



Producción de bioetanol combustible a partir de Pasto Elefante:

estudio de la hidrólisis enzimática y fermentación

**TESINA DE GRADUACIÓN
Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República**

por

Laura Camesasca Salsamendi

Tutora: Ing. Claudia Lareo
Co-tutor: Ing. Daniel Ferrari

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de este trabajo.

A mi querida familia y en especial a mis padres, gracias por el apoyo incondicional a lo largo de todo este tiempo, tanto emocional como económico.

A mis tutores, Ing. Claudia Lareo y al Ing. Daniel Ferrari, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, por haber confiado en mí para desarrollar este trabajo y por sus enseñanzas durante todo este tiempo.

A cada una de mis compañeras del Departamento de Bioingeniería, Belén, Verónica, Guadalupe, Lyliam, Valeria, Eloísa, Lucía, Juliana y en especial a Mairan, por todos los consejos y ayuda recibida, y por sobre todo su amistad.

A la ANII por su financiamiento a través de una beca de iniciación.

Índice de Contenidos

Índice de Contenidos.....	3
Índice de Figuras.....	7
Índice de Tablas.....	8
Resumen.....	9
Capítulo 1: Introducción.....	11
1.1 Biocombustibles y sus antecedentes.....	12
1.1.2 Biocombustibles de primera generación.....	13
1.1.3 Biocombustibles de segunda generación.....	13
1.2 Bioetanol.....	13
1.2.2 Bioetanol en el Uruguay.....	15
1.2.3 Producción de Bioetanol.....	16
1.3 Pasto elefante.....	18
1.4 Estructura de la biomasa lignocelulósica.....	19
1.4.1 Celulosa.....	20
1.4.2. Hemicelulosa.....	211
1.4.3 Lignina.....	21
1.5 Visión general del proceso producción de bioetanol lignocelulósico.....	21
1.6 Pretratamientos.....	22
1.6.1 Pretratamientos Físicos.....	25
- Pretatamiento mecánico.....	25
- Pretatamiento térmico.....	25
1.6.2 Pretratamientos Químicos.....	25
- Hidrólisis ácida.....	25
- Hidrólisis alcalina.....	25
- Solventes orgánicos.....	26

- Ozonólisis	26
- Oxidación húmeda	26
1.6.3 Pretratamientos Físico-Químicos	26
- Explosión por CO ₂	26
- Explosión de fibra por amoníaco (AFEX).....	27
1.6.4 Pretratamiento Biológico	27
1.7 Hidrólisis enzimática.....	27
1.8 Surfactantes	29
1.9 Fermentaciones.....	30
1.9.1 Microorganismos fermentadores.....	30
1.9.2 Tipos de fermentación	31
- Hidrólisis y fermentación en secuencia (SHF).....	32
- Hidrólisis y fermentación simultáneas (SSF).....	32
- Hidrólisis y co-fermentación simultáneas (SSCF).....	32
- Bioproceso consolidado (CBP).....	33
Capítulo 2: Objetivos	35
2.1 Objetivo general	37
2.2 Objetivos específicos	37
Capítulo 3: Materiales y Métodos	38
3.1 Materia Prima.....	39
3.2 Pretratamientos.....	39
3.2.1 Hidrólisis ácida diluida	39
3.2.2 Pretatamiento alcalino	39
3.3 Hidrólisis enzimática.....	40
3.3.1 Estudio del uso de β-glucosidasa sobre la hidrólisis enzimática con celulasas ..	40
3.3.2 Estudio del efecto de la adición de surfactante y de β-glucosidasa en la hidrólisis enzimática.....	40
3.3.3 Estudio de la hidrólisis enzimática para distintas concentraciones de sustrato ..	40

3.3.4 Estudio del efecto de un pretratamiento alcalino adicional sobre la hidrólisis enzimática	41
3.3.5 Estudio de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática del residuo FPAA	41
3.4 Ensayos de Fermentación.....	41
3.4.1 Desarrollo de inóculo	41
3.4.2 Ensayos de fermentación	42
3.5 Métodos Analíticos.....	42
3.5.1 Determinación del tamaño medio de partícula	42
3.5.2 Humedad.....	42
3.5.3 Cenizas.....	43
3.5.4 Determinación de azúcares estructurales y lignina	43
3.5.5 Extractivos	43
3.5.6 Determinación de azúcares, ácidos y etanol mediante cromatografía líquida ...	43
3.5.7 Concentración celular	44
3.6 Cálculos	44
3.7 Análisis estadístico.....	45
Capítulo 4: Resultados y Discusión	46
4.1 Caracterización de la gramínea <i>Pennisetum purpureum Schum</i>	47
4.2 Tratamientos de hidrólisis sobre el residuo FPA.....	49
4.2.1 Caracterización de FPA y evaluación de su digestibilidad enzimática.....	49
4.2.2 Evaluación del efecto de la adición de surfactante y el efecto sinérgico de la β -glucosidasa en la hidrólisis enzimática	51
4.2.3 Hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos	54
4.3 Tratamientos de hidrólisis sobre el residuo FPAA	55
4.3.1 Pretatamiento alcalino del residuo FPA	55
4.3.2 <i>Evaluación del efecto de la adición de un pretatamiento alcalino sobre la hidrólisis enzimática</i>	57
4.3.3 Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis del residuo FPAA	59
4.4 Hidrólisis y fermentación simultáneas del residuo FPAA	60

Capítulo 5: Conclusiones	66
Referencias	68
Anexo	78

Índice de Figuras

Fig. 1: Flujo de material y energía para la producción y utilización de bioetanol lignocelulósico	14
Fig. 2: Balance energético de Uruguay para los años 2007 y 2010	16
Fig. 3: Modelo de producción de bioetanol a partir de azúcares simples	17
Fig. 4: Modelo de producción de bioetanol a partir de amiláceos	17
Fig. 5: Modelo de producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico	18
Fig. 6: Ilustración diagramática de la estructura lignocelulósica y sus componentes	20
Fig. 7: Diagrama general de la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica	22
Fig. 8: Representación esquemática de la hidrólisis enzimática de la celulosa	28
Fig. 9: Estrategias utilizadas para la conversión de la lignocelulosa a etanol	34
Fig. 10: Esquema de las principales actividades experimentales llevadas a cabo a lo largo de este trabajo	36
Fig. 11: Distribución del tamaño de partícula del pasto elefante	49
Fig. 12: Avance de la hidrólisis enzimática del residuo FPA, utilizándose 25 FPU/g de residuo sólido de complejo celulásico expresado en porcentaje de conversión de celulosa a glucosa	51
Fig. 13: Avance de la hidrólisis enzimática del residuo FPA con y sin agregado de β -glucosidasa con un porcentaje de sólidos 5% (p/v), expresado en g/L de glucosa obtenidos	52
Fig. 14: Porcentaje de conversión de celulosa a glucosa con respecto al máximo teórico de glucosa, para la hidrólisis enzimática en presencia de distintos surfactantes	53
Fig. 15: Fracción remanente de cada componente lignocelulósico en muestras de pasto elefante, luego de cada etapa de pretatamiento físico-químico	57
Fig. 16: Hidrólisis enzimática del residuo FPAA a 50 y 37 °C	59
Fig. 17: SSF llevada a cabo sobre el residuo FPAA en una relación del 10% (p/v), utilizándose la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , a 37 °C en ausencia de surfactante	62
Fig. 18: SSF llevada a cabo sobre el residuo FPAA en una relación del 10% (p/v), utilizándose la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , a 37 °C con 0.05 g de PEG ₆₀₀₀ /g de sólido	62

Fig. 19: Porcentaje de celulosa convertida a glucosa de la SSF y la hidrólisis enzimática individual, realizadas a 37 °C, con 10% (p/v) de sólidos, 5 FPU/g de residuo sólido y 10 CBU/g de residuo sólido..... 64

Índice de Tablas

Tabla 1: Composición química típica de distintos materiales lignocelulósicos.....	20
Tabla 2: Tecnologías de pretatamientos más prometedoras.....	24
Tabla 3: Algunos microorganismos fermentadores y sus características.....	31
Tabla 4: Composición química del pasto elefante.....	47
Tabla 5: Composición del pasto elefante o <i>Pennisetum purpureum Schum</i> y otras gramíneas expresando sus datos como porcentaje en base seca.....	48
Tabla 6: Composición química del residuo sólido remanente luego de la hidrólisis ácida (FPA).....	49
Tabla 7: Hidrólisis enzimática del residuo FPA en presencia y ausencia de PEG ₆₀₀₀ , para distintas concentraciones de sustrato.....	54
Tabla 8: Composición química de la fracción FPAA, expresada en porcentaje en base seca.....	56
Tabla 9: Hidrólisis enzimática de los residuos FPA y FPAA, con concentraciones de sólidos del 10% (p/v), llevada a cabo sobre el residuo con y sin surfactante.....	58
Tabla 10: Datos comparativos de experiencias de SSF realizadas con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , respecto a este trabajo.....	63
Tabla 11: Concentración de ácidos y glicerol producidos durante la SSF, expresados en g/L.....	65

Resumen

La necesidad por combustibles limpios y amigables para el medio ambiente ha convertido al bioetanol, en un producto de interés mundial. Éste, puede ser producido a partir de diferentes fuentes, sin embargo, la lignocelulosa es la fuente de carbono renovable más abundante y prometedora por su bajo costo y baja interferencia en el precio de los alimentos. La ausencia de una tecnología de bajo costo en lo que refiere a la recalcitrancia de la lignocelulosa e hidrólisis enzimáticas eficientes de la celulosa con bajas concentraciones enzimáticas, constituyen los principales desafíos.

En este trabajo se utilizó como materia prima la gramínea *Pennisetum purpureum* Schum o pasto elefante, analizándose en un primera instancia su composición, la cual fue de: 27% de glucano, 14.06% de xilano, 27.7% de lignina total y 95.87% de sólidos totales, datos expresados en base seca.

Posteriormente se evaluó la digestibilidad enzimática (expresada como porcentaje de conversión de celulosa a glucosa) del residuo sólido remanente luego de la hidrólisis ácida del pasto elefante. En un principio se evaluaron condiciones de alta y baja concentración enzimática (25 y 5 FPU/g de residuo sólido respectivamente), a 50 °C de temperatura y pH 4.8, obteniéndose valores de conversión de celulosa a glucosa de 31.5 y 27.7% respectivamente. También se evaluó el efecto de la adición de β -glucosidasa y sustancias surfactantes tales como BSA, polietilenglicol 6000 (PEG₆₀₀₀) y Tween 80 sobre el porcentaje de conversión en presencia de 5 FPU/g de residuo sólido de complejo celulásico. Se obtuvo un efecto positivo en la hidrólisis enzimática, tanto frente a la adición de β -glucosidasa como en la adición de surfactante, destacándose entre los surfactantes el efecto del polietilenglicol. Se obtuvieron valores en porcentaje de conversión de celulosa a glucosa de 29.6 para el ensayo con adición de β -glucosidasa, 35.6 para el ensayo con adición de PEG₆₀₀₀ y 41.2 para el ensayo con adición tanto de β -glucosidasa como de PEG₆₀₀₀. También se evaluó el efecto de la concentración de sustrato sobre la digestibilidad enzimática. Se obtuvieron, en los casos sin adición de PEG₆₀₀₀, valores de porcentaje de conversión de celulosa a glucosa de 29.6 y 13.2% y para aquellos con adición de PEG₆₀₀₀, se obtuvieron valores de 41.2 y 16% para concentraciones de residuo sólido del 5 y 10% (p/v) respectivamente.

A modo de eliminar un mayor porcentaje de lignina del residuo sólido remanente de la hidrólisis ácida, y así permitir una mayor accesibilidad de las enzimas a la celulosa, se llevó a cabo sobre el residuo, un pretatamiento alcalino adicional. Mediante éste, se eliminó un 58% (p/p) de la lignina con respecto a la composición del residuo anterior. Se evaluó la digestibilidad enzimática de este residuo con respecto al residuo proveniente de la hidrólisis ácida, utilizándose una concentración de sólido del 10% (p/v) a 50 °C. Se obtuvieron valores de porcentaje de conversión de 38 y 45% para los casos sin y con agregado de PEG₆₀₀₀ respectivamente, valores que resultaron superiores a los obtenidos para la hidrólisis enzimática del residuo sin pretatamiento alcalino. También se evaluó el efecto de la temperatura sobre la digestibilidad enzimática de éste último residuo, utilizándose una concentración de sólidos del 10% (p/v). El porcentaje de conversión de celulosa a glucosa a 37 °C fue de 34.4 y 38.8 para los casos sin y con agregado de PEG₆₀₀₀ respectivamente, valores inferiores a aquellos obtenidos en las mismas condiciones a 50 °C, mencionados anteriormente.

En última instancia, se llevó a cabo la hidrólisis y fermentación en simultáneo (SSF) del residuo sólido remanente del pretatamiento alcalino. Se evaluó tanto la digestibilidad enzimática como la capacidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de fermentar en condiciones de 10% (p/v) de sólidos y 37 °C. Se midieron el etanol producido, eficiencia de la fermentación y viabilidad celular, obteniéndose valores de 15.8 y 24 g/L de etanol, 71.4 y 72.1% de eficiencia, 0.64 y 0.84 de células viables para los casos sin y con agregado de PEG₆₀₀₀ respectivamente. El porcentaje de conversión de celulosa a glucosa aumentó hasta un 51.8 y 80.9% para los casos sin y con agregado de PEG₆₀₀₀ respectivamente.

“Surge fantasma de nueva crisis del petróleo”

(Diario “El País”, Montevideo, Uruguay, 26/02/2011)

1.1 Biocombustibles y sus antecedentes

Si bien no se conoce aún con certeza cuando el agotamiento de los recursos de origen fósil llegará a un estado crítico, este es un tema de gran preocupación y debate a nivel mundial. En el titular al comienzo de este capítulo, publicado el año pasado por un periódico local, se advierte que nuestro país también se enfrenta a la crisis global de los combustibles y es también afectado por el continuo aumento del precio del crudo. Desde hace varios años especialistas estudian y especulan acerca de este tema. Algunos muy reconocidos como el Dr. J. Campbell¹ y el Dr. John D. Edwards², estiman que las reservas mundiales de petróleo habrían comenzado a descender a partir del 2010 en el caso de Campbell, o que lo harán a partir del 2020 según Edwards (Campbell y Laherrère, 1998). Más allá de las diferentes opiniones, el agotamiento del petróleo fósil parece ser una realidad inevitable en el correr de los próximos años, lo que alerta a los gobiernos sobre la importancia de investigar en las diferentes energías renovables, como los biocombustibles.

Los biocombustibles, han sido utilizados desde hace muchísimos años. En 1897 Nikolas Otto, inventó el motor de combustión interna, alimentado con etanol, el cual más tarde luego de la crisis del petróleo en 1970, convirtió al etanol en un combustible de uso alternativo (Balat et al., 2008). Los biocombustibles tienen varias cualidades atractivas, entre ellas se pueden destacar: su carácter renovable, su participación en la mitigación del cambio climático a través de la reducción de emisiones de gases con efecto invernadero, generan empleos y promueven el desarrollo económico de zonas rurales, y no menos importante, contribuyen a la independencia energética. Pueden ser obtenidos a partir de fuentes muy diversas, tales como granos, melazas, frutas, celulosa, etc., y se clasifican según su origen y la tecnología usada en biocombustibles de primera o segunda generación.

¹ Geólogo asesor del ODAC (Oil Depletion Analysis Centre)

² Geólogo del American Geological Institute, Universidad de Colorado.

1.1.2 *Biocombustibles de primera generación*

Los combustibles de primera generación, son aquellos obtenidos a partir de cultivos tradicionales tales como granos (maíz), remolacha azucarera, semillas oleaginosas (soja, girasol y colza), caña de azúcar, etc. Si bien sus efectos positivos en cuanto a la disminución de los gases de efecto invernadero han sido ya comprobados y cuentan con la ventaja del amplio conocimiento existente en sus tecnologías de producción, tienen la gran desventaja de competir con la industria alimenticia, provocando el aumento de los costos de dichos alimentos.

1.1.3 *Biocombustibles de segunda generación*

Se conocen como combustibles de segunda generación aquellos producidos principalmente a partir de materias primas no tradicionales como los materiales lignocelulósicos. Pero su origen varía desde semillas oleaginosas no comestibles, residuos forestales hasta desechos sólidos municipales. También se puede recurrir al cultivo de distintas especies herbáceas, que a diferencia de las plantaciones de cultivos alimenticios, no necesitan tierras de alta calidad. La biomasa lignocelulósica representa una de las fuentes biológicas más abundantes y poco utilizadas del planeta, por lo que se la considera una fuente potencial de material para biocombustibles. Si bien el principal atractivo de este tipo de biocombustible es la abundancia de su materia prima, su baja interferencia en el precio de los alimentos y menor agotamiento de recursos, tienen la desventaja de que aún queda mucho por conocer y mejorar en lo que refiere a sus tecnologías de producción y transformación para aumentar sus rendimientos (Sims et al., 2010).

1.2 Bioetanol

El bioetanol, es producido ampliamente a nivel mundial a partir de diferentes materias primas, pero casi un 90 % de éste proviene del maíz y la caña de azúcar (Hamelinck et al., 2005). El primero producido principalmente en EE.UU y el segundo en Brasil, en ambos casos con subsidio del estado a modo de superar el alto costo de producción y estimular a los compradores a consumir biocombustibles (Coyle, 2007).

Como ventajas del bioetanol se puede destacar que, dado que es un combustible oxigenado (aproximadamente un 35%), permite que se lleve a cabo una combustión más completa hacia dióxido de carbono (CO₂), disminuyendo de esta

forma la emisión de compuestos aromáticos y de monóxido de carbono (CO), lo que lo hace más amigable al medioambiente (Balat et al., 2008). El etanol, también tiene un mayor número de octano³, mayor velocidad de ignición y mayor calor de vaporización que la gasolina, lo que le confiere una mayor eficiencia. Sin embargo el bioetanol tiene menor capacidad energética (66% de la energía que la gasolina) y es también altamente corrosivo, a su vez, podría aumentar las emisiones de óxidos de nitrógeno y aldehídos (Balat et al., 2008). En cuanto a lo que refiere a emisiones de CO₂, dado que la biomasa utilizada en la producción de biocombustibles absorbe CO₂ para el crecimiento vegetal, se puede considerar que las emisiones generadas por la producción y uso de biocombustibles se equilibran (Figura 1).

En la actualidad, se utiliza una mezcla de la gasolina de origen fósil y etanol en porcentajes que varían de un 10 a un 20% generalmente. El porcentaje de etanol en gasolinas en EEUU promedia el 10% y en Brasil existen mezclas con un contenido de 23% de etanol, llegándose también a utilizar como combustible bioetanol hasta en un 100% (Ghosh y Prelas, 2011).

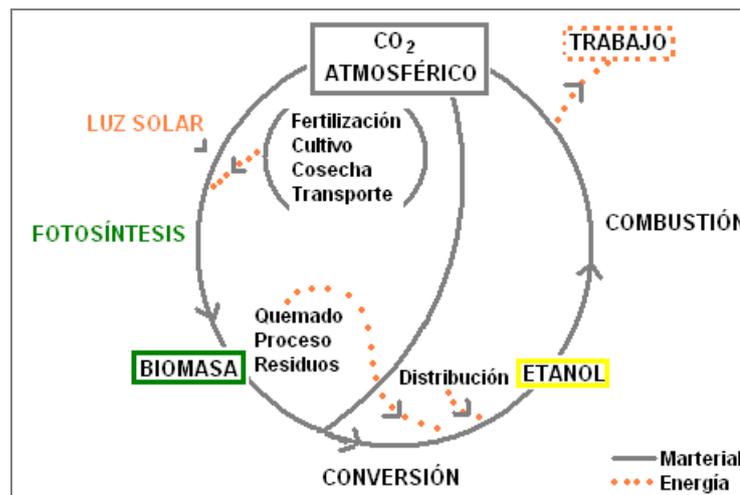


Figura 1. Flujo de material y energía para la producción y utilización de bioetanol lignocelulósico. Adaptado de (Lynd, 1990).

³ Número de octano: parámetro que se utiliza como medida de la calidad de una gasolina y que implica una baja capacidad autodetonante y un incremento en la resistencia a la compresión, que puede ser utilizado para prevenir la ignición temprana, lo que puede llevar a la rotura del cilindro. Las máquinas de combustión interna, necesitan combustibles con un alto número de octano (Sánchez y Cardona, 2005).

