

200

*Administración Nacional  
de Combustibles Alcohol y Portland  
Directorio*

**CONVENIO ESPECÍFICO ENTRE**

**LA UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA – FACULTAD DE INGENIERÍA  
Y LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE COMBUSTIBLES, ALCOHOL Y  
PÓRTLAND**

En la ciudad de Montevideo, entre, POR UNA PARTE: La **Universidad de la República – Facultad de Ingeniería (en adelante UdelaR)**, representada por su Rector, Dr. Rodrigo Arocena, y el Decano de la Facultad de Ingeniería, Dr. Héctor Cancela, con domicilio en la calle Julio Herrera y Reissig 565, de esta ciudad, Y POR OTRA PARTE: La **Administración Nacional de Combustibles, Alcohol y Pórtland (en adelante ANCAP)**, representada por el Presidente del Directorio, Lic. Raúl Sendic y el Secretario General, Dr. Miguel A. Tato Corbo, con domicilio en la calle Paysandú s/n esq. Avenida del Libertador Brigadier General Lavalleja, de esta ciudad, quienes suscriben el siguiente convenio:

**PRIMERO.- ANTECEDENTES.**

ht)

*Administración Nacional  
de Combustibles Alcohol y Portland  
Directorio*

- I. La UdelaR y ANCAP han suscrito un convenio general con el objetivo de formalizar el apoyo a proyectos de investigación seleccionados como resultado de los llamados realizados en el marco de las Cuartas Jornadas ANCAP–UdelaR.
- II. En dicho marco fue seleccionado, en el llamado a proyectos de investigación posterior a las Cuartas Jornadas ANCAP – UdelaR, el proyecto denominado “Producción de biobutanol combustible a partir de sorgo dulce”.

**SEGUNDO.- OBJETIVOS.**

Por intermedio del presente ANCAP se compromete a otorgar a la UdelaR – Facultad de Ingeniería y ésta acepta un financiamiento no reembolsable de hasta un millón ochenta y un mil ciento treinta y tres con 98/100 pesos uruguayos (\$ 1.081.133,98) a fin de ejecutar el proyecto aprobado que se adjunta y que se tendrá como parte integrante del presente. En caso de producirse incrementos salariales en la UdelaR, podrá incrementarse dicho financiamiento en la proporción correspondiente. El mencionado financiamiento no reembolsable será abonado por ANCAP a la UdelaR –



*Administración Nacional  
de Combustibles Alcohol y Portland  
Directorio*

Facultad de Ingeniería en tres partes: 40% a la firma del convenio, 40% al inicio de la segunda etapa del proyecto y 20% al aprobarse por parte de ANCAP el informe técnico final presentado. (ver Anexo 1) Para el caso de que ANCAP no se pronuncie sobre la aprobación del informe de referencia dentro del plazo de 45 días corridos, a contar desde la presentación del informe técnico final, el importe retenido deberá ser automáticamente entregado a la beneficiaria, al vencimiento del plazo mencionado.

**TERCERO.-FECHA DE INICIO DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO Y VIGENCIA**

La fecha de inicio de ejecución del proyecto será a los quince días de firmado el presente contrato y regirá hasta su completa ejecución, conforme al cronograma de actividades adjunto. La UdelaR se obliga a ejecutar el proyecto en el plazo máximo de veinticuatro meses, contados a partir de la fecha de inicio del proyecto. Ambas partes acuerdan que para el caso de que se produzcan demoras y/o suspensiones en las entregas del financiamiento acordado en el presente no imputables a la UdelaR se prorrogará automáticamente el plazo previsto para la ejecución del proyecto de

*Administración Nacional  
de Combustibles Alcohol y Portland  
Directorio*

investigación por el mismo período que haya insumido la demora o suspensión.

**CUARTO.- EJECUCIÓN FINANCIERA**

La ANCAP, entregará a la UDELAR - Facultad de Ingeniería la totalidad del financiamiento en 3 pagos, de conformidad con el cronograma ya referido.

**QUINTO.-MANEJO DE LOS FONDOS**

Los desembolsos que realice ANCAP, quedarán condicionados a los siguientes requerimientos:

1. Que la UdelaR otorgue a ANCAP informes de avances.
2. Que del seguimiento que hace ANCAP del proyecto, surja que el avance de las actividades del mismo es concordante con el cronograma aprobado y los entregables sean conforme a lo esperado.
3. Según el avance y en conformidad de ambas partes se podrá redefinir

*Administración Nacional  
de Combustibles Alcohol y Portland  
Directorio*

el alcance y cronograma iniciales del proyecto. En ese caso deberá existir una aprobación expresa de la Comisión de Seguimiento.

4. En caso de que, a juicio de ANCAP, se constate que no se cumple con lo establecido, la referida Comisión, solicitará el bloqueo de los desembolsos y la suspensión del proyecto, debiendo en este caso, la UdelaR, presentar una rendición de cuentas con comprobantes fehacientes conteniendo la referencia del proyecto.

**SEXTO- DESEMBOLSOS**

Los desembolsos se realizarán contra el cumplimiento de los avances previstos en cada período según el cronograma adjunto, que forma parte integrante del contrato.

**SÉPTIMO.- OBLIGACIONES**



*Administración Nacional  
de Combustibles Alcohol y Portland  
Directorio*

La UdelaR se obliga a:

1. Cumplir con los objetivos específicos y generales del proyecto así como con la metodología y cronograma de actividades.
2. Entregar a ANCAP, al culminar el proyecto un informe final que recoja toda la información generada a través del mismo, sin perjuicio de los datos e informes parciales que durante su ejecución se reúnan y que deberán presentarse de acuerdo a la periodicidad estipulada.
3. A manejar con reserva toda la información referida al proyecto.

La ANCAP se obliga a:

1. Cumplir con los desembolsos comprometidos en las fechas pactadas.
2. Comunicar a la UdelaR quiénes serán los referentes del Proyecto por ANCAP.
3. Proporcionar toda la información pertinente, solicitada por UdelaR para el cumplimiento del proyecto.



*Administración Nacional  
de Combustibles Alcohol y Portland  
Directorio*

4. A manejar con reserva toda la información referida al proyecto.

#### **OCTAVO.- MODIFICACIONES AL PROYECTO**

La UdelaR deberá solicitar autorización a ANCAP para toda modificación que proyecte realizar en la metodología y cronograma de actividades y de ejecución, así como las que puedan incidir en los objetivos del proyecto.

ANCAP podrá solicitar modificaciones en función de los avances del proyecto. La Comisión de Seguimiento podrá solicitar modificaciones en función de los avances del proyecto. Toda solicitud de modificación será evaluada y resuelta por la Comisión de Seguimiento.

#### **NOVENO.- MORA**

Queda pactada la mora automática de pleno derecho sin necesidad de interpelación judicial o extrajudicial alguna por un hacer o no hacer algo contrario a lo estipulado.



*Administración Nacional  
de Combustibles Alcohol y Portland  
Directorio*

**DÉCIMO.- INCUMPLIMIENTO**

En caso de constatarse algún incumplimiento por cualquiera de las partes, la Comisión de Seguimiento será la encargada de evaluar el mismo, sin que el mismo tenga efecto vinculante para las partes al momento de solicitar la rescisión unilateral.

