



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



CIN Centro de
Investigaciones
Nucleares
Facultad de Ciencias - UDELAR

Estudios de deslignificación de bagazo de caña de azúcar para su uso en la producción de bioetanol.

SILVANA ANDREA BONIFACINO BUTTIGLIONE

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Tutora: Dra. Mary Lopretti

Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología, Centro de Investigaciones
Nucleares, Facultad de Ciencias

Montevideo, Uruguay
2012

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Carla, a mi papá Julián y a mi hermana Claudia por todo lo que me enseñaron, especialmente a hacer todo con AMOR, a valorar y respetar la vida, a ser humilde y respetuosa, y a buscar la paz y la armonía.

A mis hermanos Bruno y Sofía por tantos momentos de alegría compartidos.

A mi hermanita Giuli por estar siempre, y preocuparse y ocuparse con tanto amor.

A mi hermana Carla por enseñarme tanto sobre las relaciones humanas, por creer en mí, por ayudarme en la etapa más difícil de la carrera y por no dejarme caer.

A mi AMOR Danilo por enseñarme a confiar en mí, por ayudarme tantas veces, por estar, por existir!!!!

A mi hermana del alma Patricia.

A mis perros y gatos por existir! Solo con eso llenan mi vida de AMOR!!!!

Y a todas las personas que me ayudaron en muchos momentos de esta larga etapa: Jorge, Julio, Laura, Marcelo, Wilde, Leticia.

Gracias Alejandro por haber sido parte de esto!

A Mary Lopretti por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis con ella, por haber dedicado su tiempo para enseñarme y por confiar en que yo podía realizar este trabajo. Por su cariño.

A la VIDA por TODO!!!!!!!!!!!!!!

*Para ver el mundo en un grano de arena y un cielo en una flor
silvestre, sostén el infinito en la palma de tu mano, y la
eternidad en una hora.*

William Blake

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
INDICE	ii
LISTA DE TABLA Y FIGURAS	iv
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1- Generalidades.....	2
2.2- Procesos de conversión de la celulosa en etanol.....	4
2.3- BIODESLIGNIFICACIÓN	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1- Producción de enzimas ligninolíticas de 3 hongos por fermentación de estado sólido y fermentación sumergida de bagazo de caña de azúcar.....	11
3.1.1- Preparación de los inóculos.	11
3.1.2- Materia prima.....	11
3.1.3- Producción de enzimas.	11
3.1.3.1- Producción de enzimas por fermentación de estado sólido (SSF)....	11
3.1.3.2- Producción de enzimas por fermentación sumergida (SF).	12
3.2- Evaluación de la producción de enzimas ligninolíticas de <i>P. ostreatus</i> , <i>P. chrysosporium</i> y <i>T. versicolor</i>	12
3.2.1- Determinación de actividad enzimática para los tiempos 7, 14 y 21 días de los procesos de SSF y SF (Lopretti, 1999).....	12
3.2.1.1- Actividad Lacasa.....	12
3.2.1.2- Actividad Lignino Peroxidasa (LiP).....	13
3.2.1.3- Actividad Manganeso Peroxidasa (MnP).....	13
3.2.1.4- Actividad carboximetilcelulasa (CMC).....	13
3.2.1.5- Método del ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS).....	13
3.3- Evaluación de los procesos de deslignificación biológica del bagazo mediante hidrólisis enzimática de la celulosa.....	14
3.3.1- Caracterización de una Celulasa comercial con carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato.....	14
3.3.1.1- Estudio del efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática.	14
3.3.1.2- Estudio del efecto de la concentración de sustrato (CMC) sobre la actividad enzimática. Determinación de la constante de Michaelis-Menten (k_M) y velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$).	14
3.3.2- Hidrólisis enzimática del bagazo obtenido de los procesos de SSF y SF.	15
3.4- Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar pretratado.	15
3.4.1- Concentración de bagazo y tiempo óptimos de hidrólisis.	15
3.5- Sacarificación y fermentación alcohólica en simultáneo del bagazo de caña de azúcar pretratado.	16
3.5.1- Producción de inóculo.	16
3.5.2- Fermentación con <i>S. cerevisiae</i> en medio óptimo.	16

3.5.3- Sacarificación y fermentación en simultáneo del bagazo de caña pretratado.....	16
3.5.4- Cuantificación de etanol por método redox del reactivo dicromato de potasio.....	17
3.6- Análisis estadístico.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1- Cinética de producción de enzimas por SSF y SF.....	18
4.1.1- Fermentación de estado sólido (SSF).....	18
4.1.1.1- Actividad Lacasa.....	18
4.1.1.2- Actividad Manganese Peroxidasa.....	18
4.1.1.3- Actividad Lignino Peroxidasa.....	19
4.1.1.4- Actividad CMCasa.....	19
4.1.2- Fermentación sumergida (SF).....	20
4.1.2.1- Actividad Lacasa.....	20
4.1.2.2- Actividad Manganese Peroxidasa.....	20
4.1.2.3- Actividad Lignino Peroxidasa.....	21
4.1.2.4- Actividad CMCasa.....	21
4.2- Comparación de las actividades enzimáticas registradas en los procesos de SSF y SF.....	21
4.3- Evaluación de los procesos de deslignificación biológica mediante la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar obtenido de las SSF y SF.....	22
4.3.1- Caracterización de una Celulasa comercial.....	22
4.3.1.1- Efecto de la concentración de Celulasa sobre la actividad enzimática.....	22
4.3.2- Hidrólisis del bagazo obtenido de los procesos de SSF y SF.....	23
4.3.2.1- Fermentación de estado sólido (SSF).....	23
4.4- Optimización de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar deslignificado.....	25
4.5- Sacarificación y fermentación alcohólica en simultáneo del bagazo pretratado.....	25
5. DISCUSIÓN.....	27
6. CONCLUSIONES.....	29
7. BIBLIOGRAFÍA.....	30

LISTA DE TABLA Y FIGURAS

Figura 2-1: Estructura de la lignina.....	8
Figura 2-2: Mecanismo de reacción de la Lignino y Manganese Peroxidasa para la degradación de la lignina.....	10
Figura 4-1: Actividad enzimática medida como μ moles de azúcares fermentables producidos por minuto a diferentes concentraciones de enzima Celulasa con sustrato optimo CMC.....	22
Figura 4-2: Gráfico de Michaelis- Menten de la actividad enzimática, medida como μ moles de glucosa producidos por minuto a diferentes concentraciones de sustrato CMC.....	23
Figura 4-3: Cinética de hidrólisis enzimática de la celulosa versus tiempo, de dos concentraciones de bagazo, expresada como mg de azúcares fermentables por g de bagazo.....	25
Figura 4-4: Variación de la concentración de glucosa en mg/mL en el proceso de SFS y el control sin inóculo (<i>S. cerevisiae</i>).....	26
Tabla IV- 1: Cinética de producción de enzima Lacasa por los hongos <i>P. ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i> y <i>P. chrysosporium</i> , a los 7, 14 y 21 días en el proceso de SSF. Expresada en unidades de actividad enzimática/ mL de extracto enzimático.....	18
Tabla IV-2: Cinética de producción de enzima MnP por los hongos <i>P. ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i> y <i>P. chrysosporium</i> , a los 7, 14 y 21 días. Expresada en unidades de actividad enzimática/ mL de extracto enzimático.....	19
Tabla IV-3: Cinética de producción de enzima LiP por los hongos <i>P. ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i> y <i>P. chrysosporium</i> , a los 7, 14 y 21 días. Expresada en unidades de actividad enzimática/ mL de extracto enzimático.....	19
Tabla IV-4: Cinética de producción de enzima Lacasa por los hongos <i>P. ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i> y <i>P. chrysosporium</i> , a los 7, 14 y 21 días. Expresada en unidades de actividad enzimática/ mL de extracto enzimático (U/mL)....	20

Tabla IV-5: Cinética de producción de enzima MnP por los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium*, a los 7, 14 y 21 días. Expresada en unidades de actividad enzimática/ mL de extracto enzimático (U/mL)....20

Tabla IV-6: Valores máximos de actividad enzimática expresada en U/mL, obtenidos con cada uno de los hongos en los procesos de fermentación de estado sólido (SSF) y fermentación sumergida (SF).....21

Tabla IV-7: Azúcares fermentables generados luego de 1 h de hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar deslignificado por los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium* en el proceso de SSF durante 7, 14 y 21 días. Los datos se presentan como mg de azúcares fermentables por g de bagazo.....24

Tabla IV-8: Azúcares fermentables generados luego de 1 h de hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar deslignificado por los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium* en el proceso de SF durante 7, 14 y 21 días. Los datos se presentan como mg de azúcares fermentables por g de bagazo.....24

Tabla IV-9: Comparación de los parámetros obtenidos en el proceso de sacarificación y fermentación en simultáneo de bagazo de caña respecto a la fermentación del medio YPD óptimo para *S. cerevisiae*.....26

1. RESUMEN

Estudios de sustentabilidad en la generación de bioetanol sugieren que debe enfocarse a la producción de bioetanol segunda generación. Éste se genera a partir de biomasa lignocelulósica. Sin embargo la producción de bioetanol a partir de dicha biomasa se ve limitada actualmente por la baja accesibilidad de las enzimas que hidrolizan la celulosa a dicho sustrato debido a la poderosa barrera mecánica generada por la lignina. Para esto se han desarrollado diferentes técnicas físicas y químicas costosas y contaminantes. Esto obligó a la búsqueda de alternativas más económicas y más amigables con el medio ambiente. Se conocen muchos microorganismos, generalmente hongos, que tienen la capacidad de producir diferentes enzimas que degradan la lignina. Sin embargo se comportan de manera diferencial respecto al sustrato, además de que cada uno tiene sus propios requerimientos fisiológicos tanto para su crecimiento como para la producción de dichas enzimas. De esta manera, la producción de bioetanol segunda generación a partir de diferentes sustratos requiere determinar previamente que microorganismo y mediante qué condiciones se logra la mayor degradación de la lignina de cada sustrato específico. En este trabajo se evaluó la deslignificación del bagazo de caña de azúcar por *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* y *T. versicolor*. Para ello se comparó la cinética de producción de las enzimas Lacasa, Manganese Peroxidasa, Lignino Peroxidasa y Carboximetilcelulasa por fermentación de estado sólido (SSF) y fermentación sumergida (SF) del bagazo de caña de azúcar. La mayor actividad de todas las enzimas se logró con *P. chrysosporium* a los 7 días de incubación mediante el proceso SSF. La evaluación de los procesos de deslignificación se realizó determinando la facilidad a la hidrólisis de la celulosa obtenida mediante el pretratamiento. Se realizó la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar pretratado para lo cual se utilizó una Celulasa comercial caracterizada previamente sobre un sustrato óptimo. Luego de hidrolizar el bagazo de caña de azúcar pretratado, se pudo determinar que el pretratamiento con *P. chrysosporium* mediante el proceso SSF durante 14 días permitió luego un aumento del 20,81% en la producción de azúcares fermentables.

