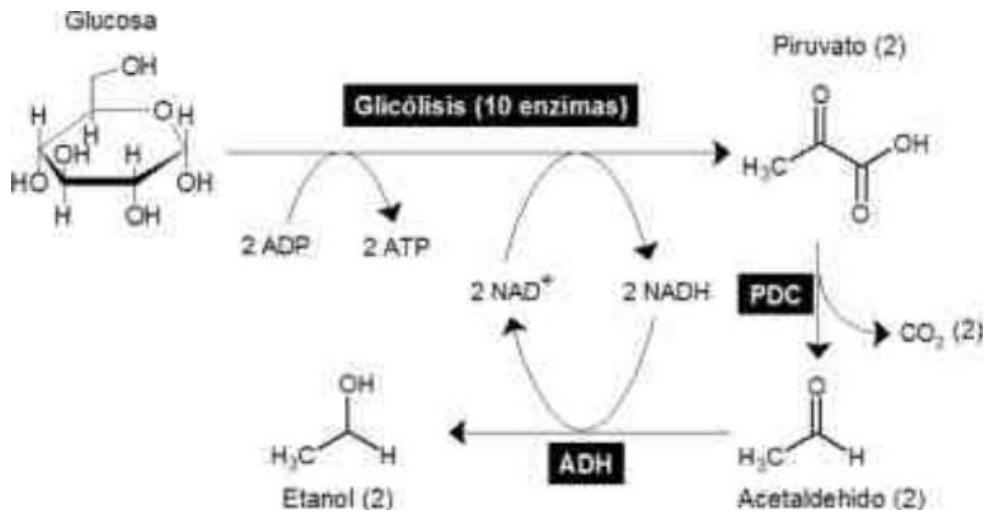


Figura 8: Esquema representativo de las reacciones que permiten la conversión de glucosa en etanol en levaduras.

Fuente: Zamora-Hernández, T., Prado-Fuentes, A., Capataz-Tafur, J., Barrera-Figueroa, B. E., & Peña-Castro, J. M. (2014). Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educación química*, 25(2), 122–127.

Yeast strain	Type of strain	Feedstock	Sugar concentration (g/D)	Fermentation condition	Ethanol concentration (g/L)	Ethanol productivity (g/L/h)	References
<i>S. cerevisiae</i> RL-11	Laboratory	Spent coffee grounds	195.0	30 °C, 200 r.p.m., 48 h	11.7	0.49	[33]
<i>S. cerevisiae</i> MTCC 173	Laboratory	Sorghum stover	200.0	30 °C, 120 r.p.m., 96 h	68.0	0.94	[109]
<i>S. uvarum</i> CBS 6054	Laboratory	Glut rice	33.4	30 °C, 150 r.p.m., 96 h	8.2	0.17	[54]
<i>S. cerevisiae</i> RL17	Wild-type	Galactose and glucose	500.0	30 °C, 200 r.p.m., 28 h	96.9	3.46	[52]
<i>S. pastorianus</i> C18PW0201	Wild-type	Gamma starch	95.0	32 °C, 120 r.p.m., 66 h	72.1	1.16	[110]
<i>S. cerevisiae</i> Q1F1011	Wild-type	Gamma starch	195.0	32 °C, 120 r.p.m., 66 h	89.1	1.35	[111]
<i>S. cerevisiae</i> ZU-10	Recombinant	Corn stover	99.0	30 °C, 180 r.p.m., 72 h	41.2	0.57	[112]
<i>S. cerevisiae</i> RW1190	Mutated hybrid	Spent coffee	72.1	30 °C, 150 r.p.m., 28 h	29.0	1.03	[46]
<i>S. cerevisiae</i> Q1F10321 (protoplast fusion)	Hybrid	Gamma starch	195.0	32 °C, 120 r.p.m., 65 h	89.8	1.38	[38]

Tabla 2: Diferentes cepas de levaduras empleadas para la producción de bioetanol en función de la materia prima de partida y las condiciones de fermentación. También se muestran concentraciones de azúcares fermentables y concentración y productividad del etanol producido en cada caso.

Fuente: Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61.