**DÉCIMO PRIMERO.- RESCISIÓN UNILATERAL**

Se pacta expresamente la rescisión unilateral a favor de la UdelaR y de ANCAP. Cuando cualquiera de las partes solicite la rescisión, la UdelaR deberá presentar los informes y rendiciones de gastos a ANCAP, pertinentes hasta la fecha. Ambas partes acuerdan que en caso de que se solicite la rescisión unilateral, la UdelaR no queda obligada a devolver las cantidades ya recibidas en cumplimiento del presente contrato ni los materiales o equipos que se hubieran adquirido a tal fin, ni ninguna otra suma por concepto alguno, siempre que se hubiera cumplido con lo estipulado en el cronograma que forma parte del presente contrato, y que las cantidades

*Administración Nacional  
de Combustibles Alcohol y Portland  
Directorio*

entregadas se hubieran aplicado según lo estipulado en este contrato. ANCAP, se reserva la rescisión en etapas anteriores a la finalización, previo pago de la etapa culminada.

**DÉCIMO SEGUNDO.- EQUIPAMIENTO E INVERSIONES.**

Los equipos comprados e inversiones realizadas con cargo a este convenio podrán ser utilizados por ANCAP en el futuro previa coordinación con los responsables de los mismos. En la medida de lo posible se aspira a que personal de ANCAP se incorpore a los proyectos de investigación.

**DÉCIMO TERCERO.- COMUNICACIONES**

Todas las comunicaciones entre las partes referentes a este convenio se efectuarán por escrito y en forma personal, por telegrama colacionado, carta certificada con aviso de retorno o cualquier otro medio fehaciente, y se reputarán cumplidas cuando el destinatario las haya recibido en el domicilio denunciado en la comparecencia .-



*Administración Nacional  
de Combustibles Alcohol y Portland  
Directorio*

**DÉCIMO CUARTO.- DOMICILIOS**

Las partes constituyen domicilios a todos los efectos legales a que dé lugar este contrato en los indicados como suyos en la comparecencia.

**DÉCIMO QUINTO.- ARBITRAJE**

En caso de que surjan diferencias entre las partes, tanto en la relación a la interpretación o aplicación de este contrato, como en cuanto a la ejecución del proyecto de investigación de que se trate, las mismas serán sometidas a consideración de una Comisión Honoraria integrada por representantes de ambas partes, sin perjuicio de las acciones judiciales que pudieren corresponder si no se lograra un acuerdo.

**DÉCIMO SEXTO.- REFERENCIA**

 Las partes acuerdan que todo lo no establecido por el presente, se regirá por

*Administración Nacional  
de Combustibles Alcohol y Portland  
Directorio*

el convenio general suscrito por UdelaR –ANCAP relacionado en la cláusula primera de antecedentes.

Para constancia de lo actuado se suscriben tres ejemplares del mismo tenor en el lugar indicado en la comparecencia.

**Por UdelaR, 19 AGO. 2013**

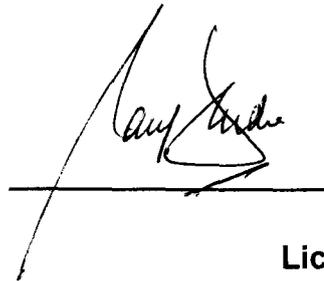
**Por ANCAP, 10/08/2013**



**Dr. Rodrigo Arocena**

**Rector**

**UdelaR**



**Lic. Raúl Sendic**

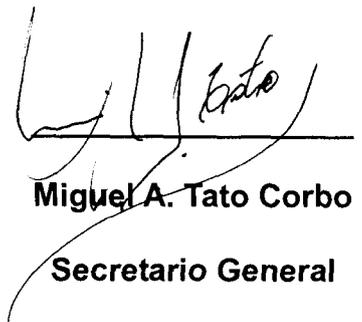
**Presidente**

**ANCAP**



**Dr. Héctor Cancela**

**Decano**



**Miguel A. Tato Corbo**

**Secretario General**

## ANEXO 1 – CRONOGRAMA

Pago al inicio: Firma del Convenio 40%

Pago al inicio de la etapa 2: 40% (al inicio del mes 3)

Pago al final de la etapa 6: 20% (al final del mes 24).

Etapa	Mes de inicio	Mes de fin	Entregable	Pago
1	1	2	Protocolos de las técnicas de análisis a realizar	Mes 0 al inicio: 40%
2	2	10	Selección de una cepa adecuada para la producción de butanol a partir de jugo de sorgo dulce y otros jugos azucarados como el jugo de caña de azúcar	Inicio de la Etapa 2: 40%
3	9	24	Informe detallando las condiciones operativas que produzcan el mejor desempeño en términos de rendimiento, velocidad, concentración de butanol de la cepa seleccionada.	No corresponde.
4	12	24	Informe con los datos resultantes de la evaluación del uso de la	No corresponde.

			energía y de la materia prima en la producción de butanol, utilizando un software específico para el modelado y simulación de procesos.	
5	20	24	Documentos/manuscritos resultantes de las actividades de transferencia al sector productivo y difusión en eventos/revistas científicas.	No corresponde.
6	23	24	Informe final del proyecto.	Final de la Etapa 6: 20%

Datos generales del Proyecto

Título del Proyecto Producción de biobutanol combustible a partir de sorgo dulce

Tema en el que se enmarca su proyecto Biobutanol a partir de azúcares

Otro tema en el que se enmarca su proyecto

Primer palabra clave biobutanol

Segunda palabra clave sorgo dulce

Tercer palabra clave biocombustible

Duración (meses) 24

(H)

## Producción de biobutanol combustible a partir de sorgo dulce

### Resumen

Biobutanol es considerado un biocombustible atractivo para su comercialización, ya que posee propiedades claramente superiores al etanol: tiene mayor contenido de energía, es menos volátil y explosivo, es menos higroscópico, puede mezclarse fácilmente con la gasolina en cualquier proporción, no requiere la modificación de los motores que utilizan gasolina y es menos corrosivo. El desarrollo de la producción de biobutanol combustible requiere: disponibilidad de materias primas de bajo costo, compatible con la producción de alimentos, integración con otros sistemas productivos, uso flexible de procesos y de materias primas y bajo consumo energético. El biobutanol puede ser producido por la fermentación llamada ABE (acetona-butanol-etanol), en la cual se produce una mezcla de solventes, generalmente en la proporción 3:6:1 de acetona-butanol-etanol respectivamente. Los microorganismos más utilizados son del género *Clostridium*. Para cumplir con el requerimiento de bajo consumo de energía, se deben mejorar las bajas concentraciones de butanol alcanzadas en los caldos de fermentación, de modo de reducir los costos de recuperación del producto, y superar los problemas ocasionados por la inhibición por producto.

El sorgo dulce tiene gran potencial como materia prima para la producción de biocombustibles, debido a sus altos rendimientos, adaptabilidad, tolerancia a la sequía, bajos requerimientos nutricionales. De la extracción de su jugo, rico en azúcares solubles, queda un residuo celulósico y granos que pueden ser aprovechados como combustible o ración animal, equilibrando la producción de energía y alimentos.