1.2.2 Bioetanol en el Uruguay

Nuestro país, cuya matriz energética es altamente dependiente de la importación de petróleo, no es ajeno a la realidad de la disminución de las reservas del crudo y su precio cada vez más elevado. Es por este motivo, que ya a partir del año 2002, se declara de interés nacional, mediante la Ley 17.567, a la producción de combustibles alternativos, renovables y sustitutos de los derivados del petróleo, elaborado con materia prima nacional. Sin embargo, el interés en nuestro país por los biocombustibles se remonta a casi cien años atrás. Ya en 1917 Latham Clarke, director del Instituto de Química Industrial, creado en 1911-1912 durante la segunda presidencia de José Batlle y Ordoñez, propone la fabricación estatal de alcohol y su utilización como carburante nacional. En 1923 se llevaron a cabo las primeras pruebas con mezcla de alcohol con gasolina en vehículos, con resultados exitosos, pero no hasta el 2005 se retoman los planes para producir biocombustibles nacionales. En el 2006 nace la empresa Alur S.A. (Alcoholes del Uruguay), con los objetivos de disminuir la dependencia energética, diversificar su matriz, colaborar en la reducción de emisiones que producen efecto invernadero e impulsar el desarrollo de cadenas agroindustriales nacionales.

En Noviembre del año 2007 el parlamento elaboró una Ley de Agrocombustibles (Ley 18.195), la cual tiene como objeto, el fomento y la regulación de la producción y comercialización así como la utilización de agrocombustibles. También en ella se establece, en el Artículo 6º, que se deberá incorporar alcohol carburante producido en el país con materias primas nacionales, en una proporción de hasta un 5% sobre el volumen total de la mezcla entre dicho producto y las naftas (gasolinas) de uso automotivo que se comercialicen internamente hasta el 31 de Diciembre de 2014.

Como se puede ver en la Figura 2, nuestro país, ya se encuentra incursionando en la utilización de biomasa como fuente energética, aumentando su participación en un 6% hasta el año 2010. Si bien, la capacidad prevista de producción de bioetanol en la actualidad cubriría una sustitución de gasolina del 5 al 8% en volumen, a medida que se requiere aumentar el nivel de sustitución en los próximos años, será necesario diversificar las materias primas y las zonas de producción del bioetanol (<http://www.miem.gub.uy/gxpsites/hgxpp001?5,6,239,O,S,0,MNU;E;72;1;73;6;MNU;> acceso julio 2012).

Las principales materias primas utilizadas en nuestro país para la producción de bioetanol combustible son la caña de azúcar, y en menor medida, el sorgo dulce. Pero

también se están evaluando otros cultivos potenciales para la producción de etanol tales como la remolacha azucarera, trigo, maíz, boniato, sorgo dulce y materiales lignocelulósicos (<http://www.alur.com.uy/etanol.html>, acceso julio 2012).

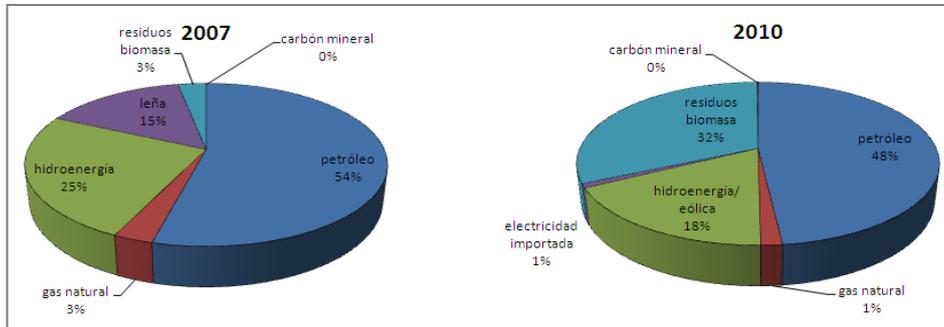


Figura 2. Balance energético de Uruguay para los años 2007 y 2010: consumo final por fuente, adaptado de

(<http://www.miem.gub.uy/gxpsites/hgxpp001?5.6.239.O.S.0.MNU;E:72;1:73;6:MNU> Dirección Nacional de Energía, 2011).

Dentro de los cultivos lingocelulósicos, el *Miscanthus* (*Miscanthus giganteus*), Switchgrass (*Panicum virgatum*) y Pasto Elefante (*Pennisetum purpureum Schum*) se muestran como los más prometedores para el cultivo y producción de etanol en nuestro país (Siri et al., 2007, www.iica.org.uy/index.php?option=com_docman&task, acceso julio 2012).

1.2.3 Producción de Bioetanol

El bioetanol puede ser producido a partir de diferentes materias primas, y el proceso de producción dependerá del origen de ésta. Sin embargo, una etapa común en el proceso para cualquier materia prima, es la fermentación de sus azúcares a etanol. La complejidad de estos procesos va de la mano con la complejidad de los azúcares a fermentar.

Los azúcares simples, tales como sacarosa, glucosa, fructosa y lactosa, provenientes de materias primas tales como remolacha azucarera, caña de azúcar, sorgo dulce, melazas, suero de leche, cuentan con una tecnología de producción de etanol sencilla y ampliamente conocida, como se muestra en la Figura 3. En estos casos, los jugos azucarados son tratados con levaduras que fermentan las hexosas a etanol el cual es posteriormente destilado.

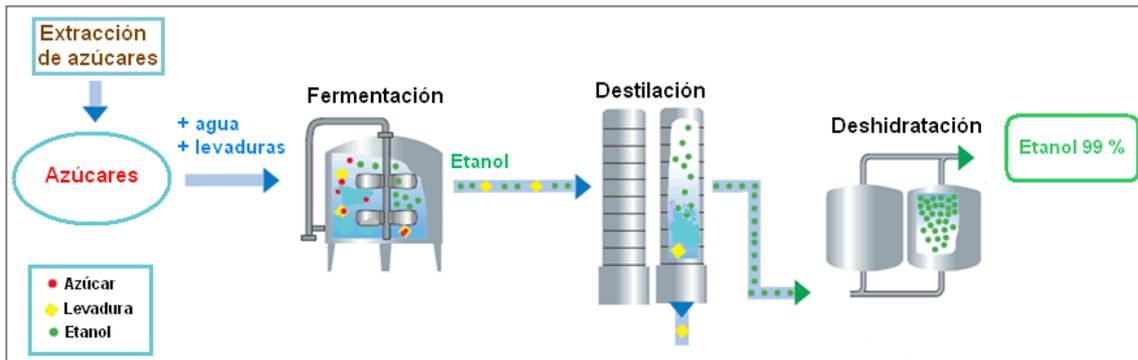


Figura 3. Modelo de producción de bioetanol a partir de azúcares simples, adaptado de (http://www.xtec.cat/~jescoda1/SergiRocamora/1024x768/bio_1.htm Rocamora, 2009-2010).

En el caso de materias primas de origen amiláceo, como granos (maíz, trigo, sorgo, etc.) y batatas (boniato, yuca, etc.) cuentan con un proceso de producción de etanol un tanto más complejo. En este caso, al ser el almidón un polisacárido (polímero de glucosa), es necesaria una etapa adicional de hidrólisis del polímero, llevada a cabo con enzimas amilolíticas con el fin de obtener los azúcares fermentables.

El proceso de producción de bioetanol a partir de amiláceos se puede resumir de la siguiente manera: molienda de la biomasa, su posterior cocción (gelatinización), hidrólisis enzimática (licuefacción y sacarificación) y posterior fermentación con microorganismos y destilación (Ghosh y Prelas, 2011). La Figura 4 muestra un esquema del proceso. La etapa de sacarificación generalmente se realiza en forma simultánea a la fermentación.

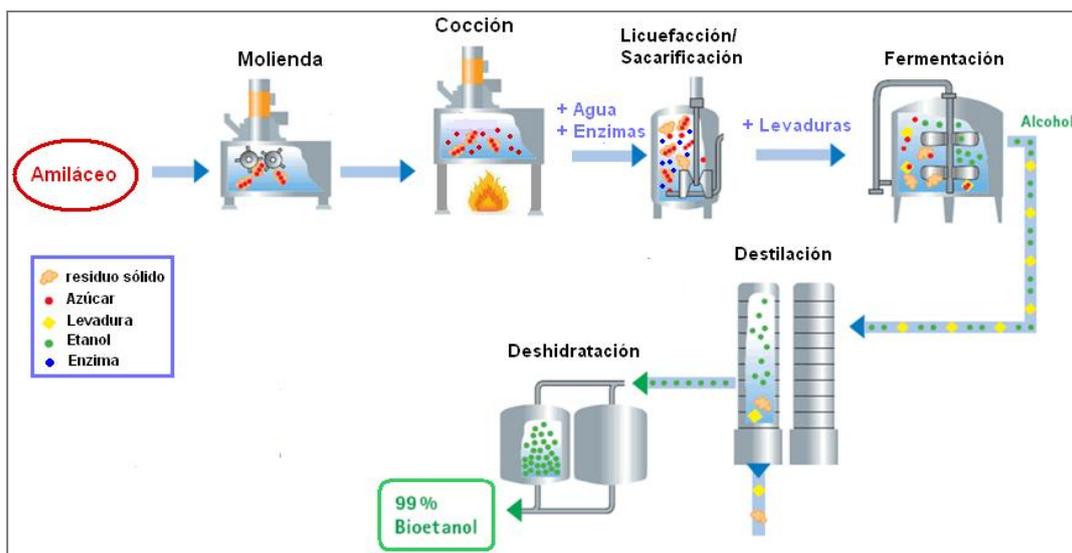


Figura 4. Modelo de producción de bioetanol a partir de amiláceos, adaptado de Rocamora (http://www.xtec.cat/~jescoda1/SergiRocamora/1024x768/bio_1.htm, 2009-2010).

La producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico es el más complejo de los procesos. La biomasa lignocelulósica no sólo tiene sus azúcares formando polímeros como la celulosa y hemicelulosa, sino que también contiene lignina, un polímero complejo de origen aromático entrelazado con la celulosa y hemicelulosa (Malherbe y Cloete, 2002). Por lo tanto, es necesaria una etapa de pretratamiento para hidrolizar la hemicelulosa, así como para remover la lignina y dejar la superficie celulósica expuesta al ataque enzimático. En estas etapas de pretratamiento, existe una gran variedad de opciones, desde tratamientos químicos, físicos, fisicoquímicos o biológicos. Luego, la celulosa es hidrolizada por enzimas específicas a azúcares que serán fermentados a etanol (Mielenz, 2001). La Figura 5 muestra un esquema del proceso.

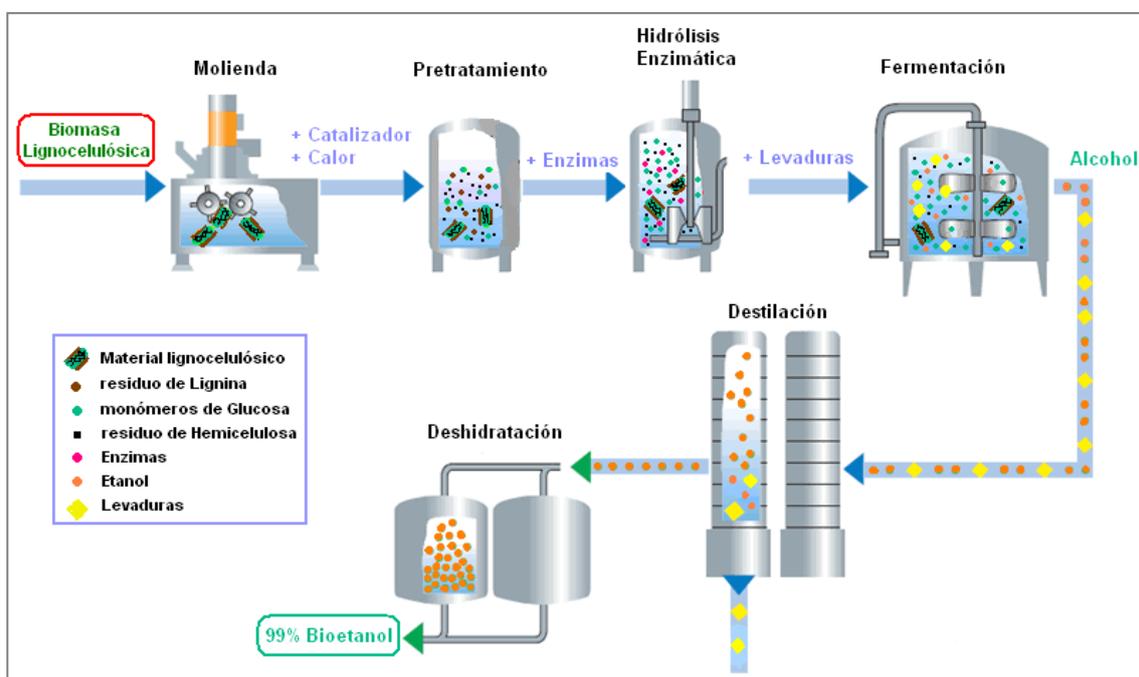


Figura 5. Modelo de producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico, adaptado de Rocamora (http://www.xtec.cat/~jescoda1/SergiRocamora/1024x768/bio_1.htm, 2009-2010).

1.3 Pasto elefante

El pasto elefante o *Pennisetum purpureum* Schum, es una gramínea de origen tropical, ampliamente utilizada como forraje por su gran capacidad fotosintética y por ende, de producir materia seca en cortos períodos de tiempo. Consta este pasto generalmente, de una caña maciza de 1,5 a 2 cm de diámetro, pudiendo alcanzar los 3 metros de altura y sus hojas hasta unos 100 cm de largo, aunque esto varía mucho de acuerdo a las condiciones del suelo y clima (Siri et al., 2007,

www.iica.org.uy/index.php?option=com_docman&task, acceso julio 2012, Anderson et al., 2008).

El pasto elefante, muestra una amplia adaptación a diversidad de suelos, pero su crecimiento es más favorable en aquellos suelos más fértiles y bien irrigados. Su temperatura óptima de crecimiento está entre los 30 y 35 °C. Si bien su follaje se ve afectado por las heladas severas, tiene la capacidad de rebrotar nuevamente en la primavera (Anderson et al., 2008).

Si bien no existe mucha información acerca del desarrollo de esta especie en otros países, Facultad de Agronomía, ha llevado a cabo estudios preliminares sobre el desarrollo de esta gramínea en nuestro país. Se ha visto, que dado su buen desarrollo de su sistema reticular, esta gramínea lleva a cabo una buena exploración del suelo, lo que resulta muy ventajoso en épocas de sequía. También, tiene una buena respuesta al riego suplementario y no necesita de altos niveles de fertilizantes. Estas características, así como su condición de cultivo perenne, sugieren que el pasto elefante tendría un alto potencial de rendimiento en nuestro país (Siri et al., 2007, www.iica.org.uy/index.php?option=com_docman&task, acceso julio 2012).

1.4 Estructura de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es el material más abundante del planeta, ya que es parte estructural del tejido vegetal (Figura 6). Las células vegetales de las plantas verdes fijan la energía recibida por el sol mediante el mecanismo de fotosíntesis, para su conversión en biomasa vegetal, por lo que la biomasa lignocelulósica puede ser vista como una “fuente de energía” (Chang et al., 1981).

La lignocelulosa consta de tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina, y otros componentes minoritarios como pectinas, proteínas, cenizas, sales y minerales pero son los dos primeros los que conciernen para la producción de bioetanol. La proporción de cada uno de ellos depende de las características estructurales de la planta.

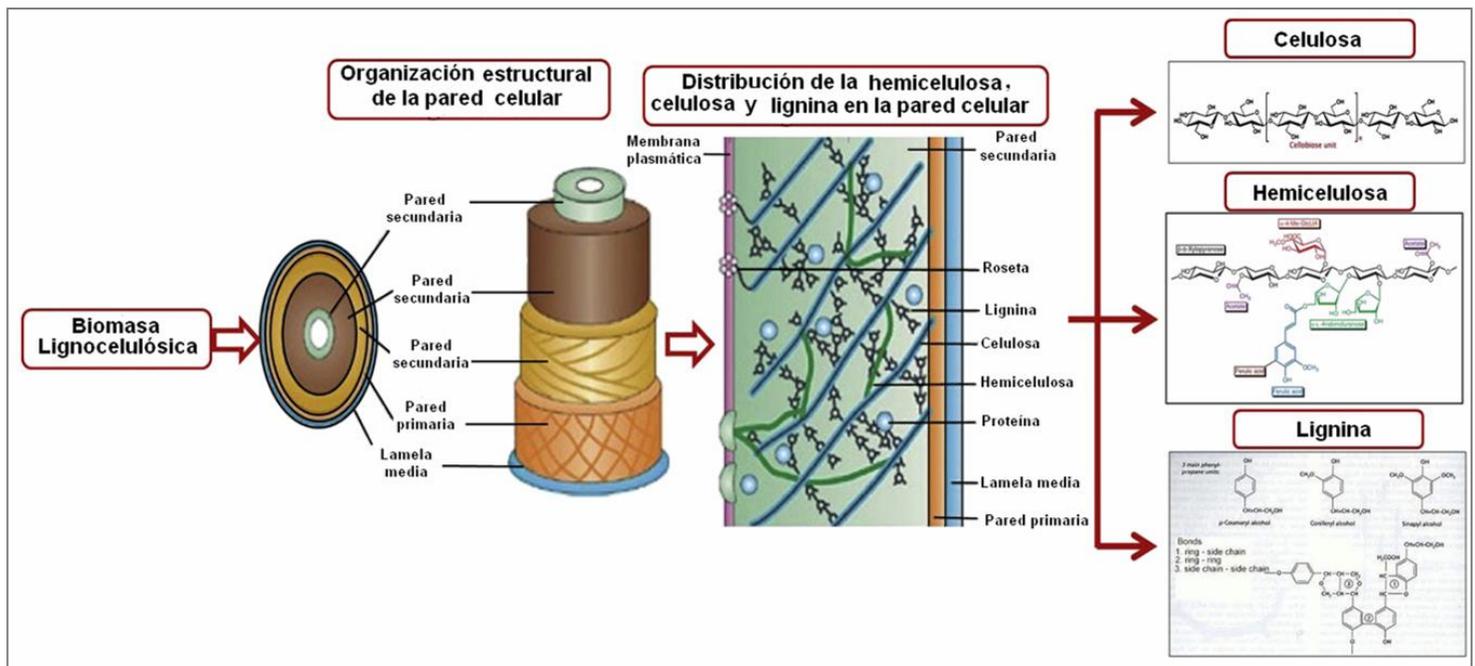


Figura 6. Ilustración diagramática de la estructura lignocelulósica y sus componentes.

Adaptado de -Menon y Rao, 2012-.

En la Tabla 1, se presentan valores aproximados de materiales típicos.

Tabla 1. Composición química típica de distintos materiales lignocelulósicos (Betts et al., 1991)

Materia Prima	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)
Madera dura	18-25	45-55	24-40
Madera blanda	25-35	45-50	25-35
Pastos	10-30	25-40	25-50

Datos expresados en base seca.

1.4.1 Celulosa

La celulosa es un polímero de D-glucopiranosas, unidas por enlaces glucosídicos β -1,4 formando de esta manera largas cadenas. Estas, se asocian mediante fuertes enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals para formar microfibrillas. Esta estructura es de naturaleza cristalina y resistente a la degradación aunque algunas zonas son de naturaleza amorfa y por lo tanto más susceptibles a ser hidrolizadas (Cuervo et al., 2009).

1.4.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos: xilano, manano, galactano y arabinano. El más importante y abundante de estos polisacáridos es el xilano, llegando a constituir hasta un 30-35% en peso seco de la pared celular vegetal, variando según las diferentes especies. El xilano varía su composición en los diferentes tipos de materiales lignocelulósicos. En las maderas blandas (ej: pino y abeto), presenta residuos de β -D-xilopranósido unidos por enlaces glucosídicos β 1-4, sin embargo en las maderas duras (ej: álamo y sauce), se presenta como 0-acetil-4-0-metilglucuronoxilano con altos niveles de acetilación. Este polisacárido se entrelaza con la celulosa interactuando mediante enlaces de hidrógeno y también con la lignina mediante enlaces covalentes (Van Dyk y Pletschke, 2012).