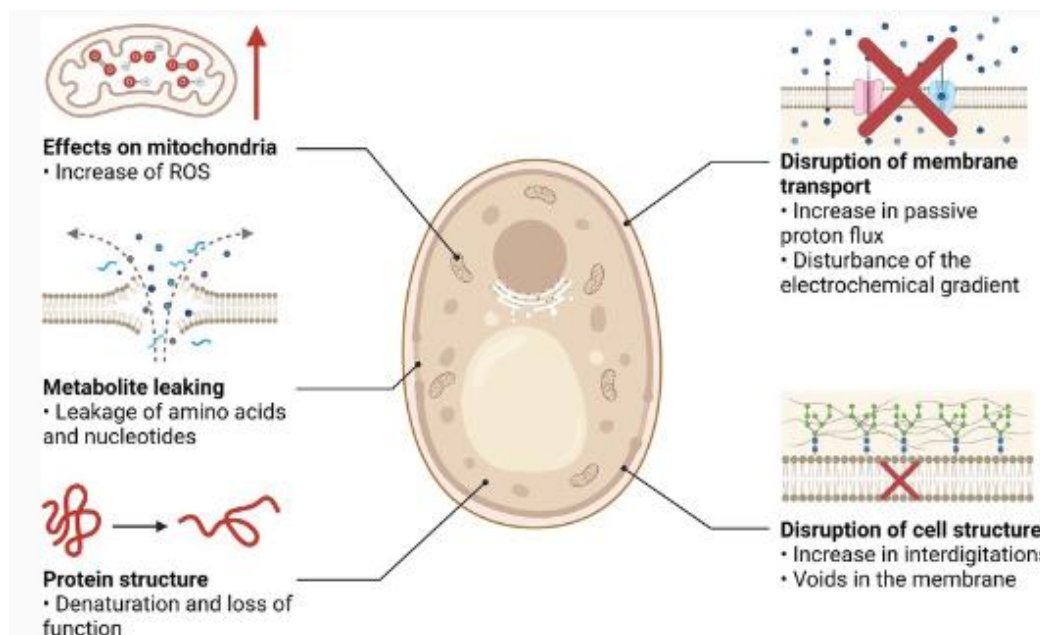


Figura 9: Esquema de los efectos tóxicos del etanol sobre las levaduras.

Fuente: de Moura Ferreira, M. A., da Silveira, F. A., & da Silveira, W. B. (2022). Ethanol stress responses in *Kluyveromyces marxianus*: current knowledge and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(4), 1341–1353.

Se pueden ver esquematizados algunos de los efectos tóxicos que provoca el etanol sobre diferentes ubicaciones de las levaduras. Observamos efectos sobre las mitocondrias (mediante el incremento de ROS), interrupción del transporte de metabolitos a través de la membrana plasmática (aumento del transporte pasivo de protones y por lo tanto desbalance del gradiente electroquímico), pérdida de la integridad de la estructura celular, fuga de

aminoácidos y nucleótidos a través de la membrana o desnaturalización y consecuente pérdida de función de algunas proteínas.

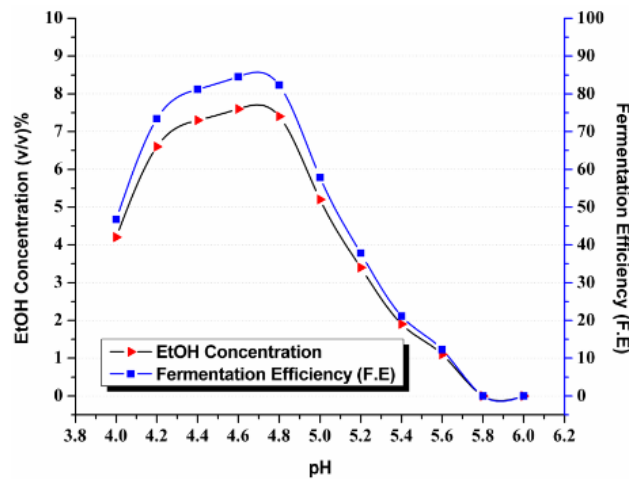


Figura 10: Efecto del pH sobre la fermentación llevada a cabo por la bacteria *Z. mobilis*. Variación de la concentración de etanol producida y la eficiencia de la fermentación en función del pH.

Fuente: Asif, H. K., Ehsan, A., Kashaf, Z., Abeera, A. A., Azra, N., & Muneeb, Q. (2015). Comparative study of bioethanol production from sugarcane molasses by using *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *African journal of biotechnology*, 14(31), 2455–2462.

En la gráfica se puede ver cómo, tanto la concentración de etanol producida como la eficiencia de la fermentación siguen un patrón similar en función del pH del entorno en el que se encuentre el microorganismo fermentador, en este caso la bacteria *Z. mobilis*. Se observa que a partir de pH 4 y hasta aproximadamente un pH 5, ambas variables aumentan conforme va aumentando el pH, pero a partir de pH 5, la tendencia es descendente.

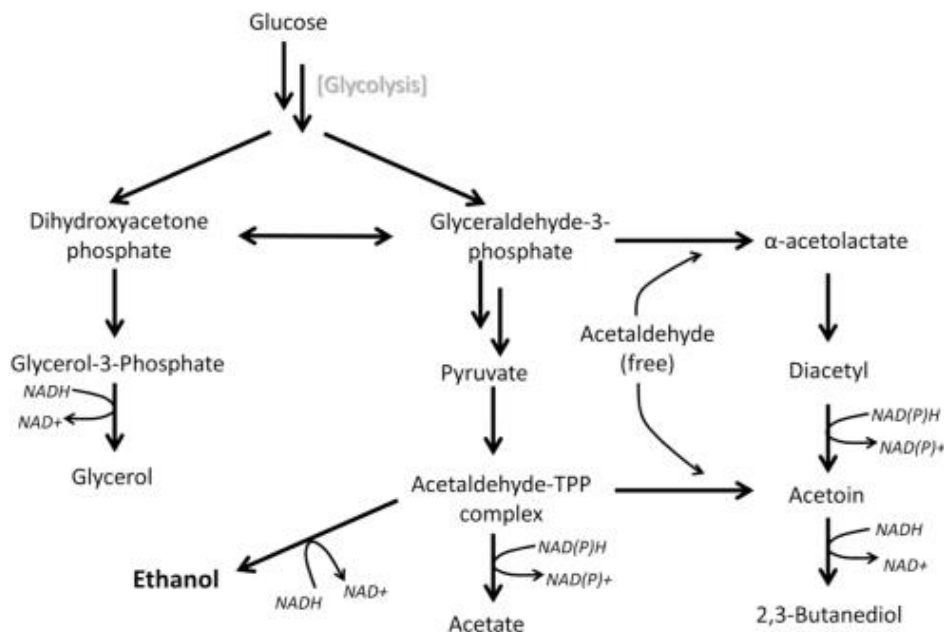


Figura 11: Esquema de la ruta de biosíntesis de etanol en *Saccharomyces cerevisiae*.

