



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE QUÍMICA



Desarrollo de procesos para utilización de biomasa lignocelulósica en biorrefinerías para producción de etanol y coproductos de valor agregado

Trabajo presentado para aspirar al título de Doctor en Química

Q. F. Fernando Bonfiglio Bardier, Mag.

Directora Académica y de tesis: Dra. María del Pilar Menéndez Rodríguez

Co-Directora de tesis: Dra. Solange I. Mussatto

Montevideo, Uruguay

Diciembre de 2021

Agradecimientos

La realización de esta tesis significó un largo viaje, figurada y literalmente, personal y profesionalmente. Infinidad de personas e instituciones me han ayudado en esta travesía y quiero ofrecerles mis más sinceros agradecimientos, porque sin ellas esta tesis no hubiera sido posible. Y pido disculpas a quien haya cometido el error de omitir agradecerle.

A mis directoras de tesis. A la Dra. Pilar Menéndez, por su sabiduría, continuo apoyo, aliento e infinita paciencia en sus sugerencias y correcciones. A la Dra. Solange I. Mussatto, por su guía, dedicación, aliento, y por recibirme en su grupo en la Universidad Técnica de Dinamarca generando una experiencia de vida inolvidable. Con ambas directoras aprendí y crecí más de lo que se puede agradecer.

A Latitud – Fundación LATU por el apoyo fundamental para realizar la tesis. Al Dr. Gustavo Domínguez por su apoyo y aliento a realizarla, facilitándome en todo lo que era posible durante estos años.

A la Facultad de Química y la Universidad de la República, por abrirme nuevamente sus puertas para seguir creciendo profesional y personalmente.

A ANCAP y a Nikolai Guchin por su apoyo para realizar esta tesis, y porque en conjunto con su equipo formamos el Centro en el que se enmarcó esta tesis.

A la ANII por la financiación de la estadía en Dinamarca, mediante la beca de movilidad (MOV_CA_2018_1_149368). A PEDECIBA Química también por el apoyo y financiación.

A Matías Cagno, Fabiana Rey, Silvia Böthig, Santiago Martínez, y a todos quienes formaron parte del Centro en estos años. Esta tesis jamás hubiera sido posible sin ellos. Y a todas las compañeras y compañeros de Latitud.

A los compañeros del Biomass Conversion and Bioprocess Technology en Dinamarca. A Celina Yamakawa por su ayuda y guía durante mi estadía. A Giuliano, Zhijia, Luana, Emilia y Jesper, grandes compañeros con los pude contar con su ayuda y amabilidad. A los amigos que hice durante esa estadía, Jasper, Niko, Lene y Katarina por acompañarme con alegría en esos meses, y honrarme con su amistad. Skål!

A Luis Reina, Emiliana Botto y a los integrantes del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, quienes me ayudaron en distintos momentos de la tesis, compartiendo sus conocimientos y tiempo.

Este viaje empezó cuando todavía estaba en Fray Bentos, por lo que agradezco a quienes me acompañaron en los primeros pasos y me apoyaron para que emprendiera el vuelo, a Javier, Viviana y Serrana y a la Unidad Fray Bentos.

A quienes me ayudaron en el último tramo de este viaje, a Vittorio, Marina, Valeria, Larissa, Karen, Ana Laura y tantos otros que me salvaron la vida (de estudiante de doctorado) en distintos momentos.

A mi familia y amigos mi agradecimiento que va más allá de esta tesis. A Ceru que siempre estuvo alentando (y por los nuevos materiales que podamos hacer derivados de esta tesis). A Alejandra que me acompañó, apoyó y soportó en este viaje, figurada y literalmente. A mi hermano Álvaro por su apoyo y motivación en todo momento. A mi hermano Pablo y a mi padre. A mi madre por su apoyo incondicional y confiar en mis capacidades infinitamente.

Finalmente, quisiera agradecerle a usted, lector o lectora. Al tribunal que se ha tomado el tiempo en leerla y estudiarla en este fin de año complicado, todavía con las esquirlas de la pandemia por Covid-19 entre nosotros. Pero también quiero agradecer al lector casual que tiene esta tesis ante sí. A veces las tesis se parecen a mensajes en botellas lanzados al mar, esperando que alguien los lea, y así como durante la realización de esta tesis he leído otras de los más diversos campos y épocas, ahora que usted está leyendo esta tesis -poco tiempo después de escrita, o muchos años después- en cierta forma habrá llegado a su destino en el viaje. Hacia el futuro y como viajando en una máquina del tiempo: gracias.

RESUMEN

El calentamiento global y el cambio climático por el uso de combustibles fósiles tanto como fuente de energía como para producir diversos materiales requieren imperiosamente ser reducidos mediante la implementación de tecnologías sostenibles ambiental, económica y socialmente. Dentro de estas tecnologías, el desarrollo de biorrefinerías es una alternativa atractiva para la producción de biocombustibles, disminuyendo las emisiones de gases de efecto invernadero, así como para generar diversos productos y materiales que pueden ser utilizados en la industria química, alimenticia, farmacéutica, de la construcción, entre otras. La generación de diversos productos a partir de la biomasa lignocelulósica también contribuye a mejorar la viabilidad económica de la producción de biocombustibles. Además, las biorrefinerías con capacidad de procesamiento de diversas biomásas pueden favorecer el desarrollo local en Uruguay y mejorar la sostenibilidad económica de la cadena productiva.

El objetivo de esta tesis es contribuir a la producción sostenible de bioetanol y coproductos de valor mediante el aprovechamiento de las fracciones mayoritarias de la biomasa.

Para ello, en este trabajo se estudiaron dos biomásas lignocelulósicas con diferentes características. Se estudió al switchgrass o pasto varilla (*Panicum virgatum*), una planta herbácea conocida como cultivo energético, y al eucalipto (*Eucalyptus globulus*), una fuente de biomasa forestal establecida en Uruguay. La estrategia ejecutada involucró la caracterización de las biomásas, el pretratamiento mediante explosión por vapor en un equipo continuo a escala pre-piloto, para luego estudiar la producción de bioetanol y coproductos de alto valor.

Se caracterizaron ambas biomásas, siendo la composición del switchgrass $31,8 \pm 0,8$ % celulosa, $25,0 \pm 1,2$ % hemicelulosa y $31,2 \pm 0,8$ % lignina (m/m). El eucalipto estaba compuesto por $47,9 \pm 1,0$ % celulosa, $16,0 \pm 0,8$ % hemicelulosa y $26,0$ % lignina (m/m).

Se diseñaron experimentos para pretratar las biomásas en el equipo de explosión. Se probaron distintas combinaciones de temperaturas y tiempos de residencia (cuya combinación se denomina severidad). El pretratamiento generó dos fracciones, una fracción sólida rica en celulosa y lignina, y una fracción líquida rica en hemicelulosa y diversos productos de degradación. Se analizó la composición de ambas fracciones y se

determinó que para las dos biomásas el punto óptimo correspondía a 200 °C y 10 minutos de tiempo de residencia, ya que la fracción sólida de este punto tenía el mayor contenido de celulosa con la menor degradación posible de la celulosa.

Para la producción de bioetanol se estudió la hidrólisis enzimática de las fracciones sólidas resultantes de la explosión por vapor y su fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*. Una primera etapa consistió en realizar la sacarificación y fermentación separadamente y en una segunda etapa, sobre el punto explotado a 200 °C y 10 minutos en las dos biomásas, se estudió la sacarificación y fermentación simultáneas. Se obtuvieron resultados promisorios de rendimiento de etanol, aproximadamente 80 % para el eucalipto y 90 % para el switchgrass. Se generó además un residuo rico en lignina que puede ser usado como fuente de energía mediante combustión, pero con posibilidades de ser procesado para producir otros productos.

Como forma de generar más valor, se investigó la fracción líquida obtenida luego de la explosión por vapor a 200 °C y 10 minutos de tiempo de residencia para la producción de xilitol y carotenoides mediante fermentaciones con cepas evolucionadas de *Kluyveromyces marxianus* y *Rhodospiridium toruloides*, respectivamente. La presencia de alto contenido de productos de degradación llevó a desarrollar una estrategia de detoxificación con la menor pérdida posible de xilosa en el hidrolizado. De esta detoxificación fue posible recuperar otros productos de valor como ácido acético y compuestos fenólicos. Implementar esta estrategia a nivel industrial mejora la viabilidad económica y ambiental, reduciendo la generación de desechos.

Los hidrolizados de eucalipto y switchgrass detoxificados se fermentaron para producir xilitol. Se obtuvo $0,48 \pm 0,04$ g xilitol/g xilosa en el hidrolizado de switchgrass y $0,68 \pm 0,10$ g xilitol/g xilosa en el hidrolizado de eucalipto. La producción de carotenoides fue posible en medios simulando los medios reales detoxificados, pero es necesario seguir desarrollando esta estrategia.

Los hallazgos de esta tesis generaron conocimiento y estrategias para la producción de etanol y productos de valor a partir de switchgrass y eucalipto, dos biomásas lignocelulósicas con distintas características. De esta manera se aportan diferentes alternativas para el desarrollo sostenible de biorrefinerías en Uruguay.

Tabla de contenido

Agradecimientos	iii
RESUMEN	v
Índice de Figuras	6
Índice de Tablas	13
Abreviaturas	15
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES, ESTADO DEL ARTE	17
1.1 Introducción	18
1.1.1 Energía – contexto global histórico.....	18
1.1.2 Biocombustibles en el contexto global	20
1.1.3 Biocombustibles en el contexto de Uruguay	23
1.1.4 Biorrefinerías.....	24
1.1.5 Dimensión económica.....	25
1.1.6 Dimensión ambiental	26
1.1.7 Dimensión social	27
1.2 Biomasa Lignocelulósica	28
1.2.1 Introducción	28
1.2.2 Celulosa	30
1.2.3 Hemicelulosa	32
1.2.4 Lignina	37
1.2.5 Complejos Lignina-Carbohidratos (<i>Lignin-Carbohydrate Complexes, LCC</i>).....	42
1.2.6 Extractivos	44
1.2.7 Minerales.....	47
1.2.8 <i>Eucalyptus</i> spp.....	47
1.2.9 Switchgrass.....	48
1.3 Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica	49
1.3.1 Introducción	49
1.3.2 Pretratamientos físicos	50
1.3.2.1 Reducción de tamaño.....	50
1.3.2.2 Extrusión.....	51
1.3.2.3 Irradiación con microondas.....	52
1.3.2.4 Ultrasonido	53
1.3.2.5 Otros pretratamientos utilizando energía de irradiación sobre la biomasa	53
1.3.3 Pretratamientos físico-químicos	54
1.3.3.1 Auto-hidrólisis	54
1.3.3.2 Explosión por vapor.....	55

1.3.3.3	Modificaciones a la explosión por vapor.....	67
1.3.4	Pretratamientos químicos	70
1.3.4.1	Pretratamientos alcalinos	70
1.3.4.2	Pretratamientos ácidos	70
1.3.4.3	Pretratamientos químicos no tradicionales	70
1.3.5	Pretratamientos biológicos	72
1.4	Hidrólisis enzimática de la celulosa	74
1.4.1	Introducción	74
1.4.2	Enzimas glicosil hidrolasas activas sobre la celulosa.....	77
1.4.2.1	Celobiohidrolasas (CBH)	77
1.4.2.2	Endoglucanasas	78
1.4.2.3	β -glucosidasas	78
1.4.3	Proteínas auxiliares (sinérgicas)	80
1.4.3.1	Módulos de unión a carbohidratos (<i>Carbohydrate-binding modules</i> , CBM)	80
1.4.3.2	Expansinas vegetales.....	82
1.4.3.3	Expansinas microbiales (o Expansin-like, similar a expansinas vegetales)	83
1.4.3.4	Monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO)	83
1.4.3.5	Sinergismo entre celulasas y proteínas auxiliares.....	84
1.4.4	Enzimas hemicelulolíticas.....	85
1.4.5	Sistema lignocelulolítico.....	85
1.5	Fermentación alcohólica de la glucosa.....	86
1.5.1	Introducción	86
1.5.2	Microorganismo – Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
1.5.3	Reacciones fermentativas	88
1.5.4	Inhibidores de la fermentación derivados del pretratamiento.....	92
1.5.5	Sacarificación y Fermentación Simultáneas (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF).....	95
1.6	Posibles coproductos a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada.....	98
1.6.1	Introducción	98
1.6.2	Productos que se pueden obtener de la hemicelulosa.....	98
1.6.2.1	Ácido láctico	99
1.6.2.2	Xilitol.....	100
1.6.3	Furfural	104
1.6.4	Otros compuestos	107
1.6.4.1	Ácido acético	107
1.6.4.2	Carotenoides	108

1.6.5	Productos a partir de la lignina	109
1.6.5.1	Usos de la lignina como macromolécula (Estrategia 1)	111
1.6.5.2	Productos de bajo peso molecular derivados de la lignina (Estrategia 2)	115
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....		121
2.1 Objetivo General.....		122
2.2 Objetivos específicos.....		122
2.3 Esquema gráfico.....		123
CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN Y PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA		124
3.1. Introducción.....		125
3.2. Materiales y métodos		125
3.2.1.	Materias primas	125
3.2.2.	Pretratamiento con explosión por vapor	126
3.2.3.	Diseño experimental de pretratamiento del switchgrass	128
3.2.4.	Diseño experimental de pretratamiento del eucalipto.....	128
3.2.5.	Cálculo del factor de severidad	128
3.2.6.	Microscopía electrónica de barrido	128
3.2.7.	Caracterización de las ligninas mediante pirólisis (Py-GC-MS)	129
3.2.8.	Espectroscopía infrarroja (Fourier Transform Infrared - FTIR).....	129
3.2.9.	Determinación de la composición química	129
3.3 Resultados y discusión		130
3.3.1	Switchgrass.....	130
3.3.1.1	Caracterización.....	130
3.3.1.2	Tratamiento de explosión por vapor de switchgrass	134
3.3.2	Eucalipto.....	147
3.3.2.1	Caracterización.....	147
3.3.2.2	Tratamiento de explosión por vapor de eucalipto.....	151
3.4 Conclusiones		164
CAPÍTULO 4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA (SACARIFICACIÓN) Y FERMENTACIÓN DE LA FRACCIÓN SÓLIDA LIGNOCELULÓSICA.....		165
4.1 Introducción.....		166
4.2 Materiales y métodos		166
4.2.1	Hidrólisis enzimática (sacarificación)	166
4.2.2	Fermentación	167
4.2.3	Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF)	167
4.3 Resultados y discusión		168
4.3.1	Switchgrass.....	168

4.3.1.1	Hidrólisis enzimática (sacarificación)	168
4.3.1.2	Fermentación	172
4.3.1.3	Sacarificación y Fermentación simultáneas (SSF)	174
4.3.2	Eucalipto.....	181
4.3.2.1	Hidrólisis enzimática (sacarificación)	181
4.3.2.2	Fermentación	181
4.3.2.3	Sacarificación y Fermentación simultáneas (SSF)	183
4.4	Conclusiones	190
CAPÍTULO 5. DETOXIFICACIÓN Y RECUPERACIÓN DE COPRODUCTOS EN LA FRACCIÓN LÍQUIDA		
191		
5.1	Introducción.....	192
5.2	Materiales y métodos.....	193
5.2.1	Pos-hidrólisis de la fracción líquida (o hidrolizados).....	193
5.2.2	Extracción en fase sólida.....	193
5.2.3	Extracción líquido-líquido.....	194
5.2.4	Métodos analíticos.....	195
5.2.5	Cálculos	196
5.3	Resultados y Discusión.....	196
5.3.1	Caracterización de los hidrolizados.....	196
5.3.2	Configuración (orden) de los distintos pasos involucrados: Pos-hidrólisis, Extracción en fase sólida, Extracción líquido-líquido.....	200
5.3.2.1	Pos-hidrólisis	205
5.3.2.2	Extracción en fase sólida.....	206
5.3.2.3	Extracción líquido-líquido.....	208
5.3.3	Comparativo entre dos columnas para Extracción en Fase Sólida	211
5.3.4	Composición final de los hidrolizados y balance de masa	212
5.4	Conclusiones	217
CAPÍTULO 6. PRODUCCIÓN DE XILITOL Y CAROTENOIDES DE LOS HIDROLIZADOS DE SWITCHGRASS Y EUCALIPTO		
218		
6.1	Introducción.....	219
6.2	Materiales y métodos.....	220
6.2.1	Microorganismos e inóculo.....	220
6.2.2	Fermentación usando medios simulados.....	220
6.2.3	Fermentación de los hidrolizados detoxificados.....	221
Fermentación en mini-reactor		221
Fermentación en micro-reactores.....		222
6.2.4	Métodos analíticos.....	223

6.3	Resultados y discusión	224
6.3.1	Fermentación de medios sintéticos por <i>K. marxianus</i>	224
6.3.2	Fermentación de hidrolizados detoxificados por <i>K. marxianus</i>	225
	Fermentación en mini-reactor	225
	Fermentación en micro-reactores.....	225
6.3.3	Fermentación de medios sintéticos por <i>R. toruloides</i>	229
6.3.4	Fermentación de hidrolizados detoxificados por <i>R. toruloides</i>	233
6.4	Conclusiones	234
	CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS.....	235
7.1	Discusión general de los resultados	236
	CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	242
	Conclusiones	243
	BIBLIOGRAFÍA.....	245
	LISTA DE PUBLICACIONES.....	294
	Publicaciones.....	294
	Presentaciones en Congresos	294

Índice de Figuras

Figura 1. Predicción del pico de Hubbert (línea punteada) comparada con la producción actual de combustible fósil en los Estados Unidos. Tomado de https://ourworldindata.org/grapher/hubberts-peak-vs-actual-oil-production-in-the-united-states?country=~USA	18
Figura 2. Emisiones globales de CO ₂ relacionadas con la energía, 1990-2021, y el cambio en las emisiones de CO ₂ según combustible. Tomado de (International Energy Agency, 2021)	20
Figura 3. Porcentaje de participación en la producción mundial de etanol (Renewable Fuels Association, 2021)	21
Figura 4. Distintas generaciones de producción de bioetanol y las materias primas involucradas	22
Figura 5. Esquema de la producción de bioetanol de segunda generación.	23
Figura 6. Esquema de producción de valor a partir de biomasa lignocelulósica en un marco de biorrefinería.	24
Figura 7. Interconexión entre las tres dimensiones o pilares de la sostenibilidad de las biorrefinerías.....	25
Figura 8. Estructura de biomasa lignocelulósica con celulosa, hemicelulosa y lignina representadas. Adaptado de (Alonso, Wettstein y Dumesic, 2012; Owonubi y otros, 2021; Miyashiro, Hamano y Umemura, 2020)	30
Figura 9. Representación de la estructura molecular de la glucosa. También se muestran la numeración de los átomos de carbono y enlace glicosídico. (Adaptado de (Eyley y Thielemans, 2014))	31
Figura 10. Enlaces inter e intramoleculares de la celulosa. Adaptado de (Yuan y Cheng, 2015) 32	
Figura 11. Diferencia de apilamiento de las hojas o capas de celulosa para formar celulosa I _α (izquierda) o I _β (derecha). Tomado de (Henriksson y Lennholm, 2009)	32
Figura 12. Componentes principales de las hemicelulosas. A= D-glucopiranosas; B= D-manopiranosas; C= D-galactopiranosas; D= L-arabinofuranosas; E= D-xilopiranosas; F= ácido D-glucurónico; G= ácido D-galacturónico	33
Figura 13. Compuestos monoméricos encontrados en la lignina. (I) Alcohol p-cumarílico; (II) Alcohol p-coniferílico; (III) Alcohol sinapílico; (IV) Derivados acetilados de los alcoholes anteriores; (V) Alcohol 5-hidroxiconiferílico; (VI) los aldehídos correspondientes a los tres primeros alcoholes. Tomado de (Rencoret, 2008).....	37
Figura 14. Enlaces más comunes entre las distintas subunidades de lignina y su nomenclatura. I: enlace β-O-4 (β-O-aril éter); II: enlace 5-5 (bifenil); III: enlace β-β (resinol); IV: enlace β-5 (fenilcumarano); V: enlace 4-O-5 (diaril éter); VI: β-1 (1,2-diarilpropano). Adaptado de (Henriksson, 2009; R.-C. Sun, 2020; Nasrullah y otros, 2017).....	38
Figura 15. Representación esquemática de la estructura de lignina. Tomado de (Singh 2019). 39	
Figura 16. Clasificación de la lignina según su método de extracción/aislamiento. Tomado de (Zevallos Torres y otros, 2020)	42
Figura 17. Diferentes enlaces de los complejos lignina-carbohidratos. I: Enlace fenil glicósido; II: enlace bencil-éter; III: enlace γ-éster. Tomado de (Giummarella, 2018).....	43
Figura 18. Mecanismo regulatorio propuesto para la formación de complejos lignina carbohidratos. Tomado de (Zhao y otros, 2020).....	43
Figura 19. Mecanismo propuesto de regulación de la frecuencia de enlaces fenil-glicósido. Tomado de (Zhao y otros, 2020)	44