Luego se evaluaron las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar, y se determinó que la concentración de bagazo debe ser del 5% (p/v), y que el tiempo de incubación a 36 °C debe ser de 36 h.

La producción de bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar pretratado se realizó mediante el proceso de sacarificación y fermentación en simultáneo utilizando *S. cerevisiae* como microorganismo productor de etanol. De esta manera se lograron obtener 3,2 g/L de etanol con un YPS de 0,06 (g etanol/g bagazo) y una eficiencia de la fermentación del 62%.

2. INTRODUCCIÓN

2.1- Generalidades

El mundo enfrenta el agotamiento progresivo de sus recursos energéticos basados mayoritariamente en combustibles no renovables y, al mismo tiempo, el consumo de energía aumenta a ritmos cada vez mayores (Lin et al., 2006; Cherubini et al., 2009). Por otro lado, el consumo global de combustibles genera enormes cantidades de gases contaminantes que son liberados a la atmósfera, causando cambios significativos en el clima del planeta, por lo que se ha convertido en una de las problemáticas que más preocupan a los gobiernos, las comunidades y la opinión pública en general (Tretyakov et al., 2008).

La única forma de superar esta problemática es diversificando la matriz energética y apuntar hacia fuentes de energía renovables (Tylor, 2009). Para ello, la biotecnología ofrece múltiples alternativas. Una solución es el uso de energía solar en forma de biomasa, la cual está representada en los materiales lignocelulósicos. Los organismos fotosintéticos captan el CO₂ de la atmósfera para producir carbohidratos, que pueden ser fermentados a etanol. La utilización de biomasa lleva consigo una disminución de la contaminación atmosférica: las emisiones de CO₂ generadas por la producción y uso de biocombustibles son compensadas por la absorción de CO₂ durante el crecimiento de las plantas y de otros materiales vegetales, a partir de los cuales dichos combustibles se producen. Una hectárea de cultivos ricos en energía usada para la producción de biocombustibles líquidos (bioetanol, biodiesel) puede evitar la emisión de 0.2-2.0 ton de carbono a la atmósfera en comparación con el empleo de combustibles fósiles (Lin et al., 2006; Goh et al., 2009). El término biocombustible engloba a todos aquellos combustibles derivados de la biomasa vegetal. Se trata por tanto, de combustibles de origen vegetal que tienen características parecidas a los fósiles, pero que no contienen azufre, uno de los principales causantes de la lluvia ácida y no contribuyen a aumentar la cantidad de CO₂ emitido a la atmósfera (Mariam et al., 2009).

El bioetanol se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas. Para mejorar la competitividad del bioetanol frente a los combustibles derivados del petróleo se deben reducir los costos de producción (Brethauer et al., 2009).

Principalmente se utilizan tres familias de productos como materia prima para su obtención: azúcares procedentes de la caña o la remolacha, cereales mediante la fermentación del almidón, y biomasa lignocelulósica por la fermentación de los azúcares contenidos en la celulosa. Estos últimos son los que ofrecen un mayor potencial. Una gran parte de los materiales con alto contenido de celulosa se generan como residuos en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal o industrial. Los residuos

agrícolas proceden de cultivos leñosos y herbáceos, destacando los producidos en los cultivos de cereal. Los residuos de origen forestal proceden de los tratamientos silvícola y de mejora o mantenimiento de los montes y masas forestales. También pueden utilizarse los residuos de industrias como la papelera, la hortofrutícola o la fracción orgánica de residuos domésticos o industriales (Chen et al., 2007; Lin et al., 2006).

Los biocombustibles de primera generación basados en cultivos se han transformado en problemas éticos y morales debido a que actualmente hay millones de personas que sufren de malnutrición y mueren de hambre. La manera de superar este problema es producir bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos, lo cual se conoce como biocombustibles de segunda generación (Tylor, 2008; Goh et al., 2009). La producción de bioetanol a partir de desechos agrícolas o contaminantes permite darles un valor agregado a estos, generar nuevos empleos y diversificar la matriz energética, favoreciendo el desarrollo sustentable en beneficio directo de los habitantes. Además no fomenta la forestación, disminuyendo así la huella ecológica (Vázquez et al., 2007; Cherubini et al., 2009; Brethauer et al., 2009; Stoglehner et al., 2009).

Uruguay presenta una alta dependencia energética de los combustibles fósiles importados. Aproximadamente el 50-70% de la energía primaria utilizada en los últimos años corresponde a combustibles fósiles, básicamente petróleo y en menor proporción gas natural y carbón. El resto corresponde a energía renovable de origen nacional, básicamente energía hidráulica y biomasa. Dada la dependencia del sistema energético nacional se creó la ley 18.195 que promueve la producción de agrocombustibles con el objetivo de diversificar la matriz energética a través de la inclusión de etanol en las naftas. La ley señala que ANCAP debe incorporar “hasta 5%” de etanol a las naftas hasta el 31 de diciembre de 2014 y después de esa fecha el 5% de etanol constituirá el “mínimo” obligatorio.

Las materias primas para la producción de etanol combustible que se utilizan en Uruguay son caña de azúcar y en menor medida sorgo azucarado. La demanda de bioetanol, dentro de esta política energética de sustitución creciente de los combustibles fósiles automotores, ha motivado el estudio de materias primas alternativas no tradicionales. La producción de bioetanol combustible a partir de caña de azúcar y sorgo dulce prevista con la capacidad instalada actual en nuestro país en la zona de Bella Unión, es de 24 millones de litros anuales, que equivalen una sustitución de gasolina del orden del 5 a 8% en volumen (<http://www.alur.com.uy/bellaunion.html>, acceso 2012-09-22). Un aumento en el nivel de sustitución requerirá diversificar las materias primas y la zona de producción. Otros cultivos con potencial de producción de etanol que están siendo evaluados son remolacha, trigo, maíz, boniato, grano de sorgo y materiales lignocelulósicos. Sin embargo, por lo antes mencionado, la única manera de producir

bioetanol de manera sustentable es utilizando los residuos lignocelulósicos obtenidos de la industria agroforestal.

2.2- Procesos de conversión de la celulosa en etanol.

La composición química de las plantas difiere considerablemente y es influenciada por factores genéticos y ambientales. La biomasa lignocelulósica presenta una estructura compleja, compuesta de varias fracciones que deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente de estos materiales a etanol. La fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa cuyas cadenas de glucosa se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad, su íntima asociación con la lignina dificultan su hidrólisis para la obtención de azúcares fermentables. Por esta razón la biomasa lignocelulósica es sometida a una fase de pretratamiento que puede ser físico (trituración mecánica, radiación de alta energía), físico-químicos (explosión por vapor con o sin amoníaco, explosión con CO₂), químicos (agua caliente líquida, oxidación húmeda, con ozono, hidrólisis básica, solventes orgánicos), o biológicos en los que el material se somete a la acción de microorganismos, como los hongos de podredumbre blanca (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*) que degradan la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático. El pretratamiento biológico tiene la ventaja de un bajo requerimiento energético y las suaves condiciones ambientales en las que se produce el proceso, además de que se producen menos compuestos que inhiben o enlentecen los procesos posteriores (Malherbe et al., 2002; Song et al., 2007; Dinis et al., 2009).

La hidrólisis de la celulosa puede realizarse mediante procesos ácidos o enzimáticos. La hidrólisis ácida consiste en un proceso químico que mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos en sus monómeros elementales. En la hidrólisis con ácidos concentrados se añade entre 70-77% de ácido sulfúrico a la biomasa, y se mantiene durante horas a altas temperaturas. Este es un proceso del que se obtienen rendimientos elevados (más del 90% de la glucosa potencial). A pesar de esto la gran cantidad de ácido empleado en la impregnación del material a tratar y lo costoso de su recuperación, unido a los efectos corrosivos de los ácidos concentrados que obliga a altas inversiones en los equipamientos, hacen que el proceso no sea rentable. Además tiene el problema de que es necesaria una costosa etapa de neutralización antes de la fermentación (Wyman, 2001).

La hidrólisis enzimática de celulosa es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, que son en realidad una

mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción conjunta produce la degradación de la celulosa. Las plantas superiores, algunos invertebrados y principalmente los microorganismos (hongos y bacterias) son productores de este tipo de enzimas. Las celulasas de origen fúngico principalmente de los géneros *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium*, han sido las más estudiadas por la capacidad de producirlas en grandes cantidades y de forma extracelular, facilitando su separación en los medios de cultivo (Patel et al., 2007; Mutreja et al., 2011).

El complejo celulolítico de los hongos está formado por distintos componentes que actúan sinérgicamente.

Este sistema enzimático tiene tres tipos diferentes de actividad.

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

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

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

La β -glucosidasa hidroliza la celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño, y es absolutamente necesaria para evitar la fuerte inhibición por producto sobre las endo y exoglucanasas (Stowers et al., 2011; Zhao et al., 2004).

La producción de etanol puede realizarse de diferentes maneras. En los procesos en dos etapas la hidrólisis ácida o enzimática de la celulosa y fermentación se realizan por separado.

En los procesos que utilizan la vía enzimática, una parte de la biomasa pretratada se utiliza como sustrato para la obtención de las enzimas del complejo celulolítico. Una vez producidas se extraen y se añaden al resto del material pretratado en un reactor de hidrólisis. La glucosa obtenida en este reactor pasa a otro donde se realiza la fermentación mediante la acción de microorganismos, principalmente levaduras. La ventaja de este proceso es que al estar separadas la hidrólisis de la fermentación, ambas pueden realizarse en condiciones óptimas. La etapa de hidrólisis de la celulosa se realiza a temperatura óptima de la enzima (en torno a los 50 °C), mientras que la fermentación se realiza a la temperatura óptima del microorganismo productor de etanol (37 °C). La principal desventaja del proceso por separado es que la glucosa y la celobiosa liberadas durante la hidrólisis enzimática, inhiben a las enzimas implicadas en el proceso, obteniéndose bajos rendimientos.

Si en lugar de la hidrólisis enzimática se emplea la ácida es necesario neutralizar los hidrolizados antes de la fermentación. Además la generación de productos de degradación durante la hidrólisis, puede afectar al microorganismo encargado de realizar la fermentación (Chartchaleram et al., 2007; Martínez et al., 2000).