Fuente: Brigham, C., Department of Bioengineering University of Massachusetts, Dartmouth, 285 Old Westport Road, North Dartmouth, MA 02747, USA, & Macedo, N. (2014). From beverages to biofuels: The journeys of ethanol-producing microorganisms. *International journal of biotechnology for wellness industries*, 3(3), 79–87.

Según el esquema podemos ver como a lo largo de la ruta de biosíntesis de etanol en *S. cerevisiae*, se generan algunos subproductos mencionados como glicerol, acetato o 2,3-butanediol.

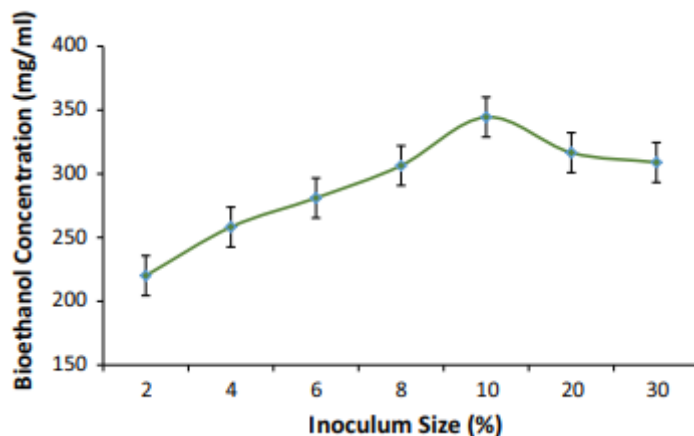


Figura 12: Efecto del tamaño del inóculo de levaduras en la conversión de azúcares a bioetanol durante el proceso de fermentación.

Fuente: Abu-Saied, M. A., Taha, T. H., Elnaggar, E. M., Amer, R. A., Mansy, A. E., & Elkady, G. M. (2018). Green production of bio-ethanol from cellulosic fiber waste and its separation using polyacrylonitrile-co-poly methyl acrylate membrane. *Cellulose (London, England)*, 25(11), 6621–6644.

En la gráfica se puede ver como la concentración de bioetanol producido en mg/ml aumenta conforme también lo hace el tamaño del inóculo de levaduras empleado, hasta un valor del 10% (de hecho, el óptimo de este tamaño del inóculo esta entre el 5-10%). A partir del 10%, la concentración del bioetanol producido va atenuándose poco a poco.

Component	Amount remaining (g/L)
Organic matter	40–65
Nitrogen	0.7–1.0
Phosphorus	0.1–0.2
Potassium	4.5–8.0

Tabla 3: Principales componentes del estilaje resultante de la destilación del etanol formado a partir de la fermentación de jugo de caña de azúcar.

Fuente: N. Glazer, A., Nikaido, H. (2007). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology* (2nd ed.). Cambridge University Press.

Se puede ver como el componente principal del estilaje tras la destilación del etanol producido a partir de la fermentación de jugo de caña de azúcar es la materia orgánica (40-65 g/L), seguida del nitrógeno, fósforo y potasio.

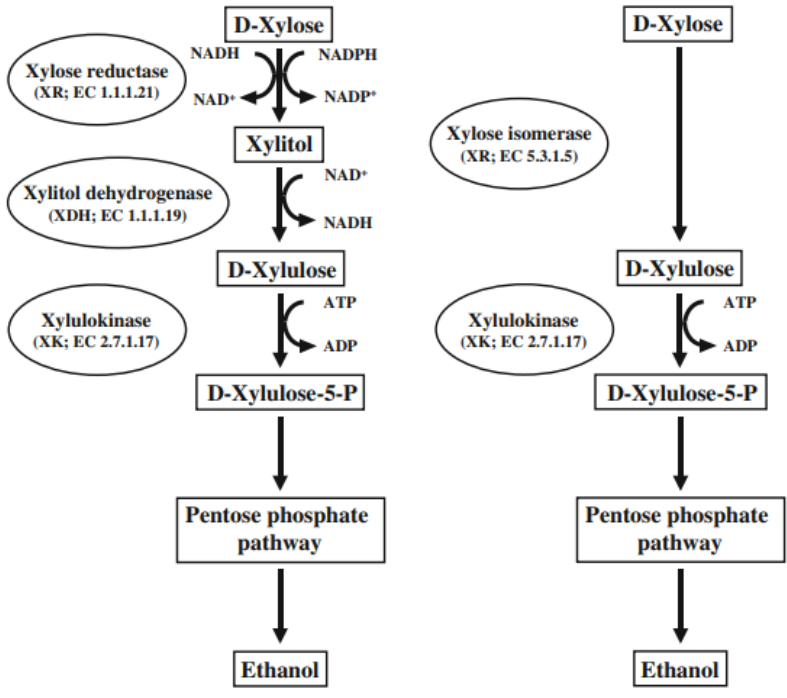


Figura 13: Esquema de las dos vías por las que puede ser metabolizada la xilosa para acabar generando etanol. A la izquierda la vía de dos pasos y a la derecha la de un solo paso.