En este proyecto se propone estudiar la producción de biobutanol a partir de jugo de sorgo dulce preparado por ALUR-Bella Unión, atendiendo a dos factores claves: máxima conversión en butanol y mínimo uso de energía. El sorgo dulce es utilizado en la actualidad por ALUR-Bella Unión para la producción de etanol combustible. Se seleccionará una cepa apropiada para la producción de butanol a partir de sorgo dulce, y se estudiarán los principales aspectos tecnológicos de su transformación. Se realizará la caracterización química y se evaluará el proceso de fermentación en condiciones que puedan ser utilizadas en el equipamiento industrial existente de modo de favorecer la transferencia tecnológica (selección de las mejores condiciones operativas y cepa microbiana). Las principales respuestas a estudiar del bioproceso son: eficiencia y velocidad de fermentación, y concentración final de butanol. Se realizará el modelado y simulación del proceso industrial con el fin de evaluar el uso eficiente de la materia prima y la energía. Como apoyo a la transferencia se incluye actividades con técnicos de ANCAP/ALUR. También se prevé la participación de estudiantes de grado y posgrado para promover la formación tecnológica en el área de la bioenergía y su desarrollo sostenible.

### 1. Antecedentes del tema a ser abordado y relevancia del mismo para ANCAP

Uruguay presenta una alta dependencia energética de los combustibles fósiles importados, siendo su participación de 48.2% dentro de la matriz energética en el 2010. El sector transporte, el cual depende casi exclusivamente de combustibles derivados del petróleo, representó un 28% en el consumo final energético (Balance Energético 2010, disponible online). La producción de biocombustibles a partir de biomasa contribuye a la independencia energética, al desarrollo rural promoviendo la generación de trabajo en zonas rurales deprimidas y la diversificación de la producción agrícola con la inclusión de nuevas materias primas, a mitigar el cambio climático reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero y a promover el desarrollo sostenible del sistema energético (Kumar y Gayen, 2011).

En el año 2007 se aprobó la Ley de Agrocombustibles (N° 18195) que tiene por objeto el fomento y la regulación de la producción, comercialización y utilización de biocombustibles, establece horizontes de sustitución de combustibles fósiles por combustibles nacionales (en el caso del etanol la incorporación de hasta el 5% en las gasolinas de uso automotivo y a partir del 2015 ese porcentaje será el mínimo obligatorio) y requisitos medioambientales para la producción, entre otros.

En el país existen emprendimientos industriales agroenergético-alimentarios en los que se obtienen distintos productos y co-productos, como azúcar, etanol, biodiesel, energía eléctrica y alimentación animal. En cuanto a la producción de bioetanol combustible, la planta instalada en Bella Unión producirá más de 26000 m<sup>3</sup> anuales a partir de caña de azúcar y sorgo dulce, que equivalen a una sustitución de gasolina del orden del 5 a 8% en volumen. En Paysandú se está construyendo un nuevo complejo de ALUR, donde se producirán 70000 m<sup>3</sup> anuales de etanol a partir de sorgo grano, 50000 toneladas de alimento animal y 12 MWh de electricidad (<http://www.alur.com.uy/homes.html>, acceso 2012-02-24).

Dentro de los biocombustibles, además de bioetanol y biodiesel, se encuentra el biobutanol. Este presenta características superiores a las del etanol: (i) el contenido de energía es mayor; (ii) es menos volátil y explosivo, y tiene un alto punto de inflamabilidad, características que hacen que sea más seguro para manipular; (iii) es menos higroscópico, y por lo tanto se puede mezclar con la gasolina en la refinería, sin presentar problemas en el almacenaje y distribución (en el caso de la mezcla de gasolina con etanol, esta debe realizarse justo antes de su uso); (iv) puede mezclarse fácilmente con la gasolina en cualquier proporción; (v) no requiere la modificación de los motores que utilizan gasolina; y (vi) es menos corrosivo. Además, el butanol puede ser utilizado como intermediario en síntesis química y como solvente para una amplia variedad de aplicaciones industriales químicas y textiles (Dürre, 2007, 2011; Lee et al., 2008; García et al., 2011; Kumar y Gayen, 2011).

El butanol se puede producir por fermentación microbiana a partir de diferentes sustratos por la llamada fermentación acetona-butanol-etanol (ABE). En la bibliografía se puede encontrar revisiones sobre la producción industrial de biobutanol (Antoni et al., 2007; Dürre, 2007; Lee et al., 2008; García et al., 2011; Kumar y Gayen, 2011). Su producción fue reportada por primera vez por Louis Pasteur en 1861, y fue uno de los procesos de fermentación industrial más grandes de las primeras décadas del siglo XX. Se fermentaron materiales como melazas y materiales amiláceos como cereales, papa, mandioca y boniato (revisado por García et al., 2011). Varios países produjeron biobutanol a escala industrial durante el período 1920-1980. Sin embargo, en la década del 60 se perdió competitividad debido al aumento en el costo de las materias primas y el crecimiento de los procesos petroquímicos más eficientes. Recientemente, la demanda creciente por el uso de fuentes renovables de materias primas combinado con los avances de la biotecnología ha generado un nuevo interés en el proceso de producción de butanol por fermentación y a la re-examinación del proceso de fermentación ABE (Ezeji et al., 2007; Lee et al., 2008).

En los últimos años, algunas compañías han mostrado interés en la producción de biobutanol, como por ejemplo BP y DuPont (<http://www.bp.com/genericarticle.do?categoryId=2012968&contentId=7018942>, [http://www2.dupont.com/Sustainability/en\\_US/Marketplace/Transportation/biofuels.html](http://www2.dupont.com/Sustainability/en_US/Marketplace/Transportation/biofuels.html), acceso 2012-02-26). Planifican utilizar caña de azúcar o remolacha azucarera, maíz, trigo, o mandioca en una primer etapa, y en el futuro, materiales lignocelulósicos de materias primas con rápido crecimiento como los "pastos energéticos" o subproductos/residuos de otras biomásas. Se han creado varias "joint venture" con el objetivo de comercializar biobutanol (Lee et al., 2008; Ni y Sun, 2009). Otra compañía que planifica producir biobutanol es Cobalt Biofuels Cobalt (<http://www.cobalttech.com/index.php/news/news-item/series-c-round>,

acceso 2012-02-26), y Gevo que planea producir isobutanol (<http://www.gevo.com/>, acceso 2012-02-26). Existen varias compañías biotecnológicas, como ButylFuel, Cathay Industrial Biotech, Cobalt Biofuels, Green Biologics, Metabolic Explorer, TetraVitae Bioscience, entre otras, que están dedicadas a proveer cepas y soluciones para el proceso de fermentación ABE para la industria. Actualmente, el proceso de fermentación ABE industrial ha sido restaurado y operado solo en algunas plantas en China y Brasil. En China, al menos once plantas de producción están en operación y otras en construcción (Ni y Sun, 2009; Tao y Aden, 2009).