Figura 20. Algunos extractivos lipofílicos que pueden encontrarse en la biomasa lignocelulósica. I: β -stosterol; II: stigmastanol; III: ácido asiático; IV: ácido arjunólico, V: ácido lignocérico (C24:0)	46
Figura 21. Estructura de pectina, con la presencia de éster de ácido galacturónico.....	47
Figura 22. Representación esquemática de los efectos del pretratamiento. Adaptado de (Chundawat y otros, 2011).....	50
Figura 23. Esquema de los componentes de un extrusor. Tomado de (Karunanithy y Muthukumarappan, 2010)	52
Figura 24. Formación de furfural. Adaptado de (Gérardy y otros, 2020) y (Peleteiro y otros, 2015)	56
Figura 25. Velocidad de disolución de polímeros (en s^{-1}) en función de su grado de polimerización (Degree of polymerization) (Ahmad y otros, 2016).....	57
Figura 26. Posibles caminos de reacción (hidrólisis y condensación) de la lignina. Tomado de (Zhang y otros, 2015)	58
Figura 27. Gotas de lignina y sus diferentes diámetros. Imagen obtenida mediante microscopio electrónico de barrido de la superficie de paredes celulares de <i>Eucalyptus globulus</i> luego de pretratamiento con explosión por vapor. Tomado de (Troncoso-Ortega y otros, 2021)	59
Figura 28. Degradación de la lignina por explosión por vapor. Los grupos fenólicos son generados por hidrólisis ácida (paso A) de las subestructuras β -O-4 generando quinonas a partir de estas (paso B). Esto facilita la rotura de los enlaces β -O-4 (paso C), generando radicales que sufren desproporción o dismutación y acoplado de radicales (condensación) para generar variedad de compuestos como fenoles, ácidos carboxílicos y oligolignoles. Tomado de (Ramos, 2003)	60
Figura 29. Esquema simplificado de formación de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) a partir de la celulosa. Adaptado de (Gérardy y otros, 2020)	61
Figura 30. Hidrólisis de 4-O-metilglucuronoxilano y celulosa de maderas duras pretratadas con explosión por vapor. Los compuestos indicados son: 1- Arabinosa, 2-xilosa, 3-xilo-oligómeros acetilados, 4-xilo-oligómeros no acetilados de mayor grado de polimerización, 5-oligosacáridos ácidos y ramificados, 6-glucosa, 7-celobiosa, 8-celo-oligómeros, 9-furfural, 10-hidroximetilfurfural, 11-ácido levulínico, 12-furano, 13-ácido 2-furoico. También están presentes ácido acético y ácido fórmico. Tomado de (Ramos, 2003)	62
Figura 31. Representación esquemática del origen de algunos inhibidores, Adaptado de (Sjulander y Kikas, 2020)	63
Figura 32. Posibles mecanismos de inhibición de algunos inhibidores derivados de la biomasa lignocelulósica. Adaptado de (Sjulander y Kikas, 2020).....	64
Figura 33. Representación esquemática de reacciones de amonólisis e hidrólisis de los enlaces éster carbohidrato-lignina y otras reacciones de tipo Maillard que pueden suceder en los pretratamientos basados en amoníaco. Adaptado de (Chundawat y otros, 2010).....	69
Figura 34. Una posible estrategia para el fraccionamiento de la biomasa utilizando líquidos iónicos. Tomado de (H. Rodríguez 2021)	72
Figura 35. Representación del pliegue principal del sitio catalítico en varias familias de glicosil hidrolasas. Tomado de (Davies y Henrissat, 1995)	75
Figura 36. Representación esquemática de las acciones de las enzimas y las proteínas auxiliares en la hidrólisis de la celulosa. Tomado de (Kim y otros, 2014)	76
Figura 37. Unión no productiva entre lignina y celulasa (imagen superior, caso I) vs unión productiva con agregado de surfactantes (imagen inferior, caso II). Tomado de (Agrawal, Satlewal y otros, 2017).....	77

Figura 38. Ilustración de la unión de la celulosa a los sitios activos de una celobiohidrolasa (Borisova y otros, 2018)	78
Figura 39. Mecanismo de reacción de la β -glucosidasa, adaptado de (Meleiro y otros, 2017; Bhatia, Mishra y Bisaria, 2002).....	79
Figura 40. Topología de los sitios de unión de los tres tipos de CBM. Tipo A: unión a celulosa cristalina, tipo B: unión a cadenas de 3 a 6 unidades monoméricas, tipo C: oligómeros de 1 a 3 unidades. En verde se muestra el sustrato. Tomado de (Armenta y otros, 2017).	82
Figura 41. Ilustración esquemática de las estructuras tridimensionales de CBM1 y CBM3 y su adsorción en la superficie de la celulosa cristalina vía interacciones del tipo A. Tomado de (Zhang y otros, 2020)	82
Figura 42. Esquema simplificado de la reacción para las posibles reacciones de las LPMO. Adaptado de (Østby, y otros 2020)	84
Figura 43. Cooperatividad y sinergismo entre glicosil hidrolasas y proteínas auxiliares. Tomado de (Østby y otros, 2020).....	85
Figura 44. Representación esquemática de una fibrilla de celulosa recubierta con hemicelulosa y lignina y las enzimas clave involucradas en la despolimerización de los polisacáridos de la pared celular de las plantas. Tomado de (Østby y otros, 2020).	86
Figura 45. Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Izquierda: Placa de agar con colonias de levaduras (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Yeast_agar_plate-01.jpg). Derecha: <i>S. cerevisiae</i> en gemación observada mediante microscopía electrónica de barrido. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Saccharomyces_cerevisiae_SEM.jpg).....	87
Figura 46. Vía glicolítica o Embden-Meyerhoff-Parnas. A la izquierda se presentan las reacciones “preparatorias”, y a la derecha las de obtención de ATP. Tomado de (Garrett y Grisham, 2010)	90
Figura 47. Reducción de piruvato a etanol. Tomado de (Nelson y Cox, 2005)	91
Figura 48. Ciclo de crecimiento de las levaduras, a: fase de latencia; b: fase de crecimiento exponencial; c: fase estacionaria (o casi estacionaria); d: fase de muerte. Tomado de (Zamora, 2009)	92
Figura 49. Interacción de los inhibidores con las distintas funciones celulares. Adaptado de (Mills, Sandoval y Gill, 2009)	93
Figura 50. Vías de conversión de furfural y 5-HMF catalizadas por aldehído reductasas. Adaptado de (Lewis Liu 2011)	94
Figura 51. Diagrama de combinaciones de los diferentes procesos para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica: SHF Hidrólisis y Fermentación Separadas; SSF Sacarificación y Fermentación Simultáneas; CF Co-fermentación; SSCF Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas; CBP BioProceso Consolidado; CBS Bio-Sacarificación Consolidada. Adaptado de (Patel y Shah, 2021).....	97
Figura 52. Compuestos que pueden ser obtenidos de xilosa. Adaptado de (Delgado Arcaño y otros, 2020).	99
Figura 53. Algunos productos químicos que se pueden obtener a partir del ácido láctico. Adaptado de (Gao, Ma y Xu, 2011)	100
Figura 54. Representación de un complejo Ca(II)-xilitol. Tomado de (K. Mäkinen, 2011)	101
Figura 55. Proceso de producción de xilitol mediante fermentación. Basado en (Hernández-Pérez y otros, 2019)	102
Figura 56. Modelo del metabolismo de la xilosa y la formación de xilitol por las levaduras. XR: xilosa reductasa, XDH: xilitol deshidrogenasa. Tomado de (Hernández-Pérez y otros, 2019). 103	
Figura 57. Xilitol como precursor para otros productos químicos. Adaptado de (Delgado Arcaño y otros, 2020)	103

Figura 58. Representación esquemática de la obtención de furfural a partir de xilosa. Tomado de (Yan y otros, 2014).	104
Figura 59. Conversión de furfural en diferentes productos químicos. Adaptado de (Yan y otros, 2014).	105
Figura 60. Estructuras químicas de algunos carotenoides más comúnmente encontrados en la dieta humana.	109
Figura 61. Relación entre volumen y precios de los productos derivados de la lignina. Basado en (Vijay Kumar Garlapati y otros, 2020)	110
Figura 62. Esquema de estrategias de valorización de la lignina. Adaptado de (Zevallos Torres y otros, 2020)	111
Figura 63. Síntesis de poliuretano-lignina. Tomado de (Saito y otros, 2013)	112
Figura 64. Formación de resina fenol-formaldehído en dos etapas, metilación y polimerización. Tomado de (Xu y Ferdosian, 2017)	113
Figura 65. Imágenes SEM de la superficie y la sección de corte de fibras de carbono obtenidas por carbonización de hilos de lignina. Tomado de (Bengtsson y otros, 2019)	114
Figura 66. Formación de las partículas coloidales de lignina. La imagen 6 es tomada con un microscopio de fuerza atómica, mientras que las imágenes 7 y 8 corresponden a microscopio electrónico de transmisión. Tomado de (Henn y Mattinen, 2019).....	115
Figura 67. Syngas como plataforma química. Adaptado de (Shinde, Hengne y Rode, 2020)...	117
Figura 68. Representación del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído o vainillina	118
Figura 69. Síntesis de vainillina a partir de eugenol y guaiacol. Adaptado de (Martău, Călinoiu y Vodnar, 2021; Yu Selikhova y otros, 2019)	119
Figura 70. Mecanismo propuesto para la depolimerización y formación de vainillina a partir de lignina. Tomado de (Fache, Boutevin y Caillol, 2016).	119
Figura 71. Ejemplos de vainillina como plataforma química. Adaptado de (Shinde, Hengne y Rode, 2020).	120
Figura 72. Esquema gráfico de la tesis	123
Figura 73. Imagen del equipo de explosión por vapor usado para el pretratamiento de las biomásas.	126
Figura 74. Representación esquemática del equipo de explosión por vapor.....	127
Figura 75. Espectro infrarrojo del switchgrass sin pretratar.....	132
Figura 76. Cromatograma de los productos de pirólisis del switchgrass sin pretratar.....	133
Figura 77. Distribución del largo de partícula de switchgrass.....	135
Figura 78. Diagrama de Pareto de los efectos de la temperatura y el tiempo de residencia y sus interacciones en los contenidos de celulosa (A), hemicelulosa (B) y lignina (C) en el sólido obtenido luego de la explosión por vapor de switchgrass.....	137
Figura 79. Gráfico de líneas de contorno representando la variación del contenido de celulosa en el switchgrass pretratado con explosión por vapor a las diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia (valores codificados)	138
Figura 80. Espectro FT-IR de distintas muestras de switchgrass, sin tratar y pretratadas. Cada espectro fue normalizado a 2907 cm^{-1}	139
Figura 81. Diagrama de Pareto de los efectos de la temperatura y el tiempo de residencia y sus interacciones en la relación G/H en el sólido obtenido luego de la explosión por vapor de switchgrass.	141
Figura 82. Cromatograma de los productos de pirólisis del switchgrass pretratado a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 15 minutos.	142
Figura 83. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica (SEM) de las muestras de switchgrass. (A) muestra sin tratar, (B) muestra pretratada en la condición de proceso menos	

severa, (C) muestra pretratada en la condición de proceso más severa. Imágenes tomadas con aumentos de 75 y 370 veces.	145
Figura 84. Espectro infrarrojo del eucalipto sin pretratar	149
Figura 85. Cromatograma de los productos de pirólisis del eucalipto sin pretratar.	150
Figura 86. Distribución del largo de partícula de eucalipto.	152
Figura 87. Composición del material sólido obtenido luego del pretratamiento con explosión por vapor de eucalipto en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia. Las letras próximas a las barras muestra diferencias significativas o no entre los distintos puntos (misma letra: no hay diferencias significativas).	153
Figura 88. Diagrama de Pareto de los efectos de la temperatura y el tiempo de residencia y sus interacciones en los contenidos de celulosa (A), hemicelulosa (B) y lignina (C) en el sólido obtenido luego de la explosión por vapor de eucalipto.	154
Figura 89. Espectro FT-IR de las distintas muestras de eucalipto, sin pretratar y pretratadas. Cada espectro fue normalizado a 2907 cm^{-1}	155
Figura 90. Diagrama de Pareto de los efectos de la temperatura y el tiempo de residencia y sus interacciones en la relación S/G en el sólido obtenido luego de la explosión por vapor de eucalipto.	157
Figura 91. Cromatograma de los productos de pirólisis del eucalipto pretratado a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 20 minutos.	158
Figura 92. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica (SEM) de las muestras de eucalipto. (A) muestra pretratada en la condición menos severa, a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, (B) muestra pretratada en la condición de proceso menos severa, (C) muestra pretratada en la condición de proceso más severa. Imágenes tomadas con aumentos de 75x y 370x.	160
Figura 93. Concentración de carbohidratos en la fracción líquida resultante de la explosión por vapor de eucalipto, según las condiciones de explosión.	162
Figura 94. Concentración de ácidos orgánicos y productos de degradación en la fracción líquida resultante de la explosión por vapor de eucalipto, según las condiciones de explosión.	162
Figura 95. Viales en incubadora para la sacarificación y fermentación simultáneas (izquierda: condiciones iniciales; derecha: con agujas colocadas a las 8 horas)	168
Figura 96. Diagrama de Pareto de los efectos de la temperatura y el tiempo de residencia y sus interacciones en el rendimiento de sacarificación obtenido usando las fracciones sólidas de switchgrass pretratado.	170
Figura 97. Gráfico de líneas de contorno representando el rendimiento de sacarificación del switchgrass pretratado con explosión por vapor a las diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia (valores codificados).	171
Figura 98. Rendimiento de la fermentación del hidrolizado enzimático de switchgrass y concentración final de etanol alcanzada.	173
Figura 99. Perfil de sacarificación y fermentación simultáneas de switchgrass pretratado a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 10 minutos, con 2 % carga de sólidos, 25 FPU/g biomasa (Condición 1) y 50 FPU/g biomasa (Condición 2)	176
Figura 100. Perfil de sacarificación y fermentación simultáneas de switchgrass pretratado a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 10 minutos, con 10 % carga de sólidos, 25 FPU/g biomasa (Condición 3) y 50 FPU/g biomasa (Condición 4).	177
Figura 101. Microscopía electrónica de barrido de las muestras luego de la sacarificación y fermentación simultáneas de switchgrass pretratado a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 10 minutos.	179
Figura 102. Espectro infrarrojo del residuo sólido luego de la SSF con 10 % carga de sólidos de switchgrass.	180

Figura 103. Perfil de sacarificación y fermentación simultáneas de eucalipto pretratado a 200 °C y 10 minutos, con 2 % carga de sólidos, 25 FPU/g biomasa (Condición 1) y 50 FPU/g biomasa (Condición 2)	185
Figura 104. Perfil de sacarificación y fermentación simultáneas de eucalipto pretratado a 200 °C y 10 minutos, con 10 % carga de sólidos, 25 FPU/g biomasa (Condición 3) y 50 FPU/g biomasa (Condición 4).....	186
Figura 105. Microscopía electrónica de barrido de las muestras luego de la sacarificación y fermentación simultáneas de eucalipto pretratado por explosión por vapor a 200 °C y 10 minutos.	188
Figura 106. Espectro infrarrojo del residuo sólido de eucalipto luego de la SSF con 10 % carga de sólidos.	189
Figura 107. Configuración de la columna Sep-PAK C18	194
Figura 108. Extracción en fase sólida con columnas de PS-DVB. Izquierda: detoxificación. Derecha: recuperación compuestos fenólicos.....	194
Figura 109. Uno de los mecanismos propuestos en la formación de huminas. Tomado de (Filiciotto y otros, 2019)	199
Figura 110. Composición del hidrolizado luego de las etapas de procesamiento del hidrolizado de switchgrass según las distintas configuraciones. PH: Pos-Hidrólisis. SPE: Extracción en fase sólida. LLE: Extracción Líquido-Líquido.	203
Figura 111. Composición del hidrolizado luego de las etapas de procesamiento del hidrolizado de eucalipto según las distintas configuraciones.....	204
Figura 112. Hidrolizado original (A) y fracciones de 15 mL recuperadas luego de extracción en fase sólida con Sep-PAK (5 g). (B) Primera fracción; (C) segunda fracción; (D) tercera fracción; (E) cuarta fracción.	206
Figura 113. Concentración de compuestos fenólicos en las fracciones de hidrolizado luego de SPE con Sep-PAK C18 (5 g). Las letras entre paréntesis se corresponden con la Figura 97. La línea punteada indica la concentración estimada de compuestos fenólicos según el volumen sometido a SPE en la misma columna.....	207
Figura 114. Eficiencia de extracción de los ácidos orgánicos usando acetato de etilo en las diferentes configuraciones.....	209
Figura 115. Eficiencia de recuperación de azúcares, luego de todo el proceso para los hidrolizados de switchgrass (SWG) y eucalipto (EUCA), usando las columnas C18 y PS-DVB. .	215
Figura 116. Eficiencia de extracción de compuestos inhibidores, luego de todo el proceso para los hidrolizados de switchgrass (SWG) y eucalipto (EUCA), usando las columnas C18 y PS-DVB.	216
Figura 117. Esquema gráfico de la producción de xilitol y carotenoides a partir del hidrolizado hemicelulósico.....	219
Figura 118. Configuración experimental del mini-reactor.....	222
Figura 119. Fermentación en micro-reactores.....	223
Figura 120. Fermentación del hidrolizado detoxificado de switchgrass con agregado de nutrientes.....	226
Figura 121. Fermentación del hidrolizado detoxificado de eucalipto con agregado de nutrientes.....	227
Figura 122. Fermentación del hidrolizado detoxificado de switchgrass sin agregado de nutrientes.....	227
Figura 123. Fermentación del hidrolizado detoxificado de eucalipto sin agregado de nutrientes.	228