1.4.3 Lignina

La lignina tiene un rol importante en la planta, le da rigidez, permite el transporte de agua y de nutrientes y le brinda protección frente al ataque microbiano. La lignina es un heteropolímero amorfo formado por alcoholes aromáticos: p-cumarílico, p-coniferrílico y sinapílico. Durante la polimerización de la lignina, estos alcoholes se asocian sin un orden específico mediante diversos enlaces tipo β , formando una estructura amorfa, tridimensional (Buranov y Mazza, 2008).

1.5 Visión general del proceso producción de bioetanol lignocelulósico

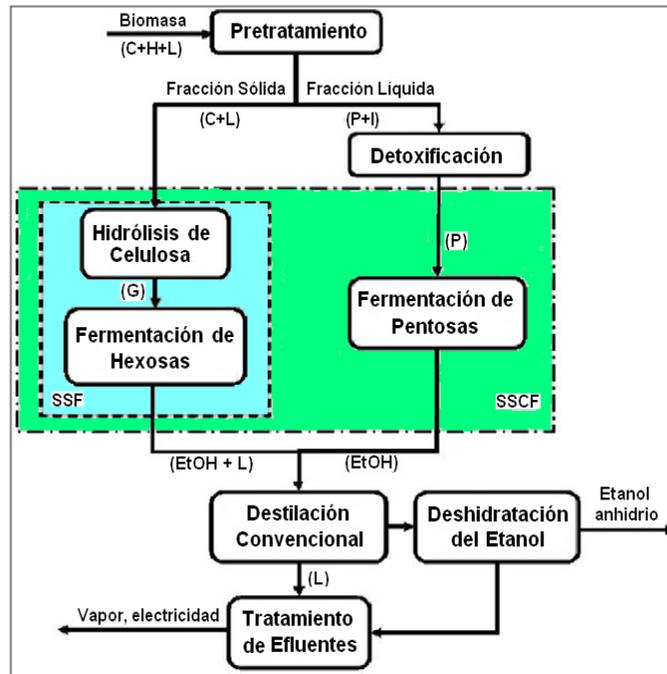
Si bien la biomasa lignocelulósica es muy rica en azúcares fermentables, éstos se encuentran formando la celulosa, atrapados en una red de interacciones lignina-hemicelulosa-pectinas que la rodean. Por lo tanto, el primer paso en el proceso global de obtención del etanol, es la liberación de estos azúcares, mediante un pretratamiento. Este es el paso más importante y limitante del proceso global. Los siguientes pasos involucran la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa para obtener azúcares fermentables, y la posterior fermentación de los mismos a etanol (Joshi et al., 2011).

La hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa a sus correspondientes monómeros puede ser llevada a cabo mediante la adición de catalizadores químicos (hidrólisis química) o mediante la adición de enzimas (hidrólisis enzimática). Las hexosas obtenidas en la hidrólisis pueden ser fácilmente fermentadas a etanol, ya que existe un amplio "pool" de microorganismos capaces de hacerlo, en cambio, las pentosas

obtenidas en la hidrólisis de la hemicelulosa, sólo pueden ser fermentadas a etanol por pocas especies microbianas (Hendriks y Zeeman, 2009).

El último paso en el proceso de producción de etanol, es la separación y purificación del mismo a partir del caldo de cultivo. Para ello se recurre a las técnicas de rectificación, destilación y deshidratación.

Figura 7. Diagrama general de la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. Procesos en recuadros: SSF (Fermentación con hidrólisis simultánea), SSCF (Hidrólisis y co-fermentación simultáneas). Componentes principales de cada proceso: C- celulosa; H-hemicelulosa; L- lignina; G-glucosa; P-pentosa; I- inhibidores; EtOH-etanol. Adaptado de (Balat , 2011).



1.6 Pretratamientos

El pretratamiento es una etapa fundamental en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. Su objetivo, es el de separar la lignina y hemicelulosa de la celulosa, reducir la cristalinidad y aumentar la porosidad de esta última. De esta manera, la celulosa queda más expuesta a la acción de las enzimas hidrolíticas, aumentando por lo tanto, la eficiencia de esta etapa posterior.

El primer paso, suele siempre ser la molienda o trituración de la biomasa para lograr partículas más pequeñas, facilitando la accesibilidad para los tratamientos posteriores. A continuación, suele llevarse a cabo un pretratamiento físico y/o químico, tales como: tratamiento con ácido diluído, alcalino, extracción por solventes, explosión por vapor, etc., liberando la hemicelulosa y lignina y rompiendo parcialmente la estructura celulósica. De aquí, se obtiene una fracción líquida rica en pentosas, derivadas de la hemicelulosa, y una fracción sólida compuesta principalmente de celulosa y lignina.

¿Cómo se elige un pretratamiento adecuado para determinada materia prima?

Un pretratamiento eficiente, debe aumentar la formación de azúcares y/o su exposición a la hidrólisis enzimática, evitar la degradación o pérdida de carbohidratos, evitar la formación de subproductos tóxicos o inhibitorios para las etapas siguientes y ser rentable (Sun y Cheng, 2002). Por lo tanto, para la elección del pretratamiento se deberá tener en cuenta la naturaleza de cada materia prima y la evaluación de su impacto económico y ambiental. A pesar de que se han propuesto muchos pretratamientos, es difícil encontrar uno que cumpla con todas las expectativas, ya que cada uno tiene sus ventajas y desventajas intrínsecas.

En la Tabla 2, se exponen alguno de los pretratamientos más prometedores existentes en el mercado de los biocombustibles.

Tabla 2. Tecnologías de pretratamientos más prometedoras. Adaptado de, (Menon y Rao, 2012).

Método de pretratamiento	Rendimiento en azúcares	Formación de Inhibidores	Generación de subproductos	Reutilización de reactivos químicos	Aplicabilidad a diferentes materias primas	Costo de equipamiento	Prueba a escala piloto	Ventajas	Limitaciones y desventajas
<i>Mecánico</i>	B	---	No	No	Sí	A	Sí	Reduce la cristalinidad de la celulosa	Mayor consumo energético que la energía inherente a la biomasa
<i>Ácidos minerales</i>	A	A	A	Sí	Sí	A	Sí	Hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, alteración de la estructura de la lignina	Peligroso, tóxico y corrosivo
<i>Alcalino</i>	A	B	A	Sí	Sí	---	Sí	Remoción de la hemicelulosa y lignina, aumenta el área superficial accesible	Largo tiempo de residencia, las sales formadas no son recuperables.
<i>Agua caliente</i>	A	A	B	No	---	---	Sí	Remoción de la hemicelulosa, aumento de la accesibilidad enzimática a la celulosa	Largo tiempo de residencia, menor remoción de lignina
<i>Solventes orgánicos</i>	A	A	A	Sí	Sí	A	Sí	Hidroliza hemicelulosa y lignina.	Los solventes deben ser drenados, evaporados, condensados y reutilizados.
<i>Oxidación húmeda</i>	A o B	---	B	No	---	A	---	Eliminación de la lignina, disolución de la hemicelulosa y decristalinización de la celulosa.	---
<i>Ozonólisis</i>	A	B	A	No	---	A	No	Reduce el contenido en lignina, no genera residuos tóxicos.	Se necesitan grandes cantidades de ozono.
<i>Explosión por CO₂</i>	A	B	B	No	---	A	---	Eliminación de la hemicelulosa, decristalinización de la celulosa, rentable.	No modifica la lignina.
<i>Explosión por vapor</i>	A	A	B	---	Sí	A	Sí	Eliminación de la hemicelulosa y modificación en la estructura de la lignina.	Destrucción incompleta de la matriz lignina-carbohidratos.
<i>AFEX (Explosión de Fibra por amoníaco)</i>	A	B	---	Sí	---	A	---	Eliminación de la hemicelulosa y lignina.	Poco eficiente para biomasa con alto contenido en lignina.
<i>Solventes iónicos</i>	A/B	B	---	Sí	Sí	---	---	Disolución de la celulosa, mayor accesibilidad a las celulasas.	Aún en las etapas iniciales.

A: - Alto y B: - Bajo.

1.6.1 Pretratamientos Físicos

Pretratamiento mecánico: Su objetivo es la disminución en el tamaño de partícula y cristalinidad de la biomasa. Esto lleva a un aumento del área superficial disponible y una disminución del grado de polimerización (Palmowski y Muller, 1999). Estos factores aumentan el rendimiento total de la hidrólisis (dependiendo del tipo de biomasa y el tipo y duración del triturado), hasta en un 25%, y reducen el tiempo de digestión en un rango de 23-59%, permitiendo de esta manera un aumento en la velocidad de hidrólisis (Hendriks y Zeeman, 2009).

Pretratamiento térmico: Entre los pretratamientos térmicos más utilizados se encuentran el tratamiento con agua caliente y explosión por vapor. En este último la biomasa se cocina con vapor a altas temperaturas (superiores a los 240 °C) y presión durante pocos minutos. Luego de pasado los minutos de cocción el vapor es liberado, y el medio con la biomasa es enfriado rápidamente. En el tratamiento de agua caliente, se utiliza el mismo mecanismo pero con la utilización de agua caliente en vez de vapor. En ambos casos, se llega a la solubilización de la hemicelulosa y solubilización parcial de la lignina (Hendriks y Zeeman, 2009).

1.6.2 Pretratamientos Químicos

Hidrólisis ácida: La hidrólisis ácida diluida ha sido ampliamente usada en la industria de la producción de biocombustibles. Los ácidos comúnmente usados son el ácido clorhídrico (HCl), fosfórico (H_3PO_4), nítrico (HNO_3) y sulfúrico (H_2SO_4), siendo este último el de más amplio uso. Las condiciones de concentración y temperatura son variables, el rango de concentraciones utilizadas varía de 0,7-3% y la temperatura varía en un rango de 120-220°C (Ghosh y Prelas, 2011; Menon y Rao, 2012). De este proceso, se obtiene una fracción líquida, rica en pentosas y una fracción sólida compuesta principalmente de celulosa y lignina. El pretratamiento ácido, es eficiente en la solubilización de la hemicelulosa, en especial el xilano, puesto que el glucomanano es resistente al ácido (Hendriks y Zeeman, 2009). Sin embargo, este método, no resulta del todo efectivo para la eliminación de la lignina.

Hidrólisis alcalina: El pretratamiento alcalino es capaz de separar tanto la hemicelulosa como la lignina, sin tener grandes efectos sobre los demás componentes. Los reactivos más utilizados son la soda (NaOH), amoníaco (NH_3) y cal (CaO , $Ca(OH)_2$), y a diferencia de los pretratamientos ácidos, no necesitan temperaturas tan altas, aunque si por lo general, necesitan tiempos más prolongados de reacción. Los pretratamientos con NaOH, logran que la biomasa se hinche,

llevando a un aumento del área superficial, una disminución del grado de cristalinidad y una disrupción en la estructura de la lignina. Sin embargo, este pretratamiento tiene como desventaja, que algunas bases se convierten a sus sales no pudiendo recuperarlas y algunas de estas sales pueden quedar incorporadas en la biomasa en el proceso del pretratamiento (Balat et al., 2008).

Solventes orgánicos: El pretratamiento con solventes orgánicos es efectivo en la eliminación de la lignina, pero no tanto para la eliminación de la hemicelulosa pudiendo aumentar su rendimiento cuando se los combina con catalizadores ácidos. Los solventes más utilizados son el metanol, etanol, etilenglicol, trietilenglicol y acetona. Si bien este método tiene la ventaja de que los solventes se pueden recuperar luego del pretratamiento por métodos tales como la destilación, se necesita grandes cantidades de estos así como de equipos capaces de alcanzar altas temperatura (160-190°C) (Cuervo et al., 2009; Joshi et al., 2011).

Ozonólisis: Es un método muy efectivo para la remoción de lignina pero no así de la hemicelulosa. Las reacciones se llevan a cabo a temperatura y presión ambiente sin la producción de tóxicos indeseables. Sin embargo se necesitan grandes cantidades de ozono para llevarlo a cabo lo que lo convierte en un pretratamiento caro (Sun y Cheng, 2002).

Oxidación húmeda: Es un método efectivo en aumentar la digestibilidad enzimática de la celulosa y en eliminar la lignina. Sin embargo, es bastante inespecífico, por lo que durante el pretratamiento se degradan muchos azúcares, sobre todo de la hemicelulosa. El método consiste en la adición de agentes oxidantes tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido peracético (CH_3CO_3H), a la biomasa suspendida en agua. Este pretratamiento no requiere de altas temperaturas pero si de largos tiempos de reacción (18-24 horas) (Hendriks y Zeeman, 2009).

1.6.3 Pretratamientos Físico-Químicos

Explosión por CO_2 : Su metodología es igual a la del pretratamiento de explosión por vapor, pero con la adición de dióxido de carbono (CO_2). El CO_2 formaría ácido carbónico aumentando la velocidad de hidrólisis. En la práctica, este pretratamiento no ha ofrecido mejores rendimientos que otros similares; sin embargo, tiene la ventaja de que no forma compuestos inhibitorios como en el caso de la explosión por vapor (Sun y Cheng, 2002).

Explosión de fibra por amoníaco (AFEX): Este pretratamiento funciona igual que la explosión por vapor, con la diferencia que la biomasa es remojada en amoníaco. Es un método efectivo en la remoción de la hemicelulosa, modifica la estructura de la lignina y aumenta la digestibilidad enzimática de la celulosa. Resulta mejor para aquellas materias primas de origen herbáceo que para maderas duras y blandas (Ghosh y Prelas, 2011).

1.6.4 Pretratamiento Biológico

El pretratamiento de la biomasa con microorganismos se muestra como una técnica prometedora, ya que cuenta con varias ventajas: no necesita de reactivos químicos que comprometan el medio ambiente, bajo costo energético, y en general sus mecanismos así como sus condiciones de trabajo son amigables al medio ambiente. Los microorganismos más utilizados son los hongos, que según su mecanismo de degradación de la biomasa leñosa se pueden identificar como, hongos de pudrición blanca, parda o blanda. Los dos últimos tienen comprobada acción celulolítica; sin embargo, solo los hongos de pudrición blanca tienen capacidad de degradar la lignina. El pretratamiento biológico también se extiende al reino procariota, pero la degradación bacteriana de la lignocelulosa es un proceso lento, ya que carecen de enzimas potentes en la degradación de la lignocelulosa. Los pretratamientos biológicos son lentos, y requieren de un riguroso control del crecimiento micobiano, además, muchos de los microorganismos ligninolíticos consumen parte de la celulosa y hemicelulosa por lo que aún este tipo de pretratamiento no resulta comercialmente atractivo (Malherbe y Cloete, 2002; Menon y Rao, 2012).

1.7 Hidrólisis enzimática

Durante la Segunda Guerra Mundial, un hongo se encargó de romper carpas y prendas de algodón. Este hongo, identificado como *Trichoderma reesei*, produce enzimas celulolíticas o celulasas, capaces de hidrolizar la celulosa (Hamelink et al., 2005). Pero la producción de estas enzimas no es exclusiva de este hongo, existen otros hongos- pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* capaces de producir celulasas, así como también algunas bacterias pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermonospora*, *Streptomyces* entre otras (Sun y Cheng, 2002).

Las celulasas se pueden clasificar en tres grandes grupos de acuerdo a su actividad catalítica: (1) endoglucanasas o 1,4-β-D-glucano-4-glucanohidrolasas, (2) exoglucanasas (1,4-β-D-glucanohidrolasas y 1,4-β-D-glucano celobiohidrolasas) y (3) β-glucosidasas o β-glucósido glucohidrolasas. Las endoglucanasas, cortan enlaces en las regiones amorfas internas de la cadena del polisacárido generando oligosacáridos de variados tamaños. Las exoglucanasas trabajan de manera procesiva hidrolizando desde los extremos de las cadenas de celulosa liberando ya sea glucosa (por las glucanohidrolasas) o celobiosa (por las celobiohidrolasas). Las β-glucosidasas hidrolizan oligosacáridos y celobiosa a glucosa (Lynd et al., 2002)

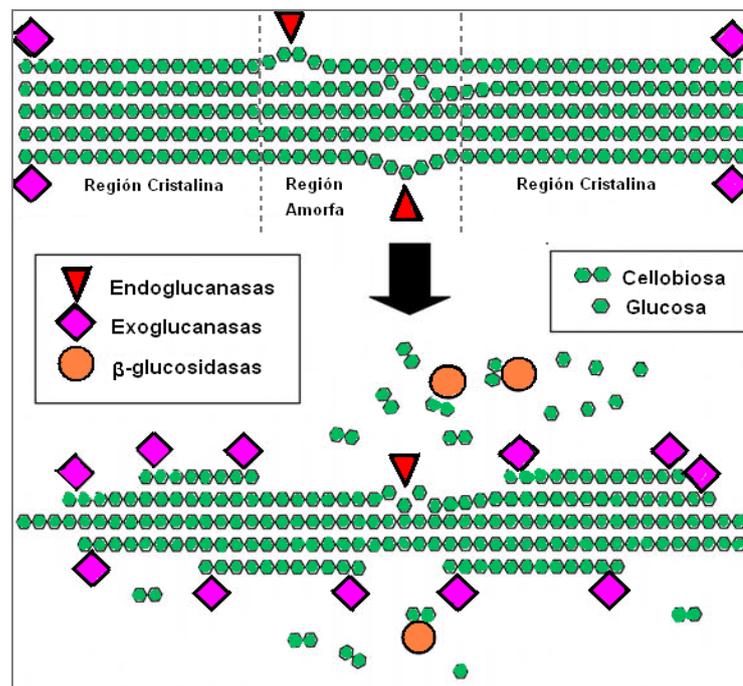


Figura 8. Representación esquemática de la hidrólisis enzimática de la celulosa.
Adaptado de -Malherbe y Cloete, 2002-.

Desde el punto de vista estructural, las celulasas, están formadas por un módulo catalítico y un módulo de unión, el cual se conoce comúnmente por su sigla en inglés CBM (Carbohydrate Binding Module). El CBM está asociado a varias funciones importantes, entre ellas: encontrar al sustrato blanco, agrupar a las enzimas sobre éste y mantener su selectividad. Este módulo se adhiere a sitios específicos en la celulosa mediante interacciones no covalentes, ayudando a que el módulo catalítico se posicione para llevar a cabo la hidrólisis (Arantes et al., 2010).

La hidrólisis enzimática de la celulosa, a diferencia de las hidrólisis químicas, es muy específica hacia su sustrato y puede llegar a tener muy altos porcentajes de

conversión a celulosa. Sin embargo se enfrenta a algunas limitaciones, una de ellas es la naturaleza cristalina de la celulosa, la cual dificulta el acceso de las enzimas. Por esta razón, es conveniente realizar previo a la hidrólisis enzimática, algún tipo de pretratamiento químico o físico-químico para eliminar la lignina y modificar la estructura de la celulosa. También, las enzimas, pueden llevar a cabo interacciones inespecíficas con la lignina, lo que disminuye considerablemente su actividad. Existen técnicas, como la utilización de surfactantes, que disminuyen estas interacciones inespecíficas aumentando el rendimiento enzimático. Otro factor limitante del rendimiento es la inhibición por producto de la reacción enzimática, este problema puede ser superado utilizando técnicas de fermentación simultánea (Van Dyk y Pletschke, 2012; Huang et al., 2011; Zheng et al., 2008).

Las enzimas, tienen un alto costo, por lo que aún queda mucho por investigar en el aumento de sus rendimientos así como en mecanismos de recuperación de enzimas, entre otros (Joshi et al., 2011; Menon y Rao, 2012).

1.8 Surfactantes

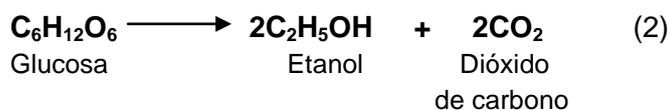
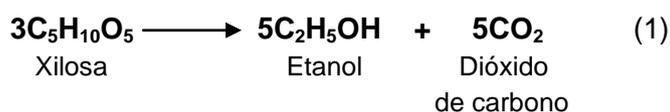
Los agentes activos superficiales o surfactantes son moléculas que contienen una porción liposoluble y otra hidrosoluble, lo que les permite permanecer en la interfase de entre una solución acuosa y otra no acuosa. Mucho se ha estudiado sobre estas sustancias, sobre todo las de origen no iónico, por sus efectos positivos en la hidrólisis enzimática. Los surfactantes más utilizados son el polisorbato 20 y 80 (Tween 20 o 80), polietilenglicol (PEG) de 2000, 4000 y 6000 Da, Berol 08 y algunas proteínas tales como la seroalbúmina bovina (BSA) (Huang et al., 2011).