En los procesos en una etapa la hidrólisis y la fermentación se realizan en el mismo reactor. La principal ventaja de estos procesos es que se reduce la inhibición por producto, ya que la presencia de microorganismos fermentadores, junto con las enzimas celulolíticas reducen la acumulación de azúcar en el fermentador. Por ello se consiguen mayores tasas de hidrólisis que en el proceso por separado, necesitándose una menor cantidad de enzimas y obteniéndose un aumento de los rendimientos de etanol. La principal desventaja es que la temperatura y el pH óptimo de los procesos de hidrólisis y fermentación son distintos. La temperatura óptima de la hidrólisis está próxima a los 50 °C mientras que las levaduras de etanol convencionales trabajan en torno a los 37 °C, por lo tanto es importante utilizar microorganismos termotolerantes cuando se quiere realizar un proceso de obtención de etanol en una etapa.

Los procesos en una etapa se dividen en dos grupos: procesos en los que el mismo microorganismo produce las celulasas y realiza la fermentación, conocido como Conversión directa por el microorganismo (CDM); y procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SFS), en los que se emplean celulasas provenientes de un organismo celulolítico (generalmente un hongo) junto con la presencia de uno productor de etanol.

En los procesos CDM se pueden emplear monocultivos, en los que un único microorganismo hidroliza y fermenta los azúcares a etanol. Se han empleado bacterias del género *Clostridium*. Los rendimientos en etanol son bajos debido a la formación de subproductos, a la baja tolerancia de la bacteria al etanol y crecimiento limitado debido a productos tóxicos presentes en el hidrolizado. También pueden emplearse cocultivos, un microorganismo realiza la hidrólisis de la celulosa (*Clostridium thermocellum*) y una bacteria etanolgénica fermenta los azúcares producidos.

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

La producción de etanol es un proceso exergónico, o sea que libera energía. La utilización de levaduras termotolerantes evitaría problemas asociados al sobrecalentamiento de los reactores, llevando a un aumento de la productividad, y sobre todo permitiría trabajar en condiciones más cercanas a las óptimas en un proceso SFS. Las levaduras más estudiadas se encuentran en especies dentro de los géneros *Candida*, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Zaldivar et al., 2001; Gírio et al., 2010; Dien et al., 2003).

K. marxianus ha sido una de las levaduras más utilizadas en los procesos de SFS, utilizando diferentes sustratos como madera, residuos de la industria

olivarera y residuos de papeleras (Oh et al., 2000; Chartchalermsri et al., 2007).

2.3- Biodeslignificación

La lignina es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Es una molécula con un elevado peso molecular.

Es el polímero natural más complejo en relación a su estructura y heterogeneidad. Por esta razón no es posible describir una estructura definida de la lignina; sin embargo, se han propuesto numerosos modelos que representan su estructura. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada. Los monómeros que forman la lignina son los denominados alcoholes cinamílicos, diferenciados entre sí por las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático. Así el alcohol p-cumarílico que da lugar a las unidades p-hidroxifenilo (unidades H) no presenta ningún sustituyente; el alcohol coniferílico que da lugar a las unidades guayacilo (unidades G) presenta un grupo metóxilo en la posición 3 del anillo aromático y el alcohol sinapílico que da lugar a las unidades siringilo (unidades S) presenta dos grupos metóxilo en posiciones 3 y 5 del anillo. La polimerización de estos precursores durante la formación de la pared celular se produce mediante la sucesión de una etapa enzimática y una etapa química. En la primera los precursores son oxidados por peroxidasas de la pared dando unidades fenóxilo que a continuación y durante la etapa química reaccionan al azar entre ellos. En este proceso se originan una gran variedad de formas resonantes que pueden reaccionar unas con otras, por ello la lignina no presenta una única estructura. Las uniones pueden ser de tipo condensado (enlaces C-C) o de tipo no condensado (enlace aril-alquil éter) en los que intervienen tanto los anillos aromáticos como las cadenas propílicas. Los enlaces que van a condicionar una alta condensación de la lignina son los enlaces C-C que solo pueden establecerse entre unidades H o G, ya que las unidades S al tener dos grupos metóxilo en posiciones 3 y 5 no pueden establecer este tipo de enlaces. La proporción de las tres unidades que forman la lignina y el tipo de enlace difiere según el tipo de planta, así como del grupo taxonómico, tejido o capa de la pared celular, estado de desarrollo y condiciones ambientales. La lignina de las maderas blandas está formada mayoritariamente por unidades guayacilo, mientras que la de las maderas duras está formada por unidades guayacilo y siringilo. Esta alta proporción de unidades derivadas del alcohol sinapílico en las maderas duras determina la estructura y características de este tipo de lignina, ya que la presencia de los dos grupos metóxilo en posiciones 3 y 5 del anillo aromático reduce la formación de enlaces tipo éter y sobre todo los enlaces C-C, lo que se traduce en una reducción del grado de polimerización y en un menor grado

de condensación. De esta forma las maderas duras son más fáciles de deslignificar que las blandas (Singh et al., 2008; Otjen et al., 1988; Boerjan et al., 2003).

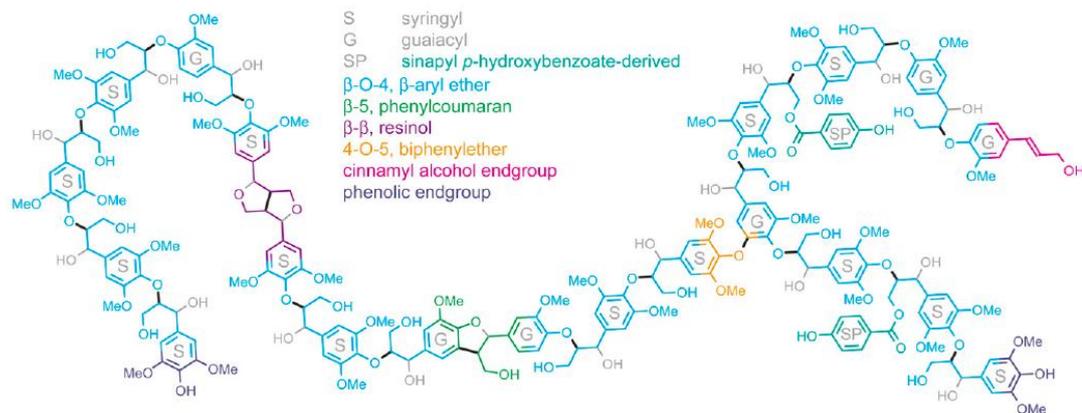


Figura 2-1: Estructura de la lignina. (Vanholme et al., 2010)

Se conocen muchos microorganismos, generalmente hongos, que tienen la capacidad de producir diferentes enzimas que degradan la lignina. Sin embargo se comportan de manera diferencial respecto al sustrato, además de que cada uno tiene sus propios requerimientos fisiológicos tanto para su crecimiento como para la producción de dichas enzimas. De esta manera, la producción de bioetanol segunda generación a partir de diferentes sustratos requiere determinar previamente que microorganismo y mediante qué condiciones se logra la mayor degradación de la lignina de cada sustrato específico (Goh et al., 2009).

Los hongos de pudrición blanca, son un grupo fisiológico de hongos que comparten la capacidad de degradar la lignina (Pointing, 2001). Taxonomicamente, la mayoría de estos hongos son basidiomicetes, aunque se han encontrado algunos ascomicetes (Blanchette, 1984). Sin embargo estos hongos no pueden utilizar la lignina como única fuente de carbono ya que presenta un muy bajo valor calorífico (Kirk et al., 1998) por lo cual permite la supervivencia pero no su crecimiento (Frioni, 1990). Para su desarrollo dependen de los polisacáridos y azúcares simples presentes en los materiales lignocelulósicos (Hammel, 1996). De esta manera la ligninolisis ocurre durante el metabolismo secundario, al cual entran por una limitación en la disponibilidad del carbono, nitrógeno y azufre (Keyser et al., 1978). Para degradar la compleja molécula de lignina, este grupo de hongos posee un sistema inespecífico de enzimas, que incluye, oxidoreductasas,

metabolitos de bajo peso molecular y especies reactivas de oxígeno (Schoemaker, 1990). Las oxidoreductasas extracelulares son Lacasa, Lignino Peroxidasa, Manganese Peroxidasa y oxidasas productoras de H_2O_2 .

Estas enzimas poseen una amplia variedad de sustratos (Barrasa et al., 2009; Asgher et al., 2007; Schoemake et al., 1996).

La Lacasa contiene 4 átomos de cobre por monómero, unidos a tres sitios redox, y difieren uno del otro en sus propiedades electrónicas. Se cree que el mecanismo catalítico de la Lacasa involucra tres pasos. Primero ocurre la oxidación de un átomo de cobre mediante la reducción del sustrato, luego se transfiere internamente el electrón entre los restantes átomos de cobre y por último se reduce el O_2 a agua. La oxidación del sustrato catalizada por la Lacasa es una reacción de un solo electrón y se genera un radical catión libre que es inestable y reactivo, y que puede hidratarse o polimerizarse con otras moléculas del medio (Pilz et al., 2003; Leonowicz et al., 2001; Asgher et al., 2007).

La Lignino Peroxidasa pertenece a una familia de hemoproteínas extracelulares glicosiladas. Cataliza la despolimerización oxidativa de la lignina. Primero reacciona con peróxido de hidrógeno para formar un intermediario oxidado deficiente de electrones (compuesto I), este intermediario oxida a la lignina y pierde un electron para dar un intermediario oxidado carente de un electron (compuesto II) y un radical libre. El compuesto II vuelve a restaurar la enzima por oxidación de una segunda molécula de sustrato (Kirk et al., 1987). Los radicales libres que se generan en este ciclo catalítico continúan reaccionando con otras moléculas de sustrato (Pilz et al., 2003; Bonnarme et al., 1990; Asgher et al., 2008; Singh et al., 2008)

La Manganese Peroxidasa es otra enzima extracelular expresada durante el metabolismo secundario, pertenece a una familia de hemoproteínas. La oxidación de la lignina y otros fenoles depende de la presencia del ion manganese. El peróxido de hidrógeno oxida a la enzima generando el compuesto I. Los compuestos fenólicos o el $Mn(II)$ pueden actuar como reductores para el compuesto I, formando el compuesto II. Este requiere exclusivamente del $Mn(II)$ para reducirse. El resultado de este ciclo catalítico es la generación de iones $Mn(III)$ que son potentes oxidantes (Glenn et al., 1986; Asgher et al., 2008; Singh et al., 2008).