Figura 124. Crecimiento celular (gráfica superior) y consumo estimado de azúcares (gráfica inferior) durante la fermentación de medios sintéticos simulando la composición de hidrolizado de switchgrass por <i>R. toruloides</i>	230
Figura 125. Crecimiento celular (gráfica superior) y consumo estimado de azúcares (gráfica inferior) durante la fermentación de medios sintéticos simulando la composición de hidrolizado de switchgrass por <i>R. toruloides</i>	231
Figura 126. Células de <i>Rhodosporidium toruloides</i> en medio sintético simulando el hidrolizado de eucalipto sin inhibidores (izquierda) y con inhibidores (derecha).	233

Índice de Tablas

Tabla 1. Resumen esquemático de la composición química de varias biomásas. Adaptado de (Volynets, Ein-Mozaffari y Dahman, 2017; Yousuf, Pirozzi y Sannino, 2020)	29
Tabla 2. Principales tipos de hemicelulosas en distintas biomásas lignocelulósicas. Adaptado de (Gírio y otros, 2010; Botto, 2018)	35
Tabla 3. Características de la lignina en la biomasa lignocelulósica y su correlación con la conversión de la biomasa. Adaptado de (Yoo y otros, 2020)	40
Tabla 4. Tipo de energía de irradiación y el efecto en la biomasa lignocelulósica. Adaptado de (Ong y Wu, 2020; Beig y otros, 2021)	54
Tabla 5. Conversión de furfural en diferentes productos químicos. Adaptado de (Machado y otros, 2016).	106
Tabla 6. Rendimientos típicos de pirólisis de madera según las condiciones (o modo). Porcentaje en m/m base seca de entrada. Tr: tiempo de reacción. Adaptado de (Bridgwater, 2018).	116
Tabla 7. Composición química del switchgrass usado en el presente estudio	131
Tabla 8. Asignación de bandas de vibración en IR. Tomado de (Reis y otros, 2020)	131
Tabla 9. Compuestos derivados de la pirólisis de switchgrass sin pretratar y su abundancia relativa (% del total de compuestos derivados de la lignina identificados). Origen H: unidades p-hidroxifenílicas, G: unidades guaiacílicas, S: unidades siringílicas.....	134
Tabla 10. Composición del material sólido obtenido luego del pretratamiento con explosión por vapor de switchgrass en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia	136
Tabla 11. Contenidos de monolignoles respecto al total de la lignina. S= Siringilo; G= Guaiacilo; H= p-Hidroxifenilo	140
Tabla 12. Compuestos derivados de la pirólisis de switchgrass pretratado a 200 °C y 15 minutos y su abundancia relativa (% del total de compuestos derivados de la lignina identificados). Origen H: unidades p-hidroxifenílicas, G: unidades guaiacílicas, S: unidades siringílicas.....	143
Tabla 13. Composición de la fracción líquida obtenida luego del pretratamiento de explosión por vapor de switchgrass en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia	147
Tabla 14. Composición química del eucalipto.....	148
Tabla 15. Compuestos derivados de la pirólisis de eucalipto y su abundancia relativa (% del total de compuestos derivados de la lignina identificados). Origen G: unidades guaiacílicas, S: unidades siringílicas	151
Tabla 16. Composición del material sólido obtenido luego del pretratamiento con explosión por vapor de eucalipto en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia. ..	153
Tabla 17 Contenidos de monolignoles respecto al total de la lignina. S= Siringilo; G= Guaiacilo; H=p-Hidroxifenilo	156
Tabla 18. Compuestos derivados de la pirólisis de eucalipto pretratado a 200 °C y 20 minutos y su abundancia relativa (% del total de compuestos derivados de la lignina identificados). Origen H: unidades p-hidroxifenílicas, G: unidades guaiacílicas, S: unidades siringílicas.....	158
Tabla 19. Composición de la fracción líquida obtenida luego del pretratamiento de explosión por vapor de switchgrass en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia	161
Tabla 20. Concentración de azúcares en las aguas de lavado (g/L). T= Temperatura, t= tiempo de residencia, Lav.= Lavado.....	163
Tabla 21. Concentración de ácidos y productos de degradación en las aguas de lavado (g/L). T= Temperatura, t= tiempo de residencia, Lav.= Lavado.....	163

Tabla 22. Rendimiento de sacarificación obtenido de las distintas muestras pretratadas de switchgrass, junto con una muestra sin pretratar y una muestra de celulosa comercial como control positivo.	169
Tabla 23. Fermentación del hidrolizado enzimático de switchgrass pretratado por explosión por vapor a distintas condiciones.	172
Tabla 24. Concentración de etanol a las 96 horas y el rendimiento de fermentación para switchgrass en el proceso SSF	174
Tabla 25. Rendimiento de hidrólisis enzimática obtenido de las distintas muestras pretratadas de eucalipto.....	181
Tabla 26. Fermentación del hidrolizado enzimático de eucalipto pretratado por explosión por vapor a distintas condiciones y luego hidrolizado enzimáticamente.	182
Tabla 27. Concentración final de etanol y el rendimiento de fermentación para eucalipto en el proceso SSF	183
Tabla 28. Gradiente de fase móvil para determinación de vainillina, ácido vanílico, ácido cumárico, 4-hidroxibenzaldehído, siringaldehído y ácido siríngico.	196
Tabla 29. Composición química de los hidrolizados de switchgrass y eucalipto obtenidos mediante pretratamiento de explosión por vapor.	197
Tabla 30. Concentración de algunos compuestos fenólicos en los hidrolizados de switchgrass y eucalipto obtenidos mediante pretratamiento de explosión por vapor.	198
Tabla 31. Composición del hidrolizado de switchgrass según las distintas configuraciones y luego de cada etapa. Concentraciones en g/L. (PH: Pos-hidrólisis, SPE: Extracción en fase sólida, LLE: Extracción líquido-líquido)	201
Tabla 32. Composición del hidrolizado de eucalipto según las distintas configuraciones y luego de cada etapa. Concentraciones en g/L. (PH: Pos-hidrólisis, SPE: Extracción en fase sólida, LLE: Extracción líquido-líquido)	202
Tabla 33. Composición y porcentaje recuperado (% Rec) según las distintas columnas utilizadas.	212
Tabla 34. Composición del hidrolizado y Eficiencia de Recuperación (ER) de los azúcares luego de todo el proceso. Los valores son referidos a la composición del pos-hidrolizado. PH: Pos-hidrolizado. SPE: Extracción en fase sólida. LLE: Extracción líquido-líquido.....	214
Tabla 35. Composición de hidrolizado y Eficiencia de Extracción (EE) de inhibidores luego de todo el proceso. Los valores son referidos a la composición del hidrolizado luego de la pos-hidrólisis, excepto en el caso de los fenólicos que son referidos al hidrolizado original.....	216
Tabla 36. Rendimiento de fermentación de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en medios complejos que simulan la composición del hidrolizado	224
Tabla 37. Masa estimada (en kg) de productos de valor obtenibles por tonelada de biomasa seca.....	238

Abreviaturas

AA	Proteínas de Actividad auxiliar
ADP	Adenosín difosfato
AFEX	Pretratamiento de Explosión de Fibra por Amoníaco
ALUR	Alcoholes del Uruguay
ANCAP	Administración Nacional de Combustibles, Alcohol y Portland
ARP	Pretratamiento de Percolación con Reciclaje de Amoníaco
ATP	Adenosín trifosfato
BG	β -glucosidasa
BTX	Benceno, Tolueno y Xileno
C18	Columna de intercambio con base de sílice unida químicamente con un grupo funcional octadecilo
CBH	Celobiohidrolasa
CBM	Módulos de unión a carbohidratos
CBP	Bioproceso Consolidado
CBS	Biosacarificación Consolidada
CF	Co-fermentación
CIDEB	Centro de Investigación y Desarrollo en Biocombustibles de Segunda Generación
Covid-19	Enfermedad infecciosa provocada por el coronavirus SARS-CoV-2
CSF	Factor de Severidad Combinado
EE	Eficiencia de Extracción
EG	Endoglucanasa
EMP	Vía Embden-Meyerhoff-Parnas
ER	Eficiencia de Recuperación
EUCA	Eucalipto
FADH ₂	Dinucleótido de flavina y adenina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FPU	Unidades de papel filtro
FTIR-ATR	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier con accesorio de Reflectancia Total Atenuada
G	Subunidad guaiacilo de la lignina
GH	Glicosil Hidrolasa
H	Subunidad p-hidroxifenilo de la lignina
5-HMF	5-hidroximetilfurfural

HPLC	Cromatografía líquida de alta precisión
IEA	Agencia Internacional de Energía
IMPO	Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales
LAB	Bacterias del ácido láctico
Latitud	Fundación del LATU orientada a la planificación y ejecución de proyectos de Investigación, Desarrollo e Innovación
LATU	Laboratorio Tecnológico del Uruguay
LCA	Análisis de Ciclo de Vida
LCC	Complejos lignina-carbohidratos
LHT	Pretratamiento de Agua Caliente Líquida (Liquid Hot Water)
LLE	Extracción Líquido-Líquido
S ₀	Factor de Severidad
LPMO	Monooxigenasas líticas de polisacáridos
MIEM	Ministerio de Industria, Energía y Minería del Uruguay
NADH/NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
NREL	National Renewable Energy Laboratory
PBI	Producto Bruto Interno
PH	Pos-Hidrólisis
PLA	Ácido poliláctico
PS-DVB	Resina de Polistireno Divinilbenceno
Py-GC-MS	Pirólisis-Cromatografía de gases-Espectro de Masas
S	Subunidad siringilo de la lignina
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SHF	Sacarificación y Fermentación Separadas
SPE	Extracción en Fase Sólida
SSF	Sacarificación y Fermentación Simultáneas
SWG	Switchgrass
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico
μ _{max}	Velocidad máxima de crecimiento celular específico

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN, ANTECEDENTES, ESTADO DEL ARTE

Solía pensar que este era el comienzo de tu historia. La memoria es algo extraño. No funciona como pensaba. Estamos tan atados por el tiempo, por su orden.

Louise Banks, The Arrival - 2017



1.1 Introducción

1.1.1 Energía – contexto global histórico

El interés global en el desarrollo de energía a partir de fuentes renovables ha estado en boga desde hace ya unos cuantos años. La preocupación por el ambiente y la constatación de que la producción de combustibles a partir de fuentes no renovables contribuye en gran medida al cambio climático ha sido lo que ha empujado a la sociedad en el aprovechamiento e investigación en combustibles renovables (Fawzy y otros, 2020). En el mismo sentido, la preocupación por la finitud de los recursos petrolíferos -la principal materia prima utilizada para producción de combustibles- también ha sido uno de los argumentos para el desarrollo de energías renovables. Sin embargo, la misma industria del petróleo ha seguido investigando para hacer más intensiva la prospección de los yacimientos, mediante técnicas más invasivas, que de todas formas siguen siendo nocivas, tanto ambientalmente como directamente para salud humana (Black y otros, 2020). Se podría considerar por ejemplo la teoría del pico de Hubbert, donde originalmente se predecía que la producción de petróleo llegaría a su máximo en el año 2000 para luego agotarse rápidamente, y sin embargo ha crecido sostenidamente con posterioridad a ese año (Figura 1) (Sandberg y otros, 2021).

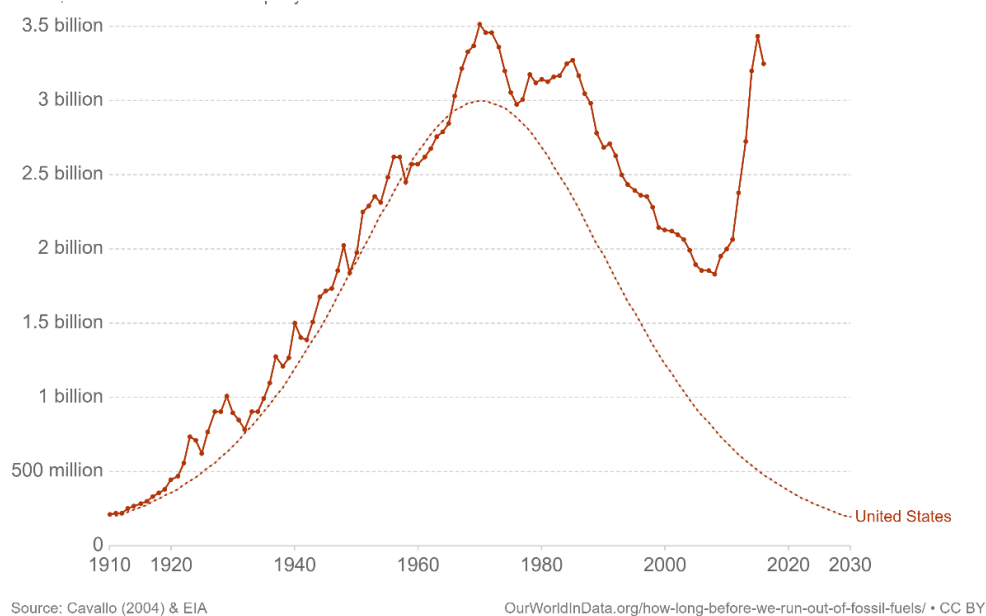


Figura 1. Predicción del pico de Hubbert (línea punteada) comparada con la producción actual de combustible fósil en los Estados Unidos. Tomado de <https://ourworldindata.org/grapher/hubberts-peak-vs-actual-oil-production-in-the-united-states?country=~USA>

Tomando en consideración estos aspectos, el paradigma que debería tomarse en cuenta es que la producción de combustibles a partir de petróleo debería ser una etapa por superar, más allá de que se agoten o no los recursos petrolíferos. Dentro de ella, la biomasa en particular ha sido objeto de significativos estudios y su utilización es promisoría, partiendo además de la base que la naturaleza ha proporcionado ciertas bases sintéticas que pueden ser aprovechadas, y no solamente “destruidas” completamente para proporcionar energía, como es el caso de la quema de la biomasa lignocelulósica o de alguna de sus fracciones.

Es interesante destacar las previsiones de acuerdo con el World Energy Outlook 2020, donde se previó una caída del 5 % en la demanda mundial de energía debida a la pandemia Covid-19, pero recayendo principalmente en las energías no renovables con un leve aumento en las energías renovables. Sin embargo, esto parece revertirse en el 2021 donde se espera un crecimiento significativo de los combustibles fósiles. De hecho, se espera que solamente la demanda de carbón para el 2021 respecto al 2020 se incremente un 60 % más que todas las renovables combinadas, aumentando en un 5 % las emisiones de CO₂ (Figura 2) (International Energy Agency, 2021).

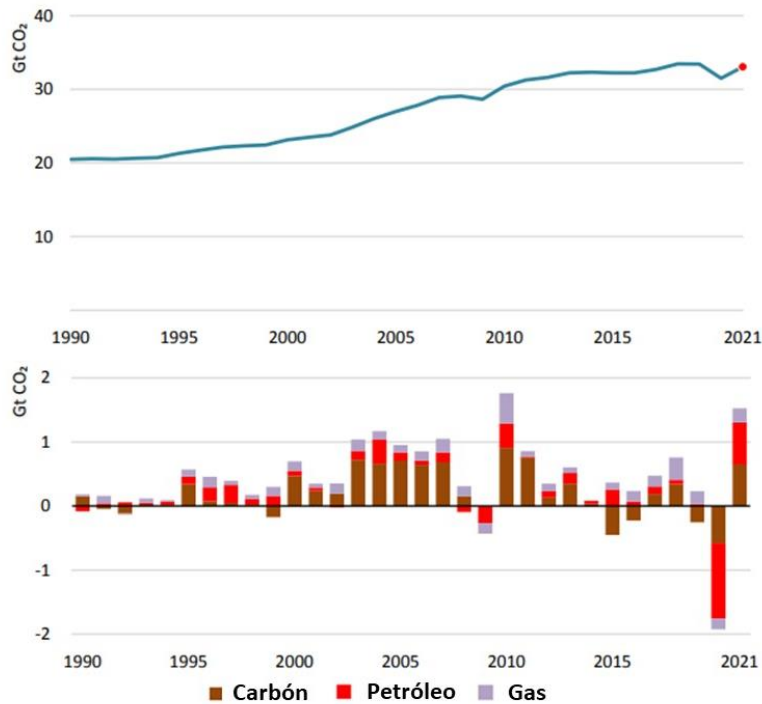


Figura 2. Emisiones globales de CO₂ relacionadas con la energía, 1990-2021, y el cambio en las emisiones de CO₂ según combustible. Tomado de (*International Energy Agency, 2021*)

Aunque muchas previsiones deban requerir actualización debido a los problemas imprevistos generados por la pandemia de Covid-19, el Banco Interamericano de Desarrollo estimaba un crecimiento de la demanda energética para América Latina y el Caribe de un 75 %, correspondiendo la energía producida a partir de fuentes renovables la mitad de esa demanda total (Herrera, de la Rúa y Lechón, 2015).

1.1.2 Biocombustibles en el contexto global

Los biocombustibles son combustibles que son producidos actualmente a partir de biomasa, donde la biomasa es material de origen biológico excluyendo el material que se encuentra incrustado en formaciones geológicas que dan origen a los combustibles fósiles (FAO, 2006). Bioetanol y biodiésel son los dos biocombustibles más comúnmente producidos a nivel mundial y que pueden ser usados en general sin mayores inconvenientes en los automotores que usan combustibles fósiles (Liu y otros, 2021). En el caso del bioetanol, las mezclas de hasta 10 % de bioetanol en gasolina pueden ser utilizadas por cualquier motor de gasolina o nafta (si el porcentaje es mayor a 10 % se

debe utilizar un vehículo “combustible flexible”), mientras que en el caso del biodiésel cualquier mezcla puede ser usada en los motores biodiésel (US Energy Information Administration, 2020; Susmozas y otros, 2020).

Los principales productores de bioetanol son Estados Unidos y Brasil que abarcan el 84 % del mercado global, siendo casi todo el bioetanol producido a partir de maíz para Estados Unidos y a partir de caña de azúcar para Brasil (Figura 3) (US Department of Energy; Alternative fuels data center, 2021). Se prevé que China aumente su porcentaje de participación en la producción de bioetanol en los próximos años (Renewable Fuels Association, 2021; Wu y otros, 2021).

