



UNIVERSIDAD DE BURGOS

Facultad de Ciencias, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Estudio de la valorización de residuos de maíz mediante la obtención de bioetanol

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Seguridad y Biotecnología Alimentarias

Autor: Helena Candela Gil

Tutores: Alba Ester Illera Gigante, María Teresa Sanz Díez

Curso académico: 2022/2023

Agradecimientos

Este Trabajo Fin de Máster ha sido realizado en el marco de los siguientes proyectos de investigación del grupo Biotecnología Industria y Medioambiental (BIOIND) de la Universidad de Burgos.

TED2021-129311B-I00 - Tecnologías verdes basadas en el empleo de fluidos presurizados para valorizar biomasa lignocelulósica mediante la producción de furfural, financiado por la Agencia Estatal de Investigación.

PDC2022-133443-I00 – Diseño de un prototipo para la extracción de bioproductos con agua subcrítica, financiado por la Agencia Estatal de Investigación.

PID2022-136385OB-I00 Nuevas estrategias para la producción de ácido láctico de segunda generación empleando tecnologías emergentes basadas en fluidos presurizados, financiado por la Agencia Estatal de Investigación.

Índice

1.	INTRODUCCIÓN	2
2.	OBJETIVOS	4
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1	Biomasa y obtención	5
3.2	Hidrólisis con subW	5
3.3	Hidrólisis enzimática.....	5
3.4	Fermentación alcohólica	6
3.5	Pervaporación.....	7
3.5.1	Estudio de la separación de etanol en mezclas sintéticas etanol + agua.....	7
3.5.2	Pervaporación de los caldos de fermentación	8
3.5.3	Parámetros para la caracterización de los procesos de pervaporación	8
3.6	Métodos analíticos.....	9
3.6.1	Determinación de componentes estructurales. Lignina y carbohidratos	9
3.6.2	Análisis mediante HPLC	9
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1.	Caracterización de la biomasa.....	10
4.2	Hidrólisis enzimática.....	10
4.2.1	Biomasa sin tratar.....	10
4.2.2	Biomasa sometida a tratamiento con subW.....	11
4.3	Fermentación	12
4.4	Pervaporación.....	14
4.4.1	Optimización de los parámetros de operación empleando mezclas sintéticas.....	14
4.4.2	Pervaporación del fermentado.....	19
4.4.3	Fermentación y pervaporación simultánea (SFP).....	20
5.	CONCLUSIONES	23
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	24

Resumen

El rastrojo de maíz es un residuo agrícola muy abundante y con alto contenido en carbohidratos; lo que hace que la valorización de este subproducto lignocelulósico sea una opción industrialmente interesante para el desarrollo de la economía circular y la reducción del uso de combustibles fósiles. Investigaciones anteriores en el grupo de investigación han estudiado la posibilidad de producción de furfural a partir de esta biomasa mediante el uso de agua en condiciones subcríticas (subW). Con el fin de llevar a cabo un aprovechamiento integral, en este trabajo se estudió la producción de bioetanol a partir del residuo sólido del rastrojo de maíz tratado con subW y su recuperación mediante pervaporación. Para ello, se realizó una hidrólisis enzimática del rastrojo de maíz sin tratar, así como tratado previamente con subW mediante el cóctel enzimático *Celluclast* 1.5 L. La concentración de glucosa liberada al hidrolizado fue muy superior en la biomasa tras subW, debido a la eliminación de las hemicelulosas y a la mayor accesibilidad de la celulosa. El hidrolizado se empleó como sustrato para la fermentación alcohólica catalizada por Ethanol Red®, obteniendo unos rendimientos industrialmente atractivos. Con el fin de recuperar el etanol producido, se recurrió a dos membranas organofílicas (POMS -polioctimetil siloxano- y silicona) para optimizar los parámetros del proceso tales como el tipo de membranas, la temperatura de trabajo y la concentración de etanol en la alimentación. En este conjunto de experimentos se determinó que las condiciones óptimas eran el empleo de la membrana de silicona a 54 °C. Por último, con el objetivo de reducir el tiempo de operación, se llevó a cabo una fermentación y pervaporación simultánea (SFP). En este experimento se determinó que esta estrategia presentaba un rendimiento similar a la fermentación y pervaporación secuencial. Por tanto, los resultados de este trabajo parecen indicar que se puede alcanzar un aprovechamiento integral del rastrojo de maíz dando lugar a productos de valor como el furfural y el etanol en unos valores industrialmente competitivos.

Abstract

Corn stover is a very abundant agricultural waste with a high carbohydrate content, which makes the valorisation of this lignocellulosic biomass an industrially interesting option for the development of the circular economy and the reduction of the use of fossil fuels. Previous works in the research group have studied the furfural production from this biomass using water in its subcritical state (subW). In order to carry out an integral valorization, in this work, it was studied the production of bioethanol from the solid residue of corn stover treated with subW and its recovery by pervaporation. For this purpose, enzymatic hydrolysis of untreated corn stover as well as pretreated with subW corn stover was performed using *Celluclast* 1.5 L enzyme cocktail. The concentration of glucose released into the hydrolysate was much higher in the biomass after subW, due to the removal of hemicelluloses and the increased accessibility of cellulose. The hydrolysate was used as a substrate for alcoholic fermentation catalysed by Ethanol Red®, obtaining industrially attractive yields. In order to recover the bioethanol produced, two organophilic membranes (POMS -polyoctimethyl siloxane- and silicone) were used to optimise process parameters such as membrane type, working temperature and ethanol concentration in the feed. In this set of experiments, the optimal conditions were determined to be the use of the silicone membrane at 54 °C. Finally, in order to reduce the operation time, a simultaneous fermentation and pervaporation (SFP) was carried out. In this experiment, it was determined that this strategy presented a similar yield to the sequential fermentation and pervaporation. Therefore, the results of this work seem to indicate that an integral valorization of corn stover can be achieved resulting in valuable products such as furfural and ethanol at industrially competitive values.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, se está produciendo una emergencia climática causada principalmente por el uso de combustibles fósiles y su consecuente emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera para generar energía. A su vez, estos combustibles fósiles se están consumiendo a mayor velocidad que a la que se generan, lo que ha aumentado drásticamente su coste en los últimos años (Qiao, J *et al.*, 2022; Singh, N *et al.*, 2022).

La biorrefinería se plantea como una alternativa sostenible para el desarrollo de una economía circular, basada en el uso de recursos renovables. Esta consiste en un conjunto de procesos de conversión de biomasa y equipamiento para producir combustibles, energía y productos químicos (Alonso-Riaño, P *et al.*, 2022a).

Uno de los residuos más abundantes es la biomasa lignocelulósica, que consiste principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina; debido a su composición, esta biomasa se puede utilizar como fuente de energía sostenible para la generación de energía limpia y respetuosa con el medio ambiente (Qiao, J *et al.*, 2022). Dentro de la biomasa lignocelulósica, destaca el rastrojo de maíz, ya que es uno de los residuos agrícolas más comunes y presenta un alto contenido en carbohidratos (Gao, L *et al.*, 2018).

Sin embargo, la composición de la biomasa lignocelulósica plantea importantes desafíos para la utilización eficaz de la biomasa debido a las interacciones entre los tres componentes principales: la lignina se asocia con celulosa o hemicelulosa para formar una red de pared celular que es extremadamente recalcitrante para la penetración y degradación de enzimas (Gao, L *et al.*, 2018; Luo, Y *et al.*, 2019). No obstante, mediante tratamientos termoquímicos, enzimáticos y/o microbianos, los componentes de la biomasa pueden hidrolizarse para producir bioproductos de interés (Singh, N *et al.*, 2022).

Dentro de los procesos termoquímicos, destacamos los tratamientos hidrotermales, como el agua en condiciones subcríticas (subW). subW es agua en estado líquido en el rango de temperatura desde 100 °C hasta 374 °C que presenta propiedades especiales como un producto iónico más alto y una constante dieléctrica más baja que en condiciones ambientales, promoviendo reacciones de hidrólisis y una mayor solubilidad de compuestos orgánicos (Alonso-Riaño, P *et al.*, 2022b). Durante el tratamiento con subW en condiciones suaves (160 – 210 °C), la fracción de hemicelulosas se solubiliza en su mayor parte, de manera que los azúcares presentes en esta fracción se liberan (como oligómeros y/o monómeros) y el sólido restante se enriquece en celulosa y lignina (Alonso-Riaño, P *et al.*, 2022b). Los azúcares mayoritarios en la fracción de hemicelulosas son pentosas, sobre todo xilosa. El principal producto de degradación en subW de las pentosas es su producto de deshidratación, furfural (2-furaldehído). El furfural es considerado por el Departamento de Energía de EE. UU (DOE) como uno de los 12 productos con mayor valor agregado. El furfural es un aldehído industrial generado a partir de la hidrólisis y deshidratación consecutiva de pentosanos que conforman la lignocelulosa (Lee, C. B. T. L *et al.*, 2021). Para aumentar el rendimiento de obtención de furfural, es necesario el empleo de catalizadores químicos, dando buenos resultados los cloruros de metales trivalentes. Estos procesos catalíticos hidrotermales, conducen a una fracción líquida con el furfural formado a partir de hemicelulosas y a un sólido enriquecido en celulosa.

El aumento de contenido de celulosa en el residuo sólido tras el tratamiento con subW convierte a esta biomasa en un sustrato idóneo para la producción de etanol. La biomasa puede someterse a un proceso de hidrólisis enzimática (sacarificación) para la liberación de monómeros de glucosa y que estos se empleen para la formación de bioetanol mediante un proceso de fermentación.

El bioetanol se considera uno de los recursos renovables sostenibles más prometedores, ya que es apto para reducir las emisiones de dióxido de carbono y el consumo de energía fósil con una tecnología relativamente simple (Melendez, J. R *et al.*, 2022).

No obstante, la producción de etanol de primera generación (a partir de cultivos ricos en azúcar y almidón) supone una competencia por el uso de los cultivos entre la producción de combustible y la alimentación; la producción de etanol de segunda generación (a partir de residuos lignocelulósicos) resuelve dicho conflicto (Qiao, J *et al.*, 2022).

Existen diferentes estrategias para la producción de etanol a partir de la celulosa, siendo las principales la sacarificación y fermentación simultánea (SSF) y la sacarificación y fermentación consecutivas (SHF). La principal ventaja de la SHF sobre la SSF es que en la primera se pueden ajustar las condiciones óptimas de la enzima y la levadura en cada etapa (en torno a 50 °C para la hidrólisis enzimática y 28 °C para la fermentación de levadura), aumentando el rendimiento del proceso (Alonso-Riaño, P *et al.*, 2022b).

Una vez generado el bioetanol, este debe recuperarse para su posterior utilización. Para ello, existen diferentes técnicas alternativas a la destilación convencional que conducen a mayores factores de separación. Las estrategias de separación para corrientes con etanol diluido incluyen técnicas tales como la pervaporación, la separación de gases, la permeabilización de vapores, la adsorción o la extracción líquido-líquido (Vane, L. M., 2008).

Entre estas técnicas, en este trabajo se opta por el estudio del potencial de la pervaporación para la recuperación del etanol producido a partir de los caldos de fermentación del residuo sólido del rastrojo de maíz tratado con subW. La pervaporación es un proceso de separación por membranas en el que se combinan la permeación y la evaporación. Consiste en poner en contacto una corriente de alimentación líquida con una cara de una membrana porosa o no porosa; al otro lado de la membrana se aplica un vacío que genera una corriente de vapor permeado (Vane, L. M., 2008). Por tanto, es un proceso de separación basado en la interacción membrana-soluto en el que las moléculas afines difunden a través de la membrana y cambian a fase vapor como se muestra en la *Figura 1*.