Se presume que los surfactantes pueden actuar de variadas formas, pudiéndoselas clasificar en tres categorías: (1) estabilización de la enzima reduciendo las fuerzas de corte térmicas o mecánicas; (2) modificando la ultraestructura del sustrato y por lo tanto aumentando la accesibilidad de las enzimas a la celulosa; (3) modificando la interacción enzima-sustrato impidiendo la adsorción inespecífica de las enzimas (Zheng et al., 2008). Este último es el mecanismo más aceptado, y según Kristensen et al._(2007). La gran ventaja entonces de la utilización de surfactantes, es que estos disminuirían los costos de la hidrólisis enzimática, al conseguir mejores rendimientos utilizando menor cantidad de enzima.

1.9 Fermentaciones

1.9.1 Microorganismos fermentadores

El microorganismo más ampliamente usado históricamente para fermentaciones, ya sea a escalas grandes o pequeñas, es por excelencia la levadura *Sacharomyces cerevisiae*. Esta no sólo es de gran importancia en la industria de los biocombustibles si no también en la industria alimenticia, en donde es más antiguo su uso, ya sea en la panificación, elaboración de vinos, cervezas, entre otros. Sin embargo, existe una amplia variedad de microorganismos desde bacterias, levaduras u hongos, que tienen la capacidad de fermentar azúcares a etanol. Esta se lleva a cabo bajo condiciones anaerobias, con la finalidad de crecer y obtener energía. De acuerdo a las reacciones (1) y (2) el rendimiento teórico máximo es de 0,51 kg de etanol y 0,49 kg de CO₂ por kg de azúcar simple (hexosa o pentosa) (Hamelink et al., 2005).



Un microorganismo fermentador ideal debe proporcionar altos rendimientos en etanol, tener una alta productividad y tolerar altas concentraciones de etanol. También es deseable que el microorganismo pueda tolerar los inhibidores generados durante las distintas etapas, tolere altas temperaturas y que tenga la capacidad de fermentar otros azúcares a parte de la glucosa (Olofsson et al., 2008). En la Tabla 3, se presentan algunos microorganismos fermentadores.

Tabla 3. Algunos microorganismos fermentadores y sus características.

Especie	Azúcar utilizado	Producción de Etanol	Tolerancia al Etanol	Resistencia a inhibidores	Temperatura	Fuente
Levaduras						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hexosas	Más de 160 g/L	Muy alta	Alta	Hasta 37 °C	Xu et al, 2009
<i>Pichia stipitis</i>	Hexosas y Pentosas	≈ 12 g/L	Baja	Baja	RM	Dellweg et al, 1984; Banat et al.1998.
Bacterias						
<i>Zimomonas mobilis</i>	Hexosas	Más de 130 g/L	Alta	Alta	RM	Xu et al, 2009; Balat et al., 2008.
<i>Lactobacillus brevis</i>	Hexosas y Pentosas	≈ 17 g/L	Alta	Alta	RM	Kim et al, 2010; Gobbetti et al, 1995.
Hongos						
<i>Trichoderma reesei</i>	Hexosas y Pentosas	Lento y bajo rendimiento	Baja	Muy alta	RM	Xu et al, 2009
<i>Mucor indicus</i>	Hexosas y Pentosas	≈ 17 g/L	Baja	Baja	≈ 37 °C	Karimi et al, 2006; Sues et al, 2005.

RM=Rango Mesofílico

A pesar de los esfuerzos dedicados a la identificación de nuevos microorganismos, así como a la modificación genética de microorganismos conocidos con el fin de obtener uno que cumpla las características antes mencionadas, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a pesar de no fermentar la xilosa, sigue siendo el microorganismo preferido. Esta levadura es un microorganismo robusto con gran tolerancia frente a altas concentraciones de etanol, así como a la presencia de inhibidores, y lo más importante, tiene altos rendimientos en la producción de etanol (Olofsson et al., 2008).

1.9.2 Tipos de fermentación

Para aumentar el rendimiento en la obtención de etanol es común utilizar procesos integrados de hidrólisis y fermentación. Mediante la utilización de estos métodos se busca minimizar la inhibición por producto generada en la hidrólisis, eliminar algunos pasos del proceso global, reducir costos y aumentar los rendimientos de etanol. Para todos los métodos integrados que se han estudiado, sigue siendo necesario un pretratamiento previo para aumentar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa e hidrolizar la hemicelulosa (Ghosh y Prelas, 2011). En la Figura 9 se

presenta un esquema de las diferentes estrategias utilizadas para la conversión de biomasa lignocelulósica a etanol.

Hidrólisis y fermentación en secuencia: Comúnmente referido como SHF (Separate or Sequential Hydrolysis and Fermentation), es la metodología de más antigua utilización. En este caso, los productos del pretratamiento son sometidos a una hidrólisis enzimática y el producto de esta, pasa a un fermentador en donde se convierte la glucosa a etanol. Esta mezcla es destilada para separar el etanol dejando en el licor la xilosa que no pudo ser convertida a etanol. La xilosa, puede ser fermentada a etanol en un segundo reactor, ya sea luego de la utilización de las hexosas en un primer fermentador, o en un fermentador en simultáneo al de las hexosas para aquellos pretratamientos que separan la hemicelulosa (Hamelink et al., 2005; Ghosh y Prelas., 2011).

Hidrólisis y fermentación simultáneas (SSF): Del inglés: “Simultaneous Saccharification and Fermentation”, consiste en la consolidación de la hidrólisis enzimática y la fermentación en un solo paso. Este método ha resultado ser uno de los más eficientes en la obtención de etanol puesto que tiene varias ventajas. Entre ellas se pueden destacar la disminución de la inhibición por producto de las enzimas, del número de reactores utilizados, y de la pérdida de glucosa adherida a la fracción rica en lignina. Sin embargo, también tiene sus limitaciones, siendo la más frecuente de ellas el problema en la elección de la temperatura de trabajo. La temperatura óptima para la hidrólisis enzimática es generalmente más elevada que la utilizada en las fermentaciones, sobre todo cuando se trabaja con levaduras. Por lo tanto, en un proceso en simultáneo, se debe elegir una temperatura intermedia, que sea tolerable para el microorganismo y en la cual éste, así como las enzimas pueda tener un buen desempeño. Lógicamente esto resulta una tarea difícil (Hamelink et al., 2005; Olofsson et al., 2008).

Hidrólisis y co-fermentación simultáneas (SSCF): Del inglés: “Simultaneous Saccharification and Co-fermentation”. En este proceso, la materia prima pretratada, la cual consiste de un hidrolizado hemicelulósico y un residuo sólido rico en celulosa y lignina, son tratados en simultáneo. En este proceso las pentosas provenientes de la hemicelulosa son fermentadas, al mismo tiempo en que se llevan a cabo la hidrólisis de la celulosa y fermentación de las hexosas obtenidas a etanol. El desafío más grande que enfrenta la SSCF, es el de encontrar un microorganismo que pueda

fermentar tanto las pentosas como las hexosas con la misma eficiencia. A su vez, es deseable que este microorganismo tenga buena tolerancia a los inhibidores producidos durante el pretratamiento, en que se hidroliza la hemicelulosa, tales como furfurales, compuestos aromáticos y ácido acético. Si bien algunos investigadores han propuesto algunos microorganismos genéticamente modificados para llevar a cabo este proceso, aún queda mucho por investigar (Decker et al., 2007; Ghosh y Prelas, 2011).

Bioproceso consolidado: Comúnmente se conoce por su sigla en inglés, CBP (Consolidated Bioprocessing). Consiste en la producción de enzimas, hidrólisis del sustrato y fermentación, todo en un solo paso y en el mismo reactor. Este proceso es llevado a cabo por un único microorganismo o por un consorcio de ellos y si bien aún queda mucho por investigar, tiene el gran atractivo de su bajo costo de producción ya que se simplifica mucho el procesamiento del material lignocelulósico, bajo costo energético y rendimientos eficientes (Joshi et al., 2011; Xu et al., 2009).

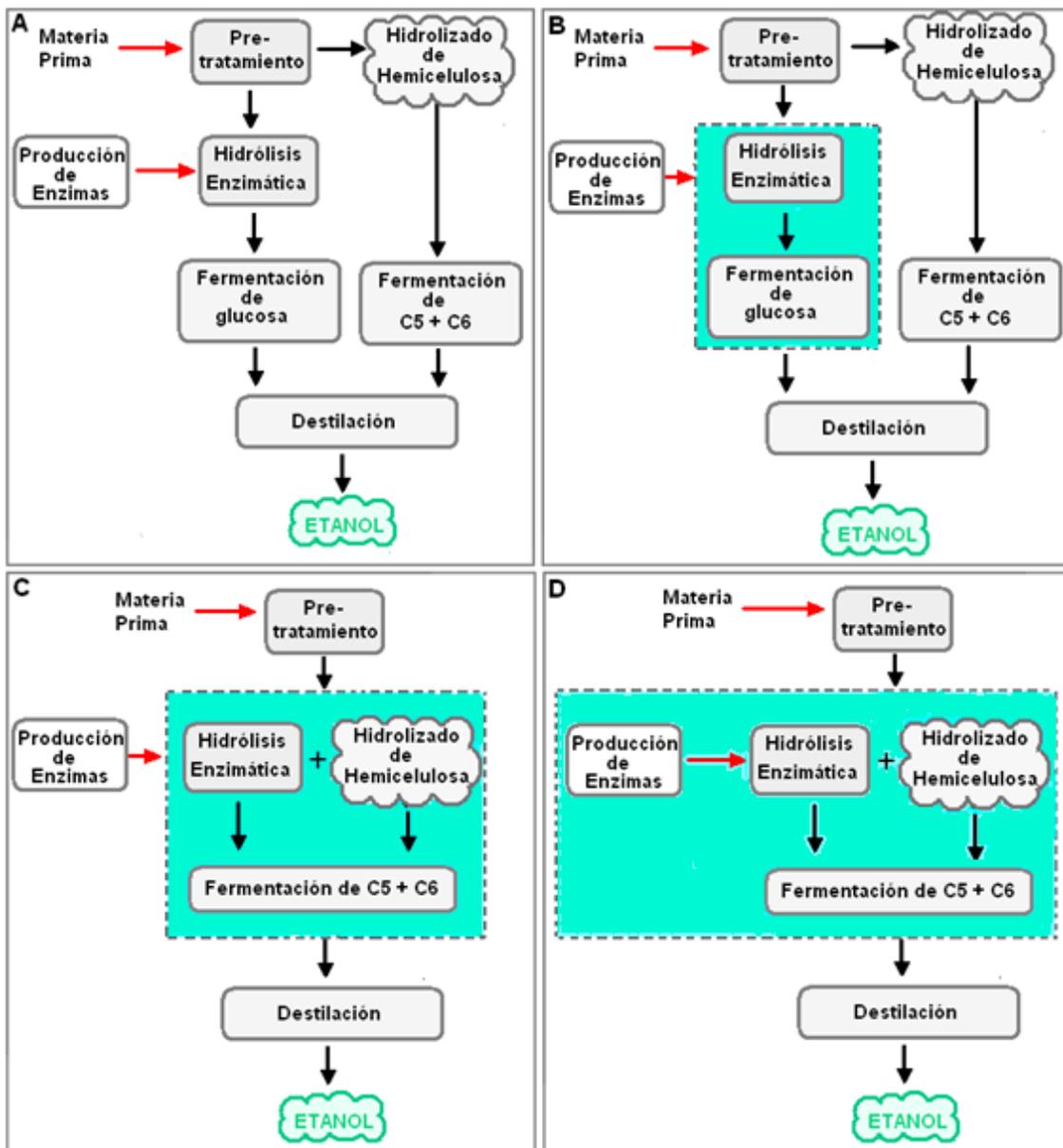


Figura 9. Estrategias utilizadas para la conversión de la lignocelulosa a etanol. A: SHF, B: SSF, C: SSCF y D: CBP.

En este trabajo se propone evaluar la potencialidad de un material lignocelulósico, promisorio desde el punto de vista agronómico y de origen experimental para la producción de bioetanol combustible. A tales efectos, se estudió su respuesta frente a un proceso de conversión que incluye etapas que prevén la producción de etanol, tanto a partir de los azúcares derivados de la hemicelulosa (C5 + C6) como de la celulosa (glucosa).

Se pone foco en el proceso experimental, que permite el pretratamiento de la celulosa para favorecer su hidrólisis enzimática a monómeros de glucosa, los cuales son utilizados por *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica. La utilización de los azúcares provenientes del hidrolizado hemicelulósico, formaron parte de la tesina de grado de otra estudiante del Departamento de Bioingeniería del Instituto de Ingeniería Química de Facultad de Ingeniería (Ramírez, 2011). En la Figura 10, se presenta un esquema del proceso de conversión a etanol llevado a cabo, recuadrándose las etapas que fueron objeto de esta tesina.

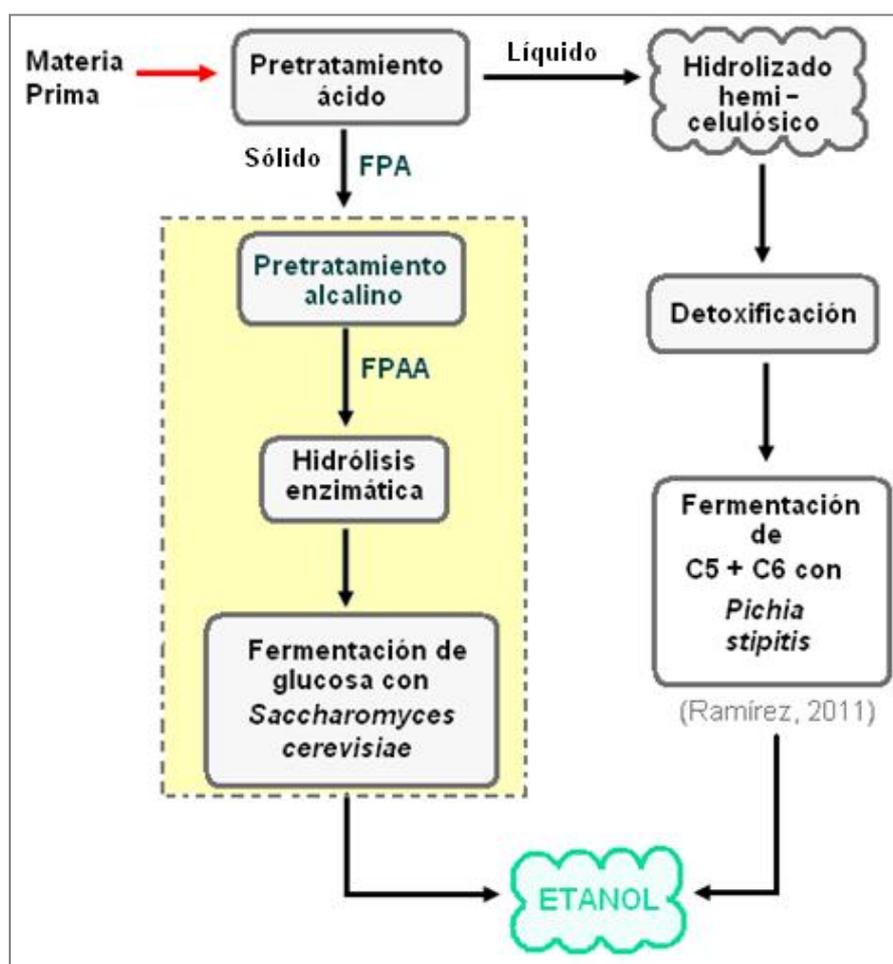


Figura 10. Esquema de las principales actividades experimentales llevadas a cabo a lo largo de este trabajo, donde FPA refiere al residuo sólido proveniente de la hidrólisis ácida y FPAA el residuo sólido proveniente de la hidrólisis alcalina.

2.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento de la fracción celulósica de la gramínea *Pennisetum purpureum schum* (pasto elefante) frente a la hidrólisis enzimática y fermentación a etanol.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la gramínea *Pennisetum purpureum Schum* (pasto elefante), cultivada en nuestro país, para la evaluación de su potencialidad para la producción de bioetanol.
- Evaluar el proceso de hidrólisis enzimática (sacarificación) de la fracción celulósica de pasto elefante a distintas condiciones de temperatura y relación sólido/líquido.
- Evaluar la utilización de un pretratamiento adicional (alcalino), de la fracción celulósica del pasto elefante, a modo de remover una mayor fracción de lignina y mejorar la hidrólisis enzimática de la celulosa.
- Evaluar el comportamiento de la hidrólisis enzimática de la celulosa frente a la adición de aditivos surfactantes.
- Evaluar la fermentabilidad del hidrolizado celulósico utilizando la levadura de panificación, *Saccharomyces cerevisiae*, así como también el proceso de sacarificación y fermentación simultáneos de la fracción celulósica del pasto elefante.



Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1 Materia Prima

Se utilizó la gramínea *Pennisetum purpureum Schum* (pasto elefante), cedida por el Departamento de Producción Vegetal, EEMAC, Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, cultivada en INIA Glencoe, Paysandú, Uruguay.

El pasto fue suministrado secado a 60 °C y molido.

3.2 Pretratamientos

3.2.1 Hidrólisis ácida diluida

La hidrólisis con ácido diluido fue puesta a punto y llevada a cabo por la tesina de grado de (Ramirez, 2011). Las condiciones seleccionadas en este trabajo fueron aquellas que brindaron los mejores rendimientos en hidrólisis de hemicelulosa, correspondiente a una concentración de ácido de 1.5% (p/p) y 60 minutos de reacción, estableciéndose la concentración de sólidos en 10% (p/p).

Este residuo sólido obtenido luego del pretratamiento ácido, será referido de aquí en más como FPA (Fracción pretratada con ácido) (Figura 10).

3.2.2 Pretatamiento alcalino

Este pretatamiento se llevó a cabo únicamente sobre el residuo FPA, el cual fue previamente secado en estufa a 60 °C, a modo de obtener un mayor grado de deslignificación y mejorar la digestibilidad enzimática de la celulosa.

El residuo sólido fue tratado con NaOH en una concentración de 2% (p/v) y una relación sólido líquido de 1:6. La suspensión fue llevada a baño de agua a 80 °C durante 6 horas. Pasado este tiempo de reacción, se centrifugó a 3900 rpm durante 10 min, eliminándose el sobrenadante. Posteriormente, se lavó el residuo sólido con agua destilada hasta llevar al mismo a un pH próximo a la neutralidad. Por último se secó el residuo sólido en estufa a 60 °C hasta peso constante.

El residuo sólido seco, obtenido a partir de este pretratamiento, será referido de aquí en adelante como FPAA (fracción con pretratamiento ácido y alcalino) (Figura 10).

3.3 Hidrólisis enzimática

3.3.1 Estudio del uso de β -glucosidasa sobre la hidrólisis enzimática con celulasas

La hidrólisis enzimática del pasto elefante pretratado con ácido diluido se llevó a cabo tomando como referencia el protocolo de NREL “Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass” (Selig et al., 2008) realizando las siguientes modificaciones: se suspendió 0.5 g de pasto pretratado en ácido diluido, seco, en 10 mL de solución tamponada a pH 4.8. Posteriormente se agregó a cada muestra un volumen adecuado del complejo celulásico y β -glucosidasa hasta alcanzar aproximadamente 25 FPU/g de residuo sólido y 10 CBU/g de residuo sólido respectivamente. La hidrólisis se llevó a cabo en agitación a 50 °C por un período de 130 horas.

Los complejos enzimáticos utilizados fueron, el complejo celulásico Novozymes NS50013 con una actividad original de 69 FPU/mL, y β -glucosidasa Novozymes NS50010, con una actividad original de 250 CBU/mL, actividades proporcionadas por el fabricante y verificadas según el protocolo de NREL “Measurement of Cellulase Activities” (Adney et al., 2008).