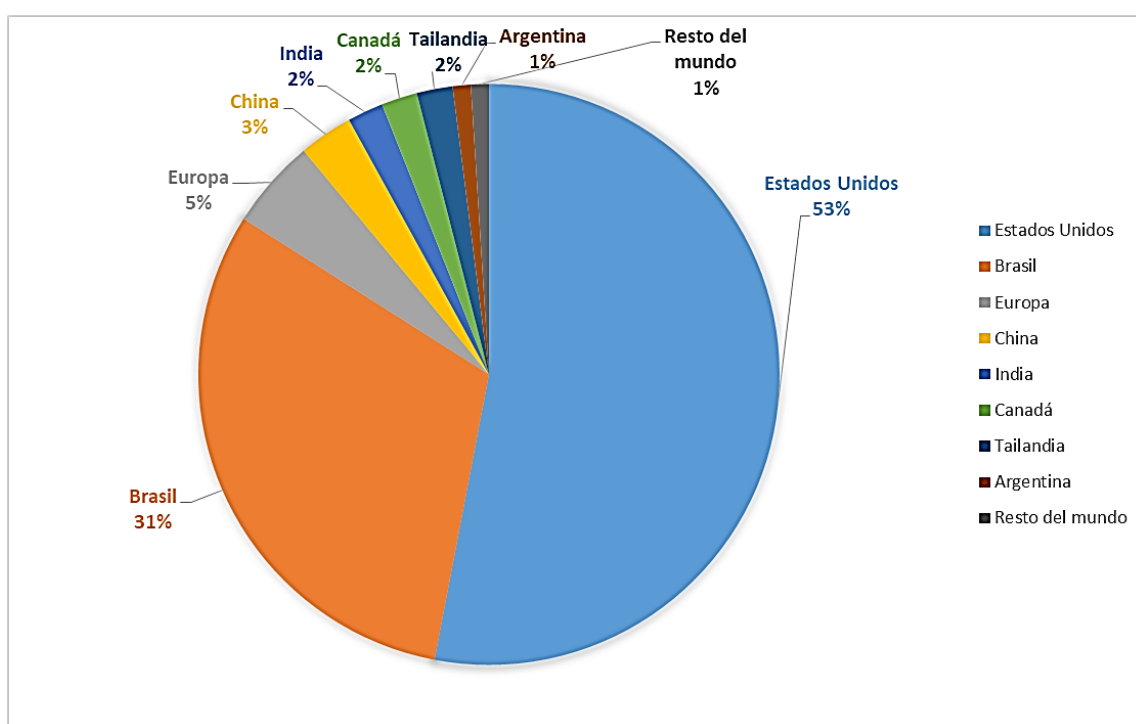


Figura 3. Porcentaje de participación en la producción mundial de etanol (*Renewable Fuels Association, 2021*)

La producción de bioetanol puede clasificarse según la biomasa utilizada (y que coincide con su orden de aparición histórico), por lo que se pueden dividir en primera, segunda, tercera y cuarta generación de bioetanol, estando estas dos últimas todavía en fase de laboratorio y deben solucionarse diversos problemas antes de su aplicabilidad (Figura 4) (Mat Aron y otros, 2020).

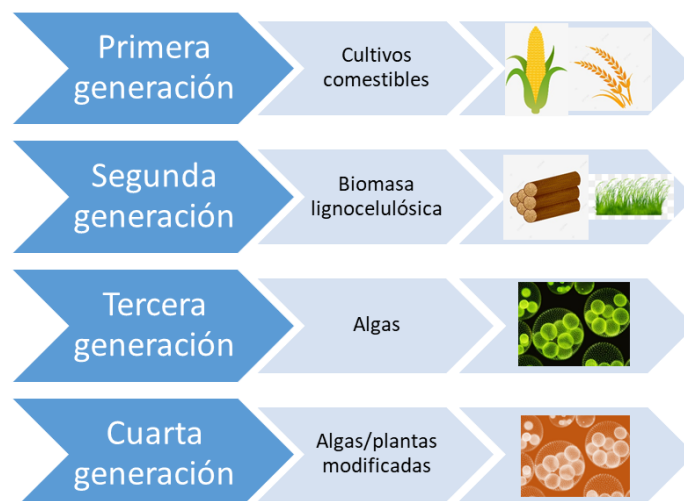


Figura 4. Distintas generaciones de producción de bioetanol y las materias primas involucradas

En el caso de bioetanol de primera generación, los combustibles se producen a partir de biomasa rica en azúcares y almidón como granos y maíz, soja, caña de azúcar, etc (Mohanty y Swain, 2019). En general el alto costo de esta materia prima, más el problema ético que supone usar biomasa que puede ser utilizada para alimentos, resultan dos grandes problemas para la utilización de esta tecnología que deben ser evaluados (Paschalidou y otros, 2018). Sumado a esto, otro problema importante que se ha encontrado en la generación de biocombustibles a partir de estas especies es que se ha afectado negativamente la biodiversidad global (Elshout y otros, 2019). Tanto Estados Unidos como Brasil, los mayores productores de bioetanol, producen bioetanol de primera generación utilizando como principales materias primas maíz y caña de azúcar, respectivamente (Osman y otros, 2021).

La segunda generación de bioetanol se produce a partir de biomasa lignocelulósica, que es la biomasa más abundante en el mundo. La producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica requiere mayor equipamiento y en general la tecnología es más avanzada respecto a la primera generación de bioetanol. Este proceso en general requiere de una o varias etapas de pretratamiento, una hidrólisis enzimática de la celulosa para obtener la glucosa fermentable, la fermentación de la glucosa para producir etanol, y finalmente las etapas de destilación, rectificación o deshidratación (Figura 5) (Gupta y otros, 2019).

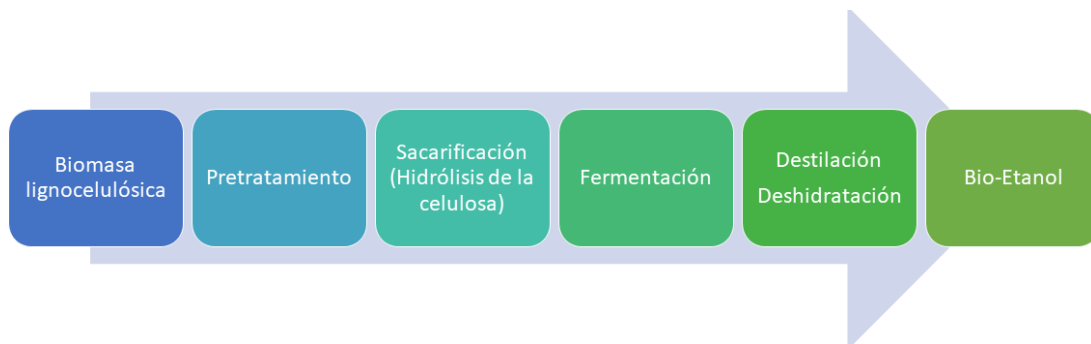


Figura 5. Esquema de la producción de bioetanol de segunda generación.

Una tercera generación de biocombustibles se está investigando usando principalmente microalgas y macroalgas, aunque aún se encuentra en fase de laboratorio y se deben solucionar diferentes problemas (Río y otros, 2019; Chong y otros, 2020). De forma similar, últimamente se ha comenzado a sugerir la posibilidad de una cuarta generación de biocombustibles. En la cuarta generación los biocombustibles son producidos directamente a partir de plantas especialmente diseñadas y no es necesario una deconstrucción de la biomasa, sino que directamente usan energía solar para producir biocombustible, en lo que se puede llamar combustibles solares fotobiológicos (Bajpai, 2021; Mehmood y otros, 2021).

1.1.3 Biocombustibles en el contexto de Uruguay

En Uruguay, la refinación e importación de hidrocarburos y derivados del petróleo es realizada por la empresa pública ANCAP (Administración Nacional de Combustibles, Alcohol y Portland). Si bien se no posee el monopolio de producción y exportación de alcoholes, ANCAP es la única empresa productora de bioetanol.

Históricamente, la matriz energética de Uruguay ha presentado una importante dependencia de los combustibles fósiles importados, hasta que a partir del año 2005 se produjo un cambio de paradigma iniciándose una importante transformación tanto en el sector eléctrico como en el reemplazo de derivados del petróleo en el transporte. La aprobación de la ley 18195 “Agrocombustibles” en el año 2007 establece porcentajes mínimos de incorporación de biocombustibles a los combustibles fósiles (5 % de etanol en gasolinas y 5 % de biodiésel en gasoil), fomentando y regulando la producción, comercialización y utilización de los biocombustibles (IMPO, 2007). Esta ley, además de buscar la disminución de la dependencia en el petróleo y diversificar la matriz energética,

busca la disminución de los gases de efecto invernadero y nocivos para la salud. También busca el impulso del desarrollo de cadenas agroindustriales en distintas regiones del país.

En concordancia con esta ley, ANCAP llevó adelante un Programa de Biocombustibles y en ese marco creó la empresa ALUR. Esta empresa produce desde el año 2009 etanol a partir de caña de azúcar y de sorgo dulce en Bella Unión (departamento de Artigas) y desde el 2014 etanol a partir de cereales en Paysandú y biodiésel a partir de oleaginosas, sebo vacuno y aceite recuperado en la zona metropolitana de Montevideo. En la misma línea, en el 2016 se creó en conjunto entre Latitud (Fundación LATU) y ANCAP el Centro de Investigación y Desarrollo en Biocombustibles de Segunda Generación (CIDEB), que se encuentra dentro de las instalaciones del LATU.

1.1.4 Biorrefinerías

Si bien la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica es uno de los motores en la utilización de biomasa, también se debe considerar que existen otras posibilidades de productos. En este sentido, el máximo aprovechamiento de la biomasa es una estrategia que contribuye no solo en la ecuación económica al posibilitar obtener mayor variedad de productos, sino que también es ambientalmente más amigable (Banu y otros, 2021). De forma similar a la existencia de refinería de petróleo, donde varios productos son obtenidos, en lo que tiene que ver con la biomasa el concepto que abarca este máximo aprovechamiento es el de biorrefinería (Figura 6) (Ubando, Felix y Chen, 2020). Además de generar múltiples productos, la utilización de distintas materias primas que aseguren la demanda de la biorrefinería es otro aspecto positivo en este esquema (Zhang y otros, 2018).



Figura 6. Esquema de producción de valor a partir de biomasa lignocelulósica en un marco de biorrefinería.

La implementación de una biorrefinería conlleva una serie de impactos en aspectos medioambientales, sociales y económicos, principalmente beneficiosos, aunque también deben tenerse en cuenta posibles peligros o amenazas. Por otra parte, aunque estas tres dimensiones (medioambiental, económica, social) se suelen considerar por separado para simplificar el análisis, sin lugar a dudas están estrechamente interrelacionadas y donde las tres dimensiones resultan positivas es que se propone un proceso sustentable (Figura 7) (Tuazon, Corder y McLellan, 2013).

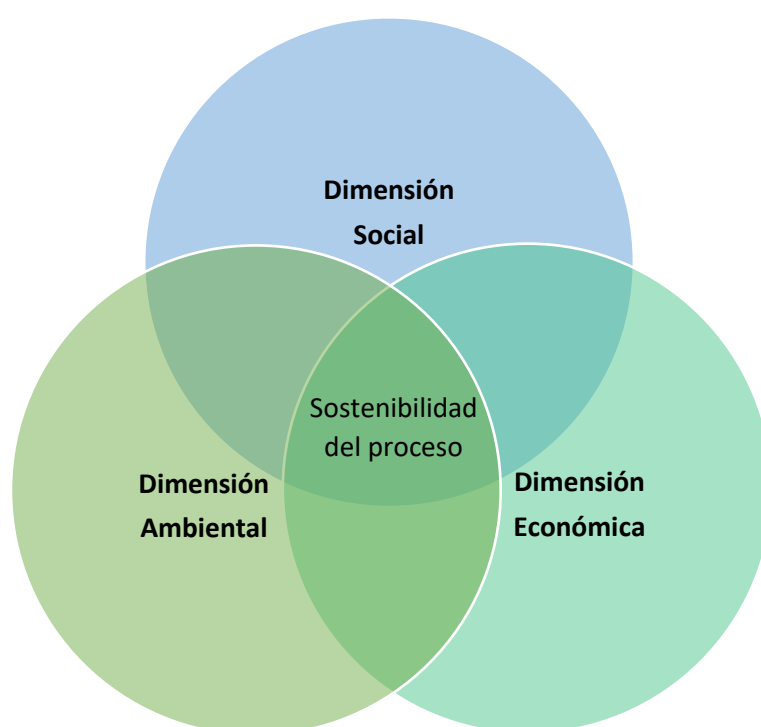


Figura 7. Interconexión entre las tres dimensiones o pilares de la sostenibilidad de las biorrefinerías.

1.1.5 Dimensión económica

Uno de los principales objetivos en la producción de bioproductos es que el proceso tenga la capacidad de convertir la biomasa en productos de valor a precios que puedan competir con aquellos derivados de fuentes fósiles. Los costos de producción de bioproductos varían por región, tipo de biomasa, logística de suministros, la tecnología de conversión, la escala de producción y el tiempo de producción durante el año (Mussatto y Bikaki, 2016).

El análisis de la dimensión económica en la sustentabilidad se realiza utilizando información relacionada con balances de masa y energía, requerimientos operativos, y equipamiento del proceso, generalmente utilizando parámetros económicos, como son el período de recuperación o amortización, valor actual neto y tasa interna de retorno (Solarte-Toro y otros, 2021). Diversos autores han realizado análisis tecno-económicos de la implementación de biorrefinerías para producción de bioetanol de segunda generación y otros bioproductos, dependientes fundamentalmente del proceso utilizado y la materia prima, pero en general con resultados satisfactorios y con gran potencial para ser usados (García-Velásquez y Cardona, 2019; Fonseca, Costa y Cruz, 2020; Alves y otros, 2017)

Como fue dicho anteriormente, las distintas dimensiones se encuentran interconectadas, y es interesante destacar algunos aspectos que contribuyen positivamente en la viabilidad económica de las biorrefinerías, que tienen su origen en demandas o impulsos no necesariamente económicos. Por ejemplo, la tendencia a la innovación dentro de este campo, junto con la demanda de productos “verdes” por parte de los consumidores, conlleva mejoras laborales y un crecimiento inclusivo, lo que impulsa la viabilidad económica junto con beneficios sociales y ambientales (Giurca y Späth, 2017).

Finalmente, puede considerarse como un atractivo para la implementación de biorrefinerías el hecho de que la biomasa lignocelulósica es una fuente relativamente barata y renovable para la producción a gran escala de combustibles, y más si se toma en cuenta los residuos forestales que no son utilizados en otros emprendimientos, como los residuos de industrias de la celulosa o de transformación mecánica de la madera, pero también se debe tener en cuenta que la naturaleza recalcitrante de la biomasa hace inevitable el pretratamiento, lo que incrementa el costo o inversión necesaria (Chandel y otros, 2018) .

1.1.6 Dimensión ambiental

El análisis de los impactos ambientales se realiza generalmente mediante la evaluación del ciclo de vida, o *Life Cycle Assessment* (LCA). En este análisis se consideran los impactos ambientales en todo el ciclo de vida del producto específico, monitoreando la energía y materiales utilizados desde el inicio de su producción hasta su disposición final junto con los productos y procesos relacionados en la cadena de producción (Ansarinasab, Mehrpooya y Sadeghzadeh, 2021). En este sentido, los distintos análisis llevados a cabo

destacan los beneficios sustanciales de las biorrefinerías frente a la contraparte fósil (Zucaro, Forte y Fierro, 2018; Chrysikou, Bezergianni y Kiparissides, 2018; Wietschel, Messmann y Tuma, 2021; Wang y otros, 2020).

Las principales ventajas están en la disminución de la dependencia en los combustibles fósiles, junto con disminución de la emisión de gases de efecto de invernadero o en la disminución el calentamiento global, así como reducción de desperdicios por usar un enfoque de biorrefinería (Parada, Osseweijer y Duque, 2017). Sin embargo, otros aspectos de la sostenibilidad ambiental también deben tenerse en cuenta, como ser la posible pérdida de biodiversidad, la erosión del suelo y eutrofización (Efroymsen y otros, 2013; Nogueira y otros, 2021).

Desde el punto de vista de la oferta de biomasa, existen diferentes impactos ambientales que deben ser evaluados. La ubicación geográfica, el tipo de cultivo, el sistema de producción y sistema de gestión agrícola influye en el método de cosecha y sistema de labranza, y todo esto impacta en el medio ambiente (Posada y Osseweijer, 2016). Algunas especies presentan características especiales que las hacen interesantes para su utilización en biorrefinerías. En un estudio comparativo de la huella de carbono evaluando las actividades asociadas entre plantaciones de maíz, trigo, sorgo y switchgrass, se concluyó que switchgrass presentó las menores emisiones de gases de efecto invernadero, que junto con sus propiedades de alto secuestro de carbono orgánico del suelo y bajos niveles de erosión, lo hacen una opción interesante para su uso en sistemas agrícolas del Uruguay (Bustamante, Siri-Prieto y Carrasco-Letelier, 2020).

1.1.7 Dimensión social

Además de los impactos económicos y ambientales asociadas a la producción de biocombustibles y otros productos a partir de biomasa lignocelulósica, también es conveniente señalar los efectos sociales que conlleva esta actividad. En 2017, el Ministerio de Industria, Energía y Minería del Uruguay (MIEM) junto con la empresa ALUR (Alcoholes del Uruguay), llevaron a cabo un estudio de los impactos socio-económicos asociados con la producción de bioetanol (Rodríguez y otros, 2017). Estos autores destacaron en particular la generación de empleo asociado a la producción bioetanol, mediante la activación de sectores como respuesta a la producción de bioetanol, así como el empleo generado directamente en las distintas fases, agrícola, producción de planta, entre otras actividades.

Diversos estudios han evaluado aspectos como la reducción de la migración rural, así como un aumento del PBI municipal y regional donde la producción de bioetanol ha tenido lugar (Satolo y Bacchi 2013; Caldarelli, Moraes y Paschoalino, 2017; Kaenchan y otros, 2019). En el mismo sentido, la integración de actividades agrícolas (siembra, riego, cultivo, cosecha, rotación de cultivos) y el procesamiento industrial de la biomasa para producción de bioetanol también ha generado un aumento en diversos indicadores de desarrollo, como es la reducción de la pobreza, educación, aumento no solo en los niveles de empleo sino también en calidad y salarios, así como fomentar la igualdad de género en el empleo (Posada y Osseweijer, 2016; Wang, Osseweijer y Duque, 2017).

1.2 Biomasa Lignocelulósica

1.2.1 Introducción

La biomasa lignocelulósica constituye la fuente de material renovable más grande de la Tierra, y comprende residuos de la agricultura o agroindustriales, cultivos energéticos, material leñoso, y residuos de la actividad humana como desechos municipales (Merklein, Fong y Deng, 2016; Mussatto y Dragone, 2016; Nanda y otros, 2015). Los residuos agroindustriales pueden ser rastrojo de maíz, paja de trigo, cáscara de arroz, entre otros (Volynets, Ein-Mozaffari y Dahman, 2017). Los cultivos energéticos son materiales especialmente dedicados para la producción de combustibles de segunda generación debido a que poseen alta productividad de biomasa como el switchgrass o pasto varilla, *Miscanthus*, *Phleum pratense* o “*Timothy grass*” y otros, (Yousuf, Pirozzi y Sannino, 2020). Dentro del material leñoso en general se distingue entre madera dura (*hardwood*, angiospermas no monocotiledóneas, como eucalipto) y madera blanda (*softwood*, gimnospermas, coníferas) (Sixta, 2006). La producción de biomasa lignocelulósica mundial se estima en casi 182 mil millones de toneladas por año (Dahmen y otros, 2019).

Los mayores componentes de la biomasa lignocelulósica son celulosa, hemicelulosa y lignina (Tabla 1). De forma esquemática, la celulosa forma una matriz a modo de esqueleto, que es rodeada e incrustada en las hemicelulosas y lignina. La celulosa, un homopolímero lineal de glucosa en la forma de D-anhidroglucopiranosas unida mediante enlaces glicosídicos β -1,4, se agrega por medio puentes inter e intra-moleculares formando las fibrillas que a su vez se combinan en microfibrillas (que a su vez se pueden agregar formando macrofibrillas). Las hemicelulosas se asocian y orientan a lo largo de la celulosa mientras que la lignina es isotrópica (es decir, que no se orienta en ningún

sentido) y rodea tanto a las hemicelulosas como la celulosa (Daniel, 2009). El largo de las fibrillas depende de las distintas especies y el grado de polimerización de la celulosa, mientras que en general se ha estimado su diámetro de 1,5 nm a 3 nm (Figura 8) (Altaner y Jarvis, 2008; Jiang y otros, 2018). Los tres componentes principales se encuentran estrechamente interconectados, no solo a nivel físico, sino también existen enlaces químicos entre ellos formando los complejos lignocelulósicos.