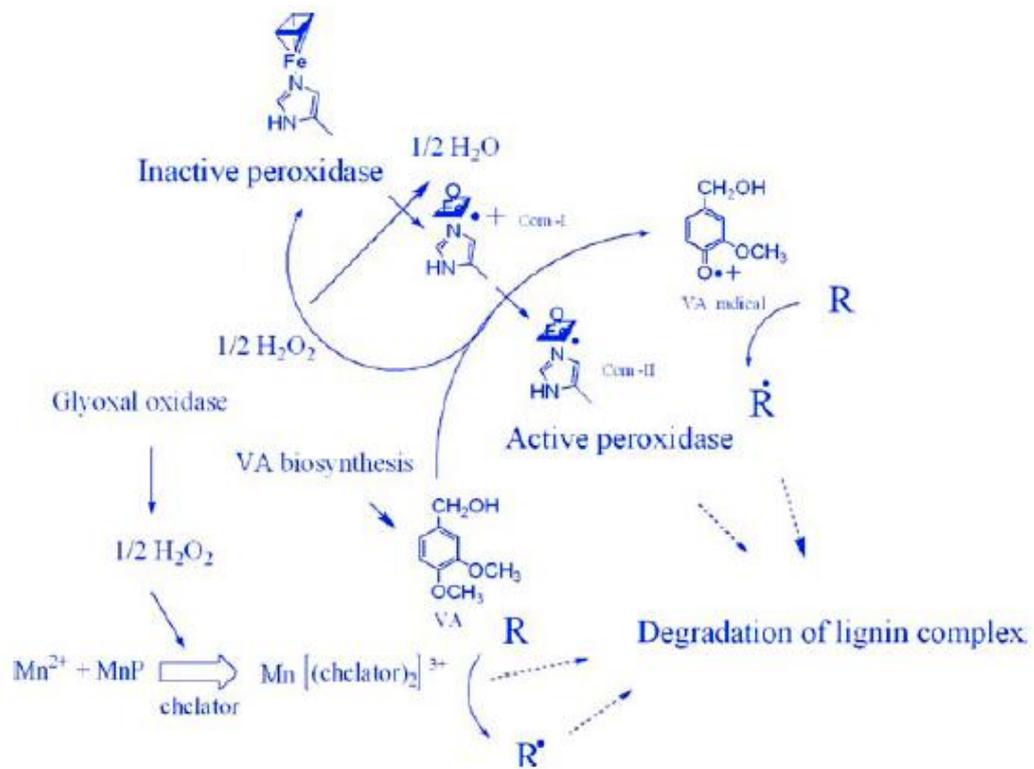


Figura 2- 2: Mecanismo de reacción de la Lignino y Manganeso Peroxidasa para la degradación de la lignina (Singh et al., 2008).

VA: alcohol veratrílico.

Comp I, II: compuestos I y II.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Producción de enzimas ligninolíticas de 3 hongos por fermentación de estado sólido y fermentación sumergida de bagazo de caña de azúcar.

3.1.1- Preparación de los inóculos.

Se usaron las cepas *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor*, de la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Se mantuvieron en placas de petri con medio papa dextrosa agar (PDA, Merck) a 4 °C. Para la preparación de los inóculos se transfirieron de forma aséptica 8 porciones de 0.5 x 0.5 cm de agar colonizado, a matraces de 250 mL con tapón de algodón, conteniendo 100 mL de medio de cultivo sintético estéril compuesto por: 10 g/L de glucosa (R. Benzo), 2,3 g/L de tartrato de amonio, 0,8 g/L de KH_2PO_4 , 0,2 g/L de Na_2HPO_4 , 0,3 g/L de MgSO_4 (Anedra), 2,0 g/L de extracto de levadura (Merck) y agua destilada. Se ajustó el pH a 6 con NaOH (Sigma) 2M. Se incubaron durante 7 días en estufa a 29 °C en oscuridad. Se homogenizaron los inóculos con una mixer doméstica (Philips) y se conservaron a 4 °C hasta su posterior uso.

3.1.2- Materia prima.

El bagazo de caña de azúcar se seco en estufa a 60 °C hasta peso constante y luego se redujo el tamaño de las fibras con una procesadora doméstica.

3.1.3- Producción de enzimas.

3.1.3.1- Producción de enzimas por fermentación de estado sólido (SSF).

Se colocaron 4,0 g de bagazo en bolsas de polipropileno de 10 x 20 cm. Luego se les agrego 12 mL de medio de cultivo sintético sin glucosa suplementado con 4,0 g/L de extracto de levadura, se ajusto el pH a 6 con NaOH 2M. Se les colocó tapón de algodón cubierto con papel de aluminio y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se les dejo

enfriar y se inocularon con 3.0 mL de inóculo homogenizado. Se realizaron controles sin inóculo.

Se incubaron con tapón de algodón (para permitir el intercambio de gases) en estufa a 28 °C por 7, 14 y 21 días en oscuridad. Cada cepa y los controles para cada tiempo se ensayaron por triplicado.

Luego de cada período se extrajeron las enzimas extracelulares mediante el lavado con 25 mL agua destilada agitando en un vortex (Vortex 5 Qilinyiyong) durante 5 minutos. Se separaron los sólidos con papel de filtro, se secaron en estufa hasta peso constante. La fase líquida se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se conservaron los sobrenadantes a 4 °C para su posterior utilización.

3.1.3.2- Producción de enzimas por fermentación sumergida (SF).

Se realizó en matraces de 125 mL, conteniendo 2,0 g de bagazo de caña de azúcar, 50 mL de medio de cultivo sintético sin glucosa suplementado con 4,0 g/L de extracto de levadura, se ajustó el pH a 6 con NaOH 2M. Se les colocó tapón de algodón cubierto con papel de aluminio y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se dejaron enfriar y se inocularon de forma aséptica con 3,0 mL de micelio homogenizado. Se realizaron controles sin inóculo. Se incubaron con tapón de algodón en estufa a 28 °C durante 7, 14 y 21 días en oscuridad. Cada cepa y los controles para cada tiempo se ensayaron por triplicado. Luego de cada período se realizó la extracción de enzimas filtrando las muestras en papel de filtro y la fase líquida se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se conservaron a 4 °C, los sólidos se secaron en estufa hasta peso constante.

3.2- Evaluación de la producción de enzimas ligninolíticas de *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* y *T. versicolor*.

3.2.1- Determinación de actividad enzimática para los tiempos 7, 14 y 21 días de los procesos de SSF y SF (Lopretti, 1999).

3.2.1.1- Actividad Lacasa.

Se determinó espectrofotométricamente (Thermo Scientific, Evolution 160 UV-Vis) utilizando ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato, Sigma) como sustrato. La mezcla de reacción se preparó con 1,0 mL de solución de ABTS 1,0 mM en buffer acetato de sodio (Anedra) 0,1mM pH 5,0 y 50 µL de sobrenadante obtenido en las fermentaciones. La reacción se midió mediante el cambio de absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36000/M.cm$)

luego de 5 minutos. El blanco de enzima se preparo substituyendo el extracto enzimático por agua destilada.

Una unidad de actividad Lacasa se definió como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 μmol de ABTS por minuto.

3.2.1.2- Actividad Lignino Peroxidasa (LiP)

Se determinó empleando el método de Tien y Kirk (1988). Se siguió espectrofotométricamente la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído. La mezcla de reacción contenía 1 mL de alcohol veratrílico (Sigma) 2 mM en buffer glicina (Merck) HCl 100 mM pH 3.0, 0.1 mL de H_2O_2 100 volúmenes, y 50 μL de sobrenadante.

Se midió el cambio de absorbancia a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9300/\text{M}\cdot\text{cm}$) luego de 10 minutos de incubación en baño de agua a 30 °C. Para el blanco se substituyó el sobrenadante por agua destilada. La actividad LiP se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de veratraldehído.

3.2.1.3- Actividad Manganeso Peroxidasa (MnP)

Se determinó espectrofotométricamente la producción de rojo fenol oxidado. La mezcla de reacción contenía 1 mL de solución de rojo fenol (Anedra) 0.01% (peso/volumen) y MnSO_4 (Anedra) 0.1mM en buffer succinato de sodio (Merck) 0.1M pH 4.5, 0.1 mL de H_2O_2 100 volúmenes, y 50 μL de sobrenadante. El blanco se preparó substituyendo el sobrenadante por agua destilada. Se midió el cambio de absorbancia a 610 nm ($\epsilon_{610} = 22000/\text{M}\cdot\text{cm}$) luego de 10 minutos de incubación en baño de agua a 30 °C. Una unidad de actividad enzimática de MnP se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de rojo fenol oxidado por minuto.

3.2.1.4- Actividad carboximetilcelulasa (CMCasa)

Se incubaron durante 10 minutos a 40 °C 70 μL de sobrenadante con 630 μL de una solución de baja viscosidad de carboximetilcelulosa al 1% p/v en buffer citrato 50 mM, pH 5.0. Luego se determinó por el método del reactivo DNS la cantidad de azúcares fermentables liberados. Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de azúcar fermentable por minuto.

3.2.1.5- Método del ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS).

Se disuelve 0.25g de ácido dinitrosalicílico y 0.75g de tartrato de sodio y potasio. Se agrega 50ml de NaOH 2M y se lleva a un volumen final de 250ml con agua destilada.

Se realiza una curva de calibración con diferentes concentraciones de glucosa (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 4.8, 6.4 y 8.0 mg/ml), se mezcla 0.1ml de solución estándar de glucosa con 1ml de DNS. El blanco se prepara con 0.1ml de agua destilada y 1ml de DNS. Se realizan ensayos por triplicado. Se incubó la mezcla a 100°C durante 10 minutos y posteriormente se mide la absorbancia a 570nm. Con los datos obtenidos se realiza una gráfica de [glucosa] mg/ml vs Absorbancia. Las muestras problema se tratan de la misma manera y el valor de absorbancia obtenido se interpola en la ecuación obtenida de la regresión lineal de la curva de calibración.

3.3- Evaluación de los procesos de deslignificación biológica del bagazo mediante hidrólisis enzimática de la celulosa.

3.3.1- Caracterización de una Celulasa comercial con carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato.

3.3.1.1- Estudio del efecto de la concentración de enzima sobre la actividad enzimática.

Se mezcló 1 mL de solución de Celulasa en buffer citrato 0.1 M pH 4 de diferentes concentraciones (1-10mg/mL) con 0.05 g de CMC. Se realizaron controles sin sustrato y controles sin enzima.

Se incubaron a 37 °C por una hora. Luego se cuantificaron los azúcares fermentables por el método del reactivo DNS, utilizando glucosa para construir la curva de calibración.

Se calculó la actividad enzimática como μ moles de azúcares fermentables liberados por minuto para posteriormente graficar actividad enzimática versus concentración de enzima y poder conocer la concentración óptima de Celulasa.