3.3.2 Estudio del efecto de la adición de surfactante y de β -glucosidasa en la hidrólisis enzimática

Se utilizaron como surfactantes: Seroalbúmina Bovina (BSA), Tween 80 y Polietilenglicol 6000 (PEG₆₀₀₀). La hidrólisis se realizó en tubos falcon de 30 mL con 15 mL de solución, con una concentración 5% (p/v) de la fracción FPA. Se realizaron los siguientes ensayos: 1) sin β -glucosidasa y sin surfactante, 2) con β -glucosidasa, sin surfactante, 3) con surfactante, sin β -glucosidasa y 4) con surfactante, con β -glucosidasa. Las dosis utilizadas fueron: 0.05 g de surfactante/g de muestra sólida (FPA), 5 FPU/g de residuo FPA seco del complejo celulásico y 10 CBU/g de residuo FPA seco de β -glucosidasa. Las condiciones experimentales fueron: pH 4.8, 50°C y agitación orbital de 100 rpm. Los ensayos se realizaron con buffer citrato 0.05 M para mantener el pH en 4.8. Los ensayos se hicieron por duplicado.

3.3.3 Estudio de la hidrólisis enzimática para distintas concentraciones de sustrato

Se realizaron ensayos de hidrólisis sobre el residuo FPA con concentraciones de sólidos de 5 y 10% (p/v), en las mismas condiciones experimentales que en el ensayo 3.3.2, con el agregado de β -glucosidasa, con y sin el agregado de PEG₆₀₀₀. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

3.3.4 Estudio del efecto de un pretratamiento alcalino adicional sobre la hidrólisis enzimática

Se trabajó con los residuos FPA y FPAA, en las mismas condiciones experimentales de pH, temperatura, agitación orbital y concentración de enzimas que en el ensayo 3.3.2. La concentración de sólidos fue de 10% (p/v). Se realizaron ensayos por duplicado con y sin agregado de PEG₆₀₀₀ (0.05 g de surfactante/g de muestra sólida).

3.3.5 Estudio de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática del residuo FPAA

Se trabajó con el residuo FPAA, en las mismas condiciones experimentales de pH, temperatura, agitación orbital y concentración de enzimas que en el ensayo 3.3.2. La concentración de sólidos fue 10% (p/v). Los ensayos se realizaron por duplicado a 37 y 50°C, con y sin agregado de PEG₆₀₀₀ (0.05 g de surfactante/g de muestra sólida).

3.4 Ensayos de Fermentación

3.4.1 Desarrollo de inóculo

En estos ensayos se trabajó con la levadura de panificación seca, *Saccharomyces cerevisiae*, Fleischmann. El desarrollo del inóculo se realizó mediante la adición de 3 g de levadura a 200 mL de medio de cultivo, en matraces de 500 mL. El medio se preparó utilizando como referencia las proporciones utilizadas por Guigou et al. (2011), considerando una concentración de glucosa similar a la esperada en la materia prima. El medio contenía: 30 g/L de glucosa, 0.9 g/L de extracto de levadura, 0.9 g/L de extracto de malta y 1.5 g/L de peptona y pH 4.8. Se incubó a 37 °C, en un agitador orbital a 150 rpm durante un período de 14 horas.

Se extrajo el volumen adecuado para obtener una concentración inicial en el matraz de fermentación de 1×10^8 células/mL. El mismo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, y se lavó el pellet con 10 mL de agua destilada estéril resuspendiendo en agitador de tubos tipo "vórtex". Posteriormente se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, eliminándose nuevamente el sobrenadante. Por último se agregaron 5 mL del medio de fermentación a cada tubo y se resuspendió en vortex, utilizándose la suspensión obtenida como inóculo para la fermentación.

3.4.2 Ensayos de fermentación

Se evaluó el desempeño de la hidrólisis en simultáneo con la fermentación (SSF). Para ello se trabajó únicamente con la fracción FPAA, puesto que a partir de los ensayos de hidrólisis enzimática, se mostró que dicha fracción fue la de mayor potencial en conversión de celulosa a glucosa.

Los ensayos de SSF se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapa de rosca conteniendo 150 mL de medio. La tapa no se cerró por completo para permitir la salida de CO₂. El medio de fermentación conteniendo 10% (p/v) de sólidos, se suplementó con 0.26 g/L de (NH₄)₂HPO₄, 0.013 g/L de MgSO₄·7H₂O y 0.51 g/L de extracto de levadura. Las condiciones iniciales de fermentación fueron pH 4.8, concentración celular 1x10⁸ células/mL, utilizándose la misma concentración de enzima que en el ensayo 3.3.2 y con el agregado de PEG₆₀₀₀ (0.05 g de surfactante/g de muestra sólida). Se agregaron las enzimas y el inóculo al comienzo de las experiencias. El cultivo se mantuvo en un agitador orbital a 100 rpm a 37°C durante 117 horas.

Se extrajeron 3 mL de muestra a las 0, 3, 8, 23, 32, 48, 72 y 117 horas analizándose el contenido de glucosa, celobiosa, etanol, número de células viables y totales, así como el contenido en ácidos orgánicos en algunas de las tomas.

3.5 Métodos Analíticos

3.5.1 Determinación del tamaño medio de partícula

El pasto seco y molido, fue tamizado con tamices de 0.074 a 2.38 mm. Se recolectó y se pesó con balanza analítica la fracción separada por cada uno de los tamices.

3.5.2 Humedad

Se determinó la humedad del pasto elefante seco y molido, así como de cada una de sus fracciones sólidas post pretratamientos, con ácido diluido y alcalino, respectivamente. Para ello se siguió el protocolo de NREL "Determination of Total Solids in Biomass" (Sluiter, 2005), secando en estufa a 105 °C hasta peso constante.

3.5.3 Cenizas

Las cenizas del pasto elefante y de sus fracciones post pretratamientos fueron determinadas según el protocolo de NREL “Determination of Ash in Biomass” (Sluiter et al., 2005). Las muestras fueron incineradas en mufla a 575 °C hasta peso constante.

3.5.4 Determinación de azúcares estructurales y lignina

Los azúcares estructurales y lignina fueron determinados según lo especificado en el protocolo de NREL “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” (Sluiter, 2006). Para la determinación de los azúcares se llevó a cabo una hidrólisis con ácido sulfúrico 72% en baño a 30 °C durante 60 minutos, luego se diluyó esta concentración hasta 4% y mantuvo la muestra en autoclave a 121 °C durante 60 minutos.

Se determinó lignina soluble e insoluble en ácido. La lignina soluble en ácido se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis a 205 nm y la lignina insoluble en ácido mediante la incineración del residuo sólido proveniente de la doble hidrólisis ácida, en mufla a 575 °C.

3.5.5 Extractivos

Los extractivos presentes en el pasto seco y molido, fueron determinados según el protocolo de NREL “Determination of Extractives in Biomass” (Sluiter et al., 2005), durante 12 y 16 horas de reflujo en agua destilada y en etanol respectivamente con un equipo Soxhlet.

3.5.6 Determinación de azúcares, ácidos y etanol mediante cromatografía líquida

La determinación de azúcares y etanol se llevó a cabo con un equipo HPLC Shimadzu CLASS-VP 5.04 utilizándose el detector de Índice de Refracción (RI).

Se determinaron celobiosa, glucosa, xilosa, glicerol y etanol con una columna Shodex KS-801 y su correspondiente precolumna Shodex KS-G. Las condiciones de funcionamiento del método empleado fueron, 55 °C de temperatura y 0.7 mL/min de flujo, utilizándose como fase móvil agua MilliQ.

Para la determinación de ácido acético se utilizó una columna Phenomenex Resex ROA de ácidos orgánicos y su correspondiente precolumna Phenomenex KJO-

4282. Las condiciones del método empleado fueron una temperatura de 60 °C y flujo de 0.6 mL/min. Como fase móvil se utilizó H₂SO₄ 0.01M.

Se realizó un pretratamiento de las muestras previo a su análisis. Se precipitaron las proteínas mediante la adición de 120 µL de ácido sulfosalicílico cada 3 mL de muestra, se centrifugó y se filtró el sobrenadante con filtros Millipore de 0.22 µm. En el caso de las muestras analizadas en la columna Shodex, estas debieron ser previamente neutralizadas con NaOH.

3.5.7 Concentración celular

La concentración celular total así como la fracción de células viables durante el desarrollo de inóculo y fermentación, fueron determinadas mediante recuento directo en cámara de Neubauer, utilizándose azul de metileno como colorante vital.

3.6 Cálculos

Conversión de celulosa a glucosa (%): Fracción de celulosa hidrolizada con respecto a la celulosa potencial a hidrolizarse en el sustrato.

$$\text{Conversión(\%)}^* = \frac{[\text{Glucosa}] + 1.053[\text{Celobiosa}] + \left(\frac{[\text{Etanol}]}{0.511} \right)}{[\text{Sólido}] f_{\text{glucano}} 1.11} \times 100$$

* En esta ecuación se desprecia la glucosa consumida para mantenimiento celular, así como su conversión en productos secundarios tales como ácido láctico, pirúvico, etc.

[Glucosa]: Concentración de glucosa obtenida en la hidrólisis en g/L.

[Celobiosa]: Concentración de celobiosa obtenida en la hidrólisis en g/L.

[Etanol]: Concentración de etanol obtenido durante la SSF en g/L.

[Sólido]: Concentración inicial de residuo sólido expresado en g/L.

f_{glucano} : Fracción de glucano presente en el sustrato.

1.053: Factor de conversión de celobiosa a glucosa (g de glucosa que pueden ser obtenidos a partir de 1 g de celobiosa).

0.511: Rendimiento teórico de etanol (g de etanol/g de glucosa).

1.11: Factor de conversión de glucano a glucosa (g de glucosa que pueden ser obtenidos a partir de 1 g de glucano).

Fracción removida (% en peso): Fracción de glucano, xilano, o lignina eliminado en cada paso de pretratamiento, así como fracción en peso de biomasa que se pierde en cada uno de los pretratamientos.

$$\text{Fracción removida (\%)} = \frac{w_2 f_{SD2} f_{x2}}{w_1 f_{SD1} f_{x1}} \times 100$$

w_1 y w_2 : Peso del sólido del pretratamiento 1 y 2 respectivamente.

f_{SD1} y f_{SD2} : Fracción de sólidos totales en base seca, del residuo de los pretratamientos 1 y 2 respectivamente.

f_{x1} y f_{x2} : Fracción del compuesto de interés (glucano, xilano, lignina, peso) en base seca, presentes en la fracción de cada pretratamiento, 1 y 2 respectivamente.

Eficiencia de la fermentación (%): Rendimiento en etanol a partir de la glucosa consumida, sobre el rendimiento estequiométrico de glucosa en etanol.

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{(\text{g etanol obtenidos})}{0.511(\text{g sólido}) f_{\text{glucano}} f_{\text{conversión celulosa-glucosa}} 1.11} \times 100$$

0.511: Rendimiento teórico de etanol (gramos de etanol obtenidos a partir de 1 g de glucosa).

$f_{\text{conversión celulosa-glucosa}}$: Fracción de la celulosa presente en la biomasa que fue convertida a glucosa al final de la SSF.

3.7 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza ANOVA, de los datos experimentales para comprobar si las diferencias encontradas entre ellos eran estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) utilizando el programa InfoStat/Estudiantil versión 2010 (Di Rienzo et al., 2010).

4.1 Caracterización de la gramínea *Pennisetum purpureum* Schum

En la Tabla 4 se presenta la composición obtenida para el pasto elefante. Si bien los valores obtenidos en este estudio son concordantes con valores publicados por estudios anteriores, la composición química puede variar asociada a factores tan diversos como la disponibilidad de nutrientes del suelo, el balance hídrico, la época de cosecha (seca o lluviosa), la edad de rebrote de la planta, la relación hoja-tallo, entre otros (Alves dos Santos et al., 2001; Valenciaga et al., 2009). En la Tabla 5, se comparan los valores obtenidos para la composición del pasto elefante con valores obtenidos en bibliografía para su composición, así como con otras gramíneas de composición similar como miscanthus, switchgrass y bermudagrass.

El porcentaje de celulosa del pasto elefante (27%), está dentro de los rangos reportados para otros materiales (21-41%), en cambio el nivel de hemicelulosa (18%) se encuentra por debajo (25-32%). En el caso de la lignina, mostró un valor de 23.3%, cercano al límite superior de valores reportados (6-23%). El pasto elefante usado presentó, en comparación con materiales similares, un relativamente bajo nivel de carbohidratos, en particular de xilanos y un alto nivel de lignificación.

Tabla 4. Composición química del pasto

Componente	Porcentaje en peso*
Glucano	27 ± 3
Xilano	14 ± 2
Arabinano	2.0 ± 0.1
Galactano	0.2 ± 0.1
Manano	2.0 ± 0.2
Lignina S.A.	1.3 ± 0.3
Lignina I.A.	22 ± 1
Cenizas	7.2 ± 0.1
Sólidos totales	96 ± 2
Extractivos	14.3 ± 0.4

*Valores promedio ± una desviación estándar de ensayos realizados por triplicado, expresados en base seca, exceptuando los sólidos totales.

Tabla 5. Composición del pasto elefante o *Pennisetum purpureum Schum* y otras gramíneas expresando sus datos como porcentajes en base seca.

	Hamelinck et al., 2005	Chung et al., 2005	Sun et al., 2005	Wang et al., 2010	adaptado de: (Haverty et al., 2012)	Sathitsuksanoh et al., 2012	Correa et al., 2008	Alves dos Santos et al., 2001	Holanda Ferreira et al., 2007	adaptado de: (Yasuda et al., 2012)	Este trabajo
Especie	<i>Switchgrass</i>	<i>Switchgrass</i>	<i>Bermudagrass</i>	<i>Bermudagrass</i>	<i>Miscanthus</i>	<i>Miscanthus</i>	<i>Pennisetum clandestinum</i>	<i>Pennisetum purpureum Schum</i>	<i>Pennisetum purpureum Schum</i>	<i>Pennisetum purpureum Schum</i>	<i>Pennisetum purpureum Schum</i>
CELULOSA	31.98	NR	NR	NR	NR	NR	26.9	30.68-31.17	34.5	NR	27
Glucano 6C	31.98	32.20	32.36	25.59	36.32	41.0	NR	NR	NR	32.52	27
HEMICELULOSA	25.19	NR	NR	NR	NR	NR	26.2	29.75-31.58	24.8	NR	18.24
Xilano 5C	21.09	20.30	19.37	15.88	17.0	18.42	NR	NR	NR	18.86	14.06
Arabinano 5C	2.84	3.70	4.33	1.95	1.89	2.08	NR	NR	NR	4.47	1.96
Galactano 6C	0.95	0	1.09	1.46	0.58	NR	NR	NR	NR	1.26	0.2
Manano 6C	0.30	0.40	NR	NR	0.23	NR	NR	NR	NR	NR	2.02
Lignina S.A.	NR	3.70	NR	3.96	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1.30
Lignina I.A.	NR	19.50	20.33	15.37	21.79	NR	NR	NR	NR	NR	22.40
Lignina Total	18.13	NR	NR	19.33	NR	23.10	5.88	8.26-8.88	14.3	14.9	23.70
Cenizas	5.95	7.10	4.17	6.6	NR	NR	NR	2.54-2.81	NR	12.7	7.20
Extractivos	17.54	NR	NR	4.17	1.81	NR	NR	NR	NR	NR	14.30

NR: No Reportado
 S.A.: Soluble en ácido
 I.A.: Insoluble en ácido

En la Figura 11 se observa la distribución del tamaño de partícula, siendo el tamaño medio de partícula de 0.297 mm.

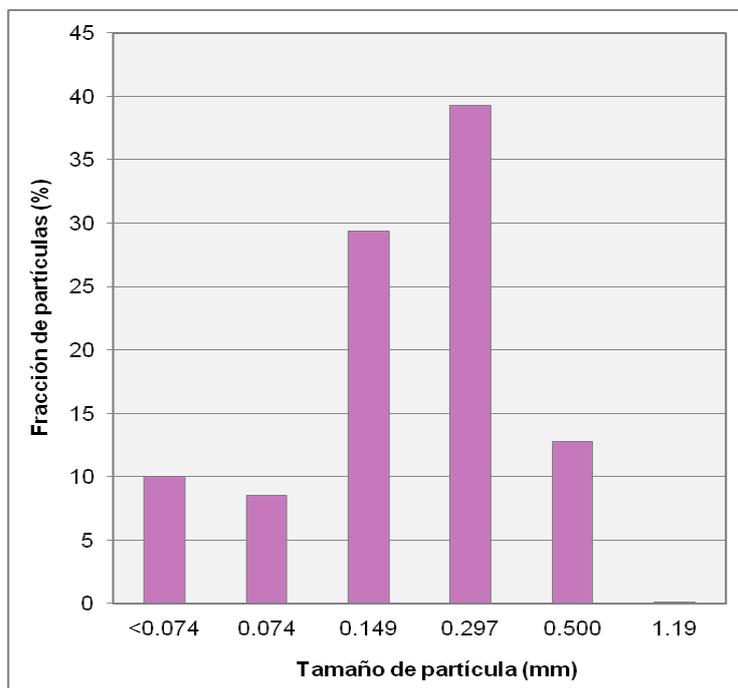


Figura 11. Distribución del tamaño de partícula del pasto elefante.

4.2 Tratamientos de hidrólisis sobre el residuo FPA

4.2.1 Caracterización de FPA y evaluación de su digestibilidad enzimática

En el presente trabajo, se utilizó el residuo sólido remanente luego de la hidrólisis ácida, referido en el capítulo 3 como FPA. Se determinó su composición, expresándose sus datos en porcentaje en base seca, ver Tabla 6.

Tabla 6. Composición química del residuo sólido remanente luego de la hidrólisis ácida (FPA).

Componente	Porcentaje en peso*
Glucano	42 ± 2
Xilano	11 ± 4
Lignina Insoluble	35.8 ± 0.2
Sólidos totales	87.3 ± 0.1

*Valores promedio ± una desviación estándar de ensayos realizados por duplicado, expresados en base seca, exceptuando los sólidos totales.

El pretratamiento con ácido diluido, es un método efectivo para la remoción de la hemicelulosa. Dependiendo de las condiciones de trabajo puede extraer hasta en un 95% los azúcares de la hemicelulosa (Karimi et al., 2006). El residuo sólido, compuesto principalmente por celulosa y lignina, tal como se puede ver en la tabla 6, puede ser hidrolizado ya sea con otro pretratamiento físico-químico o con enzimas (Martín et al., 2007).

Se llevó a cabo un ensayo preliminar de hidrólisis enzimática, a modo de evaluar la digestibilidad del residuo FPA, utilizándose una alta carga enzimática, 25 FPU/g de residuo sólido de complejo celulásico (aproximadamente 60 FPU/g de celulosa) y 10 CBU/g de residuo sólido de β -glucosidasa. Como se observa en la Figura 12, al cabo de 130 horas de reacción se alcanzó un porcentaje de conversión de celulosa a monómeros de glucosa del 31.5%. Este valor es comparable a valores encontrados en bibliografía para materiales lignocelulósicos pretratados, en los que se utilizó la misma carga enzimática: 49.9% para paja de centeno pretratada con ácido diluido en iguales condiciones de concentración y tiempo de exposición (Sun, 2002), 48.9% para bagazo de caña de azúcar pretratado con explosión por vapor (Martín et al., 2008) y 32% para bagazo de caña de azúcar pretratado con ácido diluido (Rezende et al., 2011).

Sin embargo, el uso de enzima en exceso no parecería ser tan ventajoso desde el punto de vista hidrolítico como podría esperarse, ya que, según Wyman et al. (2005), la reducción de la cantidad de enzima utilizada hasta en un 75%, solo disminuyó el porcentaje de conversión de celulosa a glucosa mínimamente. También numerosas investigaciones, Kristensen et al. (2007), Sipos et al. (2011), Zheng et al. (2008), Singh y Bishnoi (2012) entre otros, informan que la adición de algunas sustancias tales como proteínas y surfactantes aumentan la eficiencia de la catálisis enzimática, pudiéndose utilizar entonces bajas dosis enzimáticas.