El costo de la materia prima utilizada en la producción de biobutanol es uno de los factores que más afectan la viabilidad económica de su producción (Lee et al., 2008; Green, 2011; Kumar y Gayen, 2011). Las materias primas se pueden clasificar en tres tipos: (i) las sacarígenas, que contienen mayoritariamente sacarosa, como el jugo de sorgo dulce, la caña de azúcar, la remolacha azucarera, (ii) los amiláceos, que contienen mayoritariamente almidón (polímero de glucosa), y (iii) los lignocelulósicos, compuestos por celulosa (polímero de glucosa), hemicelulosa (polímero compuesto por azúcares como xilosa, arabinosa, manosa y galactosa, ácidos urónicos y acético) y lignina (Balat y Balat, 2007). El uso de material lignocelulósico tiene gran interés debido a su bajo costo y gran disponibilidad. Las primeras etapas del proceso en las cuales se realiza la extracción de azúcares fermentables varían con la materia prima a utilizar. En el caso de los materiales sacarígenos, generalmente se realiza la extracción de los azúcares mediante molienda. Para fermentar materias primas amiláceas, se debe procesar el material (moler, cortar), y en el caso de que el microorganismo a utilizar no posea amilasas, se debe convertir el almidón en glucosa generalmente mediante un proceso con enzimas. En el caso de materias primas lignocelulósicas, es necesario realizar un pretratamiento físico/químico más severo que permita romper la estructura del material y poder liberar los azúcares que pueden ser fermentables. En este último caso, luego del pretratamiento, la hidrólisis de la celulosa a glucosa se realiza generalmente con un complejo enzimático (celulasas,  $\beta$ -glucosidasas y xilanasas). En algunos casos, también es necesaria una etapa de detoxificación, para eliminar compuestos que se generan durante el pretratamiento y que pueden inhibir la fermentación (Qureshi et al., 2008b). Los azúcares son convertidos posteriormente en butanol mediante fermentación.

Muchos microorganismos son capaces de producir butanol. La selección de la cepa depende de un número de factores, debiendo ser adecuada para metabolizar los sustratos disponibles localmente. Las cepas utilizadas para la fermentación ABE industrial son principalmente del género *Clostridium*, incluyendo *C. acetobutylicum* (también llamada cepa "Weizmann"), *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* y *C. saccharoperbutylicum* (Jones y Keis, 1995; Jones y Woods, 1986). Cepas de *C. acetobutylicum* y *C. beijerinckii* son adecuadas para la fermentación de acetona-butanol a partir de maíz, mientras *C. saccharobutylicum* y *C. saccharoperbutylicum* se han utilizado para fermentar melazas (Jones y Keis, 1995; Dürre, 2007).

Las cepas de Clostridia capaces de producir los solventes ABE (solventogénicas), pueden utilizar una gran variedad de sustratos: desde monosacáridos incluyendo varias pentosas y hexosas, como glucosa, fructosa, manosa, a polisacáridos como sacarosa, lactosa, y almidón. Galactosa, xilosa, arabinosa, rafinosa pueden ser parcialmente utilizados (Jones y Woods, 1986; Lee et al., 2008; Papoutsakis, 2008; Kumar y Gayen, 2011). Generalmente se requiere una fuente de nitrógeno compleja como extracto de levadura. Sin embargo, el requerimiento de otros nutrientes para el crecimiento es bastante simple (revisado por Lee et al., 2008). *C. acetobutylicum* es capaz de metabolizar almidón, habiendo sido aisladas dos amilasas y analizadas en detalle de este microorganismo. Del estudio del genoma, se encontraron genes que deberían permitir la degradación de celulosa y xilanos. Estos últimos ha mostrado ser metabolizado por *C. acetobutylicum*; sin embargo, la celulosa no ha podido ser metabolizada directamente (Dürre, 2007). Además, se ha encontrado que puede tolerar

muchos compuestos que se forman durante el pretratamiento e hidrólisis de los materiales lignocelulósicos, y que frecuentemente inhiben el crecimiento de muchos microorganismos, como por ejemplo furfural e hidroximetilfurfural (Green, 2011; Qureshi et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Dentro de las cepas de *Clostridium*, la más estudiada ha sido *C. acetobutylicum*. Es una bacteria gram-positiva, anaerobia, formadora de esporas. En una primera etapa se producen mayoritariamente los ácidos butírico y acético junto con  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$  (acidogénesis) y en una segunda etapa una mezcla de butanol, acetona y etanol (solventogénesis) (Dürre, 2007; Lee et al., 2008; García et al., 2011; Kumar y Gayen, 2011). Se produce aproximadamente el doble de butirato que acetato. También se forma algo de etanol en esta etapa. La formación de lactato depende de las condiciones de crecimiento específicas. Al final del crecimiento exponencial, ocurre un cambio en el metabolismo de *C. acetobutylicum*. La producción de ácidos se reduce, y convierte el acetato y butirato producidos en acetona y butanol (aproximadamente el doble de butanol que acetona). Esto se produce como respuesta a las condiciones ambientales. Debido a la formación de ácidos durante la fermentación, el pH fuera de las células disminuye a un valor que no es tolerable por las mismas. Para mitigar este efecto, estos microorganismos transforman los ácidos producidos en solventes y aumentan de esta manera el pH al valor original. Si bien de esta manera se supera el problema creado con el bajo pH, el butanol formado tiene un efecto dañino sobre las membranas. Como respuesta, la bacteria comienza a sintetizar endoesporas para garantizar su supervivencia. Generalmente se produce una mezcla de solventes en la relación 3:6:1 de acetona:butanol:etanol (Bowles y Ellefson, 1985; Dürre, 2007; Lee et al., 2008).

Las cepas Clostridia, si bien producen una mezcla de solventes, presentan una pobre resistencia a los mismos. El efecto tóxico de los solventes, especialmente del butanol, limita la concentración admisible del mismo en el caldo de fermentación. Concentraciones mayores de 20 g/L de butanol son tóxicas para estas cepas. Este nivel de butanol hace que el costo de la destilación para recuperar el producto sea prohibitivo (Aden, 2007; Ezeji et al., 2010; Green, 2011). Para poder solucionar el problema de la toxicidad del butanol, se ha intentado modificar genéticamente microorganismos que tienen una resistencia natural a los solventes y que no son productores naturales de solventes, y que a su vez tienen buenas características de crecimiento (por ejemplo, crecen más rápido que Clostridia), como *Escherichia coli*, *Lactobacillus* y *Saccharomyces cerevisiae*. La manipulación genética de microorganismos productores de butanol se orientó además, a la búsqueda de cepas que pudieran producir butanol en mayor proporción que los demás solventes. Por otro lado, también se busca mejorar la cinética de la fermentación eliminando la etapa acidogénica separada, y simplificar la fermentación eliminando la asociación ("coupling") entre las etapas de esporulación y producción de solventes (Ni y Sun, 2009; García et al., 2011). Sin embargo, las cepas de Clostridia parecen tener un potencial mucho mayor para la producción de butanol que los microorganismos manipulados genéticamente hasta el momento (Ezeji et al., 2010; Patakova et al., 2012).

Se han utilizado varias modalidades de fermentación del proceso ABE: en batch (batch), semi-continuo (fed-batch) y continuo (Huang et al., 2004; Ezeji et al., 2005, 2007; Qureshi y Maddox, 2005; Qureshi et al., 2008a, 2008c; Kumar y Gayen, 2011). La concentración final de solventes producido en forma batch generalmente se encuentra en el rango 12 a 20 g/L (Lee et al., 2008). Una fermentación continua podría aumentar la productividad volumétrica de butanol a partir de Clostridia, pero la velocidad de crecimiento de estos microorganismos requeriría recirculación celular o células inmovilizadas (Qureshi y Maddox, 1995). Un problema adicional con *C. acetobutylicum* en fermentación continua, es la posible degeneración de la capacidad de producción de solventes, pues es susceptible a la pérdida del megaplásmido que contiene los genes solventogénicos. Fermentaciones de tipo fed-batch y continua presentan el problema de la toxicidad y naturaleza bifásica de los solventes

acetona-butanol. Se han ensayado fermentaciones continuas con células libres, inmovilizadas, y recirculadas (Baba et al., 2012).