3.3.1.2- Estudio del efecto de la concentración de sustrato (CMC) sobre la actividad enzimática. Determinación de la constante de Michaelis-Menten (k_M) y velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$).

A diferentes cantidades de CMC (0.00 - 0.16 g) se les adicionó 1 mL de solución de Celulasa en buffer citrato 0.1 M pH 4 de concentración óptima. Se realizaron controles sin sustrato y controles sin enzima.

Se incubaron a 37 °C por una hora. Luego se cuantificaron los azúcares fermentables por el método del reactivo DNS, utilizando glucosa para construir la curva de calibración.

Se calculó la actividad enzimática como μ moles de azúcares fermentables liberados por minuto para posteriormente graficar actividad enzimática versus concentración sustrato CMC y poder conocer la concentración óptima de CMC. Se determinó además, la velocidad máxima de reacción y la constante de Michaelis-Menten, (k_M).

3.3.2- Hidrólisis enzimática del bagazo obtenido de los procesos de SSF y SF.

Se les agregó buffer citrato 0.1 M pH 4 a los sólidos obtenidos en los procesos de SSF y SF (tratados con hongos y blancos) en una relación 5% p/v. Se esterilizaron las muestras por tratamiento térmico en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Luego se les adicionó una concentración al 0,5% p/v de enzima celulasa previamente caracterizada (ver punto 3.3.1), y se incubaron en estufa a 36 °C durante 1 hora. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los controles de hidrólisis se prepararon sin celulasa.

Finalizado el tiempo de sacarificación se cuantificaron los azúcares fermentables por el método del reactivo DNS.

El mejor proceso de deslignificación se definió como aquel que permitió la mayor producción de azúcares fermentables en la hidrólisis comparado con los blancos de pretratamiento (sin hongos).

3.4- Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar pretratado.

3.4.1- Concentración de bagazo y tiempo óptimos de hidrólisis.

A los efectos de evaluar la mejor concentración de sólidos para la hidrólisis se analizaron concentraciones de 5 y 10% p/v de bagazo obtenido del proceso SSF con *P. chrysosporium*, en buffer citrato pH 4 y se esterilizaron las muestras por tratamiento térmico en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Se les adicionó una concentración al 0,5 % p/v de enzima celulasa y se incubaron en estufa a 36 °C para realizarse la hidrólisis. Se realizaron ensayos por triplicado y se utilizaron blancos (sin celulasa) para cada condición.

Se realizaron tomas asépticas de todas las muestras a tiempo inicial, 2, 3, 4, 8, 12, 24 y 36 h, a los efectos de evaluar el mejor tiempo de hidrólisis. Para cada tiempo se evaluó la concentración de azúcares fermentables (en mg/g de bagazo) determinados por el método del reactivo DNS.

3.5- Sacarificación y fermentación alcohólica en simultáneo del bagazo de caña de azúcar pretratado.

3.5.1- Producción de inóculo.

Se transfirieron, de forma aséptica, colonias de levadura *Saccharomyces cerevisiae* crecidas en placa con medio YPD, a tubos conteniendo medio YPD líquido estéril, se ajustó la concentración celular en 0,200 UA a 560 nm. Los controles se dejaron sin inocular.

Se incubaron 24 h a 30 °C en condiciones aerobias.

3.5.2- Fermentación con *S. cerevisiae* en medio óptimo.

Se transfirió el inóculo a medio YPD líquido estéril en una relación de 6% v/v. Se prepararon controles sin inóculo. Se incubó por 36 h a 30 °C en condiciones anaerobias. La fermentación se realizó por triplicado. Una vez finalizada la fermentación se enfriaron las muestras, se cuantificaron los azúcares remanentes por el método del reactivo DNS. Luego se destilaron todas las muestras y se conservaron los sobrenadantes en heladera a 4 °C, para la posterior cuantificación de etanol.

3.5.3- Sacarificación y fermentación en simultáneo del bagazo de caña pretratado.

Se mezcló la cantidad óptima de bagazo pretratado con buffer citrato 0.1 M pH 4 adicionado con 10 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de peptona. Se esterilizaron las muestras por tratamiento térmico en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Se les adicionó una concentración al 0,5 % p/v de enzima celulasa y se incubaron en estufa a 37 °C para realizarse la sacarificación. A las 4 h de comenzado el proceso se agregó el inóculo de levadura, y se continuó la fermentación en simultáneo con la sacarificación hasta las 36 h. Se realizaron ensayos por triplicado y se utilizaron controles sin inóculo. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 4, 8, 12, 24, 36 h) para cuantificación de azúcares fermentables por el método del reactivo DNS.

Terminada la fermentación se enfriaron las muestras, luego se filtraron los sólidos y se destiló la fase líquida para cuantificación de etanol (ver siguiente punto).

3.5.4- Cuantificación de etanol por método redox del reactivo dicromato de potasio.

Se realizó según la técnica descrita por Chartchalerm et al (2007).

Primero se realizó una curva de calibración con soluciones estándar de etanol (R. Benzo), en el rango de concentraciones de 2 a 46 g/L.

La mezcla de reacción se preparó con 3,00 mL de una solución 0,1 M de $K_2Cr_2O_7$ (Anedra) y 5 M de H_2SO_4 , 300 μ L de solución de etanol. Se sellaron los tubos de reacción con parafilm y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se midió absorbancia a 590nm. Para el blanco se sustituyó la solución de etanol por agua destilada.

Para las muestras de fermentación se sustituyó la solución de etanol por el destilado, y el valor de absorbancia se interpoló en la ecuación obtenida de la regresión lineal de la curva de calibración.

3.6- Análisis estadístico.

Las medias de todos los parámetros evaluados fueron analizadas estadísticamente empleando la herramienta Two-Way ANOVA. Se aceptaron como diferencias significativas valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1- Cinética de producción de enzimas por SSF y SF.

4.1.1- Fermentación de estado sólido (SSF)

4.1.1.1- Actividad Lacasa.

La producción de enzima Lacasa por los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium*, permaneció constante hasta los 14 días de incubación ($p > 0,05$). Ninguna mostró actividad a los 21 días. Tampoco se observaron diferencias significativas entre cepas ni a los 7 ni a los 14 días ($p > 0,05$) (Tabla IV-1).

Tabla IV- 1: Cinética de producción de enzima Lacasa por los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium*, a los 7, 14 y 21 días en el proceso de SSF. Expresada en unidades de actividad enzimática/ mL de extracto enzimático.

Tiempo (días)	<i>P. ostreatus</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>
7	0,215 ± 0,059 ^a	0,214 ± 0,104 ^a	0,349 ± 0,012 ^a
14	0,227 ± 0,068 ^a	0,349 ± 0,076 ^a	0,395 ± 0,061 ^a
21	00.00	00.00	00.00

Letras iguales entre medias no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.1.1.2- Actividad Manganeso Peroxidasa.

Las 3 cepas utilizadas mostraron el máximo de actividad MnP a los 7 días. *P. chrysosporium* fue el que presentó mayor actividad seguido por *P. ostreatus*, y por último *T. versicolor* ($p < 0,05$). No se detectó actividad MnP en ninguna cepa a los 21 días de incubación. (Tabla IV- 2).

Tabla IV-2: Cinética de producción de enzima MnP por los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium*, a los 7, 14 y 21 días. Expresada en unidades de actividad enzimática/ mL de extracto enzimático.

Tiempo (días)	<i>P. ostreatus</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>
7	0,069 ± 0,006 ^{b1}	0,053 ± 0,004 ^{c1}	0,081 ± 0,003 ^{a1}
14	0,009 ± 0,004 ^{b2}	0,009 ± 0,002 ^{b2}	0,017 ± 0,001 ^{a2}
21	00.00	00.00	00.00

Para filas, letras iguales entre medias no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

Para columnas, números iguales entre medias no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.1.1.3- Actividad Lignino Peroxidasa.

P. chrysosporium presentó mayor actividad LiP a los 7 días de incubación, seguido por *T. versicolor* al mismo tiempo ($p < 0,05$). *P. ostreatus* presentó la menor actividad a dicho tiempo ($p < 0,05$), no obstante fue quien mostró mayor actividad a los 14 días ($p < 0,05$). Todos mostraron menor actividad el día 21 (Tabla IV-3).

Tabla IV-3: Cinética de producción de enzima LiP por los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium*, a los 7, 14 y 21 días. Expresada en unidades de actividad enzimática/ mL de extracto enzimático.

Tiempo (días)	<i>P. ostreatus</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>
7	0,2315 ± 0,0007 ^{c1}	0,2966 ± 0,0003 ^{b1}	0,3119 ± 0,0002 ^{a1}
14	0,2461 ± 0,0241 ^{a1}	0,1632 ± 0,0611 ^{b2}	0,1820 ± 0,0230 ^{b2}
21	0,0712 ± 0,0063 ^{b2}	0,1221 ± 0,0082 ^{a3}	0,1474 ± 0,0050 ^{a3}

Para filas, letras iguales entre medias no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

Para columnas, números iguales entre medias no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.1.1.4- Actividad CMCasa.

Solo se detectó actividad CMCasa a los 7 días.

P. ostreatus y *P. chrysosporium* no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) presentando mayor actividad CMCasa que *T. versicolor* ($p < 0,05$), siendo los valores medios: 0,145 ± 0,022, 0,175 ± 0,045 U/mL y 0,113 ± 0,018 U/mL respectivamente.

4.1.2- Fermentación sumergida (SF).

4.1.2.1- Actividad Lacasa.

Las 3 cepas utilizadas mostraron la misma actividad Lacasa hasta los 14 días de incubación ($p > 0,05$). Ninguna presentó actividad a los 21 días. (Tabla IV-4)

Tabla IV-4: Cinética de producción de enzima Lacasa por los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium*, a los 7, 14 y 21 días. Expresada en unidades de actividad enzimática/ mL de extracto enzimático (U/mL).

Tiempo (días)	<i>P. ostreatus</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>
7	0,0021 ± 0,0005 ^a	0,0027 ± 0,0018 ^a	0,0019 ± 0,0003 ^a
14	0,0043 ± 0,0014 ^a	0,0017 ± 0,0003 ^a	0,0013 ± 0,0006 ^a
21	00.00	00.00	00.00

Letras iguales entre medias no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.1.2.2- Actividad Manganeso Peroxidasa.

Las 3 cepas utilizadas presentaron la misma actividad MnP hasta los 14 días de incubación ($p > 0,05$). Ninguna mostró actividad a los 21 días. (Tabla IV-5)

Tabla IV- 5: Cinética de producción de enzima MnP por los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium*, a los 7, 14 y 21 días. Expresada en unidades de actividad enzimática por mL de extracto enzimática (U/mL).