Fuente: Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T., & Sawayama, S. (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 37–53.

Process type	Enzymatic hydrolysis period (h) before start of fermentation	Total process period (h)	$Y_{E \text{ tan of}}$ (g/100 g raw biomass)		
			<i>S. stipitis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i> + <i>S. stipitis</i>
SHF	48	72	17.78	17.59	18.79
SSF	0	24	16.66	16.66	17.29
SVSF	4	28	16.24	16.05	16.48
SVSF	7	31	16.33	16.40	16.85
SVSF	10	34	17.03	17.06	17.16
SVSF	24	48	18.65	17.62	18.73

Tabla 4: Productividades de etanol a partir de diferentes procesos de fermentación con cultivos de las levaduras *S. stipitis* y *S.cerevisiae*.

Fuente: Karagöz, P., & Özkan, M. (2014). Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system. *Bioresource Technology*, 158, 286–293.

Se puede apreciar que las productividades a etanol son efectivamente mayores cuando se trabaja con las dos levaduras simultáneamente en forma de co-cultivo que cuando se emplean de forma separada. La productividad más alta alcanzada se obtuvo con la estrategia de SHF y a partir del co-cultivo de las mencionadas levaduras, sin embargo, con la estrategia SVSF y con un periodo de hidrolisis enzimática previo a la fermentación de 24 horas, se obtuvo

también una productividad elevada. Esta es la principal ventaja de esta estrategia en comparación con la de SHF que también da lugar a una buena productividad de etanol, y es que el proceso dura menos tiempo (concretamente hasta 24 horas menos, como vemos en la tabla).

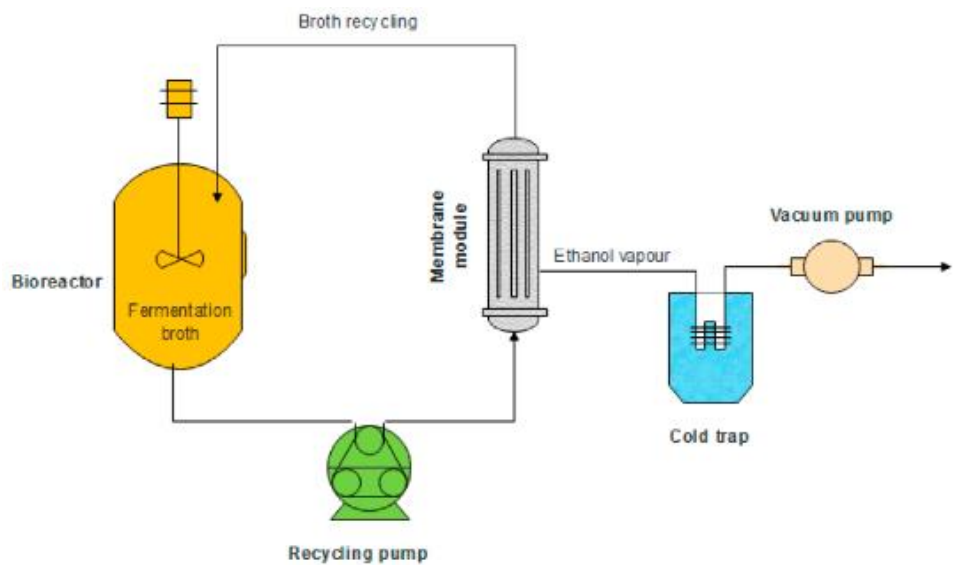
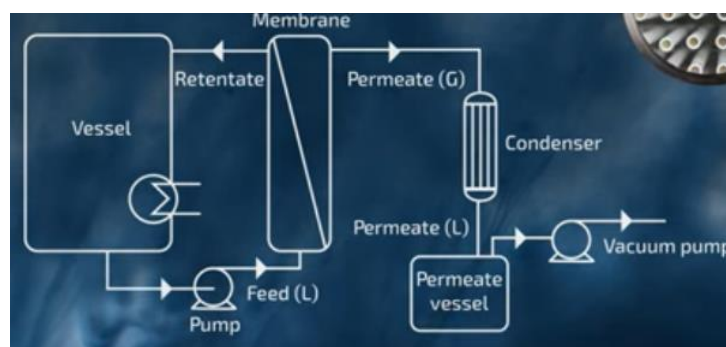


Figura 14: Diagrama del proceso de fermentación acoplado a un sistema de separación por pervaporación.

Fuente: Zentou, H., Abidin, Z., Yunus, R., Awang Biak, D., & Korelskiy, D. (2019). Overview of alternative ethanol removal techniques for enhancing bioethanol recovery from fermentation broth. *Processes (Basel, Switzerland)*, 7(7), 458.

Este sistema de pervaporación consta, habitualmente, de un tanque con el caldo de fermentación en este caso, una bomba de alimentación que impulse la mezcla líquida hacia la membrana para que los componentes se adsorban a ella, un módulo de membrana por el que va a permear nuestro componente de interés (en este caso el bioetanol), un calentador que permita la evaporación por el lado del permeado (porque lo que atraviesa la membrana pasa a estado gaseoso y lo que no la atraviesa, el retenido, se recicla y vuelve en estado líquido al tanque inicial de fermentación), un condensador que convierta el permeado gaseoso en permeado líquido (etanol líquido) y una bomba de presión a vacío final que permita recoger ese etanol líquido.