Para que la producción de butanol sea económicamente viable es necesario contar con materias primas de bajo costo, mejorar la eficiencia de la fermentación y utilizar procesos más sustentables para la recuperación del solvente y recirculación de agua del proceso. La utilización de materiales lignocelulósicos como materia prima de bajo costo todavía es inviable económicamente a nivel industrial. Mayor investigación es necesaria en este tema, tanto a nivel del pretratamiento de la materia prima como en la búsqueda de microorganismos que fermenten el material en forma eficiente (García et al., 2011). Con respecto a la fermentación, como posibles soluciones se han propuesto desarrollar microorganismos que puedan tolerar concentraciones de butanol altas y/o desarrollar métodos para remover el producto *in situ* de forma tal que el microorganismo no se vea expuesto a elevadas concentraciones de butanol (Green, 2011; García et al., 2011). Se han ensayado métodos como por ejemplo: adsorción, gas stripping, extracción líquido-líquido, per-evaporación, separación en dos fases acuosa, extracción supercrítica, flasheo, entre otros (Ezeji et al., 2007, 2010; Mariano et al., 2010; García et al., 2011; Bankar et al., 2012).

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es un cultivo con mucho potencial para su uso como materia prima en una variedad de bioprocesos, por sus altos rendimientos de azúcares fermentables y biomasa lignocelulósica. El sorgo dulce es menos importante para la producción de azúcar refinado que otros cultivos sacarígenos como la caña de azúcar y remolacha azucarera desde el punto de vista económico. Sin embargo, puede producir más azúcares fermentables bajo condiciones marginales que los otros cultivos referidos (Whitfield et al., 2012). Como cultivo presenta altos rendimientos, buen crecimiento y adaptabilidad, tolerancia a la sequía, relativamente bajos requerimientos nutricionales, pudiendo entrar en rotaciones con pasturas, permitiendo una explotación más racional del suelo y equilibrando los sistemas de producción de energía y alimentos. Con respecto a la producción de biomasa, este cultivo se caracteriza por presentar una elevada eficiencia fotosintética y un alto rendimiento de biomasa y azúcares (Mamma et al., 1996; Gnansounou et al., 2005; Liu et al., 2008; Siri-Prieto et al., 2008; Almodares y Hadi, 2009; Bennett y Anex, 2009; de Vries et al., 2010).

Del tallo del sorgo dulce se puede extraer un jugo con alto contenido de azúcares fermentables (básicamente sacarosa, glucosa y fructosa). Este cultivo, al igual que la caña de azúcar, ofrece más ventajas que otros cultivos para la producción de biocombustibles, ya que deja un residuo sólido (bagazo) que puede ser utilizado como combustible para producir energía en la planta (Monti y Venturi, 2003), como alimento animal (Ratnavathi et al., 2010), o como fertilizante para suelo después de composteo con otros residuos (Negro et al., 1999). Este también podría llegar a ser utilizado para producir biocombustibles, ya que es un material lignocelulósico (Zhang et al., 2011; Yu et al., 2012). Además, el sorgo dulce tiene una panoja con granos que puede ser usada tanto como alimento animal (Ratnavathi et al., 2010), o como materia prima (el almidón) para la producción de butanol o etanol. A nivel mundial, el sorgo se usa marginalmente como ración animal o para la preparación de jarabe edulcorante. En Uruguay, el sorgo dulce puede ser una buena opción para pequeños y medianos productores. En la actualidad, Alur-Bella Unión utiliza jugo de sorgo dulce para la producción de bioetanol combustible (<http://www.alur.com.uy/bellaunion.html>, acceso 2012-02-27). En cuanto a la producción de butanol a partir de sorgo dulce, se dispone de poca información en la bibliografía internacional (Shin et al., 2004; Cheng et al., 2008; Whitfield et al., 2012; Yu et al., 2012).

Este proyecto pretende contribuir a la producción nacional de biobutanol atendiendo aspectos claves como: uso de materias primas de bajo costo, no competidoras con alimentos, integración con otros sistemas productivos, uso flexible de procesos y de materias primas que permitan asegurar el suministro del producto. Se propone estudiar la

producción de biobutanol a partir de jugo de sorgo dulce preparado por ALUR-Bella Unión, atendiendo a dos factores claves: máxima conversión en butanol y mínimo uso de energía.

### **Antecedentes del equipo de investigación**

El Departamento de Bioingeniería del Instituto de Ingeniería Química, de la Facultad de Ingeniería, tiene infraestructura y competencia técnica en el área de la Ingeniería de las Fermentaciones desde el año 1985 y en Microbiología Industrial desde el año 1971.

En los años 1989-1991, se trabajó sobre la producción de bioetanol a partir de lactosuero con financiamiento de ANCAP. Se realizaron estudios a escala de laboratorio y piloto utilizando un fermentador (150 L) de la planta de Capurro, ANCAP. Los principales resultados se recogieron en diferentes publicaciones:

- Varela H, Ferrari MD, Loperena L, Lareo C. Effect of aeration rate on the alcoholic fermentation of whey by *Kluyveromyces fragilis*. *Microbiología (SEM)* 8, pp. 14-20, 1992
- Ferrari MD, Loperena L, Varela H. Ethanol production from concentrated whey permeate using a fed batch culture of *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology Letters* 16 (2), pp. 205-210, 1994

A partir del 2006, se ha estado trabajando en la producción de etanol combustible a partir de diferentes materias primas sacarígenas (sorgo dulce, caña de azúcar y remolacha azucarera), amiláceas (boniato) y lignocelulósicas (pastos perennes), con financiamiento del Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT), del Ministerio de Educación y Cultura (Proyectos PDT S/C/OP/47/10 y S/C/OP/79/01), del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria del INIA (Proyecto FPTA 266) y de la ANII (Proyecto FSE 2009\_1\_37). Los dos primeros finalizaron, y el último finaliza en diciembre 2012.

En el proyecto PDT S/C/OP/47/10 se realizaron ensayos en parcelas experimentales de pequeños productores de diferentes variedades de caña de azúcar (3), sorgo dulce (5) y remolacha (17). Se evaluaron los resultados en base al rendimiento agrícola, su contenido de azúcares y la fermentabilidad de sus azúcares evaluada en ensayos de laboratorio. Con relación al sorgo dulce, las variedades más promisorias fueron Theis, Topper y M81 que alcanzaron rendimientos de 111 a 122 t/ha. En base a los análisis de azúcares y los resultados de fermentación se determinaron rendimientos de etanol superiores a los 4000 litros por hectárea. Los principales resultados del trabajo en este proyecto se resumen en el trabajo:

- Ziliani N., Mazziotto J., Braña G., Laborda I., Vilaró P., Lluberas M.E., Satrano E. Lareo C. y Ferrari M.D. (2012) Producción de bioetanol combustible a partir de cultivos experimentales de caña de azúcar, sorgo dulce y remolacha azucarera en Uruguay. Enviado para su publicación a la revista *Ingeniería Química, AIQ*.