Tiempo (días)	<i>P. ostreatus</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>
7	0,017 ± 0,004 ^a	0,027 ± 0,021 ^a	0,018 ± 0,009 ^a
14	0,031 ± 0,009 ^a	0,021 ± 0,003 ^a	0,049 ± 0,026 ^a
21	00.00	00.00	00.00

Letras iguales entre medias no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.1.2.3- Actividad Lignino Peroxidasa.

No se detectó actividad Lignino Peroxidasa para las cepas utilizadas en la fermentación sumergida del bagazo de caña de azúcar.

4.1.2.4- Actividad CMCasa.

La actividad CMCasa solo se detectó a los 7 días de incubación *T. versicolor* y *P. chrysosporium* no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) presentando mayor actividad CMCasa que *P. ostreatus* ($p < 0,05$), siendo los valores medios: $0,151 \pm 0,069$, $0,171 \pm 0,088$ y $0,057 \pm 0,015$ U/mL respectivamente.

4.2- Comparación de las actividades enzimáticas registradas en los procesos de SSF y SF.

En la Tabla IV-6 se presentan los valores máximos de actividad enzimática obtenidos con cada uno de los hongos en los procesos de SSF y SF. En ambos procesos, el máximo de actividad de todas las enzimas ocurrió a los 7 días. Se observó que todos los hongos presentaron mayor actividad de todas las enzimas estudiadas mediante el proceso de SSF ($p < 0,05$). En el proceso SF ningún hongo presentó actividad Lignino Peroxidasa.

Tabla IV-6: Valores máximos de actividad enzimática expresada en U/mL, obtenidos con cada uno de los hongos en los procesos de fermentación de estado sólido (SSF) y fermentación sumergida (SF).

Enzima	Hongo	Proceso	
		SSF	SF
Lacasa	<i>P. ostreatus</i>	$0,214 \pm 0,104^a$	$0,0021 \pm 0,0005^b$
	<i>T. versicolor</i>	$0,215 \pm 0,059^a$	$0,0027 \pm 0,0018^b$
	<i>P. chrysosporium</i>	$0,349 \pm 0,012^a$	$0,0019 \pm 0,0003^b$
MnP	<i>P. ostreatus</i>	$0,069 \pm 0,006^a$	$0,017 \pm 0,004^b$
	<i>T. versicolor</i>	$0,053 \pm 0,004^a$	$0,027 \pm 0,021^b$
	<i>P. chrysosporium</i>	$0,081 \pm 0,003^a$	$0,018 \pm 0,009^b$
LiP	<i>P. ostreatus</i>	$0,2461 \pm 0,0241^a$	-
	<i>T. versicolor</i>	$0,2966 \pm 0,0003^a$	-
	<i>P. chrysosporium</i>	$0,3119 \pm 0,0002^a$	-
CMCasa	<i>P. ostreatus</i>	$0,145 \pm 0,022^a$	$0,057 \pm 0,015^b$
	<i>T. versicolor</i>	$0,113 \pm 0,018^a$	$0,151 \pm 0,069^b$
	<i>P. chrysosporium</i>	$0,175 \pm 0,045^a$	$0,171 \pm 0,088^b$

Para filas, letras iguales entre medias no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.3- Evaluación de los procesos de deslignificación biológica mediante la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar obtenido de las SSF y SF.

4.3.1- Caracterización de una Celulasa comercial.

4.3.1.1- Efecto de la concentración de Celulasa sobre la actividad enzimática.

La mayor actividad enzimática se obtuvo con una concentración de 5 mg/mL de Celulasa (Figura 4-1), generándose 1,85 $\mu\text{g/mL}$ de azúcares fermentables a partir de la hidrólisis de 0,05 g de CMC luego de 1 h de incubación.

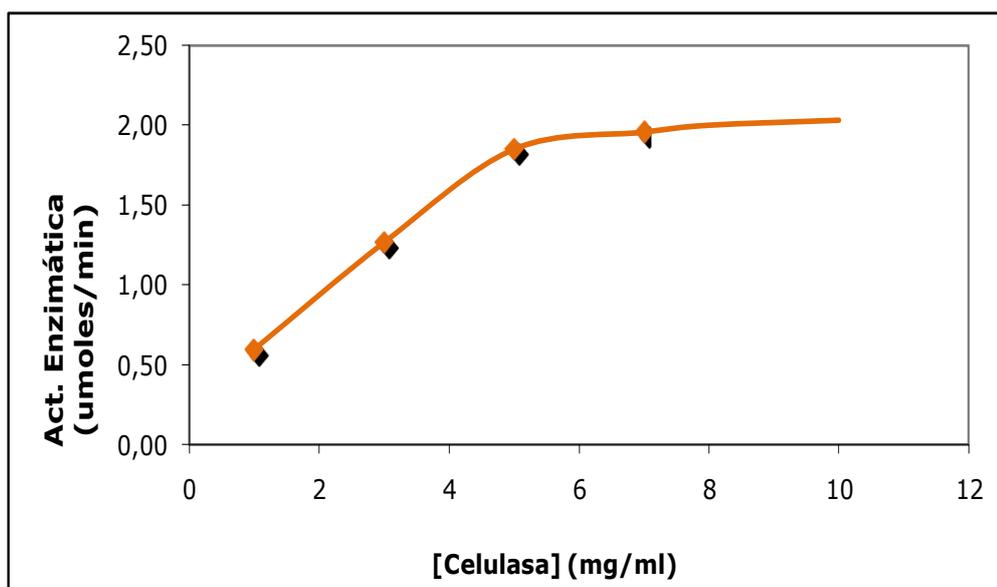


Figura 4-1: Actividad enzimática medida como μmoles de azúcares fermentables producidos por minuto a diferentes concentraciones de enzima Celulasa con sustrato óptimo CMC.

4.3.1.2- Efecto de la concentración de CMC sobre la actividad enzimática.

A partir de los datos obtenidos de actividad enzimática en función de la concentración de sustrato CMC, se determinaron los parámetros k_M y $V_{m\acute{a}x}$ con la herramienta Non-linear Curve Fit del programa Microcal Origin, ajustándose a un modelo de hipérbola de tipo $y = P_1(x) / P_2 + (x)$, donde $P_1 = V_{m\acute{a}x}$ y $P_2 = k_M$. La enzima celulasa utilizada en este estudio presentó una $V_{m\acute{a}x} = 7,68$ $\mu\text{moles}/\text{min}$, y una $k_M = 0,039$ g/mL (Figura 4-2).

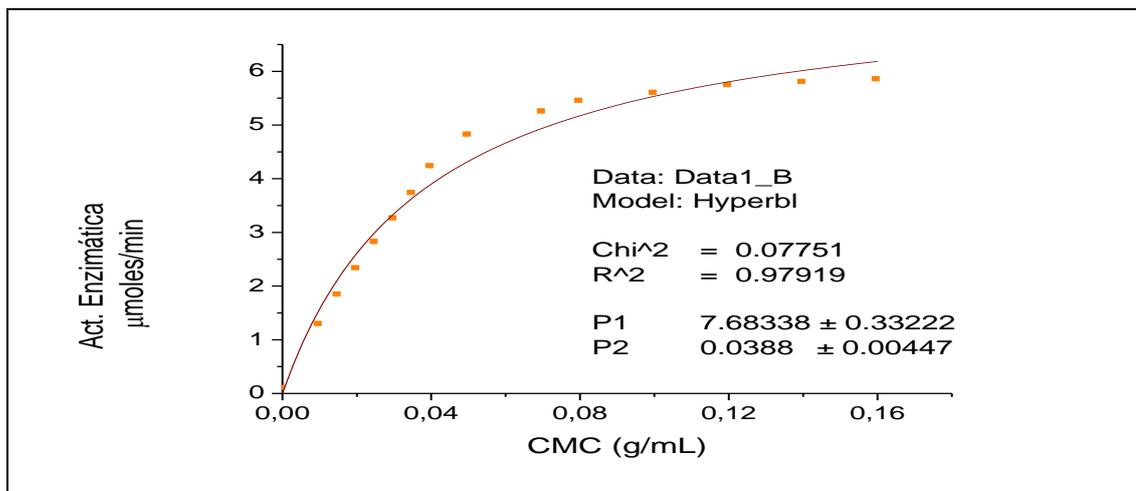


Figura 4-2: Gráfico de Michaelis- Menten de la actividad enzimática, medida como μmoles de glucosa producidos por minuto a diferentes concentraciones de sustrato CMC.

4.3.2- Hidrólisis del bagazo obtenido de los procesos de SSF y SF.

4.3.2.1- Fermentación de estado sólido (SSF)

El pretratamiento con cualquiera de los 3 hongos utilizados generó mayor cantidad de azúcares fermentables en la hidrólisis enzimática, respecto al blanco (sin hongos). Se pudo determinar que el tiempo óptimo de pretratamiento fue de 14 días, y que *P.chrysosporium* permitió la mayor hidrólisis del bagazo, luego *T. versicolor* y por último *P. ostreatus*, presentando todas diferencias significativas (Tabla IV-7). Se observó que a los 21 días de pretratamiento con cualquiera de los 3 hongos se generaron menores concentraciones de azúcares fermentables en la hidrólisis.

Tabla IV-7: Azúcares fermentables generados luego de 1 h de hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar deslignificado por los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P.chrysosporium* en el proceso de SSF durante 7, 14 y 21 días. Los datos se presentan como mg de azúcares fermentables por g de bagazo.

Tiempo (días)	<i>P. ostreatus</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>P.chrysosporium</i>	Blanco
7	46,2 ± 1,8	32,3 ± 1,3	22,2 ± 1,2	5,9 ± 0,7
14	52,1 ± 1,7 ^c	62,7 ± 1,3 ^b	70,6 ± 1,2 ^a	4,4 ± 0,7 ^d
21	15,3 ± 1,1	17,6 ± 1,2	23,7 ± 1,2	6,3 ± 0,5

Letras iguales entre medias no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.3.2.2- Fermentación sumergida (SF)

El pretratamiento con cualquiera de los 3 hongos utilizados generó mayor cantidad de azúcares fermentables en la hidrólisis enzimática, respecto al blanco (sin hongos). Sin embargo no hubo diferencias significativas en la hidrólisis del bagazo obtenido de los 3 pretratamientos, ni respecto al tiempo de incubación (Tabla IV-8).

Tabla IV-8: Azúcares fermentables generados luego de 1 h de hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar deslignificado por los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P.chrysosporium* en el proceso de SF durante 7, 14 y 21 días. Los datos se presentan como mg de azúcares fermentables por g de bagazo.