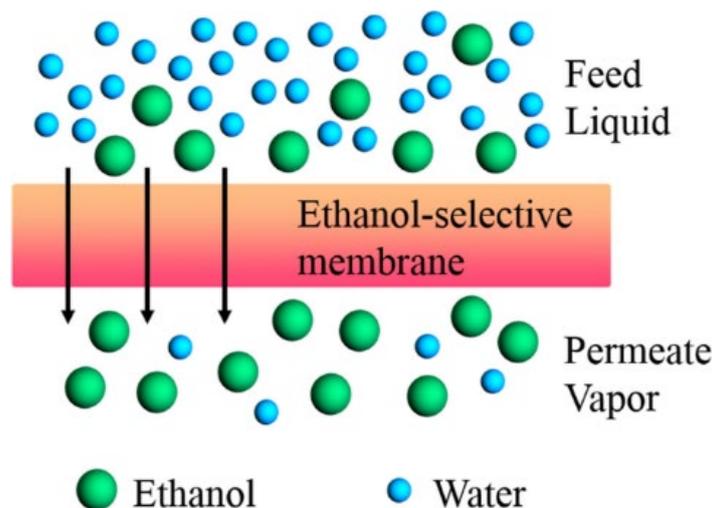


Figura 1. Fundamentos de la pervaporación (Peng, P et al., 2021).

En este trabajo se proponen dos estrategias para la producción y separación de bioetanol a partir del residuo sólido generado tras tratamiento mediante catálisis en subW de los residuos de maíz:

- (1) Etapas consecutivas: sacarificación + fermentación + separación por pervaporación.
- (2) Proceso híbrido que combina la fermentación y la separación en una única etapa.

Además, se comparará el efecto del tratamiento de subW en los procesos de sacarificación llevando a cabo la hidrólisis enzimática directa en el residuo maíz. Un esquema de las diferentes estrategias planteadas se recoge en la *Figura 2*.

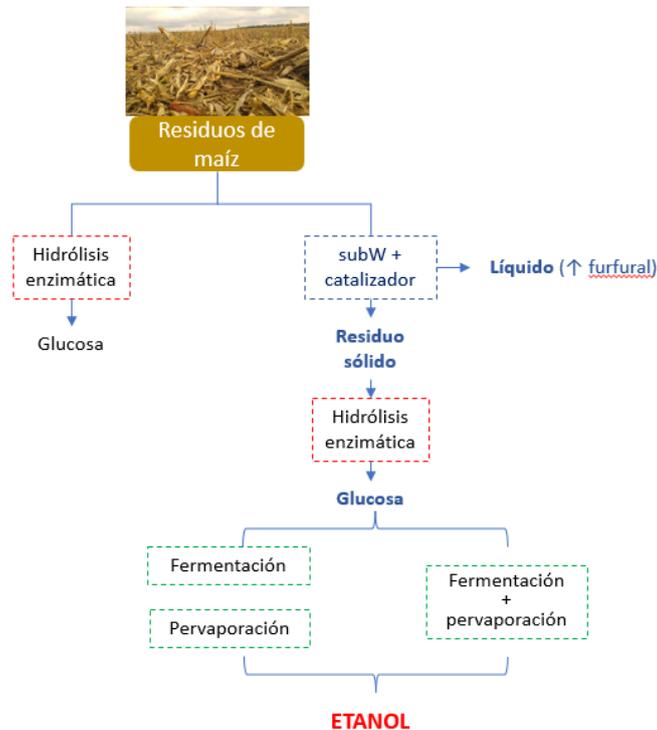


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso

2. OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo es lograr el aprovechamiento integral del rastrojo de maíz tras la producción de furfural para su valorización mediante la obtención de bioetanol. Para alcanzar este objetivo principal, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- I. Investigar el efecto de la concentración de biomasa y el tratamiento con subW para la liberación de monómeros de glucosa mediante una hidrólisis enzimática a partir del rastrojo de maíz.
- II. Estudiar la recuperación de bioetanol mediante el empleo de membranas de pervaporación organofílicas y la optimización de los parámetros del proceso.
- III. Analizar la efectividad y rendimiento de una estrategia de fermentación y pervaporación simultánea (SFP) con el objetivo de reducir el tiempo de operación y aumentar la productividad

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Biomasa y obtención

La materia prima empleada en este trabajo ha sido obtenida de la cosecha de maíz del año 2022 en Palencia, Castilla y León. Se separaron las mazorcas de los tallos y hojas; se secaron a temperatura ambiente hasta humedad constante y se trituraron hasta un tamaño menor a 2 mm. Se determinó la humedad y se realizó la caracterización de la biomasa de acuerdo con los protocolos del National Renewable Energy Laboratory (NREL) ((Sluiter, A *et al.*, 2004).

Para este estudio se escogieron los residuos conformados por tallos y hojas de maíz ya que presentaban una mayor proporción de hemicelulosas (ver sección 4.1). La humedad de este material fue del 6 %.

3.2 Hidrólisis con subW

La primera etapa que se plantea en este trabajo es el proceso de valorización de los residuos de maíz mediante catálisis en subW para la obtención de furfural. Este proceso ya ha sido optimizado en el grupo de investigación y se recoge brevemente a continuación. Se realizó un tratamiento de la biomasa consistente en una hidrólisis con subW con el objetivo de extraer las hemicelulosas y así hacer más accesibles las celulosas del material. El tratamiento con subW se llevó a cabo en un reactor discontinuo de 0,5 L de capacidad máxima, rodeado con una camisa calefactora (230 V y 400 W) para alcanzar y mantener la temperatura de trabajo. En el interior del reactor se sitúa un sensor Pt100 conectado a un sistema PID que registra la temperatura durante el proceso. A su vez, para obtener la presión necesaria, se introduce un gas presurizado (CO₂) a través de una conducción de alta presión.

Para llevar a cabo el tratamiento, se introdujeron 24 g de biomasa en el reactor, se añadió CrCl₃·6H₂O como catalizador en un 2 % respecto a la xilosa de la biomasa y se completó con 300 mL de agua (8 % p/v de biomasa). La mezcla se calentó hasta 180 °C y se sometió a una presión de 50 bar con CO₂ durante 60 min. Tras el tratamiento con subW se obtiene una fracción líquida y otra sólida, ambas se almacenan en refrigeración para posteriores análisis. La fracción sólida, la cual fue utilizada en este trabajo, fue sometida a sucesivos lavados con agua destilada para asegurar la eliminación de furfural y otros ácidos orgánicos que pueden interferir en la fermentación.

3.3 Hidrólisis enzimática

Para obtener monosacáridos fermentables, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática en los dos sustratos de interés: biomasa sin tratar y biomasa después de la hidrólisis en subW. Para ello, se empleó *Celluclast* 1.5 L, un cóctel celulolítico proporcionado por Novozymes A/S y cuya actividad enzimática consiste en la hidrólisis de los enlaces (1,4)-beta-D-glucosídicos en celulosa y otros beta-D-glucanos en moléculas de glucosa libre. Se trata de un cóctel de celulasas líquidas con una densidad 1,2 g/mL y una actividad de endoglucanasas de 700 unidades/g. Su actividad en unidades de papel de filtro (FPU) se determinó de acuerdo con el procedimiento estándar del NREL como 53,7 FPU/mL y se empleó de una actividad de 45 FPU/g para realizar la hidrólisis (Alonso-Riaño, P *et al.*, 2022b).

Respecto a la biomasa sin tratar, se realizaron 2 hidrólisis enzimáticas con concentraciones de biomasa del 8 % y 5 % peso seco/volumen.

Por otra parte, respecto a la biomasa después del tratamiento con subW, se realizó una única hidrólisis enzimática al 8 % peso seco/volumen. La humedad del residuo sólido tras subW (87,6 %) fue determinada mediante el equipo Ohaus MB120 Moisture Analyzer.

Todas las hidrólisis se llevaron a cabo a una temperatura constante de 50 °C en reactores encamisados de 500 mL y agitación magnética. Se tomaron muestras a diferentes tiempos para determinar la cinética de la reacción. Para detener la hidrólisis en las muestras tomadas, la enzima se inactivó mediante un tratamiento térmico a 100 °C durante 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas (Thermo Scientific Microcentrífuga Sorvall™ Legend™ Micro 17R) y filtradas con un filtro de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro (Scharlab) antes de su análisis mediante HPLC.

Las hidrólisis se detuvieron mediante tratamiento térmico (100 °C, 5 min) cuando el contenido de glucosa era estable y, tras centrifugación, se almacenaron en refrigeración tanto la fracción sólida como la líquida para posteriores estudios.

El proceso de la hidrólisis enzimática se evaluó mediante el rendimiento de conversión a glucosa, que es la relación entre la cantidad de glucosa liberada al medio y el máximo rendimiento potencial de glucanos obtenido a partir de la caracterización del sólido (Ecuación 1):

$$\text{Rendimiento}_{\text{glucosa}} (\%) = \frac{\text{Glucosa en el hidrolizado enzimático}}{\text{Glucosa en el residuo sólido}} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

3.4 Fermentación alcohólica

El hidrolizado enzimático obtenido en la etapa anterior (fase líquida) se empleó como sustrato para producir bioetanol debido a las unidades de glucosa libre. Para ello, se empleó la levadura Ethanol Red®, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* desarrollada para la producción industrial de etanol y proporcionada por Lesaffre.

La cepa se incubó a 28 °C durante 48 h y se mantuvo a 4 °C en un medio sólido compuesto por glucosa 10 g/L, peptona 5 g/L, extracto de malta 3 g/L, extracto de levadura 3 g/L y agar 20 g/L. El pre-inóculo se preparó mediante la transferencia de una colonia de levadura procedente del medio sólido a 10 mL de medio líquido esterilizado (similar al medio sólido excepto por la ausencia de agar) y se incubó a 28 °C y 180 rpm durante 24 h. El inóculo se preparó transfiriendo el pre-inóculo a 40 mL de medio líquido; el inóculo se incubó a 28 °C y 180 rpm durante 14 h.

Para llevar a cabo la fermentación, se preparó por duplicado un volumen final de 140 mL de reactivos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, que se incubó a 28 °C y 180 rpm. Se empleó una disolución de suplementación que se disuelve directamente en el hidrolizado con el objetivo de evitar la dilución de los azúcares. La suplementación está compuesta por (NH₄)₂HPO₄ 80 g/L, (NH₄)₂SO₄ 40 g/L, MgSO₄·7H₂O 20 g/L y extracto de levadura 100 g/L; la disolución es ajustada a un pH de 5,5.

La reacción de fermentación está compuesta por hidrolizado enzimático (85 % v/v), disolución de suplementación (5 %) y el volumen de inóculo que garantiza obtener una concentración de 0,2 g/L al inicio de la fermentación. El volumen es ajustado con una solución de NaCl 0,9 % v/v.

Se midió la densidad óptica de la biomasa (λ = 620 nm) y se determinó la concentración de esta mediante el empleo de una curva de calibrado realizada previamente en el grupo de investigación.

Se tomaron muestras periódicamente para determinar la concentración de azúcares y etanol, así como la densidad óptica de la biomasa; la fermentación se detuvo a las 48 h. Las muestras fueron centrifugadas y filtradas con un filtro de jeringa de 0,22 μm de tamaño de poro (Scharlab) antes de su análisis mediante HPLC.