En el proyecto PDT S/C/OP/79/01 se realizaron ensayos con materiales experimentales de sorgo dulce, boniato y pasto elefante. Los principales resultados obtenidos se resumen en los trabajos presentados a los siguientes eventos y una publicación en una revista científica arbitrada:

- Guigou M., Lareo C., Pérez L.V., Lluberas M.E., Vázquez D., Ferrari M.D. (2011) Bioethanol production from sweet sorghum: Evaluation of post-harvest treatments on sugar extraction and fermentation. *Biomass and Bioenergy* 35(7): 3058-3062
- Ramírez M.B., Camesasca L., Guigou M., Lareo C., Ferrari M.D. (2011) Producción de etanol a partir de pasto elefante: Respuesta a la prehidrólisis ácida y fermentación con *Pichia stipitis*. XVIII SINAIFERM 2011, Caxías do Sul, Brasil, 24-27 julio. Póster.

- Ramírez M.B., Camesasca M.L., Guigou M., Ferrari M.D., Lareo C. (2010) Evaluación preliminar de pasto elefante para la producción de bioetanol combustible. XX Congreso Latinoamericano de Microbiología, Montevideo, Uruguay. Póster.
- Guigou M., Pérez L.V., Lareo C., Lluberas M.E., Vázquez D., Ferrari M.D. Bioethanol production from three sweet sorghum varieties: evaluation of post-harvest treatment on sugar extraction and fermentation. XVII SINAFERM 2009, Natal, Brasil, 2-5 agosto 2009. Presentado en forma oral.
- Guigou M., Pérez L.V., Ferrari M.D., Fajardo L., Lareo C. Production of bioethanol from sweet potato: evaluation of simultaneous saccharification and fermentation. XVII SINAFERM 2009, Natal, Brasil, 2-5 agosto 2009. Presentado en forma de póster.
- Lareo, C., Ferrari M.D., Pérez, L.V., Carvalho, F., Fajardo, L., Guigou, M. Producción de etanol combustible a partir de boniato. VIII Encuentro Nacional de Microbiólogos, Montevideo, Uruguay, 6 y 7 de noviembre 2008. Presentado en forma oral.

El objetivo principal del proyecto FPTA fue mejorar la eficiencia del proceso de hidrólisis y fermentación de materiales amiláceos para la producción de bioetanol combustible. Se estudió el uso de boniato y granos de sorgo dulce con el fin de poder utilizar todos los azúcares fermentables de la planta (jugo y granos). El uso combinado del almidón de los granos y de los azúcares del tallo permitirá aumentar el rendimiento de etanol. Los principales resultados obtenidos hasta la fecha se resumen en una tesis de maestría y en los trabajos presentados a los siguientes eventos:

- Guigou M.D. (2011) Producción de bioetanol combustible a partir de boniato. Tesis de Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- Ethanol production from sweet potato. Workshop Evaluating the sustainability of potential agro-industrial chains (sweet sorghum, grain sorghum, sweet potato and forestry) for agroenergy production, INIA-USDA-ECPA, Montevideo, Uruguay, junio 2011. Presentación oral.
- Fajardo L., Guigou M., Larnaudie V., Ferrari M.D., Lareo C. (2011) Evaluation of starch hydrolysis and fermentation of sweet potato for bioethanol production. XVIII SINAFERM 2011, Caxías do Sul, Brasil, 24-27 julio. Póster.
- Guigou M.D., Fajardo L., Larnaudie V., Lareo C., Ferrari M.D. (2010) Producción de bioetanol combustible a partir de boniato: efecto del secado de la materia prima. XX Congreso Latinoamericano de Microbiología, Montevideo, Uruguay. Póster.

Dentro del marco de estos proyectos se realizó un análisis del ciclo de vida del etanol combustible, cuyos principales resultados dio lugar a la siguiente presentación:

- Croce M.J., Juárez F., Rica R. y Ferrari M.D. Análisis del ciclo de vida del etanol combustible de caña de azúcar en Uruguay: balance de energía y evaluación de emisiones de gases de efecto invernadero. IV Encuentro Regional de Ingeniería Química, Asociación de Ingenieros Químicos del Uruguay, LATU, Montevideo, Uruguay, 5, 6 y 7 de junio de 2008.

En materia de asesoramiento de interés para el proyecto se ha dictado un curso para futuros operarios de destilería de etanol en Alur Bella Unión (Fundamentos de la Tecnología de la Fermentación Alcohólica, noviembre 2008) y se ha realizado el trabajo de evaluación de sorgo grano para la producción de bioetanol, para la Alur Paysandú (octubre 2011 – febrero 2012)

## 2. Objetivos

<b>General</b>	Promover la producción nacional sostenible de biocombustibles líquidos automotores.
<b>Específico</b>	Promover la producción de biobutanol combustible a partir de sorgo dulce mediante procesos eficientes e integrables a la producción de bioetanol.

## 3. Estrategia de investigación y actividades específicas

El jugo de sorgo dulce que se utilizará en el proyecto será provisto por ALUR-Bella Unión. Se propone realizar las siguientes actividades:

1. Puesta a punto de técnicas analíticas de determinación de azúcares, butanol, acetona, etanol, y ácidos orgánicos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y gaseosa (GC).
2. Evaluación de cepas por su aptitud para la producción industrial de butanol en base a:
  - Alto rendimiento, velocidad, concentración final de butanol (incluyendo el impacto de otros productos solventes secundarios como acetona y etanol)
  - Capacidad para trabajar en biorreactores
  - Capacidad de fermentar jugo de sorgo dulce

Los ensayos se realizarán en matraces agitados y/o fermentadores de laboratorio con medios sintéticos que simulen medios naturales y los propios medios naturales (jugo de sorgo dulce).

3. Ensayos con la cepa más promisoría seleccionada, para evaluar las condiciones operativas que produzcan el mejor desempeño en términos de rendimiento, velocidad, concentración de butanol, incluyendo formación de acetona y etanol. Se analizará la conveniencia de estudiar otro tipo de modalidad de fermentación para la producción de biobutanol (fed-batch, por ejemplo).
4. Evaluación del uso de la energía y de la materia prima usando un software específico para el modelado y simulación, considerando diferentes configuraciones de procesos.
5. Actividades de transferencia al sector productivo, que incluyen la participación de técnicos de Alur y difusión de los resultados obtenidos en eventos y revistas científicas.
6. Evaluación global de resultados, incluyendo principales conclusiones y líneas de acción futura, elaboración del informe final.

Otras actividades a realizar en forma permanente, no incluidas en el cronograma, son:

- Actividades de formación de recursos humanos mediante la participación de estudiantes de grado y posgrado de las carreras de Ingeniería Química, Ingeniería de Alimentos, Maestría en Energía, Maestría en Ingeniería Química, Maestría en Biotecnología y Licenciatura en Bioquímica, dependiendo de la confidencialidad requerida.
- Recopilación bibliográfica y relevamiento de las condiciones operativas disponibles o utilizadas en la práctica industrial para la producción de biobutanol.
- Actividades permanentes de dirección, coordinación y revisión de actividades a ejecutar.