Tiempo (días)	<i>P. ostreatus</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>P.chrysosporium</i>	Blanco
7	17,8 ± 1,6 ^a	15,4 ± 1,0 ^a	18,5 ± 1,2 ^a	4,9 ± 0,4 ^b
14	12,4 ± 1,0 ^a	12,0 ± 0,8 ^a	12,8 ± 0,7 ^a	6,7 ± 1,2 ^b
21	12,9 ± 1,0 ^a	12,2 ± 0,7 ^a	12,9 ± 0,8 ^a	5,8 ± 0,7 ^b

Letras iguales entre medias no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.4- Optimización de la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar deslignificado.

Según los resultados obtenidos, se logró un mayor rendimiento en la producción de azúcares fermentables, luego de 36 h, con una concentración de bagazo del 5% p/v, obteniéndose $212,5 \pm 3,4$ mg/ g de bagazo, respecto a los $169,5 \pm 1,2$ mg/ g de bagazo obtenidos de una concentración de bagazo al 10% ($p < 0,05$). La velocidad de hidrólisis aumentó rápidamente en las primeras 4 horas para ambas concentraciones. Luego se observó una disminución de la velocidad (Figura 4-3).

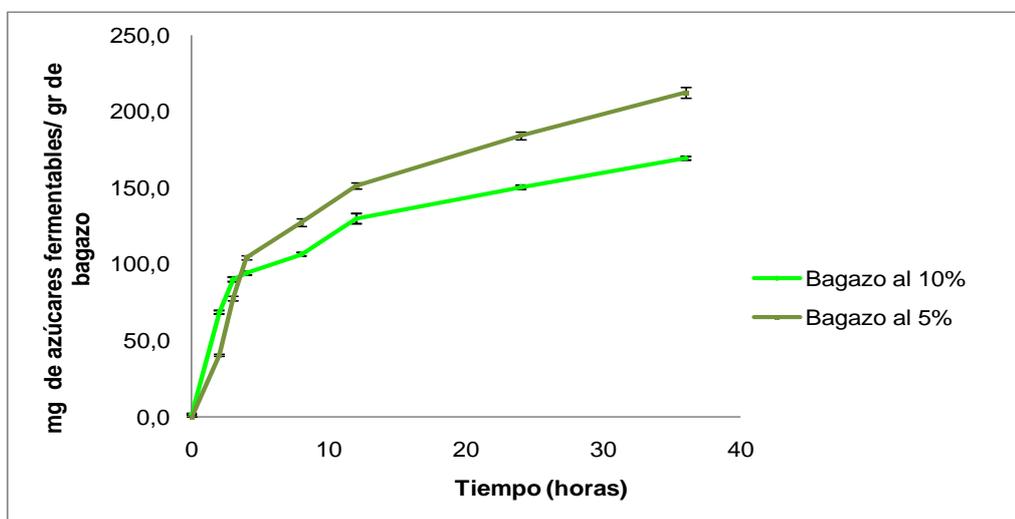


Figura 4-3: Cinética de hidrólisis enzimática versus tiempo, de dos concentraciones de bagazo, expresada como mg de azúcares fermentables por g de bagazo.

4.5- Sacarificación y fermentación alcohólica en simultáneo del bagazo pretratado.

Todos los parámetros determinados fueron significativamente mayores para la fermentación con *S. cerevisiae* del medio óptimo YPD respecto al medio con bagazo (Tabla IV-9). La cantidad de azúcares remanentes en el medio YPD fue de 7,0 mg/mL. No se pudo determinar la cantidad de azúcares generados por la celulasa en el proceso de SFS ya que ésta varió notablemente, comparado con lo ocurrido en el control de fermentación,

luego de 4 h de haber sido agregado el inóculo de *S. cerevisiae*. Por lo tanto tampoco se pudo determinar la cantidad de azúcares fermentados. Para el cálculo de eficiencia de la fermentación se tomó como referencia la cantidad de azúcares fermentables obtenidos en el control de la fermentación a las 36 h (Figura 4-4).

Tabla IV-9: Comparación de los parámetros obtenidos en el proceso de sacarificación y fermentación en simultáneo de bagazo de caña respecto a la fermentación del medio YPD óptimo para *S. cerevisiae*.

Medio	YPS (g _{etanol} /g _{sustrato})	Concentración de etanol (g/L)	Eficiencia de la fermentación	Productividad volumétrica global (g/L/h)
YPD	0,21 ¹	4,2 ± 0,4	0,67	0,11
Bagazo	0,06 ²	3,2 ± 0,1	0,62*	0,09

1: sustrato glucosa

2: sustrato bagazo

*: se tomó como referencia la cantidad de azúcares fermentables obtenidos en el control de fermentación a las 36 h.

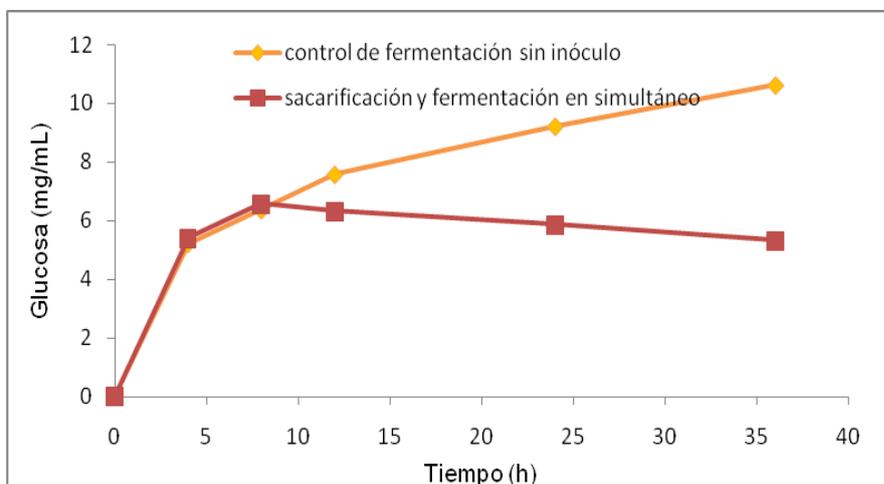


Figura 4-4: Variación de la concentración de glucosa en mg/mL en el proceso de SFS y el control sin inóculo (*S. cerevisiae*).

5. DISCUSIÓN

Se compararon dos procesos de deslignificación del bagazo de caña de azúcar, utilizando los hongos *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium*. Al evaluar la capacidad de dichos hongos de producir las diferentes enzimas involucradas en la deslignificación del sustrato lignocelulósico, se observó que en el proceso de fermentación de estado sólido (SSF), las tres cepas presentaron actividad de las enzimas Lacasa (Lacc), Manganese Peroxidasa (MnP), Lignino Peroxidasa (LiP) y Carboximetilcelulasa (CMCasa). Mientras que en el proceso de fermentación sumergida (SF) se evidenció la expresión de Lacc, MnP y CMCasa, pero no se detectó actividad LiP. Además se observaron mayores niveles de actividad de todas las enzimas en el proceso SSF respecto al proceso SF. Estos resultados concuerdan con los descriptos en otros trabajos, los cuales indican que el proceso de SSF sobre un sustrato lignocelulósico favorece la expresión de las enzimas ligninolíticas, mientras que el proceso de SF pueden llegar a inhibirse (Elisashvili et al., 2008).

También se pudo observar que en iguales condiciones de cultivo, cada cepa presentó un patrón diferencial en la expresión de las enzimas, excepto para la Lacc, evidenciado por los diferentes niveles de actividad detectados. Este patrón diferencial en la expresión ha sido reportado en varios trabajos, en los cuales también se observaron diferencias entre cepas, además de la fuerte influencia de la relación carbono-nitrógeno del sustrato (Quintero et al., 2006, Silva et al., 2005; De Souza-Silva et al., 2005; Dinis et al., 2009; Elisashvili et al., 2008). En el presente trabajo se determinó que la cepa de *P. chrysosporium* utilizada fue quien presentó mayor capacidad de producir extracelularmente las enzimas ligninolíticas, mediante la fermentación de estado sólido del bagazo de caña de azúcar suplementado con el medio sintético sin glucosa, en un periodo de 7 días.

La hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar obtenido de los procesos de SSF y SF permitió evidenciar el grado de deslignificación provocado por cada una de las cepas utilizadas. Sin embargo, se determinó que se requieren 14 días de pretratamiento con hongos en las condiciones establecidas en este trabajo, para obtener los mejores rendimientos en la hidrólisis enzimática. Se ha observado que no hay correlación directa entre el tiempo en el cual se obtiene la máxima producción de enzimas ligninolíticas y la degradación de la lignina, debido al hecho de que la máxima actividad de las enzimas ocurre antes del pico máximo de pérdida de ésta, por lo cual se sugirió que las enzimas actúan sinérgicamente (Dinis et al., 2009; Quintero et al., 2006). También se ha observado que para un mismo sustrato inoculado con diferentes cepas y bajo diferentes

condiciones, la degradación de la lignina puede variar entre 2 y 65% (Arora et al., 2002; Agosin et al., 1985)

En este trabajo se observó que *P. chrysosporium*, mediante el proceso de SSF, logró el mayor nivel de degradación de la lignina, permitiendo un aumento de la digestibilidad enzimática del bagazo del 6,62%, en tan solo 1 h de tratamiento con la enzima Celulasa, seguido de *T. versicolor* con un 5,83% y *P. ostreatus* con 4,77%. Sin embargo, el pretratamiento con los hongos durante 21 días generó menor cantidad de azúcares fermentables, seguramente debido a que luego de degradar la lignina, comienzan a degradar la celulosa.

Cuando el tratamiento con la enzima Celulasa se prolongó por 36 h, se logró aumentar hasta 20,81% la producción de azúcares fermentables a partir del bagazo deslignificado con *P. chrysosporium*. Teniendo en cuenta que el bagazo de caña de azúcar tiene un contenido de glucosa que varía entre 39,9 y 34,1% (Rabelo et al., 2009), se obtuvo un rendimiento del 53% respecto al valor esperado. Este resultado es similar al obtenido con un pretratamiento de bagazo de caña de azúcar con 0,4 g/g de hidróxido de calcio a 70 °C durante 65,6 h, a partir del cual se logró la digestión enzimática del 21,8% del bagazo (Rabelo et al., 2009).

Debido a que la Celulasa es inhibida por sus productos de hidrólisis, celobiosa y glucosa, se ha establecido que si la hidrólisis enzimática se realiza en simultáneo con la fermentación alcohólica (proceso SFS), se logra mantener bajos los niveles de azúcares, por lo cual la velocidad de hidrólisis de la celulosa no se ve afectada (Brethauer et al., 2009; Gauss et al., 1976; Spindler et al., 1987; Takagi et al., 1977).