El proceso de la fermentación se evaluó mediante el rendimiento de la producción de etanol, que es la relación entre la cantidad de etanol producido y la glucosa inicial presente en el caldo de fermentación (Ecuación 2):

$$Rendimiento_{etanol} (\%) = \frac{Etanol\ producido}{Glucosa_{caldo} * 0.511} * 100 \quad (Ec.2)$$

3.5 Pervaporación

Se estudiaron dos membranas poliméricas organofílicas durante este trabajo: una membrana cuya capa selectiva está conformada por polioctimetil siloxano (POMS) y otra membrana cuya capa selectiva estaba compuesta de silicona (10 % Deh 940 anf), proporcionadas por Helmholtz-Zentrum Hereon.

El equipo de pervaporación se muestra en la *Figura 3* y está conformado por un tanque de alimentación encamisado en el que se introduce un agitador (IKA® RW 16 basic overhead stirrer), una bomba peristáltica (qdos30 Watson Marlow) y una celda de pervaporación de acero inoxidable de Sulzer Chemtech® para membranas con un área efectiva de 170 cm². Este sistema proporciona un flujo radial de alimentación sobre la superficie de la membrana con un caudal fijado en 102 kg/h. La temperatura del líquido de alimentación fue controlada mediante un termostato que calentaba el tanque encamisado. Además, en el equipo se acopla un serpentín con agua en circulación como refrigerante para la condensación de posibles vapores.

Por otra parte, el sistema se conectó en el lado del permeado a 2 trampas de vidrio paralelas en las que se condensa el permeado mediante el empleo de nitrógeno líquido. La presión del permeado se mantuvo constante a 3 mbar utilizando una bomba de vacío (Edwards RV12) y un controlador de vacío (CVC-3000).

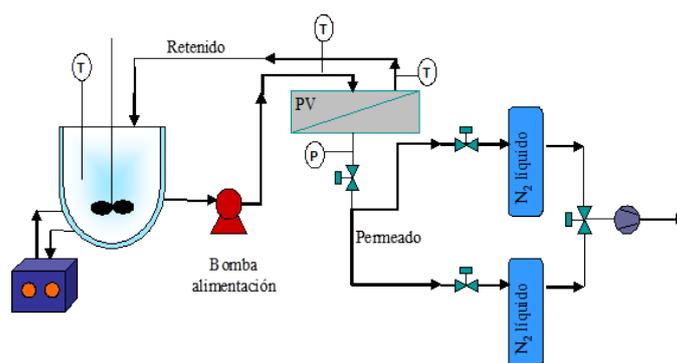


Figura 3. Esquema del equipo de pervaporación

3.5.1 Estudio de la separación de etanol en mezclas sintéticas etanol + agua.

En primer lugar, se estudió la efectividad de las dos membranas hidrofóbicas para la separación selectiva de etanol empleando mezclas binarias etanol + agua. Se estudió la selectividad de las membranas a diferentes temperaturas entre 30 °C y 55 °C utilizando únicamente agua como alimentación, así como una disolución de etanol-agua (15 g/L).

Posteriormente, se estudió el comportamiento de la membrana más selectiva (silicona) a temperatura óptima (54 ± 1 °C) a diferentes concentraciones de disoluciones etanol-agua (1,5, 3, 6, 12, 15, 25, 35 y 45 g/L). Ambos experimentos se llevaron a cabo en un reactor encamisado de 5 L con un volumen final de 3 L, para trabajar con una relación V/A elevada, de forma que la concentración en el reactor se puede considerar constante debido al pequeño volumen de permeado recogido.

3.5.2 Pervaporación de los caldos de fermentación

Para la recuperación de etanol de los fermentados se empleó un reactor encamisado de 0,5 L de capacidad con un volumen final de 260 mL. De esta forma se reduce la relación V/A para conseguir una recuperación adecuada del etanol generado en los procesos de fermentación. Se realizaron dos experiencias:

1. Pervaporación del caldo de fermentación obtenido en una etapa previa. En este ensayo se trabajó a una temperatura constante de 49 ± 3 °C hasta que la concentración de la alimentación fue inferior a 1,3 g/L (duración del proceso 3 h).
2. Se realizó un nuevo experimento consistente en una fermentación y pervaporación simultánea. El caldo estaba compuesto por hidrolizado enzimático (85 % v/v), disolución de suplementación (5 %) y el volumen de inóculo que garantiza obtener una concentración de 0,2 g/L al inicio de la fermentación. El volumen se ajustó con una solución de NaCl 0,9 % v/v. Se trabajó a la temperatura óptima del proceso de fermentación, 28 °C. El proceso de pervaporación comenzó tras 4 h, tiempo en el que terminó el proceso de adaptación del microorganismo.

En todos los casos, se tomaron muestras de la alimentación y el condensado que fueron filtradas con un filtro de jeringa de 0,22 μm de tamaño de poro (Scharlab) y analizadas mediante HPLC.

3.5.3 Parámetros para la caracterización de los procesos de pervaporación

El flujo total de permeado se evaluó considerando la cantidad de permeado, el tiempo y el área de membrana tal y como se observa en la *Ecuación 3*.

$$J_{total} = \frac{\text{cantidad permeado (g)}}{\text{tiempo (h)} * \text{área membrana (m}^2\text{)}} \quad (\text{Ec. 3})$$

El flujo de etanol fue calculado a partir del flujo total de permeación y la fracción másica del etanol del permeado de acuerdo con la *Ecuación 4*:

$$J_{etoh} = J_{total} * w_{etoh} \quad (\text{Ec. 4})$$

El rendimiento de separación de las membranas de pervaporación se comprobó mediante el factor de enriquecimiento (β), definido para el etanol como la relación entre su concentración en el permeado y la alimentación (*Ecuación 5*):

$$\beta = w_{etoh,permeado} / w_{etoh,alimentación} \quad (\text{Ec. 5})$$

Por último, el rendimiento de las membranas se evaluó mediante el índice de separación por pervaporación (PSI), que es la relación de compromiso entre el flujo de permeación y el factor de separación alimentación (*Ecuación 6*):

$$PSI = J_{total} * \beta \quad (\text{Ec. 6})$$

3.6 Métodos analíticos

3.6.1 Determinación de componentes estructurales. Lignina y carbohidratos

La caracterización de la biomasa se realizó según los protocolos del NREL (Sluiter, A *et al.*, 2004). Este procedimiento utiliza una hidrólisis ácida de dos pasos en la que se emplea una solución de ácido sulfúrico 72 % p/p para llevar a cabo una hidrólisis primaria, seguida de una dilución con agua hasta alcanzar una solución de ácido sulfúrico 4 % y una hidrólisis secundaria a alta temperatura (autoclave a 121 °C durante 60 min).

Durante la hidrólisis, la lignina se fracciona en material insoluble en ácido y material soluble en ácido, que se miden por separado. El material insoluble en ácido, se considera lignina de alto peso molecular; este se filtra al vacío y se mide gravimétricamente tras incineración en mufla 24 h. Por su parte, la lignina soluble en ácido se considera lignina de bajo peso molecular, medible por espectrofotometría ($\lambda = 240$ nm).

Los carbohidratos estructurales, aquellos ligados a la estructura de la biomasa, se hidrolizan en azúcares monoméricos, que son solubles en la solución de hidrólisis y fácilmente cuantificables por HPLC. Para ello, después de determinar la densidad óptica de las muestras, estas son llevadas a pH 5 mediante la adición de CaCO_3 .

Se realizó la caracterización de los sólidos generados a partir del tratamiento con subW y tras la hidrólisis enzimática, así como de la biomasa sin tratar. Las muestras sólidas son preparadas a partir de 0,3 g de materia y 3 mL de H_2SO_4 72 %; las muestras líquidas se preparan a partir de 5 mL de muestra y 174 μl de H_2SO_4 72 %. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

3.6.2 Análisis mediante HPLC

La cuantificación de los compuestos hidrolizados, fermentados y permeados se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna Bio-Rad Aminex-HPX-87H (300x7,8 mm, Bio-Rad), un detector de longitud de onda variable (VWD) y un detector de índice de refracción (RID) utilizando una fase móvil constituida por ácido sulfúrico 0,005 M. El detector de columna se mantuvo a 40 °C.

Los monosacáridos y etanol se analizaron directamente a partir de las muestras tomadas previamente filtradas a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm de tamaño de poro (Scharlab).

Los estándares empleados para el análisis por HPLC fueron glucosa (99,5 %), xilosa (99 %), arabinosa (99 %) y furfural (99 %) adquiridos a Sigma Aldrich (España) así como etanol absoluto ($\geq 99,8$ %) adquirido de VWR Chemicals (España).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de la biomasa

En la *Tabla 1*, se muestra la composición de los residuos de maíz empleados en este trabajo: rastrojo de maíz crudo, rastrojo de maíz tratado (subW) y rastrojo de maíz tratado después de hidrólisis enzimática (HE).

Tabla 1. Composición química en porcentaje en peso en base seca del rastrojo de maíz crudo, del rastrojo tratado con subW y del residuo sólido remanente tras la hidrólisis enzimática del rastrojo pretratado con subW al 8% (p/v) de carga de sólidos. Las determinaciones de caracterización se realizaron por duplicado. Las mediciones analíticas se realizaron por triplicado. Los valores se expresan como la media \pm la desviación estándar.

CARACTERIZACIÓN GLOBAL, TALLOS Y HOJAS DE MAÍZ									
Componente	Tallos y hojas de maíz			Residuo subW		Residuo HE			
Lignina	25,6	\pm	0,8	31	\pm	2	56	\pm	1,0
Lignina soluble	7,7	\pm	0,1	3,6	\pm	0,1	4,9	\pm	0,1
Lignina insoluble	17,9	\pm	0,7	27	\pm	2	51,0	\pm	0,9
Glucanos	44	\pm	2	59	\pm	3	4,2	\pm	0,4
Hemicelulosa	28	\pm	1	3,7	\pm	0,1	3,1	\pm	0,1
Xilanos	24	\pm	1	3,7	\pm	0,1	3,1	\pm	0,1
Arabinanos	4,3	\pm	0,2	n.d			n.d		
TOTAL	97	\pm	4	94	\pm	5	63	\pm	2

4.2 Hidrólisis enzimática

4.2.1 Biomasa sin tratar

Con el fin de estudiar el efecto de la concentración de biomasa en la reacción, se ensayó la hidrólisis enzimática a dos concentraciones de residuos sólidos de maíz (8 % y 5 % p/v) mediante el empleo de un cóctel celulolítico denominado *Celluclast 1.5 L*.

Como se puede observar en la *Figura 4*, el rendimiento máximo del proceso se alcanza al superar las 41 h con un valor de 26,1 % para la digestión al 5 % p/v y a las 44 h con un porcentaje de 22,6 % para la hidrólisis al 8 %. Este rendimiento resulta similar en ambos ensayos siendo ligeramente inferior en la hidrólisis al 8 %. Se estudió el uso de una concentración superior de biomasa (10 % p/v) pero la cantidad de sólido empleada dificultaba la homogeneización de los reactivos (debido al hinchamiento de la materia prima) y la hidrólisis no se realizó correctamente.