4. Personal docente asignado al proyecto (nombre, grado y dedicación proyectada semanal al proyecto).

Rol	Nombre	Cargo	Dedicación horaria al proyecto	Nivel Académico / Perfil	Actividades
Responsable	Claudia Lareo Varela	Grado 4/DT	15	Doctorado/ Ingeniería química	Coordinación, planificación y seguimiento de actividades Diseño de experiencias y análisis de resultados Supervisión de tarea de laboratorio Gestión económica y de compras Actividades de transferencia, relacionamiento y difusión Capacitación de docentes grado 1 y 2.
Investigador	Mario Daniel Ferrari Vidal	Grado 4	10	Maestría/ Ingeniería química	Diseño de experiencias y análisis de resultados, Actividades de transferencia, relacionamiento y difusión Capacitación de docentes grados 1 y 2.
Ayudante	Mairan Denise Guigou Berretta	Grado 2	10	Maestría/ Ingeniería química	Diseño y análisis de experiencias Ejecución de tareas experimentales y simulación del proceso Mantenimiento de equipos Aprendizaje de nuevas técnicas experimentales
Ayudante	Valeria Inés Larnaudie Plachot	Grado 1	20	Ingeniería química	Diseño y análisis de experiencias Ejecución de tareas experimentales y simulación del proceso Mantenimiento de equipos Aprendizaje de nuevas técnicas experimentales
Ayudante	María Eloísa Rochón Martínez	Grado 1	30	Estudiante de Ingeniería de Alimentos	Diseño y análisis de experiencias Ejecución de tareas experimentales Mantenimiento de equipos Aprendizaje de nuevas técnicas experimentales
Ayudante	A contratar con cargo al proyecto	Grado 1	25	Estudiante de Ingeniería Química, de Alimentos, o Lic. en Bioquímica	Diseño y análisis de experiencias Ejecución de tareas experimentales Mantenimiento de equipos Aprendizaje de nuevas técnicas experimentales

5. Cronograma de actividades/tareas a ser realizadas durante el proyecto.

Actividad		Trimestre en que se realizará la actividad							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	Puesta a punto de técnicas de análisis.	X	X						
2	Evaluación de cepas.		X	X	X				
3	Ensayos de fermentación con cepa seleccionada.			X	X	X	X	X	
4	Evaluación del uso de la energía y de la materia prima.					X	X	X	X
5	Actividades de transferencia al sector productivo y difusión.		X		X		X		X
6	Evaluación global de resultados.								X

## **6. Descripción del espacio físico así como de los equipos y materiales disponibles para la realización del proyecto.**

En el Departamento de Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería se dispone de 250 m<sup>2</sup> de laboratorios con servicios y equipamiento básico de laboratorio. Entre los equipos existentes se destacan:

- Cromatógrafo de gases Shimadzu GC 14B con detectores TCD y FID;
- Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 Plus AF con detector FID;
- Fermentadores de 2 L de capacidad, BioFlo, NewBrunswick Scientific;
- Fermentador de 5 L de capacidad Biostat A Plus, Sartorius
- Fermentador de 5 L de capacidad Minifors Infors HT
- Agitadores orbitales NewBrunswick Scientific e Infors Ecotron;
- Centrífuga refrigerada;
- HPLC Shimadzu;
- Espectrofotómetro;
- Banco de flujo laminar Holten Lamin Air HB 2441;
- Microscopios;
- Estufas de esterilización y de cultivo;
- Autoclaves;

## **7. Estrategia de comunicación con ANCAP durante la realización del proyecto.**

Se prevé la realización de reuniones, talleres y/o charlas con los técnicos de ANCAP y Alur. En las charlas realizadas durante la ejecución del proyecto se intercambiarán puntos de vista con los técnicos de ANCAP de modo de obtener una retroalimentación para las tareas del proyecto, que pueden implicar revisión o reformulación de actividades. Las reuniones se harán tanto en la planta industrial como en las instalaciones del Departamento de Bioingeniería, de modo de facilitar la transferencia no solo de resultados sino de métodos experimentales y técnicas analíticas que pueden ser usados por la propia industria, aspectos ambos que ya se ha practicado en proyectos previos relativos a métodos de fermentación y de análisis de almidón.

## **8. Mecanismos de difusión de los resultados.**

La difusión de los resultados se realizará mediante la elaboración de artículos científicos presentados en eventos científicos, técnicos y/o revistas arbitradas por pares ("Peer review"). Se prevé la participación de estudiantes de grado y posgrado de las carreras de Ingeniería Química, Ingeniería de Alimentos, Maestría en Energía, Maestría en Ingeniería Química, Maestría en Biotecnología y/o Licenciatura en Bioquímica, que permitirá la transmisión académica formal de los conocimientos.

## **9. Resultados esperados e impactos de los mismos en ANCAP; beneficios esperados para el avance de las disciplinas del proyecto u otras.**

Se espera obtener los siguientes resultados:

- Selección de una cepa apta para la producción de butanol a partir de jugo sorgo dulce.
- Selección de las mejores condiciones operativas para la producción de butanol de jugo de sorgo dulce en base a eficiencia y velocidad de fermentación, y concentración final de butanol. Se dispondrá de informe correspondiente.

- Identificación de los principales parámetros del proceso industrial que inciden en el uso eficiente de la materia prima y de la energía mediante herramientas de modelo y simulación de procesos. Se dispondrá de informe correspondiente.
- Transferencia directa de los resultados obtenidos al sector productivo, básicamente técnicos de ANCAP y Alur. Se dispondrá de las presentaciones y documentos de apoyo asociados.
- Capacitación de docentes grados 1 y 2 participantes en el proyecto.
- Difusión de los resultados en por lo menos dos eventos científicos, y actividades de enseñanza de grado y posgrado, y publicación de un artículo en revista arbitrada.
- Creación de competencias e infraestructura básica para ensayos de producción de butanol que permita apoyar futuras investigaciones y las decisiones tecnológicas de ANCAP con relación a la incorporación de nuevos procesos, tecnologías y productos.

Los impactos, directos o indirectos, de los resultados de este proyecto son:

- Mejor conocimiento de la tecnología de la producción de biobutanol que permitirá una mejor evaluación de las ofertas comerciales disponibles y reducir los riesgos tecnológicos asociados.
- Disponibilidad de datos de proceso para realizar estudios de prefactibilidad técnica y económica.
- Disponibilidad de competencias técnicas y de servicios de ensayos locales como apoyo a la selección y desarrollo de nuevos emprendimientos, de modo de darle sustentabilidad al desarrollo del mercado de los biocombustibles.
- Aprendizaje conjunto academia – industria.
- Promover materias primas agrícolas por diversificación de los productos a obtener.
- Mayor y más eficiente uso de la capacidad instalada de producción de biocombustibles.