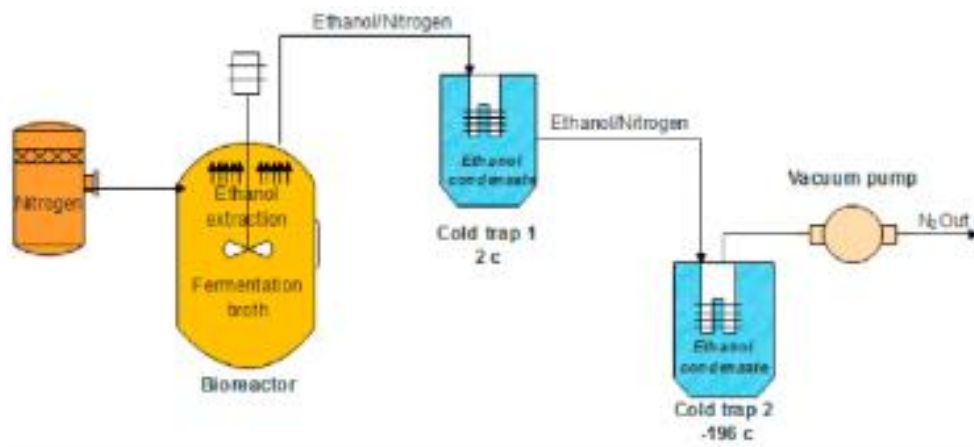


Figura 15: Esquema del proceso integrado de extracción in situ-desgasificación.

Fuente: Zentou, H., Abidin, Z., Yunus, R., Awang Biak, D., & Korelskiy, D. (2019). Overview of alternative ethanol removal techniques for enhancing bioethanol recovery from fermentation broth. *Processes (Basel, Switzerland)*, 7(7), 458.

A partir de un depósito de N_2 se administra este gas a altas temperaturas al tanque de fermentación, para permitir la evaporación del etanol presente en este último. Tanto el etanol evaporado como parte del N_2 añadido pasan a un doble sistema de condensación, donde el primer condensador permite convertir el etanol gas en líquido (a 2°C) y el segundo condensador permite hacer lo propio con el N_2 gas que pasará a estar en estado líquido (a -196°C)

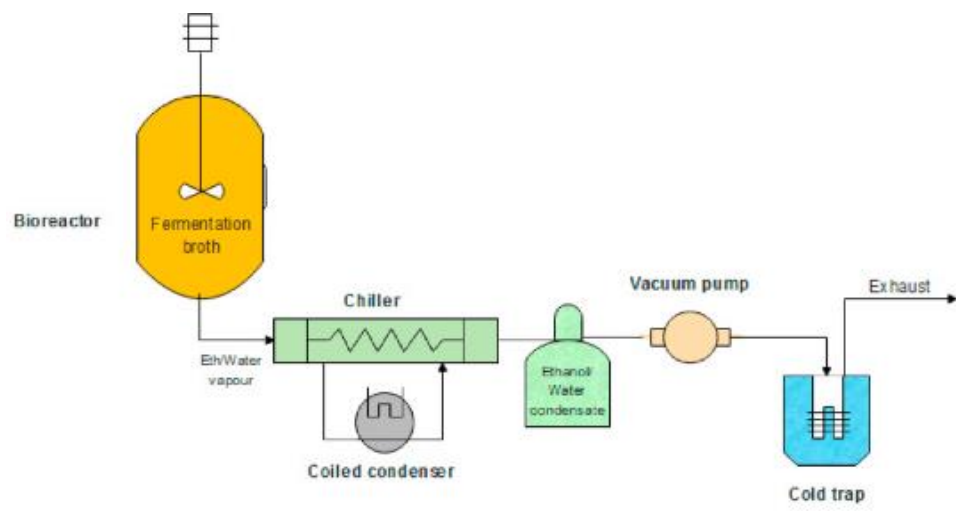


Figura 16: Esquema del proceso de fermentación junto con el sistema de extracción al vacío para la recuperación de etanol.