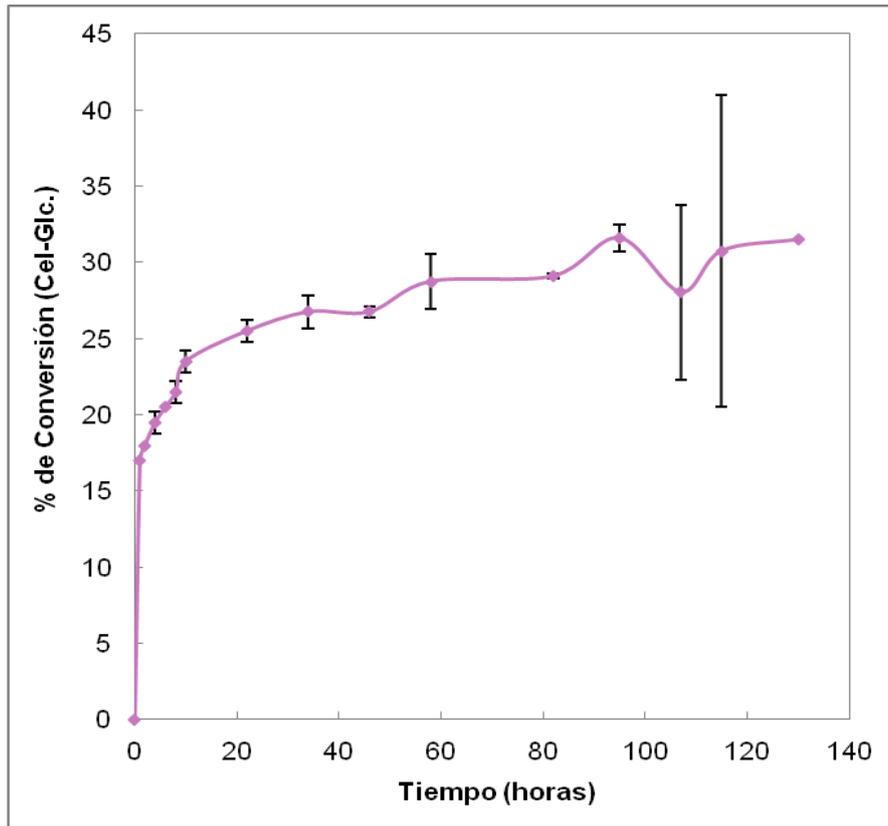


Figura 12. Avance de la hidrólisis enzimática del residuo FPA, utilizándose 25 FPU/g residuo sólido de complejo celulásico expresado en porcentaje de conversión de celulosa a glucosa.

4.2.2 Evaluación del efecto de la adición de surfactante y β -glucosidasa en la hidrólisis enzimática

Se realizaron ensayos de hidrólisis enzimática en los cuales se utilizó una cantidad de enzima mucho menor que en el ensayo descrito en el ítem 4.2.1 (80% menor), y se evaluó tanto el efecto de la adición de β -glucosidasa, como la adición de surfactantes en el rendimiento de la hidrólisis del complejo celulásico.

La suplementación con β -glucosidasa, cumple la función de hidrolizar la celobiosa del medio mediante su hidrólisis a glucosa, minimizando la inhibición que ejerce la celobiosa sobre las celulasas. Tal como se observa en la Figura 13, la adición de β -glucosidasa mejora la hidrólisis tanto en rendimiento como en velocidad de hidrólisis. Las enzimas cooperan de manera sinérgica para degradar al sustrato, esto implica que la actividad de las enzimas trabajando en conjunto es mayor que la adición de sus actividades individuales (Van Dyk y Pletschke, 2012).

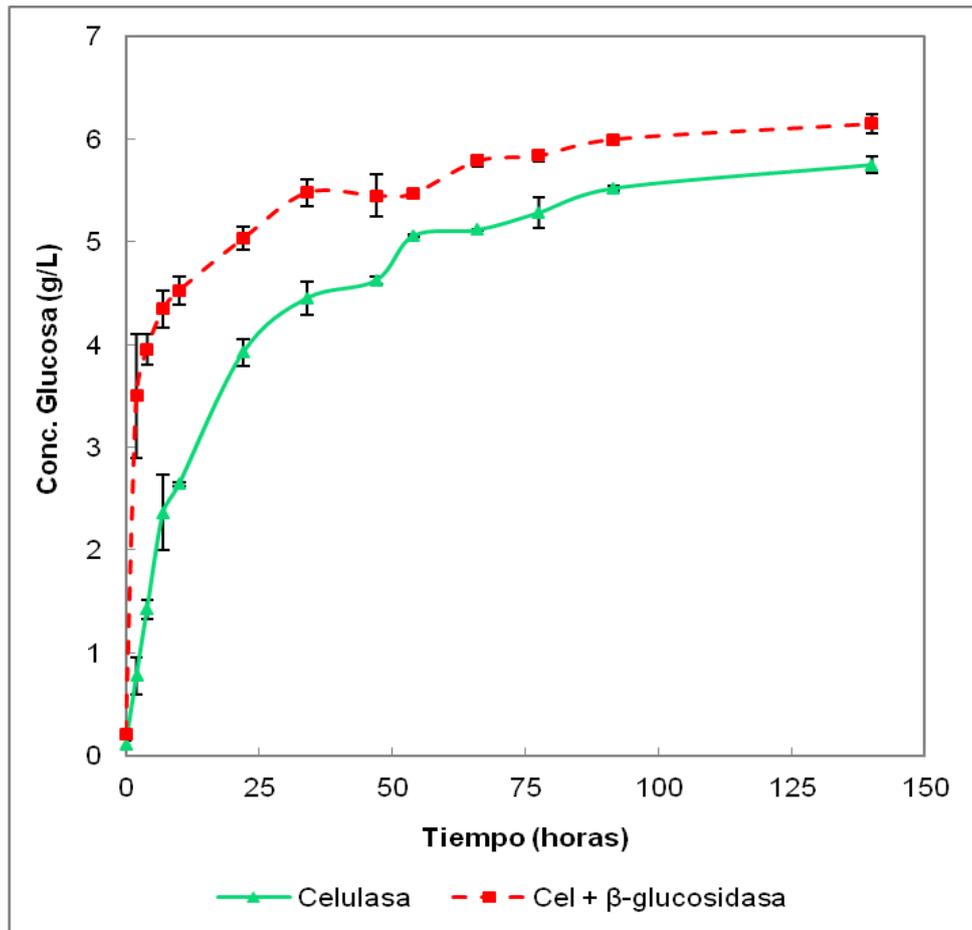


Figura 13. Avance de la hidrólisis enzimática del residuo FPA con y sin agregado de β -glucosidasa con un porcentaje de sólidos del 5 % (p/v). Dosis utilizadas: 5 FPU/g sólido de complejo celulásico y 10 CBU/g sólido de β -glucosidasa.

En la Figura 14, se muestran los ensayos de hidrólisis enzimática con adición de surfactantes. Se espera que estas sustancias mejoren la hidrólisis ya que al establecer interacciones hidrofóbicas con la lignina, llevan a que la enzima adsorbida a la lignina se libere (Van Dyk y Pletschke, 2012).

La hidrólisis sin la adición de surfactantes, dio lugar a concentraciones de glucosa de 5.7 g/L utilizándose sólo celulasa y 6.2 g/L utilizándose celulasa suplementada con β -glucosidasa cuyos porcentajes de conversión de celulosa a glucosa con respecto al máximo teórico, corresponden al 27.7 y 29.6% respectivamente. La adición de BSA no tuvo efecto en la conversión de celulosa a glucosa, por el contrario la adición de PEG₆₀₀₀ y Tween 80 incrementó el porcentaje de hidrólisis a valores de 41.2 y 41.6 % respectivamente al cabo de 140 horas, valores que resultaron superiores al obtenido con 25 FPU/g de residuo sólido de celulasas de 31.5 %.

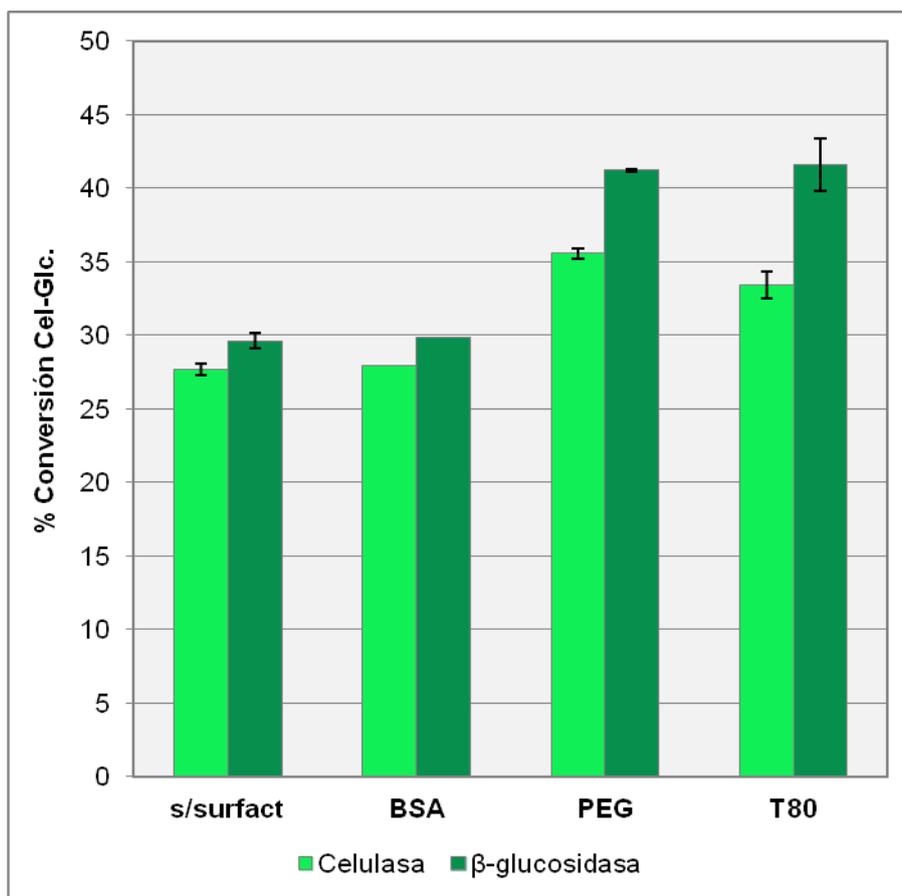


Figura 14. Porcentaje de conversión de celulosa a glucosa con respecto al máximo teórico de glucosa, para la hidrólisis enzimática en presencia de distintos surfactantes.

De estos resultados también se observó que el efecto positivo de la adición de β-glucosidasa es más notable en los ensayos realizados en presencia de surfactantes, pasando desde un incremento en el porcentaje de conversión del 6.8 % en el caso de los ensayos sin surfactantes, hasta un aumento del 24.5 % para los ensayos con Tween80. Esto puede ser explicado teniendo en cuenta que dado que la β-glucosidasa no tiene dominios CBM de unión a la celulosa, tiende a adherirse a la lignina (Guo et al., 2009). Los surfactantes minimizarían la cantidad de esta enzima adherida a la lignina, permitiendo por lo tanto, que haya más β-glucosidasa libre en el medio para favorecer la hidrólisis.

Del análisis estadístico de los datos, se deduce que el cambio en el porcentaje de conversión de celulosa a glucosa generado por la adición de PEG₆₀₀₀, es más significativo que el generado por la adición de β-glucosidasa.

4.2.3 Hidrólisis enzimática con alta concentración de sólidos

En la Tabla 7 se puede observar el grado de hidrólisis (expresado en % de conversión de celulosa a glucosa) y la concentración final de glucosa expresada en g/L, utilizándose concentraciones de sólidos del 5 y 10%. Se utilizó como surfactante únicamente PEG₆₀₀₀, por sus altos rendimientos obtenidos en las hidrólisis anteriores y fácil manejo. El uso de altas concentraciones iniciales de sustrato reducen el costo de producción así como el consumo de energía del proceso (Roche et al., 2009).

El porcentaje de conversión de la celulosa fue superior en los ensayos con menor concentración de sólidos, sin embargo, si se observan las concentraciones finales de glucosa, estas fueron prácticamente duplicadas en los ensayos con 10% (p/v) de sólidos.

Tabla 7. Hidrólisis enzimática del residuo FPA en presencia y ausencia de PEG₆₀₀₀, para distintas concentraciones de sustrato

Concentración de sustrato (% p/v)	Muestra	Conversión de celulosa a glucosa (%)*	Concentración final de glucosa (g/L)*
5	Sin surfactante	29.6 ± 0.5	6.1 ± 0.1
	PEG ₆₀₀₀	41.2 ± 0.1	8.5 ± 0.1
10	Sin surfactante	28 ± 5	10 ± 2
	PEG ₆₀₀₀	39 ± 3	14 ± 1

*Valores promedio ± una desviación estándar de ensayos realizados por duplicado.

Según Rosgaard et al., (2007), quienes llevaron a cabo estudios sobre el efecto de altas concentraciones de sustrato sobre el rendimiento de la hidrólisis enzimática, la disminución en el rendimiento de la hidrólisis se debe a que los materiales lignocelulósicos pretratados tienen una alta viscosidad inicial, lo que evita que haya un mezclado eficiente. También sugieren, que al haber una mayor concentración de sustrato, hay mayor unión improductiva de las celulasas a la lignina, sobre todo a medida que avanza la hidrólisis y disminuye la concentración de celulosa.

Por lo tanto, para aumentar el rendimiento de la hidrólisis enzimática con altas concentraciones de sustrato se pueden utilizar estrategias tales como la adición

secuencial de sólidos (Linde et al., 2006), o agregar un paso adicional de pretratamiento a modo de extraer la lignina restante y minimizar la unión inespecífica de las enzimas a la lignina.

4.3 Tratamientos de hidrólisis sobre el residuo FPAA

A partir de los resultados presentados en el punto anterior, se observó, que el pretratamiento con ácido diluido, si bien fue efectivo en la extracción de la hemicelulosa, no resultó un buen método para promover la hidrólisis efectiva de la celulosa. Según Guo et al. (2009), y Yang y Wyman (2004), el pretratamiento ácido diluido provoca además la redistribución de la estructura química de la lignina lo cual tendría un efecto inhibitorio significativo sobre la hidrólisis ya que aumentaría la adsorción de las enzimas (sobre todo de la β -glucosidasa) a la misma, dejando menor cantidad de enzima disponible en la reacción hidrolítica.

Mediante la adición de surfactantes se logró aumentar el porcentaje de hidrólisis, ya que estos disminuyen la adsorción de las enzimas, sin embargo, quedaría entre el 58.8 y 58.4 % de celulosa residual sin hidrolizarse aún en los mejores casos (PEG₆₀₀₀ y Tween 80 respectivamente). Por lo que, a modo de aumentar la eficiencia de la hidrólisis, se hace necesario agregar un nuevo paso de pretratamiento, con la finalidad de eliminar una fracción mayor de lignina.

4.3.1 Pretatamiento alcalino del residuo FPA

En la tabla 8 se muestra la composición del sólido residual del pretratamiento alcalino, referido en el capítulo 3 como FPAA. Se pudo observar que hubo un aumento del contenido de glucano y una disminución del contenido de lignina insoluble después del pretratamiento alcalino (ver Tabla 6 y 8).

Tabla 8. Composición de la fracción FPAA, expresada en porcentaje en base seca.

Componente	Porcentaje en peso*
Glucano	58 ± 4
Xilano	10 ± 4
Lignina insoluble	23 ± 6
Sólidos totales	93 ± 1

*Valores promedio ± una desviación estándar de ensayos realizados por duplicado, expresados en base seca, exceptuando los sólidos totales.

Los pretratamientos alcalinos, se caracterizan por tener una buena capacidad de deslignificación, sin afectar sustancialmente a los demás componentes (Balat et al., 2008). Como se observa en la Figura 15, en el pretratamiento ácido la remoción de lignina fue prácticamente nula, eliminándose casi el 60 % de la lignina en el paso posterior de pretratamiento alcalino. Este valor resulta más bajo a los encontrados en bibliografía para pretratamientos en secuencia en condiciones similares al de este trabajo, tales como Zhang et al. (2009) y Rezende et al. (2011) cuyos valores de deslignificación fueron de 81 y 88 % respectivamente. En cuanto a la extracción del xilano el comportamiento fue inverso, la mayor parte de este se extrajo durante el pretratamiento ácido (53.2 %) y sólo un 17 % fue extraído durante el pretratamiento alcalino, lo cual resulta consistente con el comportamiento expresado por Rezende et al. (2011).

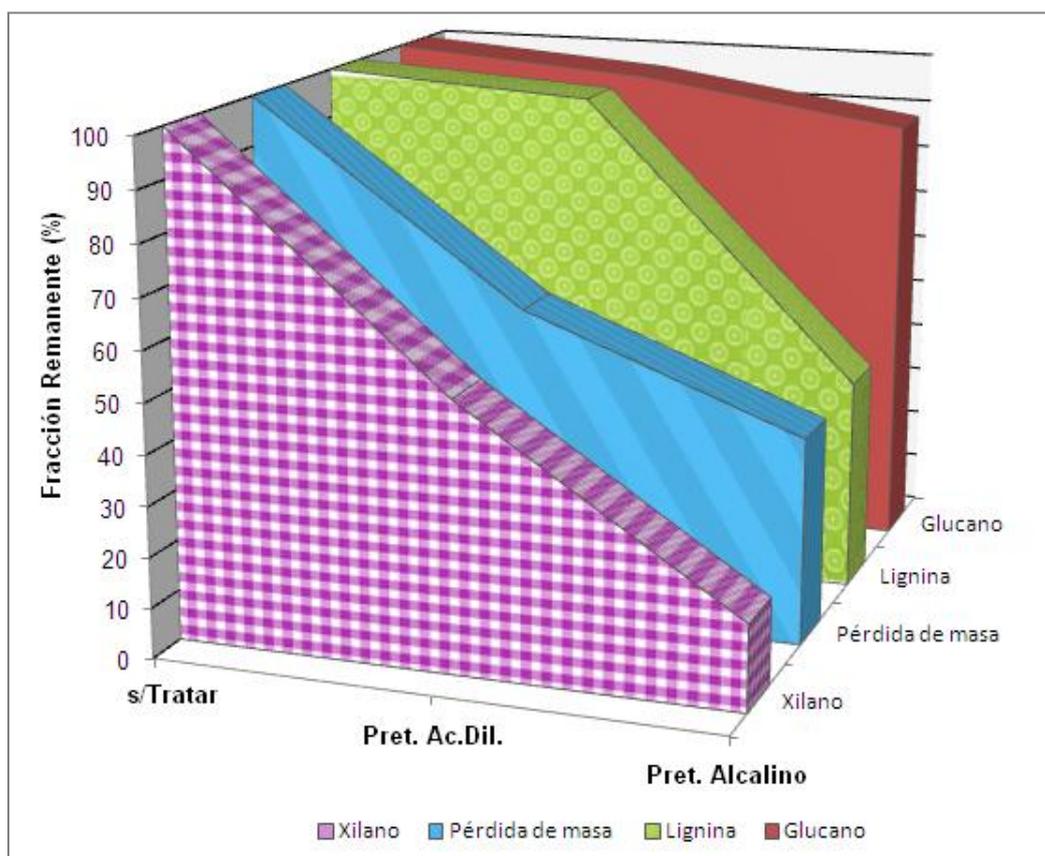


Figura 15. Fracción remanente de cada componente lignocelulósico en muestras de pasto elefante, luego de cada etapa de pretratamiento físico-químico.

4.3.2 Evaluación del efecto de la adición de un pretratamiento alcalino sobre la hidrólisis enzimática

En la Tabla 9, se presentan los resultados obtenidos para la hidrólisis con el residuo FPA y el residuo FPAA en las mismas condiciones: 5 FPU/g de residuo sólido de celulasas, 10 CBU/g de residuo sólido de β -glucosidasa, 10% (p/V) de sólidos a 50 °C de temperatura. El rendimiento de la hidrólisis fue superior para el residuo FPAA, alcanzándose el 38 y 45% de conversión para los ensayos sin y con PEG₆₀₀₀ respectivamente. Tal como se esperaba, al disminuir la proporción de lignina luego de la hidrólisis alcalina, y disminuir así el efecto adsorbente de las enzimas a esta, se logró aumentar la eficiencia de la hidrólisis a altas concentraciones de sustrato.

Tabla 9. Hidrólisis enzimática de los residuos FPA y FPAA, con concentración de sólidos del 10%, llevada a cabo sobre residuo con y sin surfactante.