## 10. Referencias bibliográficas.

- Aden A. (2007) Biomass and Biofuels: Technology and Economic Overview. REL/PR-510-41793. Presentado al "2007 Global Energy Technology Strategy Project (GTSP) Technical Workshop", May 23, College Park, Maryland.
- Almodares A., Hadi M.R. (2009) Production of bioethanol from sweet sorghum: a review. African Journal Agricultural Research **4**(9):772-780.
- Antoni D., Zverlov V.V., Schwarz W.H. (2007) Biofuels from microbes. Applied Microbiology and Biotechnology **77**:23-3
- Baba, S.-i., Tashiro Y., Shinto H., Sonomoto K (2012) Development of high-speed and highly efficient butanol production systems from butyric acid with high density of living cells of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Journal of Biotechnology **157**: 605-612.
- Balance Energético (2010). Dirección Nacional de Energía. Disponible online <http://www.miem.gub.uy/gxpsites/hgxpp001?5,6,239,O,S,0,MNU;E;72;1;73;6;MNU;,.> acceso 2012-02-24).
- Balat M., Balat H., Oz C. (2007) Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science **34**: 551-573

- Bankar S.B., Survase S.A., Singhal R.S., Granström T. (2012) Continuous two stage acetone-butanol-ethanol fermentation with integrated solvent removal using *Clostridium acetobutylicum* B 5313. *Bioresource Technology* **106**: 110–11
- Bennett A.S., Anex R.P. (2009) Production, transportation and milling costs of sweet sorghum as a feedstock for centralized bioethanol production in the upper Midwest. *Bioresource Technology* **100**: 1595–1607
- Bowles L.K., Ellefson W.L. (1985) Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **50**(5): 1165-1170.
- Cheng Y., Li S., Huang, J., Zhang Q., Wang X. (2008) Production of acetone and butanol by fermentation of sweet sorghum stalk juice. *Transactions Chinese Society Agricultural Engineering* **24**: 177–180.
- de Vries S.C., van de Ven G.W.J., van Ittersum M.K., Giller K.E. (2010) Resource use efficiency and environmental performance of nine major biofuel crops, processed by first-generation conversion techniques. *Biomass and Bioenergy* **34**: 588-601
- Dürre P. (2007) Biobutanol: An attractive biofuel. *Biotechnology Journal* **2**: 1525-1534.
- Dürre P. (2011) Fermentative production of butanol — the academic perspective. *Current Opinion in Biotechnology* **22**(3): 331-336
- Ezeji T., Milne C., Price N.D., Blaschek H.P. (2010) Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**:1697– 1712
- Ezeji T.C., Qureshi N., Blaschek H.P. (2005) Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Biotechnology* **115**(2): 179-187
- Ezeji T.C., Qureshi N., Blaschek H.P. (2007) Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology* **18**(3): 220-227
- García V., Pääkkilä J., Ojamo H., Muurinen E., Keiski R.L. (2011) Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**(2): 964-980
- Gnansounou, E, Dauriat A, Wyman CE. (2005) Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. *Bioresource Technology* **96**: 985–1002
- Green E.M. (2011) Fermentative production of butanol—the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology* **22**(3): 337-343
- Huang W.-C., Ramey D.E., Yang S.-T. (2004) Continuous production of butanol by *Clostridium acetobutylicum* immobilized in a fibrous bed bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **115**(1-3): 887-898
- Jones D.T., Keis S. (1995) Origins and relationships of industrial solvent-producing clostridial strains. *FEMS Microbiology Reviews* **17**: 223-232
- Jones D.T., Woods D.R. (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews* **50**(4): 484-524.
- Kumar M., Gayen K. (2011) Developments in biobutanol production: New insights. *Applied Energy* **88**(6): 1999-2012
- Kwiatkowski J.R., McAloon A.J., Taylor F., Johnston D.B. (2006). Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products* **23**, 288–296.
- Lee S.Y., Park J.H., Jang S.H., Nielsen L.K., Kim J., Jung K.S. (2008) Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering* **101**(2): 209-228
- Liu R, Li J, Shen F. (2008) Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation. *Renewable Energy* **33**:1130-1135
- Mamma D, Koullas D, Fountoukidis G, Kekos D, Macris BJ, Koukios E. (1996) Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture. *Process Biochemistry* **3**(4): 377-381
- Mariano A.P., Costa C.B.B., de Angelis D.F., Mauger Filho F., Atala D.I.P., Wolf Maciel M.R., Maciel Filho R. (2010) Optimisation of a continuous flash fermentation for butanol

- production using the response surface methodology. *Chemical Engineering Research and Design* **88**(5–6): 562-571
- Monti A, Venturi G. (2003) Comparison of the energy performance of fibre sorghum, sweet sorghum and wheat monocultures in northern Italy. *European Journal of Agronomy* **19**: 35–43
- Negro MJ, Solano ML, Ciria P, Carrasco J. (1999) Composting of sweet sorghum bagasse with other wastes. *Bioresource Technology* **67**: 89-92
- Ni Y., Sun Z. (2009) Recent progress on industrial fermentative production of acetone – butanol – ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**:415– 423
- Patakova P., Linhova M., Rychtera M., Paulova L., Melzoch K. (2012) Novel and neglected issues of acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by clostridia: Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. *Biotechnology Advances* (en prensa). Disponible online
- Papoutsakis E.T. (2008) Engineering solventogenic clostridia. *Current Opinion in Biotechnology* **19**(5): 420-429
- Qureshi N., Bowman M.J., Saha B.C., Hector R., Berhow M.A., Cotta M.A (2012) Effect of cellulosic sugar degradation products (furfural and hydroxymethyl furfural) on acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation using *Clostridium beijerinckii* P260. *Food and Bioproducts Processing* (en prensa). Disponible online
- Qureshi, N., Maddox, I.S. (1995) Continuous production of acetone–butanol–ethanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid liquid extraction. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **80**, 185–189.
- Qureshi N., Maddox I.S. (2005) Reduction in Butanol Inhibition by Perstraction: Utilization of Concentrated Lactose/Whey Permeate by *Clostridium acetobutylicum* to Enhance Butanol Fermentation Economics. *Food and Bioproducts Processing* **83**(1): 43-52
- Qureshi N., Saha B.C., Cotta M.A. (2008a) Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part II—Fed-batch fermentation. *Biomass and Bioenergy* **32**(2): 176-183
- Qureshi N., Saha B.C., Hector R.E., Cotta M.A. (2008b) Removal of fermentation inhibitors from alkaline peroxide pretreated and enzymatically hydrolyzed wheat straw: Production of butanol from hydrolysate using *Clostridium beijerinckii* in batch reactors. *Biomass and Bioenergy* **32**(12): 1353–1358
- Qureshi N., Saha B.C., Hector R.E., Hughes S.R., Cotta M.A. (2008c) Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I —Batch fermentation. *Biomass and Bioenergy* **32**(2):168-175
- Ratnavathi CV, Suresh K, Vijay Kumar BS, Pallavi M, Komala VV, Seetharama N. (2010) Study on genotypic variation for ethanol production from sweet sorghum juice. *Biomass and Bioenergy* **34**(7):947-952
- Shin K.C., Hong B., Fan L.T. (2004) Fermentative production of butanol from sorghum molasses. *Proceeding de la Conferencia: Wood and Agricultural Residues: Research on Use for Feed, Fuels, and Chemicals, Kansas, EEUU. Código 5646.*
- Siri-Prieto Siri-Prieto G, Terzagui L, Ribero H, Gandolfo D, Mosqueira J. (2008) Potencialidad del sorgo dulce como bio-combustible en el Uruguay. *Cangüé* **30**: 19-24.
- Tao L., Aden A. (2009) The economics of current and future biofuels. *In Vitro Cellular and Developmental Biology — Plant* **45**:199 – 217.
- Whitfield M.B., Chinn M.S., Veal M.W. (2012) Processing of materials derived from sweet sorghum for biobased products. *Industrial Crops and Products* **37**(1): 362–375
- Yu J., Zhang T., Zhong J., Zhang X., Tan T. (2012) Biorefinery of sweet sorghum stem. *Biotechnology Advances* (en prensa). Disponible online
- Zhang T., Du N., Tan T. (2011) Biobutanol production from sweet sorghum bagasse. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* **5**: 331–336.
- Zhang Y., Han B., Ezeji T.C. (2012) Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. *New Biotechnology* **29**(3): 345-351