Fuente: Zentou, H., Abidin, Z., Yunus, R., Awang Biak, D., & Korelskiy, D. (2019). Overview of alternative ethanol removal techniques for enhancing bioethanol recovery from fermentation broth. *Processes (Basel, Switzerland)*, 7(7), 458.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chandel, A. K., Chan, E. S., Rudravaram, R., Narasu, M. L., Rao, L. V., & Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2(1), 14-32.
2. Inambao, F. (Ed.). (2021). Bioethanol technologies. *IntechOpen*. ISBN: 9781839683930
3. Montesinos, A., Huertas Cardozo, J.I. (2017). Usos del biodiésel, bioetanol y biometanol. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. *MéxicoX*. Disponible en <http://hdl.handle.net/11285/631139>
4. RFA (2013). Annual ethanol industry outlook. Renewable Fuels Association [en línea]. <http://www.ethanolrfa.org/pages/rfa-publications>.
5. Niven, R. K. (2005). Ethanol in gasoline: environmental impacts and sustainability review article. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 9(6), 535–555.
6. Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19–27.
7. Álvarez Maciel, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Econinforma*,(359), 63-89.
8. Jeffries, T.W. (1994). Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In: *Ratledge, C. (eds) Biochemistry of microbial degradation*. Springer, Dordrecht.
9. Quintanar G.S., Arana C.A., Mercado F.Y., Gracida R.J. y Téllez J.A. (2012). Effect of particle size and aeration on the biological delignification of corn straw using *Trametes* sp. *BioResour.* 7, 327-344.
10. Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11.
11. Gray, K. A., Zhao, L., & Emptage, M. (2006). Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(2), 141–146.
12. Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., & Wu, Y. V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 40(12), 3693–3700.
13. Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519–546.
14. Teymouri, F., Laureano-Perez, L., Alizadeh, H., & Dale, B. E. (2005). Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, 96(18), 2014–2018.
15. Hu, Z., & Wen, Z. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 38(3), 369–378.
16. Mankar, A. R., Pandey, A., Modak, A., & Pant, K. K. (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresource Technology*, 334(125235), 125235.
17. Duque, A., Manzanares, P., & Ballesteros, M. (2017). Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications. *Renewable Energy*, 114, 1427–1441.

18. Han, S.-Y., Park, C.-W., Endo, T., Febrianto, F., Kim, N.-H., & Lee, S.-H. (2020). Extrusion process to enhance the pretreatment effect of ionic liquid for improving enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Wood Science and Technology*, 54(3), 599–613.
19. Lu, H., Zhang, L., Yan, M., Wang, K., & Jiang, J. (2022). Screw extrusion pretreatment for high-yield lignocellulose nanofibrils (LCNF) production from wood biomass and non-wood biomass. *Carbohydrate Polymers*, 277(118897), 118897.
20. Liu, H., Pang, B., Zhao, Y., Lu, J., Han, Y., & Wang, H. (2018). Comparative study of two different alkali-mechanical pretreatments of corn stover for bioethanol production. *Fuel* (London, England), 221, 21–27.
21. Lu, H., Zhang, L., Liu, C., He, Z., Zhou, X., & Ni, Y. (2018). A novel method to prepare lignocellulose nanofibrils directly from bamboo chips. *Cellulose* (London, England), 25(12), 7043–7051.
22. Flores, E. M. M., Cravotto, G., Bizzi, C. A., Santos, D., & Iop, G. D. (2021). Ultrasound-assisted biomass valorization to industrial interesting products: state-of-the-art, perspectives and challenges. *Ultrasonics Sonochemistry*, 72(105455), 105455.
23. Gallo, M., Ferrara, L., & Naviglio, D. (2018). Application of ultrasound in food science and technology: A perspective. *Foods* (Basel, Switzerland), 7(10).
24. Ong, V. Z., Wu, T. Y., Chu, K. K. L., Sun, W. Y., & Shak, K. P. Y. (2021). A combined pretreatment with ultrasound-assisted alkaline solution and aqueous deep eutectic solvent for enhancing delignification and enzymatic hydrolysis from oil palm fronds. *Industrial Crops and Products*, 160(112974), 112974.
25. Subhedar, P. B., Ray, P., & Gogate, P. R. (2018). Intensification of delignification and subsequent hydrolysis for the fermentable sugar production from lignocellulosic biomass using ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40, 140–150.
26. Barroso Casillas, M. (2010). PRETRATAMIENTO DE BIOMASA CELULÓSICA PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL EN EL MARCO DE UNA BIORREFINERÍA. Universidad Politécnica de Madrid.
27. Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T. I., & Dale, B. E. (2005). Pretreatment of Switchgrass by Ammonia Fiber Explosion (AFEX). *Applied biochemistry and biotechnology*, 124(1–3), 1133–1142.
28. Toquero, C., & Bolado, S. (2014). Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresource Technology*, 157, 68–76.
29. Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2(3), 51–68.
30. Rodríguez-Chong, A., Alberto Ramírez, J., Garrote, G., & Vázquez, M. (2004). Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, 61(2), 143–152.
31. Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R., & Lee, Y. Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96(18), 1959–1966.