Tabla 1. Resumen esquemático de la composición química de varias biomasas. Adaptado de (Volynets, Ein-Mozaffari y Dahman, 2017; Yousuf, Pirozzi y Sannino, 2020)

Biomasa	Celulosa (%, m/m)	Hemicelulosa (%, m/m)	Lignina (%, m/m)
Residuos de agricultura			
Rastrojo de maíz	35-37	20-31	18-23
Paja de trigo	33-40	20-25	15-20
Cáscara de arroz	36-49	22-33	16-17
Cultivos energéticos (p. ej. switchgrass)	25-40	25-50	10-32
Maderas			
Blandas	39-50	20-35	25-35
Duras	45-55	24-40	18-27

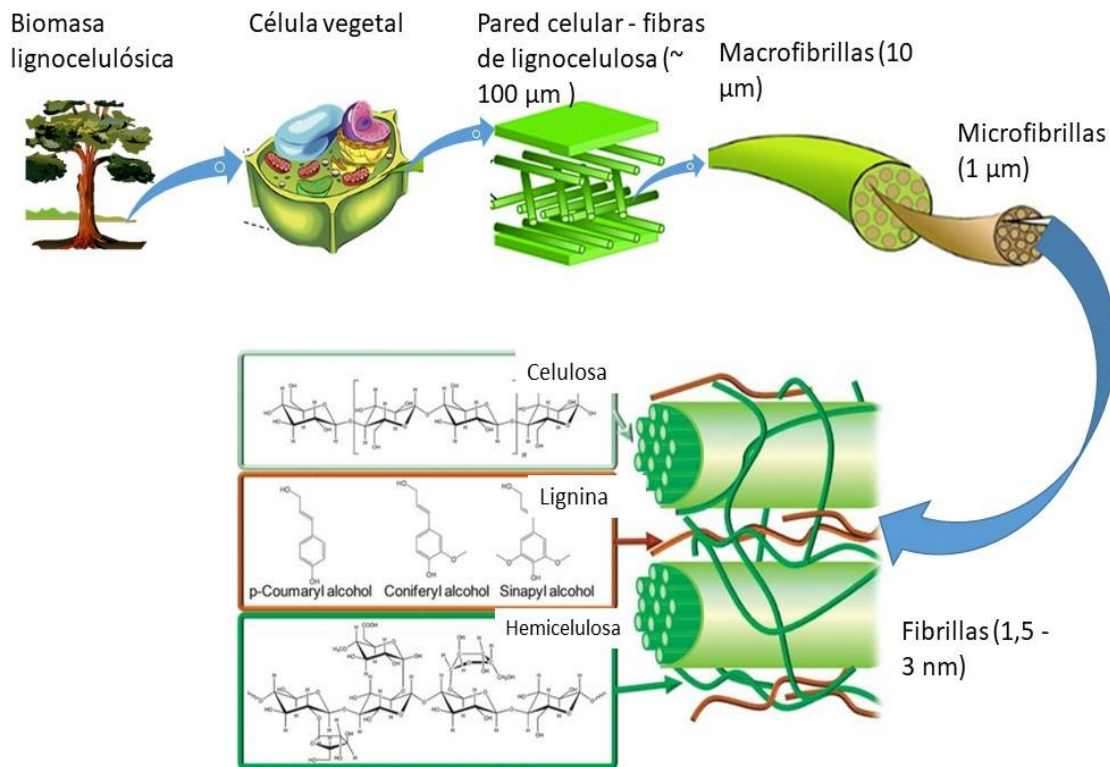


Figura 8. Estructura de biomasa lignocelulósica con celulosa, hemicelulosa y lignina representadas. Adaptado de (Alonso, Wettstein y Dumesic, 2012; Owonubi y otros, 2021; Miyashiro, Hamano y Umemura, 2020)

1.2.2 Celulosa

La celulosa es el polímero orgánico más abundante de la Tierra y es producida por plantas, algas, ciertos tipos de bacterias, y tunicados, una familia de animales marinos (los únicos animales conocidos capaces de producir celulosa) (Vazquez y otros, 2015; Djalal y otros, 2020). Aunque la función de la celulosa en estos organismos es siempre mecánica, pueden existir algunas diferencias relativas a la ubicación: en plantas, Oomycetes y en algunas bacterias, la celulosa se encuentra en la pared celular, en los tunicados la celulosa se encuentra rodeando al animal, y en las bacterias *Acetobacter* la celulosa es producida como fibrillas extracelulares formando hojas donde la bacteria flota (Moon y otros, 2011; Henriksson y Lennholm, 2009).

La celulosa es un homopolímero de unidades de D-anhidroglucopiranososa -aunque también es referida como un polímero de anhidroglucosa o glucopiranososa- unida por

enlaces glicosídicos β -1,4 (Eyley y Thielemans, 2014). La anhidroglucopiranososa tiene grupos hidroxilos en C-2, C-3 y C-6. En la celulosa, la anhidroglucopiranososa terminal con un hidroxilo libre en C-4 es el extremo no reductor, mientras que la glucosa terminal con el C-1 libre en forma de hemiacetal es el extremo reductor. La conformación de la celulosa es una silla 4C_1 , con los hidroxilos libres en el plano ecuatorial y los átomos de hidrógeno en el plano axial, como se ve en la Figura 9 (Klemm y otros, 1998). Como cada uno de los residuos de glucosa están rotados 180° respecto a la anterior unidad de glucosa, la unidad repetitiva está basada en la celobiososa, lo que explica en parte la rigidez de la celulosa. La polimerización de la celulosa puede ir desde 5000 unidades de glucosa hasta 15000 unidades, lo que hace a la celulosa uno de los polisacáridos más largos conocidos (Mussatto y Dragone, 2016; Henriksson y Lennholm, 2009).

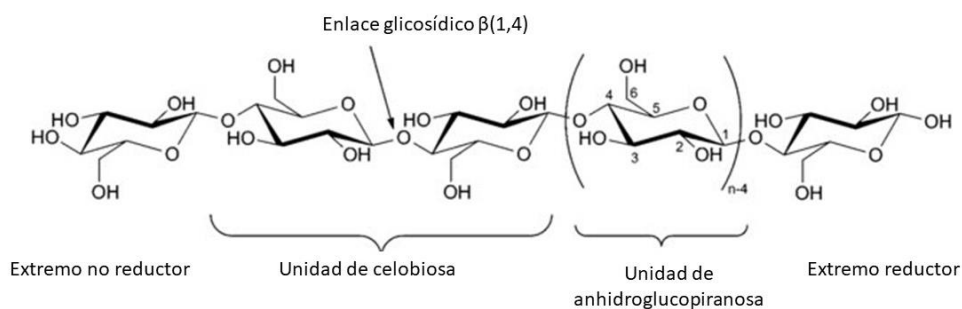


Figura 9. Representación de la estructura molecular de la glucosa. También se muestran la numeración de los átomos de carbono y enlace glicosídico. (Adaptado de (Eyley y Thielemans, 2014))

La celulosa presenta otros niveles superiores de estructura que le aportan mayor complejidad al sistema. En lo que supone ser la estructura secundaria, la existencia de puentes de hidrógeno intermoleculares (entre los hidroxilos de C6 y C2 y entre el oxígeno en C5 y el hidroxilo en C3) aportan mayor rigidez a la molécula y estabilizando el enlace glicosídico. Entre las distintas cadenas de celulosa también existen puentes de hidrógeno formando *hojas* (Figura 10). Estas hojas también interactúan entre sí, pero no mediante puentes de hidrógeno, sino mediante enlaces de van der Waals pudiendo formar dos formas cristalinas diferentes, celulosa I_α y I_β (Henriksson y Lennholm, 2009). La diferencia entre estas dos formas cristalinas de la celulosa radica en la disposición de las unidades de glucosa al apilarse las hojas de celulosa (Figura 11). Aunque las dos formas cristalinas I_α y I_β coexisten, la I_β es termodinámicamente más estable en la biomasa

lignocelulósica y es por lo tanto la que se encuentra en forma mayoritaria, mientras que la forma I_{α} es la predominante en la celulosa bacteriana y de algas (Yuan y Cheng, 2015; Klemm y otros, 1998).

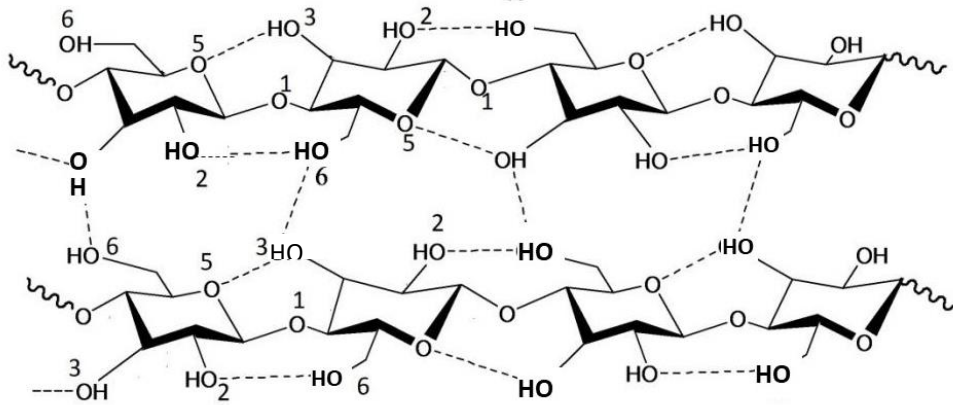


Figura 10. Enlaces inter e intramoleculares de la celulosa. Adaptado de (Yuan y Cheng, 2015)

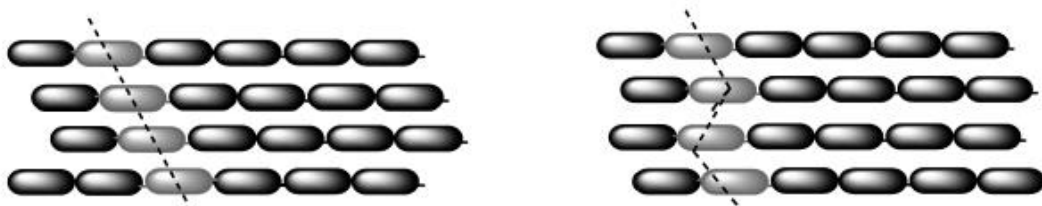


Figura 11. Diferencia de apilamiento de las hojas o capas de celulosa para formar celulosa I_{α} (izquierda) o I_{β} (derecha). Tomado de (Henriksson y Lennholm, 2009)

1.2.3 Hemicelulosa

La denominación hemicelulosa comprende aquellos polisacáridos que pueden ser extraídos de la biomasa vegetal con solución alcalina, según fue propuesto originalmente por Schulze en 1891 (Norris y Preece, 1930).

Las hemicelulosas son el segundo polisacárido más abundante luego de la celulosa y contribuyen con las propiedades mecánicas de la pared celular, funcionando como una interfase entre celulosa y lignina facilitando la incrustación de las fibrillas. Es posible que las hemicelulosas contribuyan con el mantenimiento del espaciado de las fibrillas, regulando la porosidad y resistencia de la pared celular. También pueden contribuir con

la humedad de equilibrio de la planta o árbol, así como mantener la conformación tridimensional de la pared celular por los enlaces interfibrilares de los polisacáridos. (Teleman, 2009).

Son un tipo de heteropolisacáridos con estructuras complejas formados por pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa) y algunos ácidos urónicos (4-O-metil-D-glucurónico, ácido glucurónico, y ácido galacturónico), con presencia de grupos acetilos (Figura 12). El grado de polimerización se encuentra generalmente en las 100-200 unidades (Rowell, Pettersen y Tshabalala, 2012).

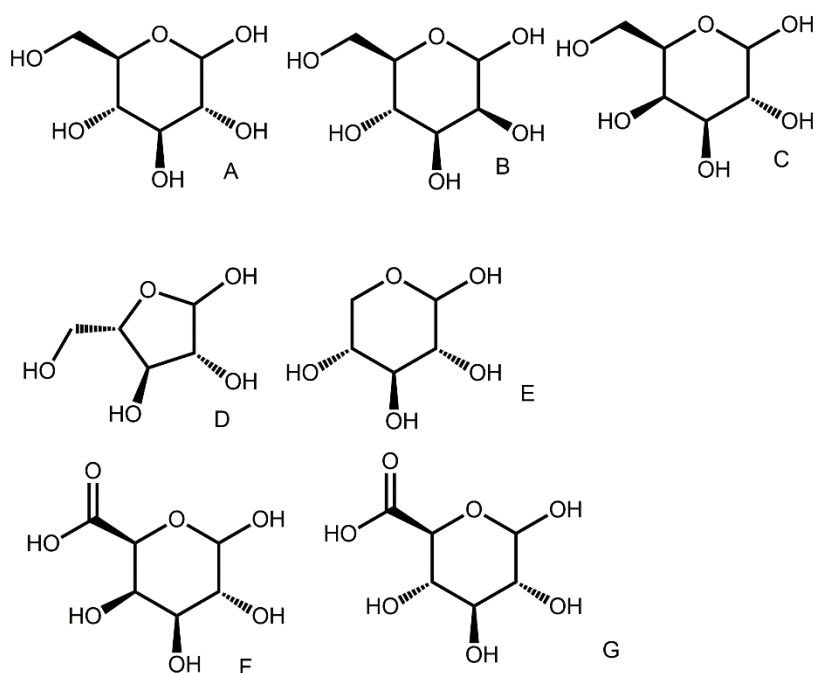


Figura 12. Componentes principales de las hemicelulosas. A= D-glucopiranososa; B= D-manopiranososa; C= D-galactopiranososa; D= L-arabinofuranososa; E= D-xilopiranososa; F= ácido D-glucurónico; G= ácido D-galacturónico

Las hemicelulosas comúnmente están formadas por más de un tipo de unidad de azúcar y se puede referir a ellas según los azúcares que contienen como glucuronoxilano, arabinoglucuronoxilano, galacto-glucomanano, arabinogalactano, etc. (Ren y Sun, 2010). En la Tabla 2 se detallan y representan distintos tipos de hemicelulosas que se pueden encontrar en las biomasas lignocelulósicas.

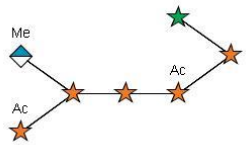
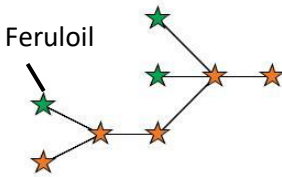
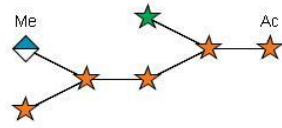
Forman puentes de hidrógeno con la celulosa y enlaces covalentes con la lignina (formando los complejos lignina carbohidratos) (Ren y Sun, 2010). La falta de algunos grupos hidroxilo respecto a la celulosa –por ejemplo, como en el caso del xilano, donde

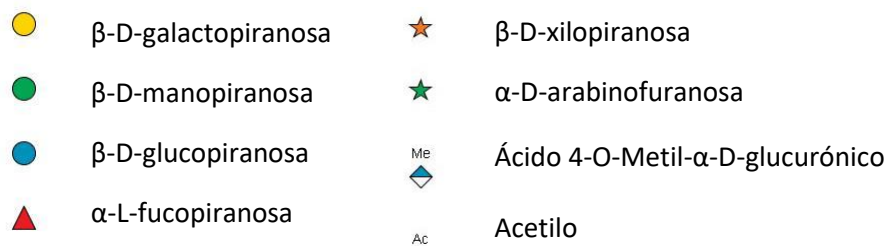
no hay O-6-, además de las conformaciones espaciales de las distintas unidades de azúcares, junto con las distintas ramificaciones, reduce las posibilidades de interacción para la formación de puentes de hidrógeno, haciendo que las hemicelulosas sean más flexibles que la celulosa, y disminuyendo las interacciones largas e ininterrumpidas. (Jarvis, 2011; Altaner y Jarvis, 2008; Khodayari y otros, 2021).

En el caso de las angiospermas o maderas duras (*hardwood*) las hemicelulosas principales son (4-O-metil-D-glucuronopiranosil)-D-xilanos parcialmente acetilados, que en general se denominan simplemente como xilanos (Ren y Sun, 2010). Se estima que en este tipo de hemicelulosas existe una ramificación con el grupo ácido metilglucurónico cada 8 a 20 unidades de xilosa, además de 4 a 7 grupos acetilo por cada 10 unidades de xilanos (Teleman, 2009).

Tabla 2. Principales tipos de hemicelulosas en distintas biomazas lignocelulósicas. Adaptado de (Gírio y otros, 2010; Botto, 2018)

Tipo de polisacárido	Origen	Cantidad (% base seca)	Cadena principal	Sustituyentes	Tipos de unión	Grado Polimerización	Representación esquemática
Arabinogalactano	Gimnospermas (madera blanda, <i>softwood</i>)	1-3; 35	β -D-Galp	β -D-Galp α -L-Araf β -D-Arap	β -(1 \rightarrow 6) α -(1 \rightarrow 3) β -(1 \rightarrow 3)	100-600	
Xiloglucano	Angiospermas (madera dura), pastos	2-25	β -D-Glcp β -D-Xilp	β -D-Xilp β -D-Galp α -L-Araf α -L-Fucp Acetil	β -(1 \rightarrow 4) α -(1 \rightarrow 3) β -(1 \rightarrow 2) α -(1 \rightarrow 2) α -(1 \rightarrow 2)		
Galactoglucomanano	Gimnospermas	10-25	β -D-Manp β -D-Glcp	β -D-Galp Acetil	α -(1 \rightarrow 6)	40-100	
Glucomanano	Angiospermas y gimnospermas	2-5	β -D-Manp β -D-Glcp			40-70	
Glucuronoxilano	Angiospermas	15-30	β -D-Xilp	4-O-Me- α -D-GlcpA Acetil	α -(1 \rightarrow 2)	100-200	

Arabinoglucuronoxilano	Pastos y cereales, gimnospermas	5-10	β -D-Xilp	4-O-Me- α -D-GlcpA β -L-Araf	α -(1 \rightarrow 2) α -(1 \rightarrow 3)	50-185	
Arabinoxilano	Pastos y cereales	0.15-30	β -D-Xilp	α -L-Araf Feruloil	α -(1 \rightarrow 2) α -(1 \rightarrow 3)		
Glucuronarabinoxilano	Pastos y cereales	15-30	β -D-Xilp	α -L-Araf 4-O-Me- α -D-GlcpA Acetil	α -(1 \rightarrow 2) α -(1 \rightarrow 3)		



Además de la variabilidad natural de hemicelulosas, también existen diferencias según sea madera joven o tardía, así como diferencias por reacción a las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, el contenido de hemicelulosas de la madera difiere si es madera de compresión o de tensión (Rowell, Pettersen y Tshabalala, 2012).

1.2.4 Lignina

La lignina es el biopolímero no carbohidrato más abundante de la biomasa lignocelulósica, que otorga rigidez, resistencia mecánica e hidrofobicidad a la pared celular de las plantas, funciona como “pegamento” de las células en los diferentes tejidos de la madera, y al mismo tiempo protege los polisacáridos del ataque microbiano (Vanholme y otros, 2010; Henriksson, 2009). Es un biopolímero tridimensional aromático complejo, resultante principalmente de la polimerización de las unidades siringil (S), guaiacil (G) y *para*-hidroxifenil (H), que a su vez derivan de los monolignoles (o hidroxicinamil alcoholes) sinapil, coniferil y *p*-cumaril. Además de estos monolignoles comunes también existen otros menos comunes, como el ácido ferúlico, coniferaldehído, alcohol coniferil y monolignoles acilados (Figura 13) (Yoo y otros, 2020; Lu y Ralph, 2010).