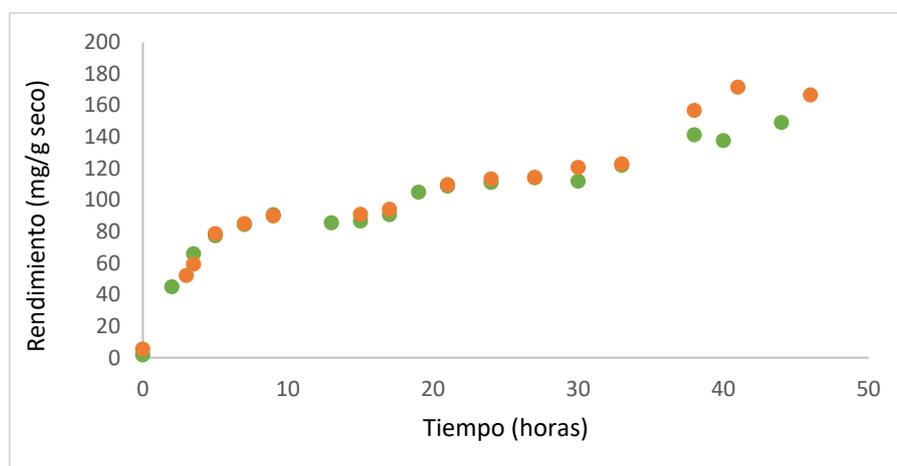


Figura 4. Evolución temporal de la hidrólisis enzimática de los rastrojos de maíz con cargas de sólidos al 8 % p/v (●) y 5 % p/v (●). El rendimiento de la hidrólisis es expresado como g de glucosa por cada 100 g de rastrojo de maíz.

Los rendimientos obtenidos en este estudio concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores (Cai, L-Y *et al.*, 2016), cuyo rendimiento máximo a partir de una hidrólisis al 10 % p/v utilizando como biomasa tallos de maíz y como celulasa NS50013 (Novozyme, Dinamarca) fue del 26,2 %.

Pese a que el rendimiento de la hidrólisis al 5 % de biomasa es mínimamente superior (26,0 % frente a 22,6 %), si se analiza la concentración de glucosa alcanzada en ambos hidrolizados (Figura 5) se puede observar como la cantidad de glucosa liberada en este proceso aumenta de forma relevante de acuerdo con un mayor porcentaje de biomasa. Esto implica que, durante una misma reacción, se pueden generar una mayor proporción de monómeros libres de interés para posteriores etapas. La concentración máxima de glucosa aumenta desde 8,6 g/L hasta 11,9 g/L debido al aumento de la concentración de sustrato de 5 % a 8 % p/v.

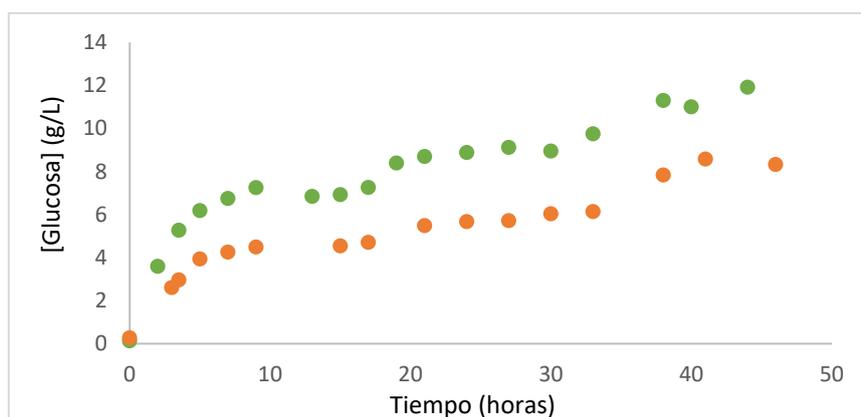


Figura 5. Evolución temporal de la hidrólisis enzimática de los rastrojos de maíz con cargas de sólidos al 8 % p/v (●) y 5 % p/v (●). La concentración de glucosa es expresada como g de compuesto por L de hidrolizado generado.

4.2.2 Biomasa sometida a tratamiento con subW

Para plantear una valorización integral de los residuos de maíz, como se ha indicado en la introducción, se plantea un proceso en cascada en el que la primera etapa consiste en la obtención de furfural mediante catálisis termoquímica a partir de la fracción de hemicelulosas del residuo de maíz. Este proceso, genera un sólido residual tras tratamiento según las condiciones reflejadas en la sección 4.1 y cuya composición se refleja en la *Tabla 1*.

En comparación con los residuos de maíz, se destaca la reducción de la fracción de hemicelulosas debido a su transformación termoquímica en furfural, y el consiguiente aumento en la composición de celulosa. Como se puede observar en la *Tabla 1*, después del tratamiento con subW, el contenido en hemicelulosa (xilanos y arabinanos) disminuyó de 28 ± 1 % a $3,7 \pm 0,1$ %, debido a la solubilización de estos compuestos, quedando en la fracción líquida donde se produce su conversión a furfural. Por otra parte, se observa la variación en el contenido en celulosa (glucanos) antes y después del tratamiento con subW: de 44 ± 1 % hasta 59 ± 3 %; este aumento implica que la mayoría de la celulosa se mantiene en el residuo sólido y que por tanto estos resultan un sustrato idóneo para la fermentación alcohólica.

Se realizó una hidrólisis enzimática a partir del residuo sólido generado con una concentración de 8 % p/v. Como se puede observar en la *Figura 6*, la conversión a glucosa es muy superior en este residuo sólido con respecto a la biomasa no tratada: La concentración máxima de glucosa aumentó a las 48 h hasta 46,2 g/L frente a 11,9 g/L que se obtenían sin el tratamiento a las 45 h. Esto es debido a que el tratamiento con subW extrae las hemicelulosas de manera que el sólido está compuesto principalmente por celulosa (*Tabla 1*), la cual se encuentra más accesible a la

acción enzimática para su conversión en monómeros de glucosa durante la hidrólisis. En el caso de la biomasa no tratada, el contenido de hemicelulosas (*Tabla 1*) puede interferir negativamente en la hidrólisis de la celulosa (Alonso-Riaño, P *et al.*, 2022b).

Cabe señalar que, en el hidrolizado a partir del residuo sólido tras catálisis termoquímica, el aumento de los niveles de glucosa a partir de las 39 horas (45,3 g/L) se produce de forma muy lenta y la reacción prácticamente ha alcanzado el estado estacionario hasta las 48 h estudiadas (46,2 g/L), por lo que en siguientes experimentos se podría detener la hidrólisis a las 39 h para mejorar el proceso en términos de productividad.

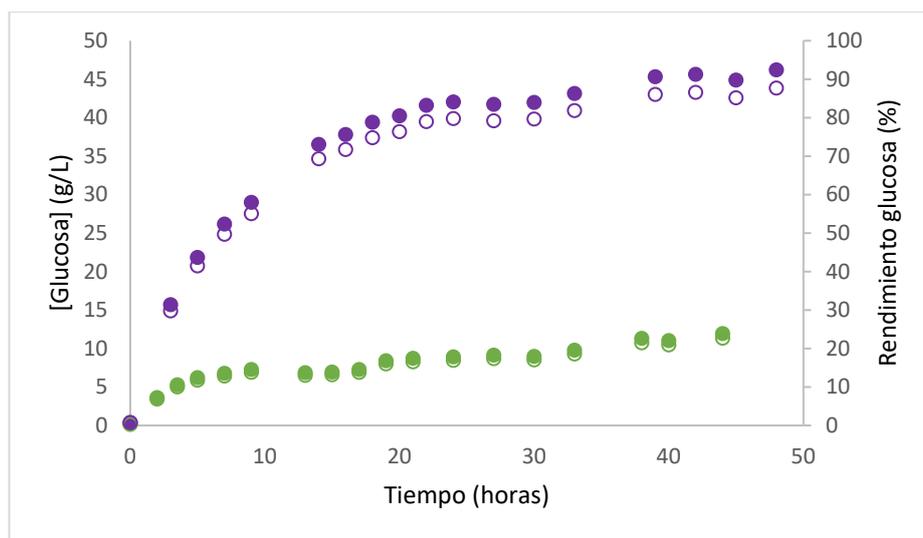


Figura 6. Evolución temporal de la hidrólisis enzimática de los rastrojos de maíz en crudo (●) y pretratado con subW (●) con cargas de sólidos al 8 % p/v. El rendimiento de la hidrólisis (○) es expresado como g de glucosa por cada 100 g de rastrojo de maíz y la concentración (vac●) como g de glucosa por L de hidrolizado.

Tal y como se muestra en la *Figura 6*, los rendimientos de producción de glucosa alcanzados en este estudio ascienden hasta el 87,7 %. Estos resultados podrían mejorarse modificando el tratamiento en agua subW, empleando otras enzimas o una combinación de ambas. Cai, L-Y *et al.*, (2016) alcanzó un rendimiento en la producción de glucosa de hasta el 95,9 % mediante el empleo de un pretratamiento combinado de álcali y N-metilmorfolina-N-óxido (NMMO) en tallos de maíz.

Otro estudio realizado con paja de trigo (Infanzón-Rodríguez, M. I *et al.*, 2022), muestra que al combinar el uso de *Celluclast* 1,5 L junto con un extracto enzimático de *A. niger* ITV 02 aumentó la concentración de glucosa en el hidrolizado hasta 1,5 veces con respecto al uso individual de *Celluclast* 1,5L.

Por último, de acuerdo con Xu, J. *et al.*, (2023), se pueden emplear aditivos tales como lignina kraft catiónica (JLQKL₅₀) junto con una celulasa obtenida de Azure Biological Co., Ltd. (Qingdao, China) para mejorar la hidrólisis enzimática del tallo de maíz pretratado con álcali diluido hasta alcanzar un rendimiento de producción de glucosa de 97,9 % en 72 h.

De la misma forma que el sólido generado tras el tratamiento con subW, se llevó a cabo el análisis de la composición del sólido tras el proceso de hidrólisis enzimática. Se observa como en el residuo después de la hidrólisis enzimática (ver *Tabla 1*), el componente principal de este es la lignina, específicamente la lignina insoluble. Esto demuestra, cómo se observa en la *Figura 6*,

que la celulosa ha sido hidrolizada con éxito a glucosa y que esta ha pasado a formar parte de la fracción líquida del hidrolizado, de modo que en el residuo solo permanece un $4,2 \pm 0,4$ %.

4.3 Fermentación

Con el objetivo de llevar a cabo la producción de etanol a partir de los residuos de maíz, se realizó una fermentación del hidrolizado enzimático obtenido previamente a partir del sólido generado tras el tratamiento con subW.

Este hidrolizado enzimático junto con una disolución de suplementación que favorece la actividad de la levadura y NaCl 0,9 %, fueron autoclavados a 121 °C durante 30 min para esterilizar y prevenir el crecimiento de contaminantes microbianos o minimizar dicha contaminación durante el proceso de fermentación. Tras el autoclavado se inició la fermentación catalizada por la levadura Ethanol Red[®].

Como se puede observar en la *Figura 7*, al inicio de la fermentación la concentración de glucosa era de 33,5 g/L mientras que los niveles de etanol eran prácticamente despreciables (0,7 g/L). Después de 13 h de fermentación, únicamente quedaron 1,8 g/L de glucosa, lo que supone un consumo del 94,5 %; a las 15 h, se detectan 0,2 g/L de glucosa correspondiente con una conversión del 99,3 % y, a las 16,5 h, la transformación fue del 100 %.

Respecto a la formación de etanol, este presentó una tendencia ascendente en la que se advierte una producción destacable a las 13 h, donde se alcanza una concentración de 14,2 g/L. A las 15 h se observó la máxima concentración de etanol producido (15,1 g/L) y a partir de este nivel se detecta una ligera disminución de su concentración hasta 12,3 g/L a las 48 h. Esta disminución se puede deber a una asimilación del producto por parte de la levadura pues, una vez agotada la glucosa, la biomasa continúa aumentando desde 2,9 g/L a las 15 h hasta 5,3 g/L a las 48 h.