32. Xu, Z., Huang, F. Pretreatment Methods for Bioethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol* 174, 43–62 (2014).
33. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686.
34. Jennings, E. W., & Schell, D. J. (2011). Conditioning of dilute-acid pretreated corn stover hydrolysate liquors by treatment with lime or ammonium hydroxide to improve conversion of sugars to ethanol. *Bioresource Technology*, 102(2), 1240–1245.
35. Bensah, E. C., & Mensah, M. (2013). Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: Technologies and innovations. *International Journal of Chemical Engineering*, 2013, 1–21.
36. Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713–3729.
37. McIntosh, S., & Vancov, T. (2011). Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. *Biomass & Bioenergy*, 35(7), 3094–3103.
38. Salocks, C., Karlyn Black, K. (2003). Technical Support Document: Toxicology Clandestine Drug Labs: Methamphetamine - Sodium Hydroxide. *Office of Environmental Health Hazard Assessment*, 1(7), 1-9.
39. Vidal, P. F., & Molinier, J. (1988). Ozonolysis of lignin — Improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass*, 16(1), 1–17.
40. Ben-Ghedalia, D., & Miron, J. (1981). Effect of sodium hydroxide, ozone and sulphur dioxide on the composition and in vitro digestibility of wheat straw. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(3), 224–228.
41. Tsegaye, B., Balomajumder, C. & Roy, P. (2019). Microbial delignification and hydrolysis of lignocellulosic biomass to enhance biofuel production: an overview and future prospect. *Bulletin of the National Research Centre* 43, 51
42. Hutterer, C., Kliba, G., Punz, M., Fackler, K., & Potthast, A. (2017). Enzymatic pulp upgrade for producing high-value cellulose out of a Kraft paper pulp. *Enzyme and microbial technology*, 102, 67–73.
43. Cabas Candama, M.A., Duque Martinez, S. & Cadena Chamorro, E.M. Optimization of Enzymatic Pretreatments to Obtain Fermentable Sugars from Fruit and Vegetable Waste. *Waste Biomass Valor* 11, 5991–6002 (2020).
44. Kumar, R., & Wyman, C. E. (2009). Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology Progress*, 25(2), 302–314.
45. Hammel, K. E., Kapich, A. N., Jensen, K. A., Jr, & Ryan, Z. C. (2002). Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), 445–453.
46. Tuncer, M., Kuru, A., Isikli, M., Sahin, N., & Celenk, F. G. (2004). Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by *Streptomyces* sp. F2621 isolated in Turkey. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), 783–791.

47. Sjulander, N., & Kikas, T. (2020). Origin, impact and control of lignocellulosic inhibitors in bioethanol production—A review. *Energies*, 13(18), 4751.
48. van den Brink, J., de Vries, R.P. (2011). Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 1477–1492
49. Vlasenko, E., Schülein, M., Cherry, J., & Xu, F. (2010). Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. *Bioresource Technology*, 101(7), 2405–2411.
50. Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., & Guimarães, V. M. (2015). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current opinion in food science*, 1, 44–49.
51. de Vries, R. P., & Visser, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 65(4), 497–522.
52. Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 577–591.
53. Grishutin, S. G., Gusakov, A. V., Markov, A. V., Ustinov, B. B., Semenova, M. V., & Sinitsyn, A. P. (2004). Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674(3), 268–281.
54. Tenkanen, M., Makkonen, M., Perttula, M., Viikari, L., & Teleman, A. (1997). Action of *Trichoderma reesei* mannanase on galactoglucomannan in pine kraft pulp. *Journal of Biotechnology*, 57(1–3), 191–204.
55. Bien-Cuong, D., Thi-Thu, D., Berrin, J.G., Haltrich, D., Kim-Anh, T., Sigoillot, J.C., Yamabhai, M. (2009). Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microb Cell Fact* 8, 59.
56. Ojeda, K., Sánchez, E., El-Halwagi, M., & Kafarov, V. (2011). Exergy analysis and process integration of bioethanol production from acid pre-treated biomass: Comparison of SHF, SSF and SSCF pathways. *Chemical Engineering Journal* (Lausanne, Switzerland: 1996), 176–177, 195–201.
57. Nisha, M., Saranyah, K., Shankar, M., Saleena, L.M. (2017). Enhanced saccharification of lignocellulosic agricultural biomass and increased bioethanol titre using acclimated *Clostridium thermocellum* DSM1313. *3 Biotech* 7, 35.
58. Periyasamy, S., Beula Isabel, J., Kavitha, S., Karthik, V., Mohamed, B. A., Gizaw, D. G., Sivashanmugam, P., & Aminabhavi, T. M. (2023). Recent advances in consolidated bioprocessing for conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol – A review. *Chemical Engineering Journal* (Lausanne, Switzerland: 1996), 453(139783), 139783.
59. Talebnia, F., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101(13), 4744–4753.
60. Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61.

61. Dien, B.S., Cotta, M.A. & Jeffries, T.W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 258–266.
62. da Silva Filho, E. A., de Melo, H. F., Antunes, D. F., dos Santos, S. K. B., do Monte Resende, A., Simões, D. A., & de Moraes, M. A., Jr. (2005). Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(10), 481–486.
63. N. Glazer, A., Nikaido, H. (2007). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology* (2nd ed.). *Cambridge University Press*
64. Panchal, C. J., & Stewart, G. G. (1980). The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. *Journal of the Institute of Brewing*. Institute of Brewing (Great Britain), 86(5), 207–210.
65. Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2010). Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88, 381–388.
66. Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R., & Boyce, A. N. (2014). Bioethanol production from fermentable sugar juice. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 957102.
67. Liu, R., & Shen, F. (2008). Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresource Technology*, 99(4), 847–854.
68. Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass & Bioenergy*, 47, 395–401.
69. Staniszewski, M., Kujawski, W., & Lewandowska, M. (2007). Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product – Kinetic model predictions. *Journal of Food Engineering*, 82(4), 618–625.
70. Brigham, C., Department of Bioengineering University of Massachusetts, Dartmouth, 285 Old Westport Road, North Dartmouth, MA 02747, USA, & Macedo, N. (2014). From beverages to biofuels: The journeys of ethanol-producing microorganisms. *International journal of biotechnology for wellness industries*, 3(3), 79–87.
71. Liu, C.-G.; Qin, J.-C.; Lin, Y.-H. (2017). Fermentation and Redox Potential. In *Fermentation Processes*; Jozala, A. F., Ed.; IntechOpen: Rijeka.
72. Abu-Saied, M.A., Taha, T.H., Elnaggar, E.M., Amer, R.A., Mansy, A.E., Elkady, G.M. (2018). Green production of bio-ethanol from cellulosic fiber waste and its separation using polyacrylonitrile-co-poly methyl acrylate membrane. *Cellulose* 25, 6621–6644.
73. Choi, G.-W., Um, H.-J., Kang, H.-W., Kim, Y., Kim, M., & Kim, Y.-H. (2010). Bioethanol production by a flocculent hybrid, CHFY0321 obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. *Biomass & Bioenergy*, 34(8), 1232–1242.