Fracción sólida utilizada	Surfactante	Conversión de celulosa a glucosa (%)*	Concentración final de glucosa (g/L)*
FPA	Sin surfactante	28 ± 5	10 ± 2
	PEG ₆₀₀₀	39 ± 3	14 ± 1
FPAA	Sin surfactante	38 ± 1	23 ± 1
	PEG ₆₀₀₀	45 ± 7	27 ± 4

*Valores promedio ± una desviación estándar de ensayos realizados por duplicado.

Según los resultados obtenidos en el análisis estadístico, el agregado de un pretratamiento alcalino, genera un cambio significativo en el porcentaje de conversión de celulosa a glucosa.

Cara et al. (2006) llevaron a cabo la hidrólisis enzimática de madera de olivo, pretratada en una primera instancia por explosión con vapor, y posteriormente llevado a cabo una deslignificación alcalina. El residuo sólido fue tratado enzimáticamente con 15 FPU/g de sustrato de celulosa y 12.6 IU/g sustrato de β -glucosidasa, con 10% de sólidos, obteniéndose una hidrólisis de aproximadamente el 55 al 62%, valores superiores a los obtenidos en este trabajo.

Wu y Lee (1997) estudiaron el efecto que tiene el orden de realización de los pretratamientos ácido y alcalino sobre la hidrólisis enzimática. Utilizando switchgrass como materia prima, llevaron a cabo un pretratamiento ácido diluido y posteriormente una deslignificación alcalina mediante ARP (Ammonia Recycled Percolation), y viceversa, observando que la deslignificación alcalina previo a la hidrólisis ácida, disminuye la pérdida de azúcares por descomposición, brindando por lo tanto mejores rendimientos en la hidrólisis. Por lo tanto, a modo de mejorar los rendimientos de la hidrólisis, el cambio en el orden de los pasos de pretratamiento, podría ser una estrategia a tenerse en cuenta en próximos estudios.

4.3.3 Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis del residuo FPAA

En la Figura 16, se muestran los resultados obtenidos para la hidrólisis de FPAA a la temperatura sugerida como óptima para las celulasas, 50°C (Selig et al., 2008) y a 37°C, temperatura en la cual se llevará a cabo la SSF.

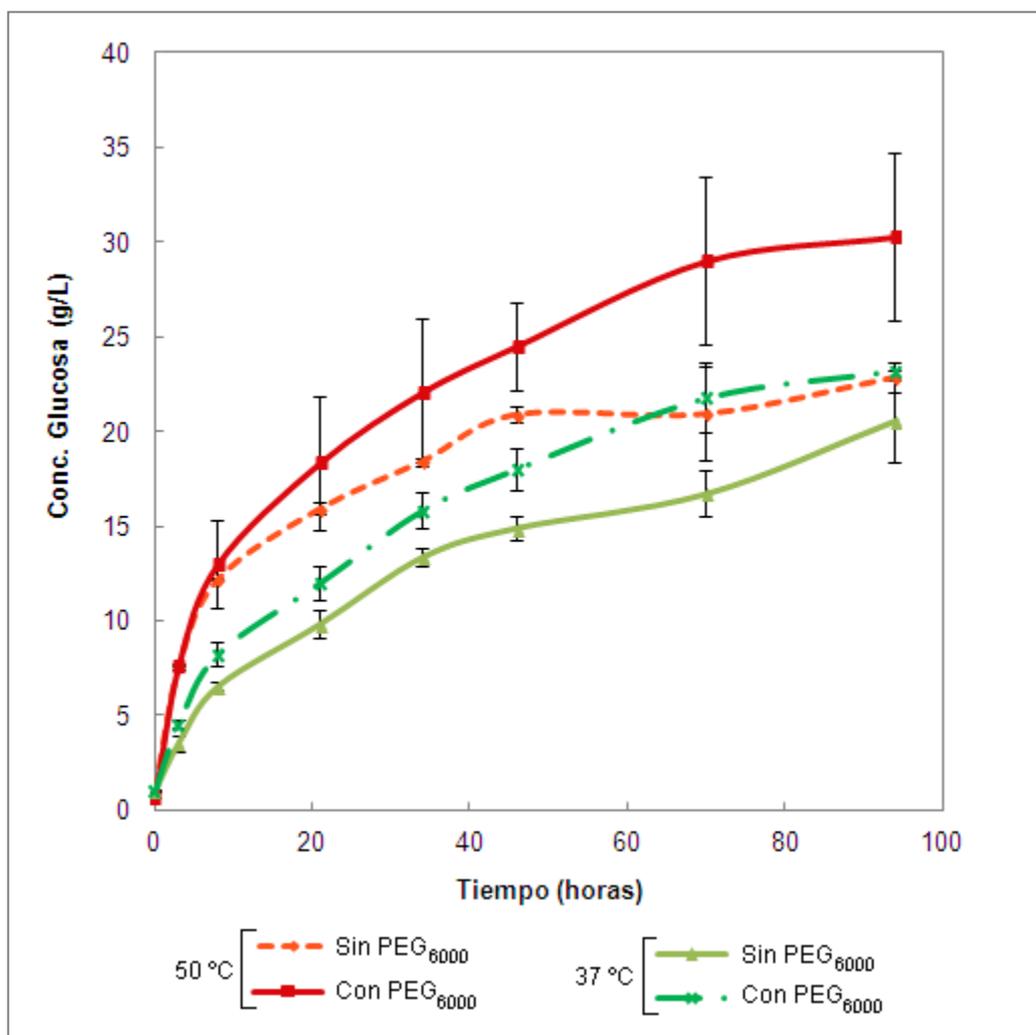


Figura 16. Hidrólisis enzimática del residuo FPAA a 50 y 37°C.

En la hidrólisis a 50°C se obtuvieron aproximadamente 23 g/L de glucosa finales para la muestra sin surfactante, correspondientes al 38% de conversión y 27 g/L de glucosa finales para la muestra con PEG₆₀₀₀, correspondiente a un 45% de conversión de celulosa a glucosa, al cabo de 94 horas. Para la hidrólisis a 37°C, se obtuvieron 20.6 g/L de glucosa finales, correspondientes al 34.4% de conversión para la muestra sin surfactante, y para la muestra con PEG₆₀₀₀ se obtuvieron 23.2 g/L de glucosa, correspondientes al 38.8% de conversión luego de 94 horas de hidrólisis. Tal

como sugieren estos valores, los ensayos con PEG₆₀₀₀ se vieron más afectados por la temperatura que aquellos sin surfactante, con una merma de 7.1 g/L de glucosa. En cuanto a la velocidad de la hidrólisis, se observa, sobre todo en el caso de las muestras sin surfactante, que ya a las 60 horas de hidrólisis, la muestra del ensayo llevado a cabo a 50°C, llegó a una fase estacionaria donde ya casi no hay más hidrólisis. Sin embargo, para la muestra llevada a cabo a 37°C, se observa que aún sigue habiendo hidrólisis, ya que hay una diferencia de casi 4 g/L de glucosa entre la penúltima y la última toma.

Los datos encontrados en bibliografía para hidrólisis realizadas a temperaturas distintas de la óptima, son muy variables. En el trabajo de Yao et al. (2011) se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de rastrojo de maíz pretratado con ácido diluido en una suspensión de 10% p/v de sólidos en solución, a 40°C durante 96 horas. Bajo estas condiciones obtuvieron 25 g/L de azúcares reductores en el caso más favorable. Sewalt et al. (1997) trabajaron con alfalfa y otras gramíneas pretratadas con NaOH, tratándolas enzimáticamente con un 5% p/v de sólidos en solución, en alta concentración enzimática, a 40°C durante 60 horas obteniendo porcentajes de conversión de entre 55-65%. Tengborg et al. (2001) realizaron la hidrólisis enzimática de aserrín de madera, pretratado por explosión con vapor, a 40°C, con 5% de materia seca en suspensión, durante 72 horas, alcanzando un porcentaje de conversión de aproximadamente el 30%.

4.4 Hidrólisis y fermentación simultáneas del residuo FPAA

Uno de los factores que influye en el rendimiento de la hidrólisis enzimática es la inhibición que genera la acumulación de glucosa y celobiosa sobre las enzimas. Por lo tanto, la hidrólisis con fermentación en simultáneo es sugerida como una posible solución a la inhibición por producto, dando generalmente muy buenos rendimientos en etanol (Olofsson et al., 2008).

En las Figuras 17 y 18 se muestra el perfil de producción de etanol y producción y consumo de azúcares durante la SSF. Para el caso de la SSF sin agregado de surfactante, se obtuvieron 15.8 g/L finales de etanol y 24.7 g/L finales para el ensayo llevado a cabo en presencia de PEG₆₀₀₀. El efecto positivo de este surfactante, es muy variable dependiendo de la materia prima, así como del pretratamiento utilizado. Según el estudio llevado a cabo por Sipos et al. (2011), el

PEG actúa formando puentes de hidrógeno entre sus átomos de oxígeno internos, con los grupos hidroxilos de los fenilos de la lignina, impidiendo de esta forma que estos interactúen con las enzimas reteniéndolas y disminuyendo así la cantidad de estas disponibles en la hidrólisis. En cuanto a su efecto sobre las levaduras, poco se conoce aún, pero algunos investigadores, tales como Singh et al. (2007), sugieren que este podría aumentar la permeabilidad de la membrana celular al interactuar con algunos de sus componentes, y de esta forma favorecería la producción e intercambio de algunos productos. Aunque, analizando los resultados de la Tabla 10, se puede inferir que dado la poca diferencia en la eficiencia de las fermentaciones con y sin PEG, el efecto más valioso de este surfactante se centra en la interacción de las enzimas con el sustrato.

En la Tabla 10 se comparan los resultados obtenidos en la SSF con y sin surfactante, con experiencias de trabajos llevados a cabo en condiciones similares por distintos investigadores. Los valores obtenidos de concentración final de etanol así como en la eficiencia de la fermentación, se encuentran en el rango de los valores de bibliografía, aunque estos son muy variables dependiendo de las distintas materias primas utilizadas.

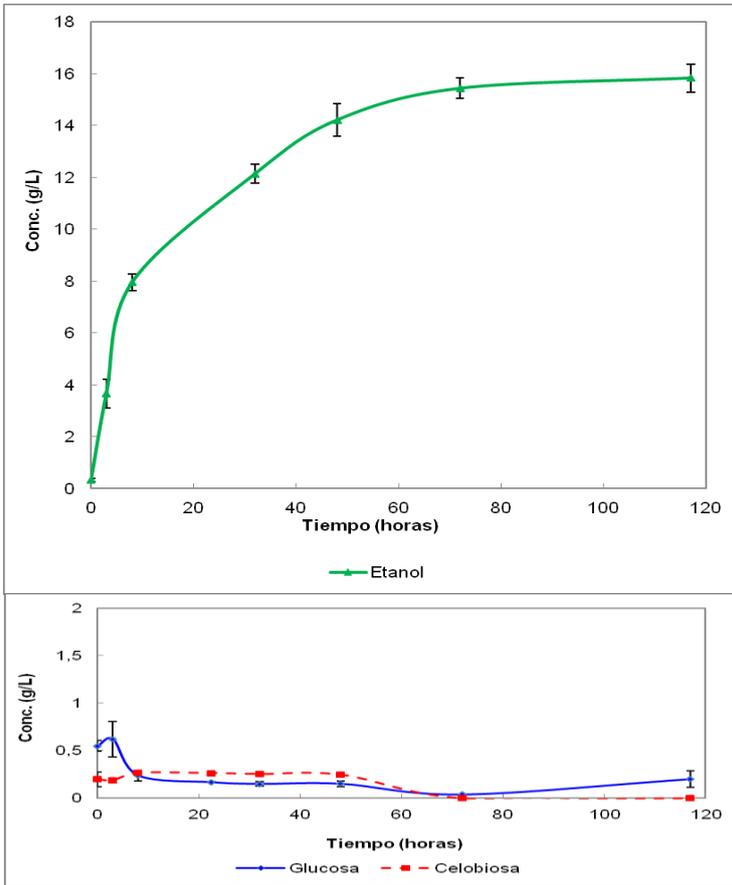


Figura 17. SSF llevada a cabo sobre el residuo FPAA en una relación del 10% (p/v), utilizándose la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a 37°C en ausencia de surfactante. A: Perfil de producción de etanol expresado en g/L. B: Perfil de azúcares (glucosa y celobiosa), expresado en g/L.

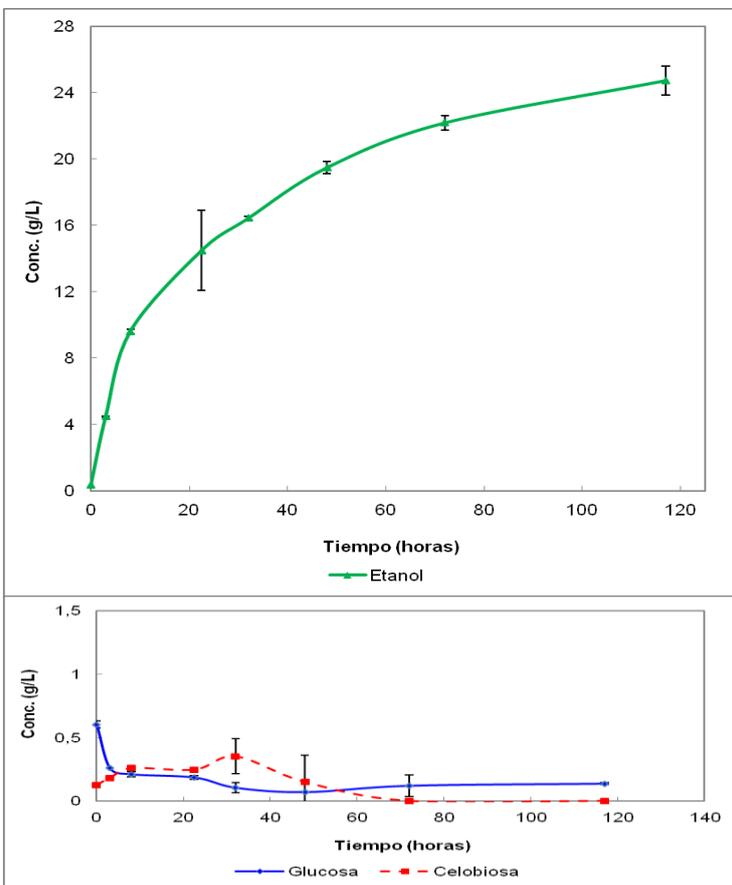


Figura 18. SSF llevada a cabo sobre el residuo FPAA en una relación del 10% (p/v), utilizándose la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a 37°C con 0.05 g PEG₆₀₀₀/g de sólido. A: Perfil de producción de etanol expresado en g/L. B: Perfil de azúcares (glucosa y celobiosa), expresado en g/L.

Tabla 10. Datos comparativos de experiencias de SSF realizadas con *Saccharomyces cerevisiae*, respecto a este trabajo.

	Alkasrawi et al. (2003)	Linde et al. (2007)	Linde et al. (2008)	Zhang et al. (2009)	Conceição et al. (2011)	Este trabajo
<i>Materia prima</i>	Chips de abeto	Paja de cebada	Paja de trigo	Mazorca de maíz	<i>Eucalyptus grandis</i>	Pasto elefante
<i>Pretatamiento</i>	Inmersión con SO ₂ + EPV	Inmersión en ácido + EPV	Inmersión en ácido + EPV	Ácido + alcalino	Ácido + alcalino	Ácido + alcalino
<i>Conc. celulosa</i>	11 FPU/g de celulosa	5 FPU/g de celulosa	6 FPU/g de WIS	30 FPU/g de celulosa	30 FPU/g de sólido	5 FPU/g de sólido seco
<i>Conc. β-gluc.</i>	41 IU/g de celulosa	6 IU/g de celulosa	7 IU/g WIS	---	---	10 CBU/g de sólido seco
<i>Contenido de sólidos (%)</i>	5% (p/p)	7.5% (p/p)	5% (p/p)	19% (p/v)	20% (p/p)	10% (p/v)
<i>Temp. (°C)</i>	37	35	35	37	37	37
<i>pH</i>	5	5	5	4.8	N.E.	4.8
<i>Surfactante</i>	2.5 g/L Tween20	---	---	---	---	Sin surfactante y con 0.05 g/g de sólido seco PEG ₆₀₀₀
<i>Conc. celular</i>	0.5% (p/p) del peso total	5 g/L	2 g/L	5 g/L cél. Secas	4 g/L	1 x 10 ⁸ cél/mL iniciales
<i>Etanol (g/L)</i>	23	13	8.5	69.2	28.7	15.2 y 24.7
<i>Eficiencia de la fermentación (%)</i>	87	46	49	81.2	N.E.	71.4 y 72.1

EPV: Explosión por vapor.

WIS: Water Insoluble Solids (Sólidos insolubles en agua).

IU: International Units (Unidades Internacionales).

CBU: Cellobiose Units (Unidades de celobiosa).

p/p: peso/peso.

p/v: peso/volumen.

N.E.: No especificado.

En la Figura 19, se muestra el desempeño de la SSF con respecto a la conversión de celulosa a glucosa, comparado a los valores obtenidos para la hidrólisis enzimática en las mismas condiciones. Se observa un efecto positivo de la SSF comparado a la hidrólisis enzimática, tanto para el ensayo llevado a cabo sin surfactante (51.8% de conversión), como para el suplementado con PEG₆₀₀₀ (80.9%

de conversión), siendo más significativo el aumento en el porcentaje de conversión en este último caso. Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta el efecto del PEG₆₀₀₀ explicado anteriormente, el cual, al disminuir la adsorción inespecífica de enzima a la lignina, permitiría que ésta esté más disponible para hidrolizar la celulosa. Al haber mayor grado de hidrólisis de la celulosa, existe una mayor posibilidad de que haya inhibición por producto. Por lo tanto, al realizarse en simultáneo la fermentación de la glucosa a etanol, se evita la inhibición que esta genera ya que la levadura va consumiendo la glucosa a medida que esta se va produciendo.

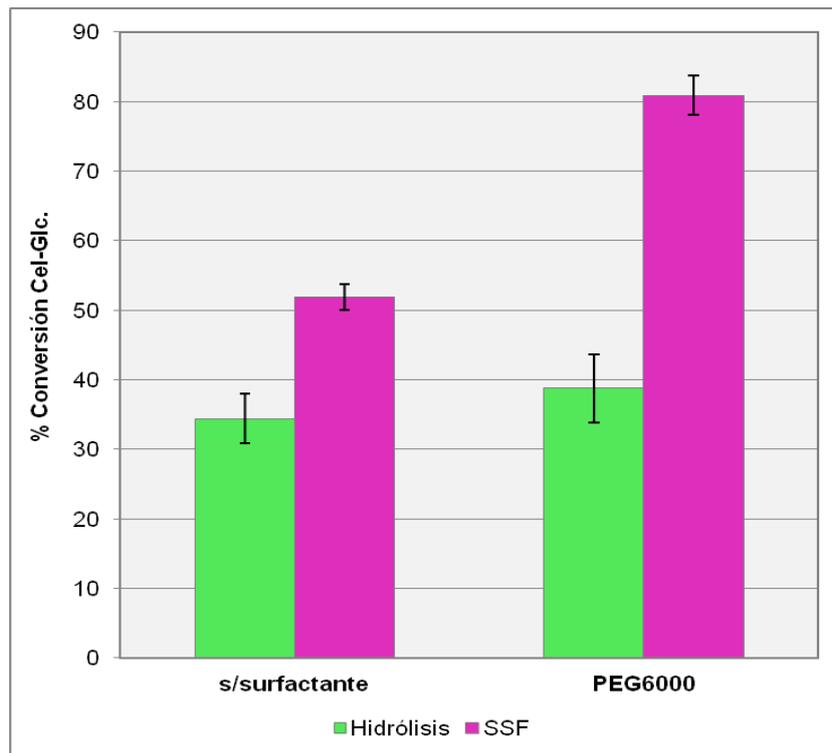


Figura 19. Porcentaje de celulosa convertida a glucosa de la SSF y la hidrólisis enzimática individual, realizadas a 37°C, con 10% de sólidos, 5 FPU/g de residuo sólido y 10 CBU/g de residuo sólido.