Durante toda la fermentación, el pH se mantuvo invariable en el tiempo ($\text{pH} = 4,5 \pm 0,2$).

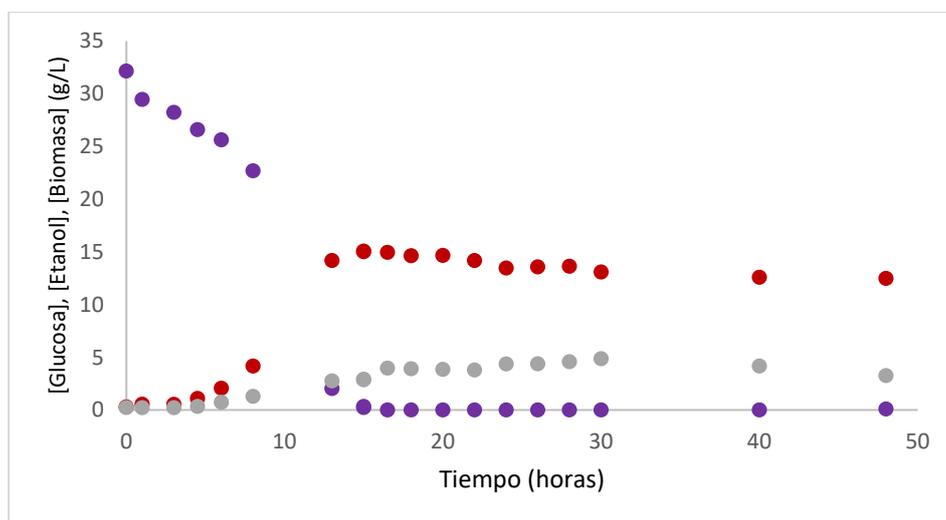


Figura 7. Evolución temporal de las concentraciones de glucosa (●), etanol (●) y biomasa (●) en la fermentación alcohólica a partir de rastrojos de maíz tratados con subW. La concentración es expresada como g de compuesto por L de hidrolizado.

De acuerdo con otros autores (Branco, R. H. R. *et al.*, 2020; Snoek, T. *et al.*, 2016) *S. cerevisiae* presenta la capacidad de reasimilar el etanol, así como de consumir otros azúcares tales como xilosa para continuar su crecimiento una vez agotada la glucosa. No obstante, en este

experimento, la concentración de xilosa se mantuvo constante en el tiempo ($t = 1$ h, $[\text{xilosa}] = 2,8$ g/L; $t = 48$ h, $[\text{xilosa}] = 2,5$ g/L) por lo que el aumento de la biomasa se debería a la reasimilación de etanol junto con otros metabolitos no estudiados durante el proceso; al igual que ocurría en el estudio realizado por Alonso-Riaño, P *et al.*, (2022b).

El máximo rendimiento observado en la producción de etanol se da a las 15 h y este presenta un valor de 91,4 %. Estos datos resultan superiores a muchos rendimientos de producción de etanol encontrados en bibliografía. En el estudio de Alonso-Riaño, P *et al.*, (2022b) de hidrólisis y fermentación secuencial de bagazo de cerveza pretratado con subW, el rendimiento máximo de etanol obtenido fue del 83 %. Otros autores (Tsegaye, B. *et al.*, 2019), alcanzaron un rendimiento de etanol de 68,2% después de 96 h de fermentación a partir de paja de trigo sometida a un pretratamiento NaOH asistido por microondas.

A su vez, otros estudios muestran resultados similares en la producción de etanol a partir de hidrolizados ricos en glucosa. Chen, J. *et al.*, (2021) obtuvieron un rendimiento del 90,3 % en la producción de etanol a partir de paja de trigo sometida a un tratamiento con subW, al igual que en el presente estudio.

4.4 Pervaporación

4.4.1 Optimización de los parámetros de operación empleando mezclas sintéticas

Con el objetivo de optimizar la técnica de separación mediante pervaporación del etanol producido, se analizaron algunos parámetros que intervienen en el proceso tales como el tipo de membrana empleada, la temperatura a la que se lleva a cabo la separación o la concentración de la alimentación inicial.

Estos experimentos de pervaporación se llevaron a cabo utilizando como alimentación agua pura y disoluciones con concentración variable de etanol.

En primer lugar, se estudió el efecto de la temperatura en el flujo de permeado para las dos membranas estudiadas. Para ello, se varió la temperatura de trabajo en un rango de entre 28 y 54 °C con una presión de vacío fijada en 3 mbar.

La *Figura 8* muestra el flujo de permeado para ambas membranas trabajando con agua pura como alimentación. El efecto de la temperatura en el flujo de permeado se describió mediante el empleo de la ecuación de Arrhenius (*Ecuación 7*):

$$J = J_o * \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (\text{Ec. 7})$$

donde J es el flujo de permeado ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$), E_a es la energía de activación aparente de permeado (kJ/mol), R es la constante de los gases ideales, J_o es el factor preexponencial y T es la temperatura absoluta (K)

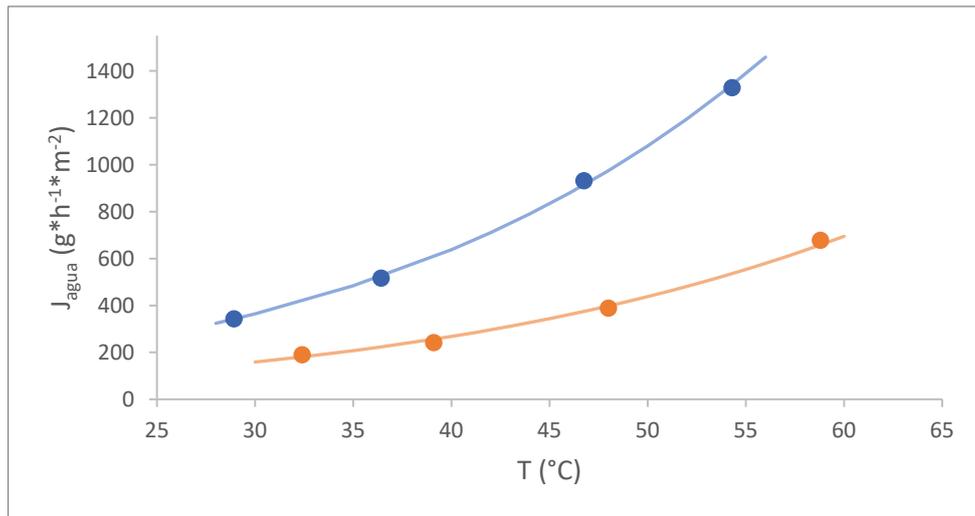


Figura 8. Flujo de permeación de agua destilada en función de la temperatura. Los símbolos ● representan la membrana de silicón y los símbolos ○ la POMS; y las líneas continuas se corresponden con la relación de Arrhenius.

Tras observar la *Figura 8*, se puede concluir que el flujo de permeación aumentó exponencialmente con la temperatura para ambas membranas. Esto es debido a que una mayor T incrementa el movimiento de las cadenas poliméricas de la membrana mejorando la difusión de las moléculas. Este comportamiento era el esperado ya que la energía de activación aparente (*Tabla 2*) presenta un valor de 41 kJ/mol para POMS y 44 kJ/mol para silicón.

Se observa que el flujo máximo alcanzado con la membrana de silicón es muy superior al de la membrana POMS en todas las temperaturas estudiadas. La diferencia en los flujos de permeado de ambas membranas se debe a las características fisicoquímicas del material de la capa selectiva que las conforman.

Un experimento similar se llevó a cabo con una disolución de 15 g/L de etanol como alimentación (*Figura 9*) en el que se estudió el efecto de la temperatura para las dos membranas de interés.

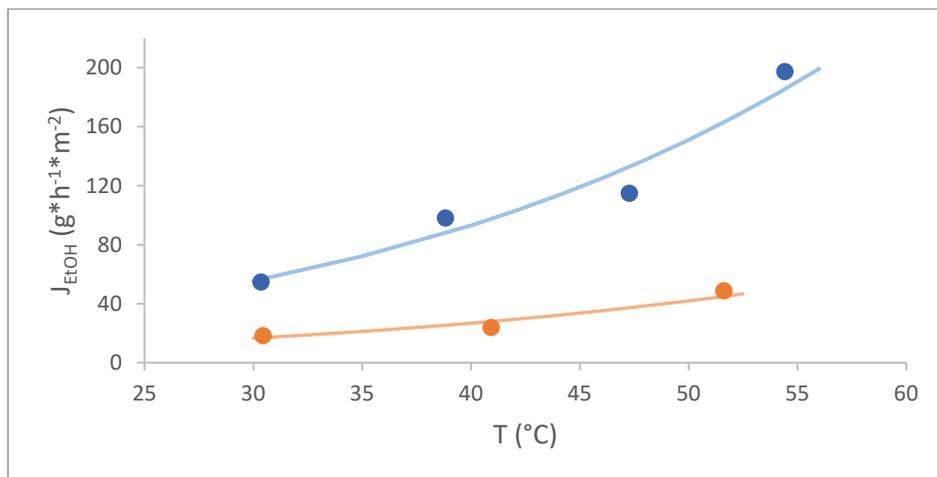


Figura 9. Influencia de la temperatura sobre el flujo de permeación de etanol empleando una mezcla binaria de etanol/agua 15 g/L. Los símbolos ● representan la membrana de silicón y los símbolos ○ la membrana POMS; las líneas continuas se corresponden con la relación de Arrhenius.

En ambas membranas, al igual que ocurriría con la alimentación de agua pura, el flujo de permeado de etanol aumenta conforme aumenta la temperatura de trabajo en todo el rango estudiado. Además, el permeado de la membrana de silicón genera un flujo muy superior de

etanol con respecto a la membrana POMS a cualquier T, por lo que se puede concluir que esta membrana presenta un mejor rendimiento para el producto de interés que la otra membrana de estudio.

En literatura se encuentran resultados similares respecto al efecto de la temperatura en el flujo de permeado. Este efecto se puede observar tanto para la membrana POMS (García, M *et al.*, 2009; Lazarova, M *et al.*, 2012; Alonso-Riaño, P *et al.*, 2023) como para membranas de otro material como PDMS (Bermudez Jaimes, J *et al.*, 2020; Alonso-Riaño, P *et al.*, 2023); en todos los casos un aumento de T incrementa el flujo de permeado. No se han encontrado otros trabajos en los que se utilice una membrana polimérica de silicona para una separación de etanol mediante pervaporación.

Por otra parte, teniendo en cuenta la $E_{a_{\text{etanol}}}$ y $E_{a_{\text{agua}}}$ en cada membrana estudiada (Tabla 2), se observa que el valor obtenido durante la pervaporación con la membrana de silicona es superior al de POMS, lo que supone un comportamiento más sensible a los cambios de temperatura: el flujo de permeado de ambos compuestos es más dependiente de la temperatura cuando se trabaja con la membrana de silicona que cuando se trabaja con la membrana POMS, por lo que también se espera que al incrementar la temperatura, el factor de separación (β) aumente en esas condiciones.

Tabla 2. Comparación de la Energía de activación aparente entre cada membrana para el agua y el etanol.