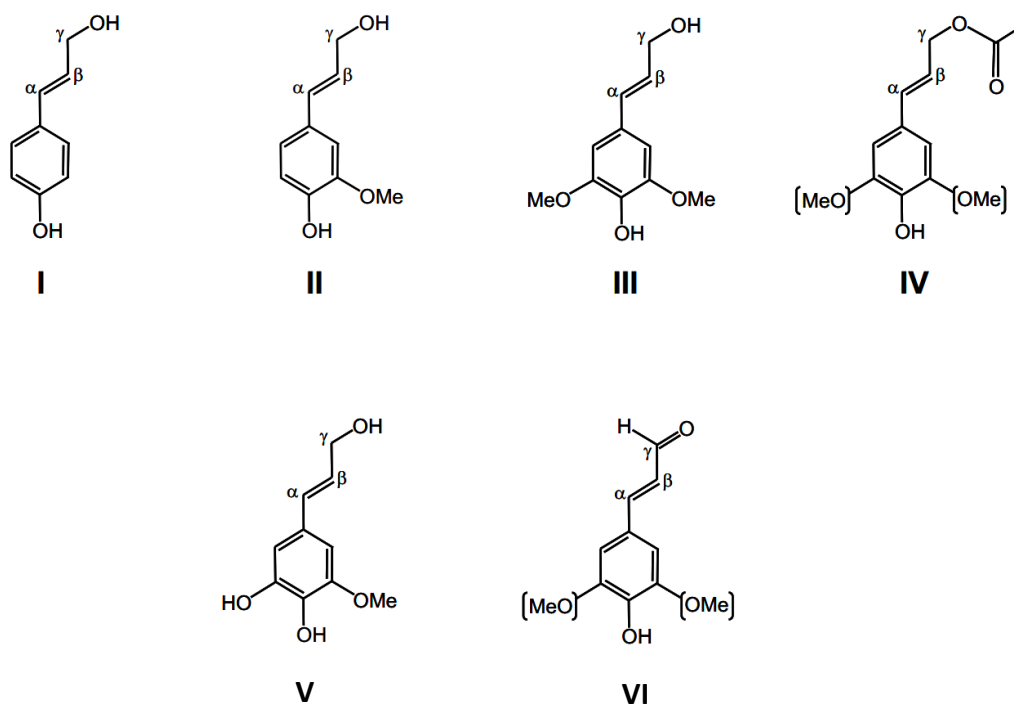


Figura 13. Compuestos monoméricos encontrados en la lignina. (I) Alcohol *p*-cumarílico; (II) Alcohol *p*-coniferílico; (III) Alcohol sinapílico; (IV) Derivados acetilados de los

alcoholes anteriores; (V) Alcohol 5-hidroxiconiferílico; (VI) los aldehídos correspondientes a los tres primeros alcoholes. Tomado de (Rencoret, 2008)

Parte de la complejidad de la lignina radica en la irregularidad de su estructura, así como la variabilidad de esta dependiendo de su origen, o incluso cuestiones circunstanciales en el crecimiento de la planta, como pueden ser vientos fuertes o ataques de patógenos (R.-C. Sun, 2020; Lu y Ralph, 2010). Las unidades fenilpropanoides presentan enlaces característicos entre las distintas unidades, siendo las uniones β -O-4, β -5, β - β y 5-5 las más comunes, aunque existen variadas uniones entre las distintas unidades (Figura 14). Los distintos enlaces se combinan en la molécula de lignina para formar una compleja red tridimensional (Figura 15)

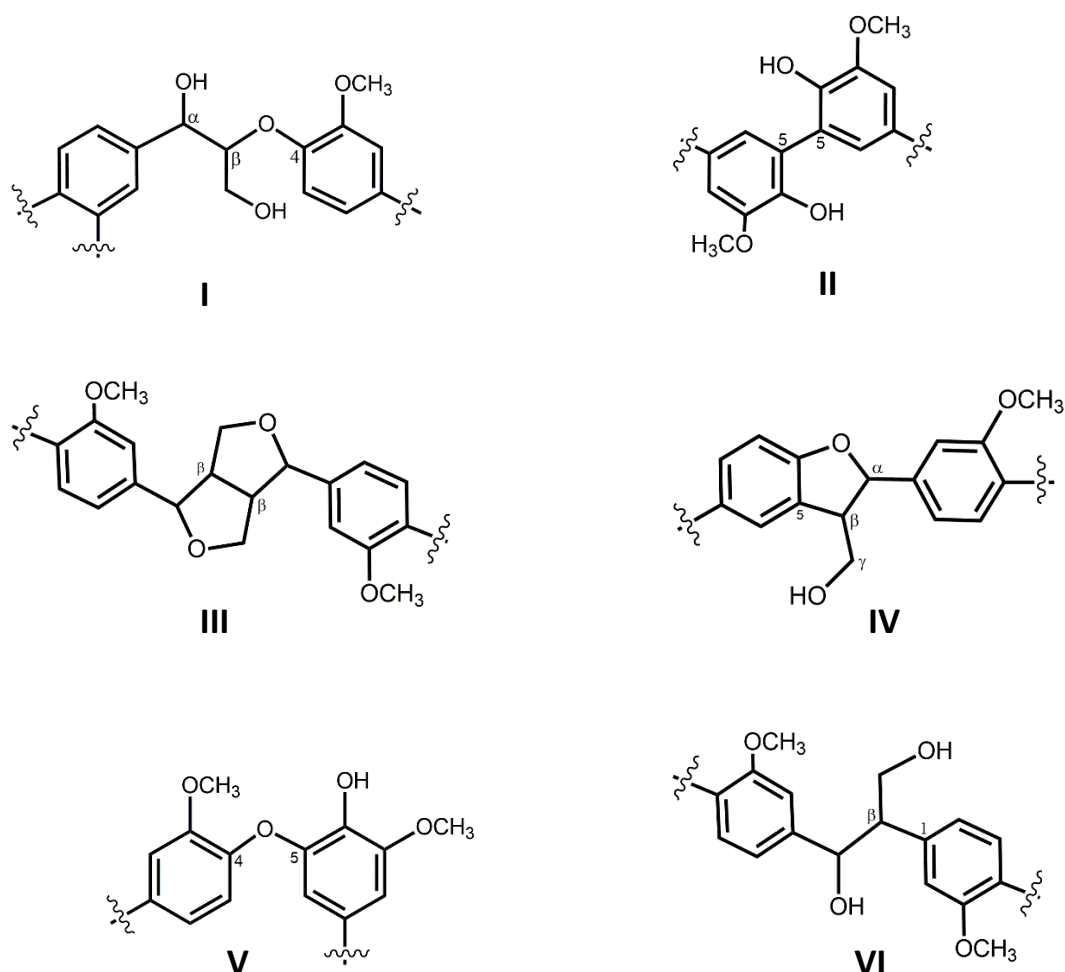


Figura 14. Enlaces más comunes entre las distintas subunidades de lignina y su nomenclatura. I: enlace β -O-4 (β -O-aril éter); II: enlace 5-5 (bifenil); III: enlace β - β (resinol); IV: enlace β -5 (fenilcumarano); V: enlace 4-O-5 (diaril éter); VI: β -1 (1,2-diarylpropano). Adaptado de (Henriksson, 2009; R.-C. Sun, 2020; Nasrullah y otros, 2017).

Como se puede observar en las figuras anteriores la nomenclatura generalmente utilizada en las unidades de fenilpropano que forman parte de la lignina, no es la IUPAC. Existe la convención de numerar al carbono 1 al que tiene la cadena alifática unida, a partir de este numerar el resto, y si hubiera un grupo unido, este debe tener el número menor. Los carbonos de la cadena alifática se indican con las letras α , β , γ con α siendo el carbono más cercano al anillo aromático.

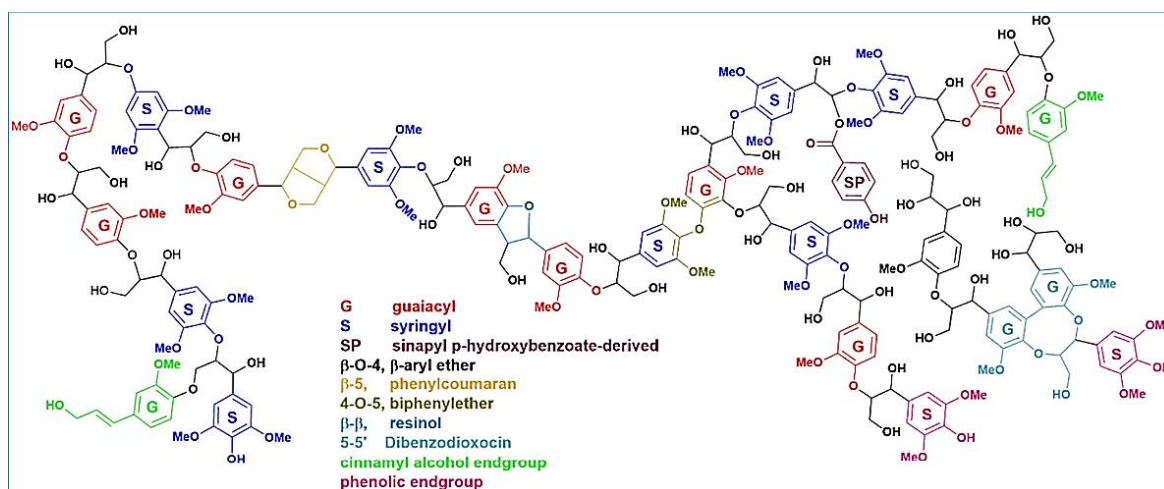


Figura 15. Representación esquemática de la estructura de lignina. Tomado de (Singh 2019)

El contenido de lignina está directamente relacionado con la recalcitrancia de la biomasa, así como existe una correlación negativa del contenido de lignina con la accesibilidad a la celulosa y la liberación de glucosa durante la hidrólisis enzimática. También la relación de contenido de subunidades siringil y guaiacil (S/G), afecta la liberación de azúcares y los efectos del pretratamiento (Yoo y otros, 2017). Estas subunidades determinan el tipo y número de enlaces cruzados: mientras que las unidades guaiacil pueden unirse covalentemente con otras tres subunidades, las unidades siringil se pueden unir solamente con dos, lo que sugiere que las ligninas ricas en unidades siringil son más fácilmente degradables por contener menor cantidad de enlaces 5-5 (Boudet y otros, 1998; Davison y otros, 2006). Unidades aromáticas como ferulato y p-cumarato que se encuentran acilando al arabinosilano y lignina en plantas herbáceas también tienen un efecto negativo

sobre la hidrólisis enzimática de la biomasa (Wang y otros, 2020). Los enlaces β -aril eter (β -O-4) y fenilcumarano (β -5) también están correlacionados con la conversión de la biomasa, afectando en general positivamente la conversión de la biomasa en el primer caso y negativamente en el segundo tipo de enlace. De forma similar, el contenido de grupos hidroxilo alifáticos es beneficioso para superar la recalcitrancia y por lo tanto la conversión de la biomasa lignocelulósica, mientras que los hidroxilos fenólicos en general afectan negativamente esta conversión (Yoo y otros, 2020). Algunas de estas propiedades están resumidas en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de la lignina en la biomasa lignocelulósica y su correlación con la conversión de la biomasa. Adaptado de (Yoo y otros, 2020)

Característica	Descripción	Efecto sobre la conversión (deconstrucción) de la biomasa
Contenido de lignina	Porcentaje de lignina en masa sobre la masa total.	A mayor cantidad aumenta la recalcitrancia.
Composición de la lignina	Contenido relativo de subunidades S, G y H sobre el total subunidades de lignina	Alto contenido de S sobre el total afecta positivamente. El resto es variable.
Monolignoles	Contenido relativo de ferulato y p-cumarato sobre el total de subunidades	Alto contenido aumenta la recalcitrancia.
Enlaces entre unidades	Contenido relativo de enlaces C-O (β -O-4), C-C (β -5, β - β) sobre el total	Los enlaces β -O-4 favorecen la conversión, en general los C-C aumentan la recalcitrancia.
Grupos hidroxilo	OH alifáticos, OH fenólicos	Los OH alifáticos favorecen la conversión. Los OH fenólicos aumentan la recalcitrancia.

En el caso de la lignina de angiospermas o de madera dura, la relación entre lignina siringil y guaiacil es variable, encontrándose en cantidades similares (S/G aproximadamente 1), a llegar a ser hasta tres veces mayor la cantidad de subunidades siringil que la guaiacil (S/G aproximadamente 3). Para las especies herbáceas, las tres subunidades de lignina se encuentran presentes, siendo en general la subunidad p-hidroxifenil la mayoritaria. En el caso de las gimnospermas o maderas blandas, la subunidad predominante es la guaiacil (Henriksson, 2009).

El contenido de lignina de la biomasa, la composición de las subunidades aromáticas, el contenido de monolignoles, los enlaces entre unidades, contenido de grupos hidroxilo y peso molecular son aspectos que generalmente se miden para evaluar las distintas biomásas, así como los efectos del pretratamiento (Yoo y otros, 2020).

Las masas moleculares típicas de la lignina abarcan un rango de 1000 a 20000 g/mol, pero son difíciles de medir exactamente, en particular las de la lignina natural, ya que la metodología aplicada para extraerla modifica la estructura de la lignina, fragmentándola de manera aparentemente aleatoria (Zinovyev y otros, 2018; Doherty, Mousavioun y Fellows, 2011). La lignina puede ser clasificada según las condiciones de extracción o aislamiento (Figura 16). Una de las clasificaciones divide a la lignina como lignina con azufre o lignina libre de azufre. Dentro del grupo de las ligninas con azufre se encuentran las ligninas tipo Kraft y lignosulfonatos, mientras que la lignina tipo soda y la organosolv se clasifican como ligninas libres de azufre (Nasrullah y otros, 2017). La lignina Kraft es una estructura altamente condensada de enlaces C-C, que contiene alta cantidad de grupos hidroxilo fenólicos debido a la ruptura del enlace β -aril. Los lignosulfonatos son solubles en agua conteniendo azufre en la forma de SO_3^{2-} y HSO_3^- . La lignina Organosolv es lignina pura con alta calidad, libre de azufre, insoluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos, más similar a la lignina nativa. La lignina “sódica” o alcalina es menos modificada que otros tipos de lignina (Nasrullah y otros, 2017).

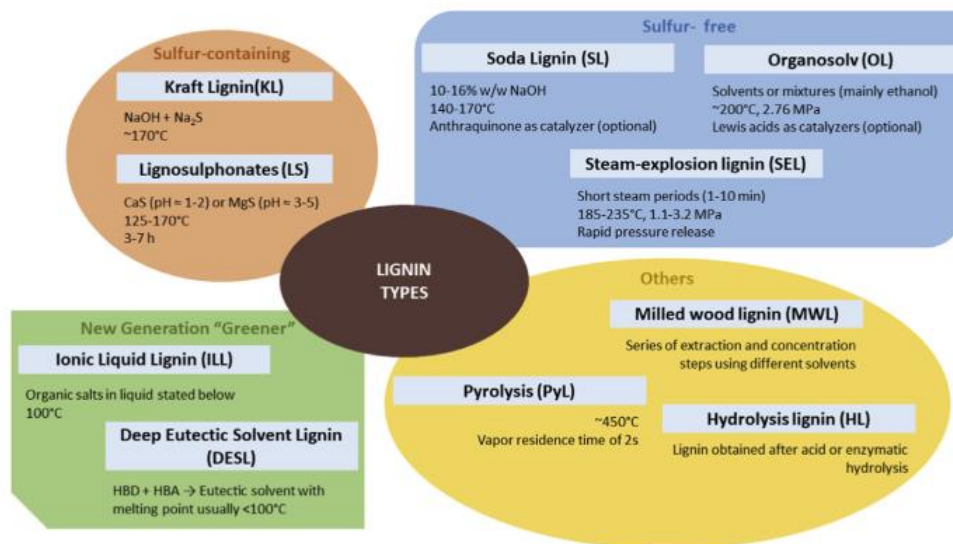


Figura 16. Clasificación de la lignina según su método de extracción/aislamiento. Tomado de (Zevallos Torres y otros, 2020)

1.2.5 Complejos Lignina-Carbohidratos (*Lignin-Carbohydrate Complexes, LCC*)

Como fue mencionado anteriormente, los tres componentes principales no existen individualmente, sino que más bien forman una red que está unida químicamente con enlaces entre la lignina y los carbohidratos (principalmente hemicelulosa) para formar lo que se llama complejos lignina-carbohidratos, o LCC por su nombre en inglés (*Lignin Carbohydrate-Complexes*) (Zhao y otros, 2020).

Distintos estudios han demostrado la existencia de uniones covalentes entre lignina y carbohidratos, y tres tipos de uniones han sido propuestas: enlaces fenil-glicosídicos, enlaces bencil-eter y enlaces éster, con un posible cuarto tipo de enlace hemiacetal o acetal (Figura 17) (Zhao y otros, 2020).

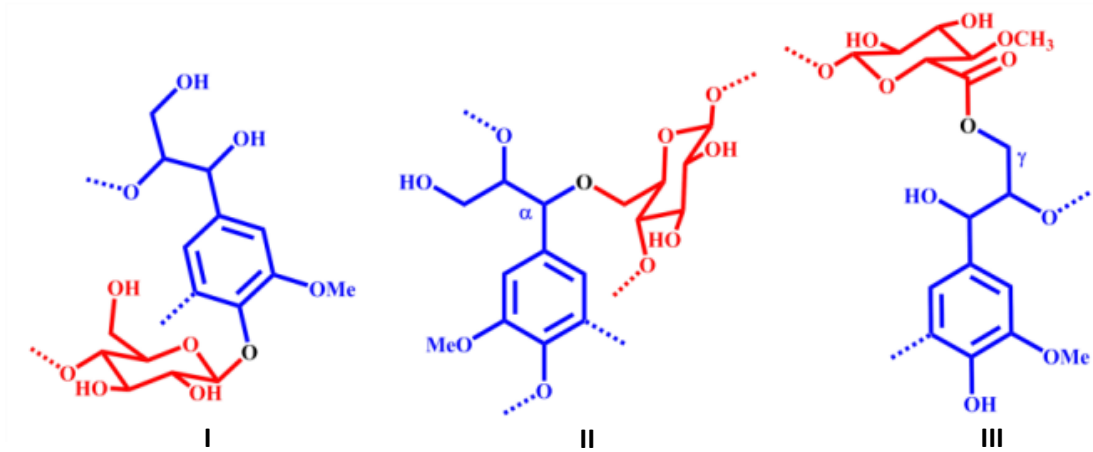


Figura 17. Diferentes enlaces de los complejos lignina-carbohidratos. I: Enlace fenil glicósido; II: enlace bencil-éter; III: enlace γ -éster. Tomado de (*Giummarella, 2018*)

En la madera los enlaces bencil-éter se dan entre la lignina y los carbohidratos, mientras que en el caso de pastos la unión de los carbohidratos se hace a través del ácido dehidroferúlico (*Zhao y otros, 2020*). Este enlace puede estar presente en dos formas:

- 1) enlaces entre la posición α de la lignina, y los hidroxilos primarios de carbohidratos como glucosa, galactosa, manosa, y arabinosa
- 2) entre la posición α de la lignina y los hidroxilos secundarios de los carbohidratos, principalmente xilosa (*Yoo y otros, 2020*). Es interesante mencionar que el mecanismo de formación de estos enlaces parece estar regulado por la presencia de grupos acetilo en el xilano: mayor cantidad de grupos acetilo parecería indicar menor formación de estos enlaces (*Figura 18*) (*Zhao y otros, 2020*).