En la Tabla 11 se muestran las concentraciones de ácido succínico, láctico, acético y glicerol producidos durante la SSF, luego de 117 horas. La producción de ácidos y glicerol fue muy baja tanto para los ensayos llevados a cabo sin surfactante, como en los suplementados con PEG₆₀₀₀.

Tabla 11. Concentración de ácidos y glicerol producidos durante la SSF, expresados en g/L.

	Sin surfactante*	Con PEG₆₀₀₀*
<i>Ac. Succínico (g/L)</i>	0.2 ± 0.3	0.4 ± 0.2
<i>Ac. Láctico (g/L)</i>	1.6 ± 0.4	1.4 ± 0.6
<i>Ac. Acético (g/L)</i>	1.1 ± 0.4	1.25 ± 0.03
<i>Glicerol (g/L)</i>	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.2

*Valores promedio ± una desviación estándar de ensayos realizados por duplicado.

El número de células totales se mantuvo prácticamente constante en todos los ensayos, con una fracción de viabilidad promedio de 0.64 y 0.84 para los ensayos sin y con PEG₆₀₀₀ respectivamente. Tal como se mencionó anteriormente, si bien no existe mucha información acerca de cómo actúa el PEG₆₀₀₀ sobre las levaduras, los datos mostrados parecen indicar que no influye ni en su crecimiento ni viabilidad.

Capítulo 5

Conclusiones



El pasto elefante estudiado, proveniente de un cultivo experimental, presentó un contenido bajo de carbohidratos (glucano y xilano) y un alto grado de lignificación comparado a otros materiales lignocelulósicos similares, esto lleva a que sean necesarios más pasos de pretratamiento para la remoción de este polímero.

En las hidrólisis enzimáticas se lograron los valores más altos de conversión de celulosa a glucosa cuando se utilizó como sustrato al residuo obtenido luego de dos pretratamientos: uno ácido seguido por uno alcalino. Mediante el agregado de aditivos surfactantes, se logró disminuir 5 veces la concentración de enzima utilizada, alcanzando valores de conversión similares a los obtenidos con alta concentración enzimática. Si bien las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática son 50°C, a bajas concentraciones de sólidos, se logró mejorar los rendimientos de hidrólisis a 37°C y altas concentraciones de sustrato, mediante la utilización del residuo tratado con el doble pretratamiento físico-químico, y el agregado de PEG₆₀₀₀.

La levadura de panificación, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentó la glucosa a etanol en la SSF, dando lugar a la formación de 16 a 24 g/L de etanol con una eficiencia del 70% aproximadamente, obteniéndose un porcentaje de conversión de celulosa a glucosa atractivo, de hasta un 80%.

Se debe profundizar en los estudios sobre los pretratamientos ácido y alcalino, y el orden en que estos sean llevados a cabo a modo de aumentar la deslignificación de la biomasa. También se puede evaluar la utilización de microorganismos termo tolerantes para la fermentación, como herramientas para aumentar las eficiencias de hidrólisis y fermentación.

Referencias



- Adney, B., y Baker, J. (2008). Measurement of cellulase activities. *Technical Report NREL/TP-510-42628*. Disponible online: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42628.pdf>. Acceso marzo, 2009.
- Alkasrawi M., Eriksson, T., Börjesson, J., Wingren, A., Galbe, M., Tjerneld, F., Zacchi, G. (2003). The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* . **33**(1): 71–78.
- ALUR. (s.f.). Etanol: Logística del etanol; Agroindustria Alur Bella Unión. Obtenido de <http://www.alur.com.uy/vision.html>. Acceso julio 2012.
- Alves dos Santos, E., Soares da Silva, D., y Leite de Queiroz Filho, J. (2001). Composição química do capim-elefante cv. roxo cortado em diferentes alturas. *Revista Brasileira de Zootecnia*. **30**(1): 18-23.
- Anderson, W.F., Casler, M.D., Baldwin, B.S. (2008). Improvement of perennial forage species as feedstock for bioenergy. En W. Vermerris (Ed.), *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. pp:309-345. Springer Science and Business Media.
- Arantes, V., y Saddler, J. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. **3**(4): 1-11.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. **52**(2): 858-875.
- Balat, M., Balat, H., y Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. **34**(5): 551-573.
- Banat, I., Nigam, P., Singh, R., Marchant, R., y McHale, A. (1998). Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **14**(6): 809-821.
- Betts, W., Dart, R., Ball, A., y Pedlar, S. (1991). Biosynthesis and structure of lignocelluloses. *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. pp:139-155, Springer-Verlag.
- Buranov, A. U., y Mazza, G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial crops and products*. **28**(3): 237–259.
- Campbell, C. J., y Laherrère, J. H. (1998). The end of cheap oil. *Scientific American*. **278**(3): 78-83.

Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., Negro, M., y Castro, E. (2006). Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry* . **41**(2): 423–429.

Chang, M., Chou, T., y Tsao, G. (1981). Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose. *Bioenergy Springer-Verlag*. **20**: 15-42.

Chung, Y.-C., Bakalinsky, A., y Penner, M. (2005). Enzymatic saccharification and fermentation of xylose-optimized dilute acid-treated lignocellulosics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **121-124**(1-3): 947-961.

Conceição, N., Vargas, G., Peñuela, M., Barros Gomes, E., y Pereira Jr, N. (2011). Ethanol production from residual wood chips of cellulose industry: Acid pretreatment investigation, hemicellulosic hydrolysate fermentation, and remaining solid fraction fermentation by SSF process. *Applied Biochemistry Biotechnology*. **163**: 928–936.

Correa, H., Carulla, J., y Pabón, M. (2008). Valor nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I. Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. *Livestock Reserch for Rural Development*. **20**(4): 1-56. Disponible oline: www.lrrd.org/lrrd20/4/corra20059.htm. Acceso junio 2012.

Coyle, W. (2007). The future of biofuels: a global perspective. *Amber Waves*. **5**(5): 24-29. Disponible online: <http://www.ers.usda.gov/AmberWaves/November07/PDF/Biofuels.pdf>. Acceso junio 2012.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2010. GrupoInfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Cuervo, L., Folch, J., y Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*. **13**(3): 11-25.

Decker, S., Sheehan, J., Dayton, D., Bozell, J., Adney, W., Hames, B., Thomas, S.R., Bain, R.L., Czernik, S., Zhang, M., Himmel, M.E. (2007). Biomass Conversion. En *“Kent and Riegel’s Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology”*. Kent, I.A., Ed. Springer Science. **2**(33): 1449-1549.

Dellweg, H., Rizzi, M., Methner, H., y Debus, D. (1984). Xylose fermentation by yeasts, comparison of *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis*. *Biotechnology letters*. **6**: 395-400.

DNE: Dirección Nacional de Energía. (2011). *Balance energético 2010*. Disponible online:

<http://www.miem.gub.uy/gxpsites/hgxpp001?5,6,239,O,S,0,MNU;E;72;1;73;6;MNU>.

Acceso julio 2012.

Ghosh, T., y Prelas, M. (2011). Ethanol. *Energy Resources and Systems Resources. Renewable Resources*. Springer-Verlag. **2**: 419-493.

Guigou, M., Lareo, C., Pérez, L., Lluberas, M., Vázquez, D., y Ferrari, M. (2011). Bioethanol production from sweet sorghum: Evaluation of post-harvest treatments on sugar extraction and fermentation. *Biomass and Bioenergy*. **35**(7): 3058-3062.

Guo, G.-L., Hsu, D.-C., Chen, W.-H., Chen, W.-H., y Hwang, W.-S. (2009). Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. *Enzyme and Microbial Technology*. **45**(2): 80-87.

Hamelinck, C., Van Hooijdonk, G., y Faaij, A. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*. **28**(4): 384-410.

Haverty, D., Dussan, K., Piterina, A., Leahy, J., y Hayes, M. (2012). Autothermal, single-stage, performic acid pretreatment of *Miscanthus x giganteus* for the rapid fractionation of its biomass components into a lignin/hemicellulose-rich liquor and a cellulase-digestible pulp. *Bioresource Technology*. **109**: 173-177.

Hendriks, A., y Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. **100**(1): 10-18.

Holanda Ferreira, A., Rodriguez, N., Neiva, J., Campos, W., y Borges, I. (2007). Características químico-bromatológicas e fermentativas do capim-elefante ensilado com níveis crescentes de subproduto da agroindústria do abacaxi. *Ceres*. **54**(312): 098-106.

Huang, R., Su, R., Qi, W., y He, Z. (2011). Bioconversion of Lignocellulose into Bioethanol: Process Intensification and Mechanism Research. *Bioenergy Research*. **4**: 225-245.

- Jensen, J., Morinelly, J., Gossen, K., Brodeur-Campbell, M., y Shonnard, D. (2010). Effects of dilute acid pretreatment conditions on enzymatic hydrolysis monomer and oligomer sugar yields for aspen, balsam, and switchgrass. *Bioresource Technology*. **101**(7): 2317-2325.
- Joshi, B., Bhatt, M. R., Sharma, D., Joshi, J., Malla, R., y Sreerama, L. (2011). Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. *Biotechnology and Molecular Biology Review* . **6**(8): 172-182.
- Jung, Y., Kim, S., Yang, T., Lee, H., Seung, D., Park, Y.-C., Seo, J.-H., Choi, I.-G., Kim, K.H. (2012). Aqueous ammonia pretreatment, saccharification, and fermentation evaluation of oil palm fronds for ethanol production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **35**(9): 1497-1503.
- Karimi, K., Emitazi, G., y Taherzadeh, M. (2006). Ethanol production from dilute-acid pretreatment rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**: 138-144.
- Kim, J.-H., Block, D., y Mills, D. (2010). Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **88**(5): 1077–1085.
- Kristensen, J.B, Bruun, M.H., Tjerneld, F., y Jorgensen, H. (2007). Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* . **40**(4): 888-895.
- Linde, M., Galbe, M., y Zacchi, G. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**(5): 1100–1107.
- Linde, M., Galbe, M., y Zacchi, G. (2006). Steam pretreatment of acid-sprayed and acid soaked barley straw for production of ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **129-132**: 546–62.
- Linde, M., Jakobsson, E.-L., Galbe, M., y Zacchi, G. (2008). Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*. **32**(4): 326 – 332.
- Lynd, L. R. (1990). Large-scale fuel ethanol from lignocellulose; potential, economics, and research priorities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **24**(25): 695-719.

Lynd, L., Weimer, P., H. van Zyl, W., y Pretorius, I. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **66**(3): 506-577.

Malherbe, S., y Cloete, T. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* .**1**: 105-114.

Martin, C., Alriksson, B., Sjöde, A., Nilvebrant, N.-O., y Jönsson, L. (2007). Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **136-140**: 339-352.

Martín, C., Marcet, M., Thomsen, A.B. (2008). Comparison between wet oxidation and steam explosion as pretreatment methods for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *BioResources*. **3**(3): 670-683.

Menon, V., y Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals. *Progress in Energy and Combustion Science*. **38**(4): 522-550.

Mielenz, J. (2001). Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*. **4**: 324-329.

Naik, S., Vaibhav, V. G., Prasant, K. R., y Ajay, K. D. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **14**: 578–597.

Olofsson, K., Bertilsson, M., y Lidén, G. (2008). A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. **1**(7): 1-14.

Palmowski, L., & Muller, J. (2000). Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. **41**(3): 155-162.

Ramirez, M.B. (2011). Producción de etanol a partir de pasto elefante: Respuesta a la prehidrólisis ácida y fermentación con *Pichia stipitis*. Tesis presentada en Facultad de Ciencias, UDELAR, Montevideo, Uruguay, para obtención del grado de la Licenciatura en Bioquímica.

Rezende, C., Aparecida de Lima, M., Maziero, P., Ribeiro deAzevedo, E., Garcia, W., y Polikarpov, I. (2011). Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*. **4**(54): 1-17.

Rocamora, S. (2009-2010). *Biofuels*. Disponible online: http://www.xtec.cat/~jescoda1/SergiRocamora/1024x768/bio_1.htm. Acceso julio, 2012.

Roche, C., Dibble, C., y Stickel, J. (2009). Laboratory-scale method for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass at high-solids loadings. *Biotechnology for Biofuels*. **2**(28): 1-11.

Rosgaard, L., Andric, P., Dam-Johansen, K., Pedersen, S., y Meyer, A. (2007). Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **143**(1): 27–40.

Sánchez, O., y Cardona, C. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*. **30**(11): 671-678.

Sathitsuksanoh, N., Zhu, Z., y Percival Zhang, Y.-H. (2012). Cellulose solvent- and organic solvent-based lignocellulose fractionation enabled efficient sugar release from a variety of lignocellulosic feedstocks. *Bioresource Technology*. **117**: 228-233.

Selig, M., Weiss, N., y Ji, Y. (2008). Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Technical Report* NREL/TP-510-42629. Disponible online: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42629.pdf>. Acceso agosto, 2009.

Sewalt, V., Beauchemin, K., Rode, L., Acharya, S., y Baron, V. (1997). Lignin impact on fiber degradation. IV. Enzymatic saccharification and *in vitro* digestibility of alfalfa and grasses following selective solvent delignification. *Bioresource Technology*. **61**(3): 199-206.

Sims, R. E., Mabee, W., Saddler, J. N., y Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*. **101**(6): 1570–1580.

Singh, A., y Bishnoi, N. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **93**(4): 1785–1793.

Singh, A., Van Hamme, J., y Ward, O. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*. **25**(1): 99-121.

Sipos, B., Szilágyi, M., Sebestyén, Z., Perazzini, R., Dienes, D., Jakab, E., Crestini, C. y Réczey, K. (2011). Mechanism of the positive effect of poly(ethylene glycol) addition

in enzymatic hydrolysis of steam pretreated lignocelluloses. *Comptes Rendus Biologies*. **334**(11): 812–823.

Siri, G., Ernst, O., Carballo, C., Gestido, V., y Arbeletche, P. (2007). Cultivos energéticos para la producción de etanol en el Uruguay. Disponible online: www.iica.org.uy/index.php?option=com_docman&task. Acceso julio 2012

Sluiter, A. (2006). Determination of structural carbohydrates and lignin. *NREL Biomass Analysis Technology Team , Laboratory Analytical Procedure*. Disponible online versión 2008, *Technical Report* NREL/TP-510-42621: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>.

Sluiter, A. (2005). Determination of total solids in biomass. *NREL Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure #001*. NREL, Golden, Co.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., y Templeton, D. (2005). Determination of Ash in Biomass. *Technology Report* NREL/TP-510-42622. Disponible online: <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42622.pdf>. Acceso marzo, 2009.

Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., y Templeton, D. (2005). Determination of Extractives in Biomass. *Technology Report* NREL/TP-510-42610. Disponible online: <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42619.pdf>. Acceso marzo, 2009.

Sues, A., Millati, R., Edebo, L., y Taherzadeh, M. (2005). Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Research*. **5**(6-7): 669–676.

Sun, Y. (2002). Enzymatic hydrolysis of rye straw and bermudagrass for ethanol production. Tesis presentada en Faculty of North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, para obtención del grado de Doctor in Philosophy. Disponible online: <http://repository.lib.ncsu.edu/ir/bitstream/1840.16/4366/1/etd.pdf>. Acceso julio, 2012.

Sun, Y., y Cheng, J. (2005). Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*. **96**(14): 1599–1606.

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

Tengborg, C., Galbe, M., y Zacchi, G. (2001). Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Enzyme and Microbial Technology*. **28**(9-10): 835-844.

- Valenciaga, D., Chongo, B., Herrera, R., Torres, V., Oramas, A., Cairo, J., y Herrera, M. (2009). Efecto de la edad de rebrote en la composición química de *Pennisetum purpureum* vc.CUBA CT-115. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. **43**(1): 73-79.
- Van Dyk, J., y Pletschke, B. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes: Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*. **30**(6):1458-1480.
- Wang, Z., Keshwani, D., Redding, A., y J.J.Cheng. (2010). Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresource Technology*. **101**(10): 3583-3585.
- Wu, Z., y Lee, Y. (1997). Ammonia recycled percolation as a complementary pretreatment to the dilute-acid process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **63-65**: 21-34.
- Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Holtzapple, M., Ladisch, M., y Lee, Y. (2005). Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. *Bioresource Technology*. **96**(18): 2026-2032.
- Xu, Q., Singh, A., y Himmel, M. (2009). Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Current Opinion in Biotechnology*. **20**: 364–371.
- Yang, B., y Wyman, C. (2004). Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*. **86**(1): 88-98.
- Yao, M., Wang, Z., Wu, Z., y Qi, H. (2011). Evaluating kinetics of enzymatic saccharification of lignocellulose by fractal kinetics analysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **16**(6): 1240-1247.
- Yasuda, M., Miura, A., Shiragami, T., Matsumoto, J., Kamei, I., Ishii, Y., y Ohta, K. (2012). Ethanol production from non-pretreated napiergrass through a simultaneous saccharification and fermentation process followed by a pentose fermentation with *Escherichia coli* KO11. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **114**(2): 188-192.
- Zhang, M., Wang, F., Su, R., Qi, W., y He, Z. (2009). Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. *Bioresource Technology*. **101**(13): 4959-4964.

Zhao, X., Song, Y., y Liu, D. (2011). Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of alkali/peracetic acid-pretreated sugarcane bagasse for ethanol and 2,3-butanediol production. *Enzyme and Microbial Technology*. **49**(4): 413-419.

Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R., Wang, D., y Jenkins, B. (2008). Non-ionic surfactants and non-catalytic protein treatment on enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*: **146**: 231-248.



Anexo

Análisis Estadístico

Análisis de resultados de varianza para el porcentaje de conversión de celulosa a glucosa según las diferentes condiciones de hidrólisis enzimática

Las distintas condiciones de hidrólisis enzimática analizadas son las siguientes: origen del sustrato (con y sin pretratamiento alcalino), concentración de sustrato, adición de β -glucosidasa y PEG₆₀₀₀, variación de la temperatura y efecto de la fermentación en simultáneo con la hidrólisis enzimática (SSF).

Two Way ANOVA

Respuesta: % Conversión de celulosa a glucosa

Factor **concentración de β -glucosidasa (CBU/g de sustrato)**

2 grupos: 0, 10

Factor **concentración de PEG₆₀₀₀ (g/g de sustrato)**

2 grupos: 0, 0.05

Análisis de resultados de varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Conc. β -glucosidasa	28.54	1	28.54	19.57	0.0069
Conc. PEG ₆₀₀₀	189.40	1	189.40	129.82	0.0001
Error	7.29	5	1.46		
Total	225.24	7			

Two Way ANOVA

Respuesta: % Conversión de celulosa a glucosa

Factor **concentración de sustrato (%p/v)**

2 grupos: 5, 10

Factor **concentración de PEG₆₀₀₀ (g/g de sustrato)**

2 grupos: 0, 0.05

Análisis de resultados de varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Conc. PEG ₆₀₀₀	244.89	1	244.89	32.21	0.0024
Conc. Sustrato	6.46	1	6.46	0.85	0.3990
Error	38.01	5	7.60		
Total	289.35	7			

Two Way ANOVA

Respuesta: % Conversión de celulosa a glucosa

Factor **adición de un pretratamiento alcalino adicional**

2 grupos: 0, 1

Factor **concentración de PEG₆₀₀₀ (g/g de sustrato)**

2 grupos: 0, 0.05

Análisis de resultados de varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Pret. Alcalino	136.71	1	136.71	7.23	0.0433
Conc. PEG ₆₀₀₀	151.78	1	151.78	8.03	0.0365
Error	94.51	5	18.90		
Total	382.99	7			

Two Way ANOVA

Respuesta: % Conversión de celulosa a glucosa

Factor **Temperatura (°C)**

2 grupos: 37, 50

Factor **concentración de PEG₆₀₀₀ (g/g de sustrato)**

2 grupos: 0, 0.05

Análisis de resultados de varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Temperatura	56.19	1	56.19	4.22	0.0952
Conc. PEG ₆₀₀₀	62.74	1	62.74	4.71	0.0821
Error	66.61	5	13.32		
Total	185.54	7			

Two Way ANOVA

Respuesta: % Conversión de celulosa a glucosa

Factor **SSF**

2 grupos: 0, 1

Factor **concentración de PEG₆₀₀₀ (g/g de sustrato)**

2 grupos: 0, 0.05

Análisis de resultados de varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
SSF	1721.15	1	1721.15	24.52	0.0043
Conc. PEG ₆₀₀₀	587.66	1	587.66	8.37	0.0341
Error	351.00	5	70.20		
Total	2659.81	7			