$E_{a_{\text{aparente}}}$ (kJ/mol)		
Componente	POMS	Silicona
Agua	41	44
Etanol (15 g/L)	38	41

No obstante, otros autores han obtenido valores superiores para la energía de activación aparente tanto de agua como de etanol empleando una membrana POMS, como es el caso de García, M *et al.*, (2009) que señala una $E_{a_{\text{etanol}}} = 43,3$ kJ/mol y $E_{a_{\text{agua}}} = 43,5$ kJ/mol así como el trabajo de Bermudez Jaimes, J *et al.*, (2020) en el que se obtuvieron $E_{a_{\text{etanol}}} = 82,7 - 84,7$ kJ/mol y $E_{a_{\text{agua}}} = 59,5 - 62,2$ kJ/mol.

Por último, para estudiar la selectividad de ambas membranas respecto al etanol, se evaluó el factor de enriquecimiento (β) y el PSI a diferentes temperaturas (Figura 10). Conforme aumenta la temperatura, también lo hace el factor de enriquecimiento en la membrana POMS debido a una mejor difusividad del compuesto de interés. No obstante, en el caso de la membrana de silicona, este factor alcanza un máximo a los 40 °C ($\beta = 12.43$) para descender ligeramente y mantenerse estable en torno a $\beta = 10$; cabe señalar que en el caso de la membrana de silicona el factor de enriquecimiento resulta superior en todas las temperaturas estudiadas respecto a la membrana POMS.

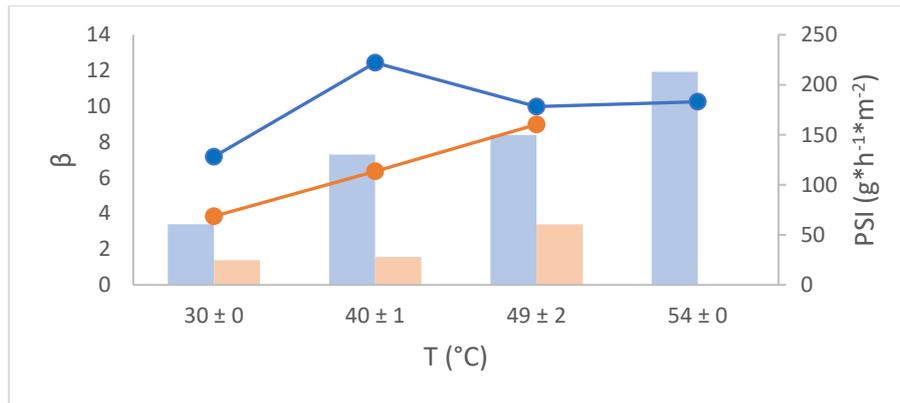


Figura 10. Influencia de la temperatura sobre el factor de enriquecimiento -gráfico de dispersión- β y PSI -gráfico de barras- para el etanol a partir de mezclas binarias etanol/agua 15 g/L. Los puntos y barras ● se corresponden con la membrana de silicón y los puntos y barras ● con la membrana POMS.

Este comportamiento también se observó en el trabajo realizado con PDMS por Bermudez Jaimés, J *et al.*, (2020) así como en los estudios llevados a cabo con POMS por Lazarova, M *et al.*, (2012), en los que, a una concentración dada en la alimentación, el factor de enriquecimiento aumenta de acuerdo con la temperatura.

Al prestar atención al PSI, se observa que este es superior para la membrana de silicón que para la POMS en todos los casos; eso es debido a un mayor flujo total para la primera membrana con respecto a la segunda. Además, el PSI sigue una tendencia positiva sin alcanzar un punto de saturación; de forma similar al factor de enriquecimiento, el índice de separación aumenta de acuerdo con la temperatura.

De acuerdo con otros autores (Alonso-Riaño, P *et al.*, 2023), cuanto mayor sea el PSI, más eficiente resultará el uso de esta membrana en un proceso de separación mediante pervaporación del compuesto de interés. Por tanto, se puede concluir que, de estas dos membranas estudiadas, aquella con su capa selectiva conformada por silicón es la idónea para la separación de etanol.

Una vez determinada que la membrana con mayor selectividad es la de silicón y la temperatura óptima de trabajo es en torno a 54 °C, se estudió el efecto de la concentración en la alimentación. Para ello se emplearon disoluciones con diferentes concentraciones de etanol (1,5, 3, 6, 9, 12, 15, 25, 35, 45 g/L). Los resultados se muestran en la *Figura 11*.

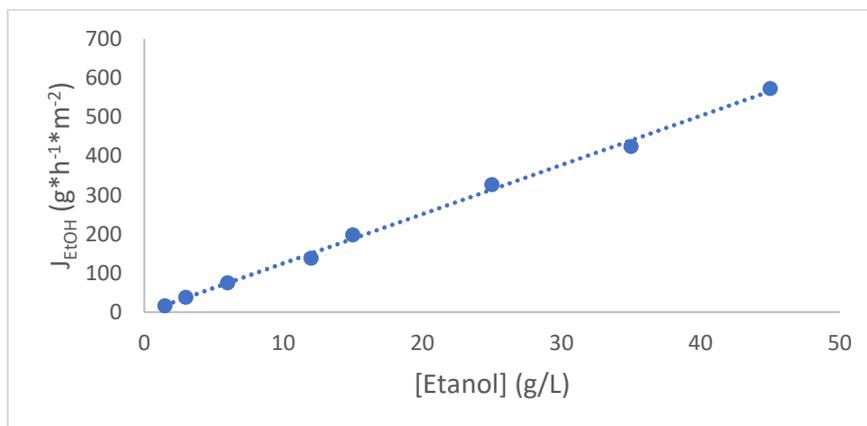


Figura 11. Influencia de la concentración de etanol en la alimentación sobre el flujo de permeación del etanol para mezclas binarias de alimentación etanol/agua. ($J_{EtOH} = 12,58 \cdot [EtOH]$)

Como se puede observar en esta gráfica, el flujo de permeado de etanol presenta una tendencia ascendente de acuerdo con un aumento en las concentraciones estudiadas, lo que indica un mayor rendimiento, así como que a las concentraciones estudiadas no se ha alcanzado el punto de saturación de la membrana.

Tal y como indica García, M *et al.*, (2009), el etanol es un componente menos polar que el agua por lo que un aumento de la concentración de este en la alimentación supone un mejor hinchamiento de la membrana, lo que da como resultado un paso más fácil de las moléculas de etanol a través de la membrana debido a su carácter hidrófobo.

A su vez, se estudió el efecto que ejerce la concentración de etanol en la alimentación en el factor de enriquecimiento y en el PSI para la membrana seleccionada, tal y como se muestra en la *Figura 12*.

Al aumentar la concentración de etanol en la alimentación hasta valores de 25 g/L, el factor de enriquecimiento muestra un descenso hasta $\beta = 7,6$ y se mantiene estable pese a que se siga aumentando la concentración de la alimentación. Estas bajadas son consecuencia del hinchamiento excesivo de la membrana, que supone la pérdida del carácter hidrofóbico de esta.

El mismo efecto advertido para el factor de enriquecimiento, se observó para el PSI, aunque en este en este caso, el descenso asociado al aumento de concentración fue menos acusado debido al incremento del flujo de permeado de etanol al aumentar la concentración de etanol en la alimentación

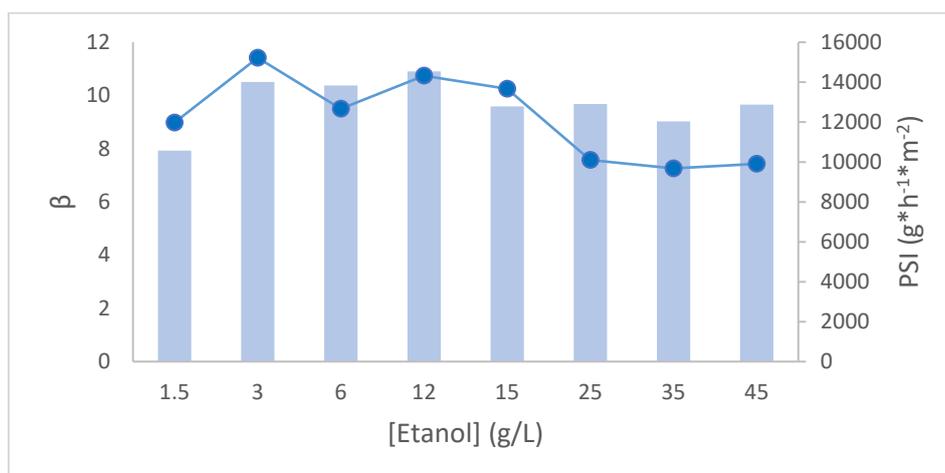


Figura 12. Influencia de la concentración de etanol en la alimentación sobre el factor de enriquecimiento -gráfico de dispersión- β y PSI -gráfico de barras- para el etanol a partir de mezclas binarias etanol/agua. Los puntos y barras ● se corresponden con la membrana de silicona.

Se puede deducir por tanto que cuando la membrana se encuentra menos hinchada tiene un comportamiento más selectivo. Estos mismos resultados fueron observados en otros trabajos de permeación de etanol, en los que se emplearon distintos tipos de membranas poliméricas tales como POMS (García, M *et al.*, 2009; Lazarova, M *et al.*, 2012) y PDMS (Bermudez Jaimes, J *et al.*, 2020).

No obstante, a concentraciones de etanol en la alimentación excesivamente bajas (1,5 g/L), se observa un ligero descenso del factor de enriquecimiento, así como del PSI, esto podría deberse a que la formación del gradiente de concentración entre ambos lados de la membrana es muy reducida. Este efecto, en caso de trabajar a concentraciones muy pequeñas, podría solventarse con un aumento en la velocidad de flujo de la alimentación para promover efectivamente la

turbulencia para una mejor mezcla, llevar las moléculas de etanol a la superficie de la membrana y, posteriormente, evitar que el agua se acumule en exceso (Peng, P *et al.*, 2021).

En el caso de trabajar a concentraciones elevadas de etanol (>25 g/L), se puede mitigar el efecto del hinchamiento excesivo empleando membranas de matriz mixta ya que integran la fácil fabricación y bajo coste de las membranas poliméricas y aportan un alto rendimiento de separación y alta estabilidad de las membranas inorgánicas (Peng, P *et al.*, 2021).

4.4.2 Pervaporación del fermentado

Con el objetivo de separar el etanol producido durante la fermentación de los residuos de maíz pretratados, se llevó a cabo un proceso de pervaporación a $49\text{ °C} \pm 3$ con una membrana de silicona y utilizando como alimentación los 260 mL de fermentado producidos.

En primer lugar, se estudió el flujo de permeado de etanol y se comparó con el flujo de permeado de etanol obtenido al emplear como alimentación diluciones con concentraciones variables de etanol. Estos datos se muestran en la *Figura 13*.