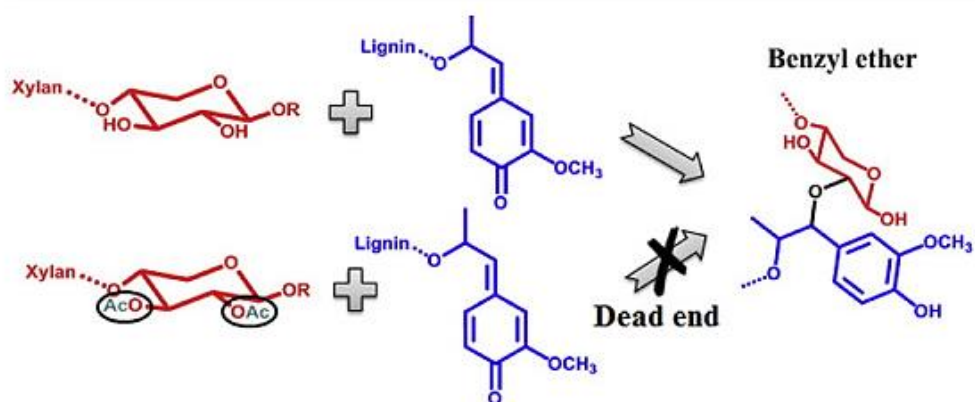


Figura 18. Mecanismo regulatorio propuesto para la formación de complejos lignina carbohidratos. Tomado de (*Zhao y otros, 2020*)

El carbono α o γ de una unidad de lignina β -diaril (dos monolignoles que están unidos por sus carbonos β) se une al carboxilo del ácido 4-O-metilglucurónico formando los enlaces bencil-ésteres. Se supone que estos enlaces son comunes en angiospermas porque la mayor acetilación limita la formación de los enlaces éter y glicósido.

Los enlaces fenil-glicósidos se dan entre el grupo hidroxilo fenólico de la lignina y el hidroxilo anomérico del glicósido, como se puede ver en la Figura 19, donde los grupos acetilo también juegan un papel en la frecuencia de formación de este enlace.

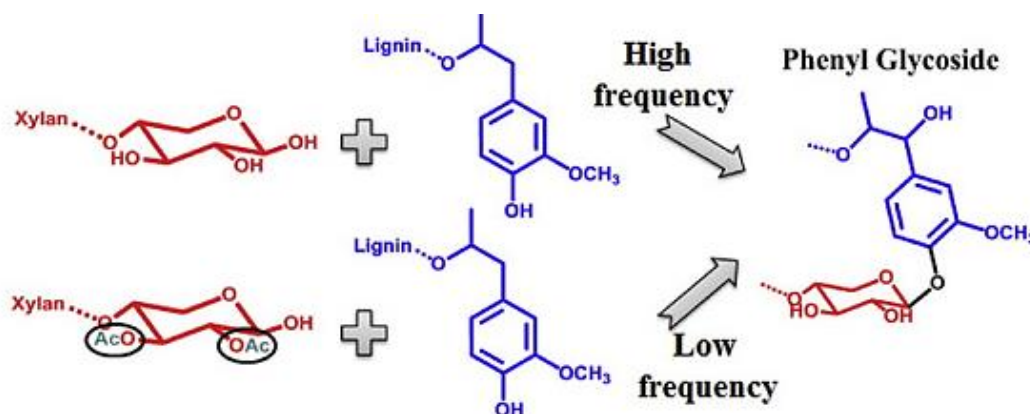


Figura 19. Mecanismo propuesto de regulación de la frecuencia de enlaces fenil-glicósido. Tomado de (Zhao y otros, 2020)

Los enlaces de tipo acetal son controversiales dado que no existen muchos estudios que demuestren su existencia en la biomasa nativa; la presencia de estos enlaces podría reducir el rendimiento de la hidrólisis enzimática (Zhao y otros, 2020)

1.2.6 Extractivos

Mientras que la celulosa, hemicelulosa y lignina son componentes estructurales de la biomasa lignocelulósica, existen otros compuestos no estructurales que son solubles en agua o solventes orgánicos, por lo que son referidos como extractivos (Björklund Jansson y Nilvebrant, 2009). Su composición varía considerablemente entre los distintos géneros y especies de vegetales, pudiendo ser desde el 4 % a 10 % en maderas duras hasta 20 % en algunas especies tropicales (Teixeira Mancini y otros, 2021). Los extractivos pueden ser alcaloides, proteínas, compuestos fenólicos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, grasas, aceites, ceras, resinas, y terpenos. Son importantes en el metabolismo de

las plantas, son reserva energética y sirven como defensa frente al ataque de diferentes microorganismos como hongos e insectos, además de impartir el color, olor y durabilidad a la madera (Kumar y otros, 2020).

Los extractivos dependen del solvente usado, y en el caso de la fracción liposoluble se pueden extraer con solventes no polares como diclorometano, hexano o éter de petróleo, lo que extrae principalmente alcoholes y ácidos grasos, fitoesteroles, y triterpenos (Gominho y otros, 2020). Los terpenoides (o isoprenoides) son considerados como el grupo más grande y diverso de metabolitos secundarios de las plantas; pueden ser clasificados según el número de estructuras de isopreno como monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), y tetraterpenos (C₄₀) (Okolie y otros, 2021). En el trabajo citado de Gominho y otros (2020) los autores analizaron exhaustivamente los extractivos lipofílicos obtenidos de madera de *Eucalyptus globulus* y dividieron sus hallazgos en distintas familias cuantificando los porcentajes relativos al total de extractivos: 40,8 % eran ácidos grasos, correspondiendo el 74,2 % de este porcentaje a ácidos grasos saturados, en particular C16:0, C24:0 y C26:0. El 19 % correspondía a fitosteroles, siendo los mayoritarios β-sitosterol y stigmastanol, 10,5 % a compuestos aromáticos (ácido siríngico, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído, ácido vanilínico y vainillina), y 10,4 % a triterpenos, mayoritariamente ácidos asiáticos y arjunólico (Figura 20).

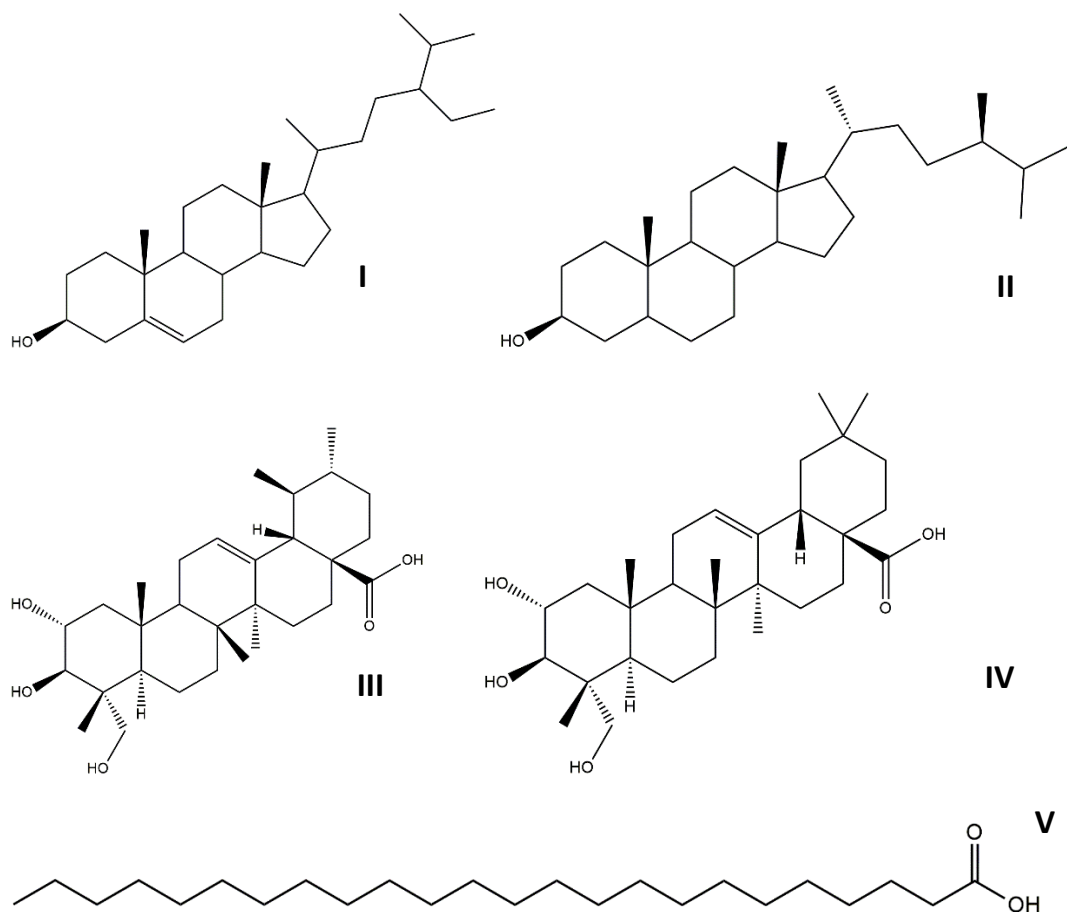


Figura 20. Algunos extractivos lipofílicos que pueden encontrarse en la biomasa lignocelulósica. I: β -sitosterol; II: stigmastanol; III: ácido asiático; IV: ácido arjunónico, V: ácido lignocérico (C24:0)

Dentro de los extractivos en agua se pueden encontrar azúcares no estructurales como la pectina, lignanos y otros compuestos fenólicos (Okolie y otros, 2021). La pectina es el componente mayoritario de las sustancias intracelulares y es una cadena polimérica de éster de ácido galacturónico intercalada con ácido glucurónico (en pequeña cantidad) (Figura 21). Relacionadas con la pectina pero insolubles en agua se encuentran el ácido péctico y la protopectina. El ácido péctico es una cadena lineal de ácidos galacturónicos unidos por enlaces α -1,4, y si bien es insoluble en agua, la solubilidad puede verse favorecida por aumento de metilación o en pH alcalino. La protopectina es la precursora de la pectina y tiene un peso molecular mayor que ésta. (H. Chen, 2014)

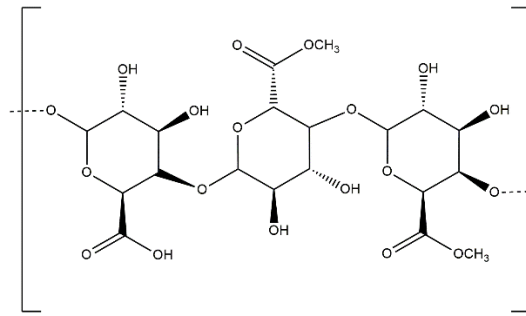


Figura 21. Estructura de pectina, con la presencia de éster de ácido galacturónico.

1.2.7 Minerales

En la biomasa lignocelulósica también se encuentran presentes minerales, que pueden ser extraíbles o estructurales (es decir, ceniza) (Mussatto y Dragone, 2016). Luego de secar la biomasa a 105 °C y ser procesada en un horno de alta temperatura (mayor a 550 °C), la ceniza es el residuo sólido inorgánico no combustible, que incluye elementos y minerales como silicatos, carbonatos, fosfatos, calcio, magnesio, sodio, potasio, etc. (H. Chen, 2014). Algunos elementos son macronutrientes, que son parte integral de sustancias orgánicas como proteínas y ácidos nucleicos y mantienen la presión osmótica, como nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, magnesio, y calcio; los micronutrientes, como hierro, manganeso, zinc, cobre, boro, molibdeno, cloro y níquel, contribuyen a la producción de enzimas (F. Xu, 2010). El silicio está en forma de silicatos en las plantas, y otorga ayuda funcional dándole más resistencia a tejidos de soporte como la corteza (Pettersson y otros, 2008). Existe gran variabilidad en el contenido de minerales entre las distintas plantas, ya que depende de factores genéticos y ambientales, así como las diferencias fisiológicas y morfológicas entre los distintos cultivos (Vassilev y otros, 2012). En maderas duras el orden de los elementos más abundantes es calcio > potasio > fósforo, mientras que en herbáceas se encuentra calcio > potasio > cloro > fósforo. En cuanto al contenido total de cenizas, en general en las materias primas leñosas se encuentra en el entorno de 1-2 %, mientras que en las plantas herbáceas es significativamente mayor, típicamente de 5 % a 9 % (Zhai y otros, 2021; Balan y otros, 2012).

1.2.8 *Eucalyptus* spp.

Eucalyptus spp. es el árbol de madera dura más plantado del mundo gracias a su rápido crecimiento y alta calidad de la madera (Elli, Sentelhas y Bender, 2020). Originaria de

Australia y perteneciente a la familia Myrtaceae, *Eucalyptus* spp. es la especie que más se ha introducido en otros países del mundo, y actualmente los mayores productores de eucaliptus son China, la India, y Brasil (Kaur y Monga, 2021). Es una madera rica en celulosa (Cebreiros, Guigou y Cabrera, 2017; Guigou y otros, 2018) y es una de las principales materias primas usada en la industria de la pulpa de celulosa y papel, particularmente en América del Sur (Uruguay, Brasil y Chile) (Vallejos-Barra y otros, 2020; Cabbage y otros, 2010). Su contenido de celulosa puede ir de 46 % a 55 % en base seca, hemicelulosa 12 % a 23 %, y lignina 22 % a 31 %, valores que tienen alta dependencia en distintos factores como edad, localización geográfica, crecimiento y condiciones del suelo (Mussatto y Dragone, 2016; Costa, Gomes y Simões, 2016)

Eucalyptus globulus, junto con otras especies de eucaliptos como *E. urograndis*, *E. grandis* y *E. maidenii* es una de las principales materias primas usadas en la industria pulpera (Gominho y otros, 2020). Se han realizado diversas caracterizaciones de la composición, muchas veces enfocadas en ese uso final. Por ejemplo, algunos de los compuestos como los extractivos lipofílicos, que son producidos y acumulados a lo largo de la vida del árbol y que en general afectan la pulpa de celulosa obtenida, fueron extensamente identificados por Gominho y otros, (2020), como fue presentado en el apartado Extractivos. Esa acumulación a lo largo de la vida hace que haya variabilidad natural de extractivos, no solo entre árboles, sino también a diferentes alturas y en las regiones radiales del árbol.

1.2.9 Switchgrass

Switchgrass o pasto varilla (*Panicum virgatum*), es un pasto perenne con metabolismo de tipo C4 que posee características que lo hacen interesante para su uso como pasto energético. Aunque ha sido objeto de estudio en diversas épocas, el switchgrass o pasto varilla empezó a ser considerado realmente como pasto energético inicialmente en los 90 en América del Norte, de donde es nativa, y casi una década más tarde en Europa (Parrish, Casler y Monti, 2012). Tiene rápido crecimiento, alto volumen de producción por área, longevidad, bajo costo de producción, y la habilidad de crecer en tierras que no son aptas para la producción de alimentos o forraje (Lindsey y otros, 2013; Siri-Prieto, 2012). Además de ser propuesto como un cultivo lignocelulósico ideal para la producción de energía, también ha sido objeto de investigaciones como fuente de fibra para la industria

de la pulpa de celulosa o papelera, para biomateriales, y para bioproductos, así como ser usado para fitorremediación (Alexopoulou y otros, 2018).

El contenido de celulosa del switchgrass se ha reportado desde 35 % a 39 % en base seca (Samuel, Foston y otros, 2011; Yan y otros, 2010; Balan y otros, 2012). Tiene alto contenido de hemicelulosa, particularmente xilano, pudiendo llegar a ser 30 % de peso en base seca (Yan y otros, 2010), mientras que el contenido de lignina usualmente se encuentra entre 19 % y 29 % (Larnaudie, Ferrari y Lareo, 2021). Las concentraciones de estos componentes pueden variar significativamente según la localización geográfica, factores genéticos, maduración de la planta, y prácticas agronómicas (Alexopoulou y otros, 2018)

1.3 Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica

1.3.1 Introducción

Para poder superar la recalcitrancia (resistencia de la pared celular vegetal a ser deconstruida) de la biomasa lignocelulósica y poder utilizar la celulosa para conversión en productos como el bioetanol y otros coproductos derivados de la hemicelulosa y de la lignina, es necesario que los distintos componentes sean accesibles, modificando o directamente rompiendo esa matriz. Esto se logra realizando el *pretratamiento* de la biomasa lignocelulósica. Específicamente para la producción de bioetanol, el propósito del pretratamiento sobre la biomasa es reducir la cristalinidad de la celulosa, aumentar la superficie específica del sustrato (generando o expandiendo los poros de la biomasa), romper el efecto de barrera que causan la hemicelulosa y la lignina, lo que en la siguiente etapa facilita el contacto y reacción de la celulosa con las enzimas hidrolíticas (Figura 22) (Zhang y otros, 2021; Auxenfans y otros, 2017). Existen gran variedad de pretratamientos posibles que pueden ser clasificados de diversas maneras, como ser físicos, biológicos, químicos y fisicoquímicos.

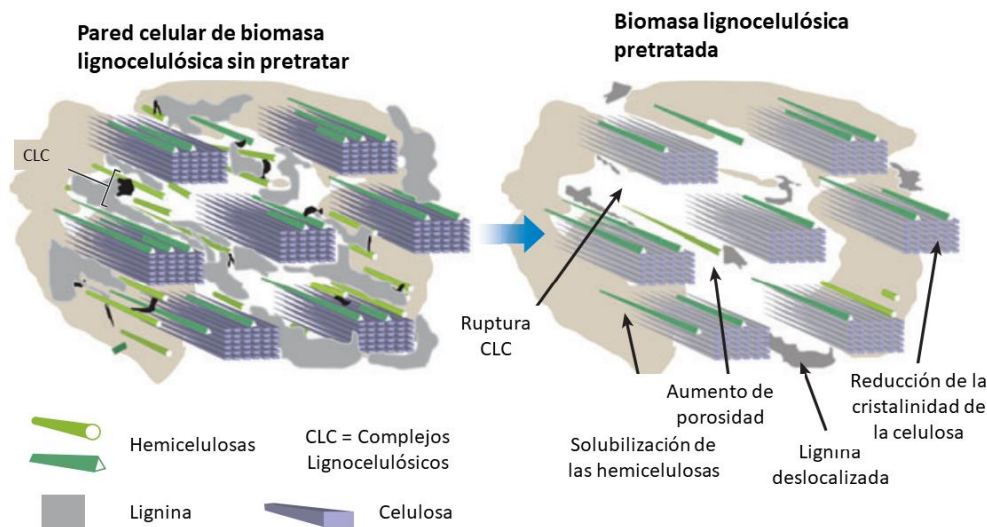


Figura 22. Representación esquemática de los efectos del pretratamiento. Adaptado de (Chundawat y otros, 2011)

1.3.2 Pretratamientos físicos

1.3.2.1 Reducción de tamaño

La reducción del tamaño de la biomasa es un proceso no solo inevitable en el tratamiento de la biomasa lignocelulósica para aprovechar sus componentes principales, sino que además impacta en los procesos siguientes, teniendo en cuenta que este proceso por sí solo no es suficiente para modificar la estructura lignocelulósica completamente (Eisenlauer y Teipel, 2020; Lamsal, Yoo y Alavi, 2010). Los mayores procesos de reducción de tamaño incluyen la combinación de los procesos de chipeado, triturado y molienda de la biomasa, procesos que también disminuyen la cristalinidad de la celulosa y aumentan la superficie y accesibilidad del material (Barakat, Vries y Rouau, 2013). Dependiendo del tipo de equipamiento utilizado en la molienda se pueden identificar distintos tipos: molienda de uno o dos rodillos, molienda de bolas, molienda de varillas, molienda de martillos, molienda vibratoria, molienda coloidal y molienda de disco húmedo, y la reducción en el tamaño de partícula y cristalinidad están determinadas por el equipo usado, además del tiempo de procesamiento y de la biomasa (Baruah y otros, 2018). Estos son procesos que requieren ciertos niveles de energía que son dependientes del tamaño final requerido y de la naturaleza de la biomasa, ya que como es de esperarse materiales más duros requieren mayor cantidad de energía. Por esta razón, en general se

asume que los costos asociados con la molienda de la biomasa para tamaños de partículas extremadamente chicos probablemente sean altos para plantas industriales de gran tamaño con márgenes de beneficio bajos (Beig y otros, 2021).