74. Govender, P., Domingo, J. L., Bester, M. C., Pretorius, I. S., & Bauer, F. F. (2008). Controlled expression of the dominant flocculation genes FLO1, FLO5, and FLO11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 6041–6052.
75. Duarte, J.C., Rodrigues, J.R., Moran, P.S., Valença, G.P., Nunhez, J.R. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express* 3, 31.
76. Vucurovic, V., M., Razmovski, R., N., & Popov, S., D. (2009). Ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilised on corn stem ground tissue. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 116, 315–322.
77. Claassen, P., van Lier, J., Lopez Contreras, A. van Niel, E.W.J., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., de Vries, S.S., Weusthuis, R.A. (1999). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 741–755.
78. Todhanakasem, T., Sangsutthiseree, A., Areerat, K., Young, G. M., & Thanonkeo, P. (2014). Biofilm production by *Zymomonas mobilis* enhances ethanol production and tolerance to toxic inhibitors from rice bran hydrolysate. *New Biotechnology*, 31(5), 451–459.
79. Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T., & Goksungur, Y. (2014). Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydrate Polymers*, 99, 454–461.
80. Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T., Sawayama, S. (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 37–53.
81. Kötter, P., Ciriacy, M. (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 776–783.
82. Batt, C. A., Caryallo, S., Easson, D. D., Jr, Akedo, M., & Sinskey, A. J. (1986). Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(4), 549–553.
83. Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Carneiro, L. M., & Teixeira, J. A. (2012). Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy*, 92, 763–768.
84. Karakashev, D., Thomsen, A.B. & Angelidaki, I. (2007). Anaerobic biotechnological approaches for production of liquid energy carriers from biomass. *Biotechnology Letters* 29, 1005–1012.
85. Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C.F., Hahn-Hagerdal, B. (2000). Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3381–3386.
86. Johansson, B., Christensson, C., Hobbey, T., Hahn-Hägerdal, B. (2001). Xylulokinase overexpression in two strains of *saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4249–4255.
87. Kruckeberg, A.L. (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 166, 283–292.

88. Leandro, M. J., Gonçalves, P., & Spencer-Martins, I. (2006). Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. *The Biochemical Journal*, 395(3), 543–549.
89. Runquist, D., Fonseca, C., Rådström, P., Spencer-Martins, I., Hahn-Hägerdal, B. (2009). Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 123–130.
90. Walfridsson, M., Hallborn, J., Penttilä, M., Keränen, S., & Hahn-Hägerdal, B. (1995). Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4184–4190.
91. Metzger, M.H., Hollenberg, C.P. (1994). Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* transketolase gene and expression in a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42, 319–325.
92. Kumari, R., Pramanik, K. (2013). Bioethanol Production from *Ipomoea Carnea* Biomass Using a Potential Hybrid Yeast Strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 771–785.
93. Nuwamanya, E., Chiwona-Karlton, L., Kawuki, R.S., Baguma, Y. (2012). Bio-Ethanol Production from Non-Food Parts of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *AMBIO* 41, 262–270.
94. Tanimura, A., Nakamura, T., Watanabe, I., Ogawa, J., Shima, J. (2012). Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. *SpringerPlus* 1, 27.
95. Chandrakant, P., & Bisaria, V. S. (1998). Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. *Critical Reviews in Biotechnology*, 18(4), 295–331.
96. Karagöz, P., & Özkan, M. (2014). Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system. *Bioresource Technology*, 158, 286–293.
97. O'Reilly, A. M., & Scott, J. A. (1995). Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(7), 636–646.
98. Fu, N., Peiris, P., Markham, J., & Bavor, J. (2009). A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(3), 210–217.
99. Zentou, H., Abidin, Z., Yunus, R., Awang Biak, D., & Korelskiy, D. (2019). Overview of alternative ethanol removal techniques for enhancing bioethanol recovery from fermentation broth. *Processes* (Basel, Switzerland), 7(7), 458.
100. Vane, L. M. (2008). Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining: Biofpr*, 2(6), 553–588.
101. Serra, A., Poch, M., Sola, C. (1988). A survey of separation systems for fermentation ethanol recovery. *Process Biochemistry*, 22(5), 154–158.
102. Huang, H.-J., Ramaswamy, S., Tschirner, U. W., & Ramarao, B. V. (2008). A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, 62(1), 1–21.

103. Liu, H.-S., & Hsien-Wen, H. (1990). Analysis of gas stripping during ethanol fermentation—I. In a continuous stirred tank reactor. *Chemical Engineering Science*, 45(5), 1289–1299.
104. Huang, H., Qureshi, N., Chen, M.-H., Liu, W., & Singh, V. (2015). Ethanol production from food waste at high solids content with vacuum recovery technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2760–2766.