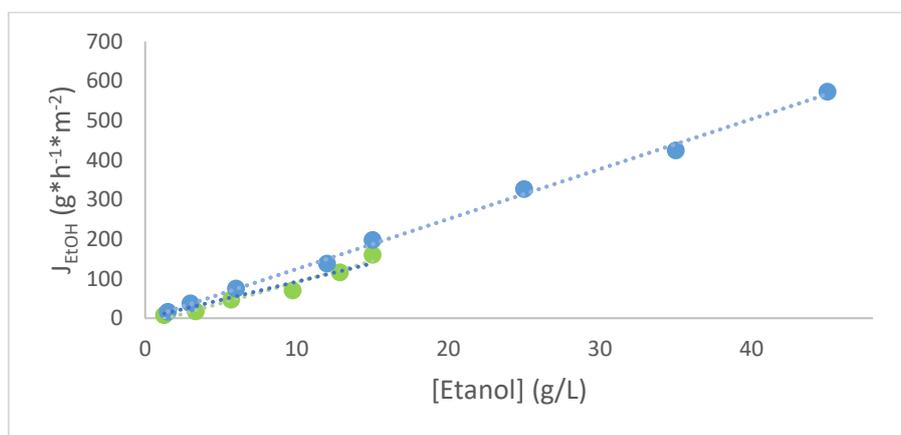


Figura 13. Flujo de permeación de etanol en función de la concentración de etanol en la alimentación. Los puntos ● se corresponden con alimentaciones binarias de etanol/agua; los puntos ● representan la permeación del fermentado. ($J_{EtOH, \text{mezclas binarias}} = 12,58 \cdot [EtOH]$, $J_{EtOH, \text{caldo de fermentación}} = 9,25 \cdot [EtOH]$)

Tal y como se puede observar, el flujo de etanol de este estudio resulta ciertamente similar al obtenido en el experimento anterior, situándose ligeramente por debajo, tal como muestran las pendientes de ambos ajustes ($m_{EtOH, \text{mezclas binarias}} = 12,58$, $m_{EtOH, \text{caldo de fermentación}} = 9,25$). Esta pequeña diferencia puede deberse al cambio de la composición de la alimentación, ya que en la muestra procedente de la biomasa hay muchos más componentes que en la muestra binaria pura, así como a la variación en la temperatura, pues debido a que sólo se disponían de 260 mL de fermentado y teniendo en cuenta el volumen que se encuentra en continua recirculación por el equipo, la alimentación no permanecía el tiempo suficiente en el reactor para alcanzar la temperatura óptima de 54 °C determinada en la optimización de parámetros, lo que disminuiría el flujo del permeado de etanol.

Por otra parte, se calculó el factor de enriquecimiento y el PSI, mostrados en la *Figura 14*. Para una mejor comparación con los datos obtenidos para mezclas binarias puras, se han incluido los datos correspondientes de la *Figura 12*. En este caso, ambos parámetros se sitúan por debajo de los encontrados para mezclas binarias etanol + agua. Estos resultados pueden deberse a la variación de la temperatura, ya que se concluyó en el apartado anterior que tanto β como PSI

aumentaban de acuerdo con la temperatura. El primer factor de enriquecimiento obtenido ($\beta_{[\text{etanol}] = 15 \text{ g/L}} = 4$) parece un dato anómalo ya que el resto de los valores obtenidos se encuentran dentro del intervalo $\beta = 8 \pm 1$. Posiblemente, se deba a un error humano durante la experimentación.

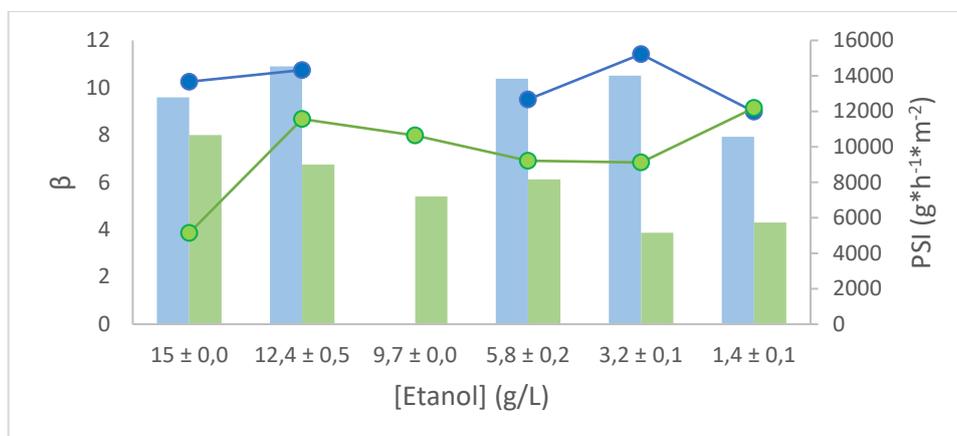


Figura 14. Influencia de la concentración de etanol sobre el factor de enriquecimiento -gráfico de dispersión- β y PSI -gráfico de barras- para el etanol. Los puntos y barras (●) se corresponden con mezclas binarias etanol/agua y los puntos y barras (●) con el fermentado.

Con los datos obtenidos, se calculó el rendimiento de este proceso a partir de los gramos de etanol recuperados en cada etapa entre los gramos iniciales de etanol en el fermentado. El porcentaje de etanol recuperado durante el proceso de pervaporación fue del 60 %.

Por último, la separación de etanol del agua mediante membranas está sujeta a 3 factores: 1) hinchamiento de la membrana, que no es la responsable de los valores obtenidos puesto que se trabaja a concentraciones bajas de etanol; 2) polarización de la concentración, que se podría mejorar mediante el aumento la velocidad de flujo de la alimentación con el objetivo de aumentar la turbulencia y mejorar la exposición de las moléculas de etanol en la membrana; 3) acoplamiento entre los componentes de la alimentación, para lo cual se debería mejorar la afinidad de la membrana hacia el compuesto de interés, en este caso, el etanol, frente al resto. Para ello, se puede optar por membranas mixtas tales como polímeros de PDMS con relleno de silicalita o MIL-53 (Davey, C *et al.*, 2016).

4.4.3 Fermentación y pervaporación simultánea (SFP)

Con el objetivo de mejorar el proceso en términos de productividad, se optó por realizar de forma simultánea la fermentación de los residuos de maíz pretratados y la pervaporación del etanol que se producía durante este proceso. Tras 4 horas de únicamente fermentación, correspondientes al período de adaptación, se inició la pervaporación simultánea.

Tal y como se observa en la *Figura 15*, la formación de etanol presenta una tendencia ascendente hasta las 11 h de fermentado, donde se alcanza una concentración de 10,3 g/L; a partir de este punto, la concentración de etanol comienza a disminuir. Esto implica que desde ese instante la velocidad de separación de etanol es superior a la velocidad de formación de este.

Al comparar estos resultados con la *Figura 7*, se observa que la cinética de formación de etanol es similar al proceso de fermentación aislado hasta las 11 h, presentando una concentración de etanol semejante en el tiempo: a las 6 h en el primer experimento se alcanzó una concentración

de 2,1 g/L y a las 8 h, 4,2 g/L; en este experimento los valores alcanzados son de 2,6 g/L y 4,7 g/L respectivamente. A partir de este punto, no se puede continuar comparando la tendencia de formación de etanol ya que se permea más cantidad de la que se forma.

La fermentación y permeación simultánea se detuvo a las 20 h ya que la concentración de etanol en el caudal de alimentación era de 1,6 g/L.

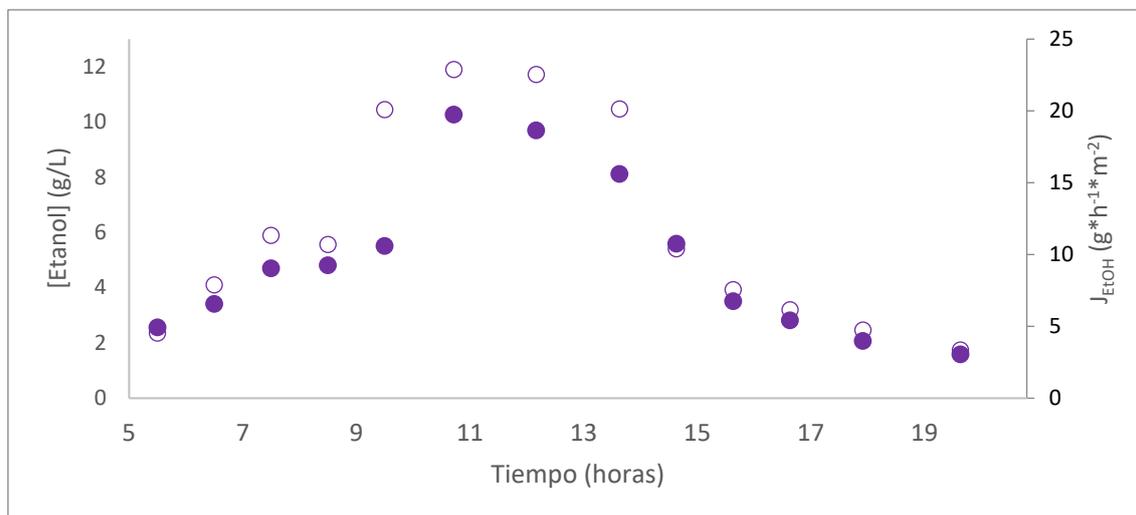


Figura 15. Evolución temporal de la fermentación y pervaporación simultánea. El flujo de permeado de etanol (O) es expresado como g de etanol por cada h y m² y la concentración de etanol en la alimentación (●) como g de etanol por L de caldo.

El flujo máximo alcanzado fue de 22,9 g·h⁻¹·m⁻² y se alcanzó a las 11 h, coincidiendo con la concentración máxima de etanol en la alimentación. En este caso, el flujo de permeado de etanol es menor que en el experimento del permeado del fermentado previo debido a las diferentes temperaturas de operación (Figura 13). En el proceso simultáneo fermentación + pervaporación, la temperatura se eligió considerando la temperatura óptima de fermentación (28 °C), ya que son dos procesos que se realizan de forma simultánea.

Al comparar con los resultados iniciales de la membrana de silicona realizados a 30 °C empleando como alimentación una disolución de 15 g/L de etanol (Figura 9), los flujos de permeado son más cercanos, aunque todavía inferiores: $J_{EtOH(15\text{ g/L})} = 54,8 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ frente a $J_{SFP} = 22,9 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Esta diferencia en el flujo puede deberse al resto de componentes de la fermentación, tales como la levadura responsable de la fermentación u otros componentes presente en la disolución de suplementación, que pueden dificultar el paso a través de la membrana.

Tal y como indicó Nakao, S.-I *et al.*, (1987), la biomasa se podría acumular en la superficie de la membrana reduciendo el área efectiva de pervaporación y dando lugar a un flujo menor. A su vez, estos autores indicaron que las sales inorgánicas añadidas como nutrientes, no se consumen por completo durante la fermentación y se acumulan en el caldo de fermentado, dañando las células responsables de la fermentación. Para ello, propusieron extraer del sistema parte del caldo durante la fermentación y pervaporación simultánea; en este experimento el flujo presentaba un valor similar al experimento anterior, pero aumentaron las células viables, así como la productividad y el rendimiento de la producción de etanol.

Por último, se calculó el PSI y el factor de enriquecimiento para este experimento a lo largo del tiempo. Tal y como se puede observar en la Figura 16, el factor de enriquecimiento se mantiene relativamente constante en torno a $7,3 \pm 0,8$, a excepción del valor correspondiente al primer

permeado (6h, $\beta = 5,16$), en el que la bomba de vacío tardó un corto periodo en alcanzar los 3 mbar de trabajo y a excepción del valor correspondiente a las 11 h ($\beta = 9,8$), en el que la concentración de etanol se encontraba en su punto máximo, lo que aumentó el rendimiento de separación.



Figura 16. Evolución en el tiempo del factor de enriquecimiento -gráfico de dispersión- β y PSI -gráfico de barras- para el etanol durante la fermentación y pervaporación simultánea.

Los valores obtenidos para el factor de enriquecimiento son similares a los alcanzados en la fermentación y permeación secuencial ($\beta = 8 \pm 1$).

Respecto al PSI, presenta una tendencia similar al factor de enriquecimiento, manteniéndose constante en $2228 \pm 312 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ a excepción del primer permeado ($1769 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) y el permeado a las 11 h ($3644 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). Estos datos son notablemente inferiores a los datos de PSI obtenidos para la fermentación y permeación secuencial (7052 ± 1922) debido al menor flujo alcanzado como consecuencia de la disminución de la temperatura de trabajo hasta las condiciones óptimas de fermentación.