En el presente trabajo se obtuvieron 3,2 g/L de etanol, con una eficiencia de la fermentación con *S. cerevisiae* del 62% en un proceso de sacarificación y fermentación en simultáneo (SFS), utilizando como sustrato el bagazo de caña de azúcar deslignificado con *P. chrysosporium*. Mientras que en la fermentación del medio óptimo YPD la eficiencia fue del 67%. La diferencia entre ambos procesos podría deberse a la cantidad de glucosa disponible en el medio desde el comienzo de la fermentación (Mariam et al., 2009). El medio YPD contenía 20 g/L de glucosa (sustrato óptimo para *S. cerevisiae*), mientras que en el medio con bagazo la concentración de glucosa inicial fue de casi 7 g/L. Los resultados obtenidos en este trabajo son comparables con los de la literatura. Los datos sobre eficiencia en la producción de bioetanol con otros sustratos lignocelulósicos son muy variados. Para la paja de trigo, que es uno de los sustratos más investigados, se han logrado rendimientos de entre 31 y 84% (Nigam et al., 2001; Alfani et al., 2000), mientras que para la paja de cebada varía entre 60 y 95% (Sun et al., 2002).

6. CONCLUSIONES

El bagazo de caña de azúcar suplementado con el medio sintético sin glucosa, se mostró como un buen sustrato para la producción de enzimas ligninolíticas de las cepas de *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chrysosporium*, mediante un proceso de SSF durante 7 días.

El pretratamiento del bagazo de caña de azúcar durante 14 días con *P. chrysosporium* permitió buenos rendimientos en la producción de azúcares fermentables.

El bagazo de caña de azúcar deslignificado se mostró como un buen sustrato para la producción de bioetanol mediante un proceso de sacarificación y fermentación en simultáneo a 37 °C durante 36 h.

Para obtener mejores rendimientos en la fermentación es necesario hacer una búsqueda exhaustiva de microorganismos fermentadores más eficientes.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agosin, E., Odier, E. 1985. Solid-state fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermented by selected white-rot fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21:397-403.

Alfani, F., Galifuoco, A., Saporosi, A., Spera, A., Cantarella, M. 2000. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 121:1133-1141.

Arora, D. S., Chander, M., Gill, P. K. 2002. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50:115-120.

Asgher, M., Bhatti, H. N., Ashraf, M., Legge, R. L. 2007. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation.* 19:771-783.

Barrasa, J. M., Martínez, A. T., Martínez, M. J. 2009. Isolation and Selection of Novel Basidiomycetes for Decolorization of Recalcitrant Dyes. *Folia Microbiol.* 54(1):59-66.

Blanchette, R. A. 1984. Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 647–653.

Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. 2003. Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:519-46.

Bonnarme, P., Jeffries, T. W. 1990. Mn(II) Regulation of Lignin Peroxidases and Manganese-Dependent Peroxidases from Lignin-Degrading White Rot Fungi. *Appl. Environment. Microbiol.* 56(1):210-217.

Brethauer, S., Wyman, C. E. 2009. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresour. Technol.*, doi:10.1016/j.biortech.2009.11.009

Chartchalerm Isarankura-Na-Ayudhya, Tanawut Tantimongcolwat, Thikamporn Kongpanpee, Ponpitak Prabkate, Virapong Prachayasittikul, 2007. Appropriate Technology for the Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to Liquid Ethanol: Future Prospects for Community Strengthening and Sustainable Development. *EXCLI Journal* 6:167-176, ISSN 1611-2156.

Chen, Y., Ratna, R., Shivappa, S., Keshwani, D., Chen, C. 2007. Potential of Agricultural Residues and Hay for Bioethanol Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142:276-290.

Cherubini, F., Jungmeier, G. 2009. LCA of a biorefinery concept producing bioethanol, bioenergy, and chemicals from switchgrass. *Int. J. Life Cycle Assess.* DOI: 10.1007/s11367-009-0124-

De Souza-Silva, C. M., Soares, I., Oliveira, R. 2005. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme Microb. Technol.* 37:324-329.

Dien, B. S., Cotta, M. A., Jeffries, T. W. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production current status. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 63:258-266.

Dinis, M. J., Bezerra, M. F., Nunes, F., Dias, A., Guedes, C., Ferreira, L. M., Cone, J. W., Marques, G. S. M., Barros, A. R. Rodrigues, A, M. 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresource Technology* 100:4829-4835.

Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T., Kvesitadze, G. 2008. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technol.* 99: 457-462.

Froni, L. 1990. Ciclo Biológico del Carbono. *Ecología Microbiana del Suelo.* 6:116-126.

Gauss, W. F., Suzuki, S., Takagi, M. 1976. Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments. US patent 3,990,944.

Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Biores. Technol.* 101:4775-4800.

Glenn, J. K., Akileswara, L., Gold, M. H. 1986. Mn(II) Oxidation is the Principal Function of the Extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 251:688-698.

Goh, C. S., Lee, K. T. 2009. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renew. Sustain. Energy Rev.* doi:10.1016/j.rser.2009.10.001

Hammel, K. E. 1996. Extracellular Free Radical Biochemistry of Ligninolytic Fungi. *New J. Chem.* 20:195-198.

Keyser, P., Kirk, T. K., Zeikus, J. G. 1978. Ligninolytic Enzyme System of *Phanerochaete chrysosporium*: Synthesized in the Absence of Lignin in Response to Nitrogen Starvation. *J. Bacterio.* 135:790-797.

Kirk, T. K., Farrel, R. L., 1987. Enzymatic combustion: The Microbial Degradation of Lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:465-505.

Kirk, T. K., Cullen, D. 1998. Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi. En: Young, R. A. and Ahktar, M. eds. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. John Wiley and Sons, Inc. 273-302.

Leonowicz, A., Cho, N. S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilwska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesemberg, D., Rogalski, J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41:185-227.

Lopretti ,M. 1999. Sistemas ligninolíticos de Hongos y Bacterias modificadores de Lignina. UdelaR PEDECIBA pp700.

Lin, Y., Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:627-642.

Malherbe, S., Cloete, T. E. 2002. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology* 1:105-114.

Mariam, I., Manzoor, K., Ali, S., Ul-Haq, I. 2009. Enhanced production of ethanol from free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* under stationary culture. *Pak. J. Bot.* 41(2):821-833.

Martinez, A., Rodriguez, M. E., York, S. W., Preston, J. F., Ingram, L. O. 2000. Effects of Ca(OH)₂ treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnol Bioeng.* 69:526-536.

Mutreja, R., Das, D., Goyal, D., Goyal, A. 2011. Bioconversion of AgriculturalWaste to Ethanol by SSF Using Recombinant Cellulase from *Clostridium thermocellum*. *Enzyme Research*, doi:[10.4061/2011/340279](https://doi.org/10.4061/2011/340279)

Nigam, J. N. 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J. Biotech.* 87(1):17-27.

Oh, K. K., Kim, S. W., Jeong, Y. S., Hong, S. I. 2000. Bioconversion of Cellulose into Ethanol by Nonisothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 89:15-30.

Otjen, L., Blanchette, R. A., Leatham, G. F. 1988. Lignin distribution in wood delignified by white rot fungi: X-ray microanalysis of decayed wood treated with bromine. *Holzforschung.* 42:281-288

Patel, S. J., Onkarappa, R., Shobha, K. S. 2007. Comparative Study of Ethanol Production from Microbial Pretreated Agricultural Residues. J. Appl. Sci. Environ. Manage. 11(4):137-141.

Pilz, R., Hammer, E., Schauer, F., Kragl, U. 2003. Laccase-catalysed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60:708-712.

Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:20-33.

Quintero, J. C., Feijoo, G., Lema, J. M. 2006. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. VITAE. 13(2):61-67.

Rabelo, S. C., Maciel Filho, R., Carvalho Costa, A. 2009. Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. Appl. Biochem. Biotechnol. 153:139-150.

Rodríguez, C. S, Santoro, R., Cameselle, C., Sanromán, A. 1997. Laccase production in semi-solid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnology Letters. 19(10):995-998.

Schoemaker, H. E., Piontek, K. 1996. On the interaction of lignin peroxidase with lignin. Pure & Appl. Chem. 68(11):2089-2096.

Silva, E. M., Machuca, A., Milagres, A. M. F. 2005. Evaluation the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. Process. Biochem. 40:161-164.

Singh, D., Chen, S. 2008. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81:399-417.

Song, A., Wu, K., Xie, H., Zhang, B. 2007. Biodegradation of Straw Stalk and Experiment of Ethanol Fermentation. Wuhan University Journal of Natural Sciences. 12(2):343-348.

Spindler, D. D., Wyman, C. E., Mohagheghi, A., Grohmann, K. 1987. Thermotolerant yeast for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. Appl. Biochem. Biotechnol. 17:279-293.

Stoeglehner, G., Narodslawsky, M. 2009. How sustainable are biofuels? Answers and further questions arising from an ecological footprint perspective. Bioresource Tech. 100:3825-3830.

Stowers, C. C., Ferguson, E. M., Tanner, R. D. 2008. Development of Activity-based Cost Functions for Cellulase, Invertase, and Other Enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 147:107-117.

Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresourch Tech.* 83(1):1-11.

Takagi, M., Abe, S., Suzuki, S., Emert, G.H., Yata, N. 1977. A Method for Production of Alcohol Directly from Cellulose using Cellulase and Yeast, Indian Institute of Technology, Delhi, India.

Taylor, G. 2008. Biofuels and the biorefinery concept. *Energy Policy.* 36:4406-4409.

Tien, M., Kirk, T. K. 1988. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. En: Scott W. A. ed. *Biomass. Methods in Enzymology.* Vol. 161. Academic Press. USA pp. 238-249.

Tretyakov, V. F., Lermontov, A. S., Makarfi, Y. I., Yakimova, M. S., Frantsuzova, N. A., Koval, L. M., Erofeev, V. I. 2008. Synthesis of motor fuels from bioethanol. *Chem.Tech.Fuels and Oils.* 44(6):409-414.

Vanholme, A., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology.* 153:895-905.

Vázquez, H. J., Dacosta, O. 2007. Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ing. Invest. Tec.* 4:249-259.

Wyman, C. E. 2001. Twenty Years of Trials, Tribulations, and Research Progress in Bioethanol Technology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91/93: 5-21.

Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson, L. 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:17-34.

Zhao, Y., Wu, B., Yan, B., Gao, P. 2004. Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. *Science in China Ser. C Life Sciences.* 47(1):18-24.