No obstante, se calculó el rendimiento de este proceso a partir de los gramos de etanol recuperados en cada etapa entre los gramos de etanol que se pueden producir durante la fermentación teniendo en cuenta la glucosa inicial en el hidrolizado (Figura 17).

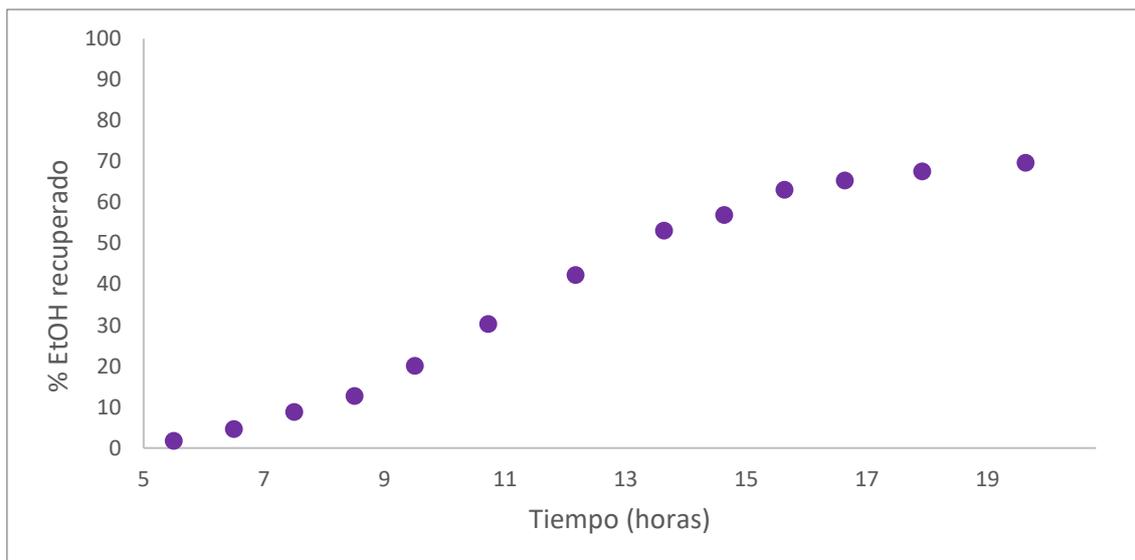


Figura 17. Evolución en el tiempo del rendimiento de etanol acumulado recuperado durante la fermentación y pervaporación simultánea.

El porcentaje de etanol recuperado durante el proceso de fermentación y pervaporación simultánea fue del 71 %; un rendimiento 1,2 veces superior al de la fermentación y pervaporación secuencial. Los resultados podrían mejorarse empleando la técnica de retirar parte del caldo descrita por Nakao, S.-I *et al.*, (1987) así como estudiando otras temperaturas de trabajo para comprobar la viabilidad y rendimiento del proceso al efectuarse en otras condiciones a las indicadas para la levadura, es un proceso que se debe seguir optimizando.

En términos de productividad, ambos enfoques presentan resultados similares: la estrategia SFP requiere de 20 h para realizar la fermentación y pervaporación simultáneas obteniendo un rendimiento final de 71 % mientras que el sistema secuencial necesita de 18 h: 15 h para la fermentación completa de la glucosa y 3 h para la pervaporación para obtener rendimientos de 91,4 % y 60 % en cada etapa respectivamente. A pesar de que las productividades son similares, hay que tener en cuenta que el proceso de SFP requiere de un único reactor mientras que la fermentación y pervaporación secuencial necesitan 2, lo que encarece el proceso en términos energéticos. Además, el proceso de SFP requiere todavía de un mayor estudio de optimización para establecer cuál es la T óptima de este proceso.

5. CONCLUSIONES

- I. La hidrólisis enzimática para la liberación de monómeros de glucosa a partir del rastrojo de maíz se ve fuertemente influenciada por el tratamiento previo con subW mientras que el efecto de la concentración de la biomasa inicial es despreciable en el intervalo entre 5 y 8 % (p/v). La hidrólisis con subW mejora el rendimiento de la hidrólisis enzimática 3,88 veces.
- II. La producción de bioetanol a partir del hidrolizado de rastrojo de maíz tratado con subW es un proceso catalizado por Ethanol Red[®] capaz de alcanzar un rendimiento del 91,4 %. La fermentación debe detenerse tras el agotamiento del sustrato para evitar su reasimilación.
- III. La recuperación de etanol presenta una fuerte relación con la temperatura de trabajo y la concentración del producto en la alimentación, así como con el material de membrana

de pervaporación. Las condiciones de trabajo afectan al flujo de permeado, al factor de enriquecimiento (β) y al índice de separación por pervaporación (PSI). Las condiciones óptimas para la pervaporación es el empleo de una membrana de silicona a 54 °C mediante las que se alcanza una recuperación del 60 % del etanol producido.

- IV. La fermentación y pervaporación simultánea (SFP) es una nueva estrategia idónea para la obtención y recuperación de bioetanol. La producción de etanol, el factor de enriquecimiento (β) y el índice de separación por pervaporación son similares a los valores obtenidos mediante una fermentación y pervaporación secuencial; el flujo de permeado es menor que en el proceso secuencial. No obstante, el rendimiento de la SFP es 1,18 veces superior. Además, se reducen los costes de equipamiento al emplear un único reactor para los dos procesos.
- V. Se plantea como trabajo futuro optimizar la temperatura para los procesos SFP.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alonso-Riaño, P., Amândio, M. S. T., Xavier, A. M. R. B., Beltrán, S., & Sanz, M. T. (2022b). Subcritical water as pretreatment technique for bioethanol production from Brewer's spent grain within a biorefinery concept. *Polymers*, 14(23), 5218. <https://doi.org/10.3390/polym14235218>

Alonso-Riaño, P., Melgosa, R., Trigueros, E., Illera, A. E., Beltrán, S., & Sanz, M. T. (2022a). Valorization of brewer's spent grain by consecutive supercritical carbon dioxide extraction and enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 396(133493), 133493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133493>

Alonso-Riaño, P., Illera, A. E., Amândio, M. S. T., Xavier, A. M. R. B., Beltrán, S., & Teresa Sanz, M. (2023). Valorization of brewer's spent grain by furfural recovery/removal from subcritical water hydrolysates by pervaporation. *Separation and Purification Technology*, 309(123008), 123008. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.123008>

Bermudez Jaimes, J., Torres Alvarez, M., Bannwart de Moraes, E., Wolf Maciel, M., & Maciel Filho, R. (2020). Separation and semi-empiric modeling of ethanol–water solutions by pervaporation using PDMS membrane. *Polymers*, 13(1), 93. <https://doi.org/10.3390/polym13010093>

Branco, R. H. R., Amândio, M. S. T., Serafim, L. S., & Xavier, A. M. R. B. (2020). Ethanol production from hydrolyzed Kraft pulp by mono- and co-cultures of yeasts: The challenge of C6 and C5 sugars consumption. *Energies*, 13(3), 744. <https://doi.org/10.3390/en13030744>

Cai, L.-Y., Ma, Y.-L., Ma, X.-X., & Lv, J.-M. (2016). Improvement of enzymatic hydrolysis and ethanol production from corn stalk by alkali and N-methylmorpholine-N-oxide pretreatments. *Bioresource Technology*, 212, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.012>

Chen, J., Wang, X., Zhang, B., Yang, Y., Song, Y., Zhang, F., Liu, B., Zhou, Y., Yi, Y., Shan, Y., & Lü, X. (2021). Integrating enzymatic hydrolysis into subcritical water pretreatment optimization for bioethanol production from wheat straw. *The Science of the Total Environment*, 770(145321), 145321. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145321>

Davey, C., Leak, D., & Patterson, D. (2016). Hybrid and mixed matrix membranes for separations from fermentations. *Membranes*, 6(1), 17. <https://doi.org/10.3390/membranes6010017>

Gao, L., Chen, S., & Zhang, D. (2018). Neural network prediction of corn Stover saccharification based on its structural features. *BioMed Research International*, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/9167508>

García, M., Sanz, M. T., & Beltrán, S. (2009). Separation by pervaporation of ethanol from aqueous solutions and effect of other components present in fermentation broths: Separation by pervaporation of

ethanol from aqueous solutions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (Oxford, Oxfordshire: 1986), 84(12), 1873–1882. <https://doi.org/10.1002/jctb.2259>

Infanzón-Rodríguez, M. I., Ragazzo-Sánchez, J. A., del Moral, S., Calderón-Santoyo, M., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2022). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass using native cellulase produced by *Aspergillus niger* ITV02 under liquid state fermentation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(1), 198–208. <https://doi.org/10.1002/bab.2097>

Lazarova, M., Bösch, P., & Friedl, A. (2012). POMS membrane for selective separation of ethanol from dilute alcohol-aqueous solutions by pervaporation. *Separation Science and Technology*, 47(12), 1709–1714. <https://doi.org/10.1080/01496395.2012.658943>

Lee, C. B. T. L., & Wu, T. Y. (2021). A review on solvent systems for furfural production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137(110172), 110172. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110172>

Luo, Y., Li, Z., Li, X., Liu, X., Fan, J., Clark, J. H., & Hu, C. (2019). The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass: A review. *Catalysis Today*, 319, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.06.042>

Melendez, J. R., Mátyás, B., Hena, S., Lowy, D. A., & El Salous, A. (2022). Perspectives in the production of bioethanol: A review of sustainable methods, technologies, and bioprocesses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 160(112260), 112260. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112260>

Nakao, S.-I., Saitoh, F., Asakura, T., Toda, K., & Kimura, S. (1987). Continuous ethanol extraction by pervaporation from a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, 30(3), 273–287. [https://doi.org/10.1016/s0376-7388\(00\)80123-4](https://doi.org/10.1016/s0376-7388(00)80123-4)

Peng, P., Lan, Y., Liang, L., & Jia, K. (2021). Membranes for bioethanol production by pervaporation. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01857-y>

Qiao, J., Cui, H., Wang, M., Fu, X., Wang, X., Li, X., & Huang, H. (2022). Integrated biorefinery approaches for the industrialization of cellulosic ethanol fuel. *Bioresource Technology*, 360(127516), 127516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127516>

Singh, N., Singhanian, R. R., Nigam, P. S., Dong, C.-D., Patel, A. K., & Puri, M. (2022). Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*, 344(126415), 126415. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126415>

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R. O., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Energy, D. of. (2004). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure*, August, 1–14.

Snoek, T., Verstrepen, K. J., & Voordeckers, K. (2016). How do yeast cells become tolerant to high ethanol concentrations? *Current Genetics*, 62(3), 475–480. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0561-3>

Tsegaye, B., Balomajumder, C., & Roy, P. (2019). Optimization of microwave and NaOH pretreatments of wheat straw for enhancing biofuel yield. *Energy Conversion and Management*, 186, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.02.049>

Vane, L. M. (2008). Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining: Biofpr*, 2(6), 553–588. <https://doi.org/10.1002/bbb.108>

Xu, J., Li, H., Alam, M. A., Muhammad, G., Lv, Y., Zhao, A., Zhang, S., & Xiong, W. (2023). Employing cationic Kraft lignin as additive to enhance enzymatic hydrolysis of corn stalk. *Polymers*, 15(9), 1991. <https://doi.org/10.3390/polym15091991>