1.3.2.2 Extrusión

La extrusión es un pretratamiento físico continuo que expone a la celulosa, alterando mínimamente la hemicelulosa y evitando la formación de compuestos inhibitorios usando químicos económicos y equipamiento simple (Capolupo y Faraco, 2016). La biomasa (junto con químicos o no) es introducida en el extrusor y transportada a lo largo del barril o tubo mediante un tornillo de conducción; la biomasa es sometida a mezclado, calentamiento y cortado lo que resulta en alteración física y química de la biomasa lignocelulósica (Lin y otros, 2012). La extrusión resulta en reducción de la distribución del tamaño de partícula, aumento del área superficial y tamaño de poros, y cambios en la cristalinidad de la celulosa. En casos extremos –cuando se alcanzan altas temperaturas o altas fuerzas de compresión o corte- es posible la ruptura del entrecruzamiento de las fibras, generando también cierta deslignificación o relocalización de la lignina, además de cierta solubilización de las hemicelulosas (dependiendo también de la biomasa y su contenido de humedad) (Duque, Manzanares y Ballesteros, 2017).

Algunas de las ventajas del pretratamiento con extrusión son: (1) bajo costo y alto control de las variables como ser la temperatura, logrando transferencias de calor y masa efectivos, (2) baja generación de productos de degradación, (3) buena adaptabilidad a diferentes modificaciones del proceso, fácilmente escalable, y (4) ser un proceso continuo con alta carga de sólidos, que presenta un mezclado rápido y efectivo –lo que permite la utilización de baja carga química (Muthukumarappan y Karunanithy, 2016; Zheng y Rehmann, 2014).

Un extrusor típico tiene tres zonas: alimentación (*feed*), transición/compresión (*transition*), y dosificación (*metering*); como se muestra en la Figura 23 los componentes principales son la tolva de alimentación (*feed Hopper*), el tornillo (*screw*), el barril (*barrel*) y el troquel (*die*) (Karunanithy y Muthukumarappan, 2010). Los parámetros usuales -como ser el tiempo de reacción, la presión, el contenido de materia seca, y tamaño de partícula- influyen en el pretratamiento de extrusión; modificando algunas configuraciones como la temperatura del barril o el tornillo y su velocidad se puede optimizar el proceso (Capolupo y Faraco, 2016). También existe la modificación de la

extrusión con un único tornillo que es usando “tornillos gemelos”, que a su vez pueden co-rotar o contra-rotar (Duque, Manzanares y Ballesteros, 2017). Como ejemplo de condiciones de trabajo usuales, se puede citar el trabajo de Karunanithy y Muthukumarappan (2010), quienes investigaron la influencia de la velocidad del tornillo entre 50 a 150 rpm y la temperatura del barril entre 50 a 150 °C. Estos autores reportaron que para el caso de switchgrass la mayor recuperación de azúcares luego de la extrusión se dio a 50 rpm y 150 °C, con baja formación de productos de degradación. Por su parte, en el trabajo de Yoo y otros (2011), las condiciones óptimas para la extrusión de cáscaras de soja fueron de 350 rpm en la velocidad del tornillo y 80 °C de temperatura del barril.

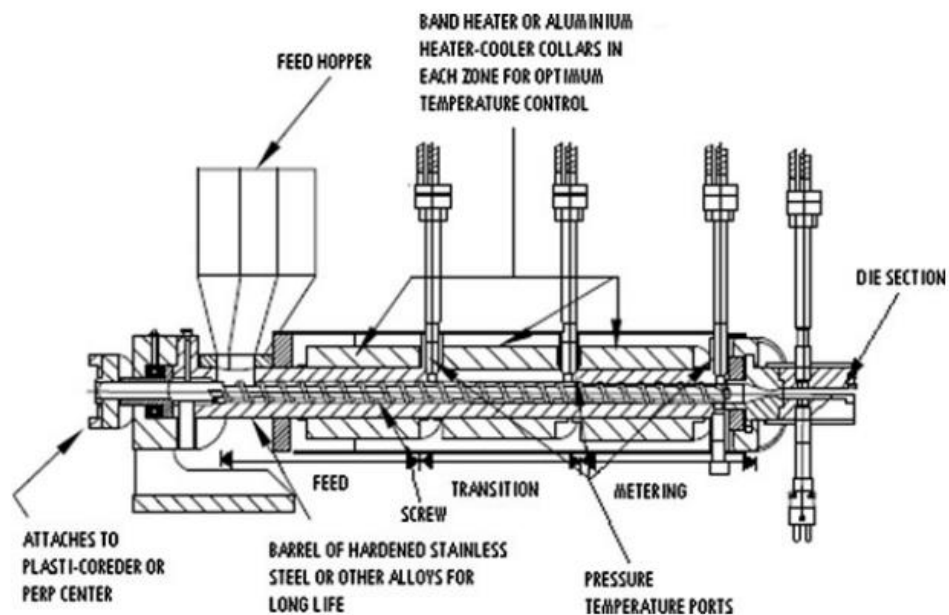


Figura 23. Esquema de los componentes de un extrusor. Tomado de (Karunanithy y Muthukumarappan, 2010)

La extrusión no es un método independiente, sino que es usado en combinación secuencial con otros pretratamientos, como puede ser irradiación con microondas, (Karunanithy, Muthukumarappan y Gibbons, 2014), pretratamiento con ozono (Coca y otros, 2016), ultrasonido (Byun y otros, 2020) o explosión por vapor (Feng y otros, 2018).

1.3.2.3 Irradiación con microondas

Las microondas son ondas electromagnéticas con frecuencias entre 300 MHz y 300 GHz, lo que implica radiaciones electromagnéticas no ionizantes de longitudes de onda de 1

mm a 1 m (Huang y otros, 2016). Las frecuencias más comúnmente usadas en los pretratamientos con microondas son 2.45 GHz y 915 MHz, y la mayoría de los microondas domésticos usan la frecuencia de 2.45 GHz (Li y otros, 2016). Este pretratamiento puede ser subdividido en dos categorías: 1) solvólisis mediante microondas a temperaturas moderadas (menor a 200 °C) para dar productos químicos básicos, y 2) pirolisis mediante microondas a altas temperaturas (más de 400 °C) para transformar la biomasa en biocombustibles (Beig y otros, 2021). El calentamiento de la biomasa mediante microondas presenta algunas ventajas frente al calentamiento tradicional por su eficiencia y facilidad de operación; además, el consumo de energía es reducido por los tiempos cortos de pretratamiento (Hoang, Nižetić y otros, 2021)

La irradiación con microondas también resulta interesante para la producción de nanoestructuras de carbono (nanotubos de carbono y nanofibras de carbono) con diferentes aplicaciones (Omoriyekomwan y otros, 2021).

1.3.2.4 Ultrasonido

El pretratamiento con ultrasonido utiliza frecuencias en el rango de 20 kHz a 1 MHz, afectando la estructura de la superficie de la biomasa lignocelulósica (Haldar y Purkait, 2021). Durante el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica con ondas ultrasónicas, se generan microburbujas que en su proceso de formación, crecimiento y colapso afectan la matriz, generando poros y aumentando la superficie de la biomasa (Wang y otros, 2018). Además de este efecto, las microburbujas pueden disociar el agua y moléculas de oxígeno disueltas, formando radicales oxidantes que atacan la matriz lignocelulósica (Pang, Abdullah y Bhatia, 2011). La aplicación de ultrasonido lleva a la ruptura de enlaces éter entre la hemicelulosa y la lignina, lo que contribuye a remover estos compuestos solubilizándolos y dejando la celulosa más expuesta a la actividad enzimática (Luo, Fang y Smith, 2014).

1.3.2.5 Otros pretratamientos utilizando energía de irradiación sobre la biomasa

En la Tabla 4 se resumen algunos otros pretratamientos que se basan en la irradiación de la biomasa.

Tabla 4. Tipo de energía de irradiación y el efecto en la biomasa lignocelulósica. Adaptado de (Ong y Wu, 2020; Beig y otros, 2021)

Tipo de irradiación	Principio	Efecto en la biomasa
Rayos gamma	Se pueden usar radio isótopos como Cesio-137 y Cobalto-60 cuyas radiaciones fácilmente penetran la estructura lignocelulósica generando radicales de alta actividad	Disminución de la cristalinidad de la celulosa y modificación de la lignina
Haz de electrones	Los haces de electrones -en la forma de rayos ionizantes generados mediante un acelerador lineal- forman radicales libres	Reducción de cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa
Campo eléctrico pulsado	La biomasa es sometida a pulsos eléctricos generados por dos electrodos junto a un campo eléctrico de $0.1-80 \text{ kVcm}^{-1}$ por un corto período de tiempo ($10^{-4}-10^{-2}$ segundos)	Incremento de la permeabilidad de la célula a solventes y enzimas

1.3.3 Pretratamientos físico-químicos

1.3.3.1 Auto-hidrólisis

Este pretratamiento hidrotérmico ha sido desarrollado con varios nombres, siendo “Agua Caliente Líquida” o por su nombre en inglés “*Liquid Hot Water*” (LHT) el más común y más conocido. Otros nombres utilizados han sido licuefacción acuosa, extracción acuosa, pretratamiento acuoso, aquasolv, pretratamiento hidrotermal, pre-hidrólisis acuosa, cocción a presión en agua, o como Auto-hidrólisis, término que además de designar el tratamiento también describe el mecanismo de hidrólisis asociado (Carvalho y otros, 2016).

En este proceso, se usa agua en fase líquida a alta temperatura (entre $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $240 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y presión (para mantener su estado líquido) durante cierto tiempo para romper la matriz lignocelulósica (Beig y otros, 2021). Este proceso es de bajo consumo energía y sin agregado adicional de reactivos químicos, y no solo se generan iones hidronio generados

por la autoionización del agua, sino que también se libera ácido acético de las hemicelulosas, actuando como catalizadores formados *in-situ* lo que lleva a la despolimerización del xilano y la generación de xilooligosacáridos y monosacáridos. (W. Zhang y otros, 2020)

1.3.3.2 Explosión por vapor

La explosión por vapor es considerada uno de los pretratamientos más eficientes, ambientalmente amigable y uno de los procesos con buena relación costo-efectividad apto para procesos industriales. No utiliza reactivos químicos (o en muy baja cantidad), es eficiente en la separación de celulosa, y genera poca polución ambiental; como desventaja, requiere relativamente alto consumo de energía (Sun y otros, 2015).

La explosión por vapor es un pretratamiento hidrotérmico donde la biomasa es calentada en un reactor mediante vapor saturado a alta presión a temperaturas que usualmente están en el entorno 160 a 260 °C (0.69-4.83 MPa). El tiempo dentro del reactor puede ir de segundos a minutos, luego del cual la presión es liberada rápidamente, sometiendo a la biomasa a explosión descompresiva (A. Duque y otros, 2016; Auxenfans y otros, 2017). Al liberar la presión instantáneamente, la humedad condensada en las fibras lignocelulósicas se evapora nuevamente, rompiendo la matriz lignocelulósica y reduciendo el tamaño de partícula de la biomasa (Monschein y Nidetzky, 2016).

Aunque originalmente la explosión por vapor era un proceso realizado en *batch*, se ha intentado que el proceso fuera realizado en forma continua, lo que permitiría mejor control de las variables de operación, mejor transferencia de calor, y menor acumulación de co-productos de degradación (A. Duque y otros, 2016). El proceso genera un barro donde la mayor parte de la celulosa y la lignina permanecen como residuo insoluble, llamándose usualmente fracción sólida, y las hemicelulosas junto con productos de degradación de la celulosa y la lignina –dependiendo de las condiciones aplicadas- se solubilizan produciendo un hidrolizado, fracción líquida o *prehidrolizado* (Vu y otros, 2020). En el caso de la lignina, puede existir una relocalización o redistribución, lo que también aumenta la accesibilidad a la celulosa por las enzimas en el paso posterior de sacarificación enzimática (Alvira y otros, 2010; Troncoso-Ortega y otros, 2021).

1.3.3.2.1 Reacciones que ocurren durante la explosión por vapor

Al usar vapor es posible realizar un calentamiento rápido de la biomasa sin diluir excesivamente los azúcares producidos durante el proceso. El vapor condensa y permea en la biomasa iniciando las reacciones de autohidrólisis debido a la catálisis de las reacciones por los iones de hidrógeno (H^+), que se encuentran en la forma de iones hidronio (H_3O^+) producidos por la auto-ionización del agua a elevadas temperaturas (Ahmad y otros, 2016). El agua funciona como ácido débil, iniciando la depolimerización de las hemicelulosas y la generación de ácidos orgánicos debidos a hidrólisis de los grupos aceto de las hemicelulosas (Castro y otros, 2013). Los ácidos rompen los polímeros de la celulosa y hemicelulosa –más fácilmente este último polímero- en la biomasa lignocelulósica para formar los monómeros de azúcar que pueden ser posteriormente fermentados (Lenihan y otros, 2010). El ácido acético baja aún más el pH y más iones hidronio son generados (Garrote, Domínguez y Parajó, 2001).

De la hidrólisis de la hemicelulosa se obtienen los monómeros de las hemicelulosas (xilosa, arabinosa, galactosa, etc) y sus oligómeros. Los monómeros también pueden sufrir degradación; por ejemplo, el producto de degradación principal de las pentosas es el furfural. En la Figura 24 se puede observar esquemáticamente la vía de formación del furfural.

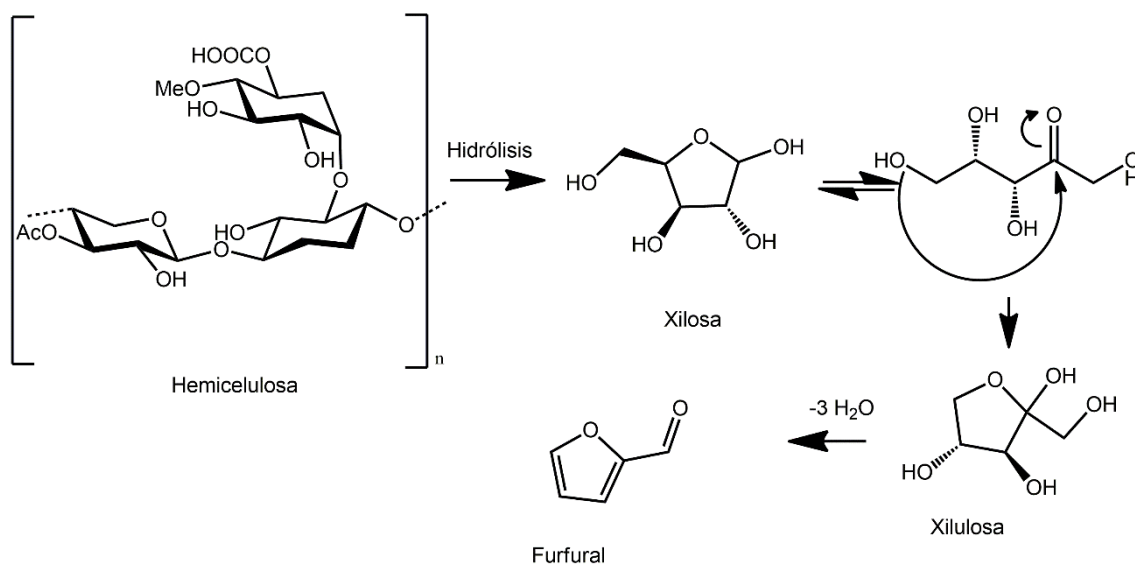


Figura 24. Formación de furfural. Adaptado de (Gérardy y otros, 2020) y (Peleteiro y otros, 2015)

Luego de la deacetilación, el siguiente paso en las reacciones irreversibles para la hemicelulosa es la disolución de los oligómeros; mientras que los oligómeros con grado de polimerización 1 a 8 se solubilizan rápida y fácilmente, los oligómeros con mayor grado de polimerización tienen una velocidad reducida (Figura 25) (Ahmad y otros, 2016)

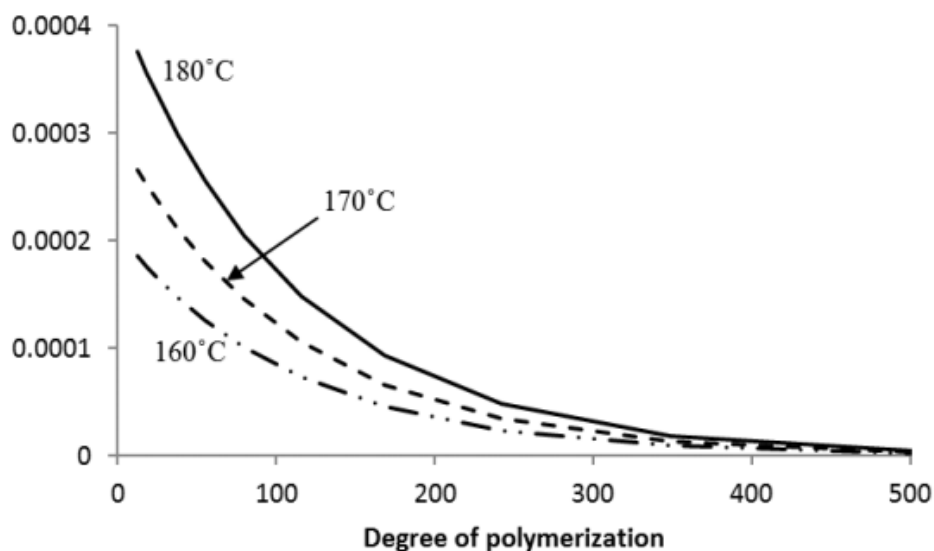


Figura 25. Velocidad de disolución de polímeros (en s^{-1}) en función de su grado de polimerización (*Degree of polymerization*) (Ahmad y otros, 2016)

La mayor parte de la lignina permanece en la fracción sólida. Sin embargo, existen en menor magnitud reacciones de depolimerización, principalmente mediante la ruptura de los enlaces β -O-4 y otros enlaces susceptibles al ataque por ácidos. Por su parte, los enlaces β - β y β -5 no son afectados mayoritariamente, mientras que simultáneamente se produce la desoxigenación α - β para formar grupos similares a cinamil, que pueden dar lugar a reacciones de repolimerización (Figura 26) (Troncoso-Ortega y otros, 2021; Auxenfans y otros, 2017; Zhang y otros, 2015). Estas reacciones de despolimerización y repolimerización pueden llevar a la reorganización de la lignina, que puede observarse como pequeñas gotas de lignina que recondensan en la superficie de las fibras (Figura 27) (Donohoe y otros, 2008).

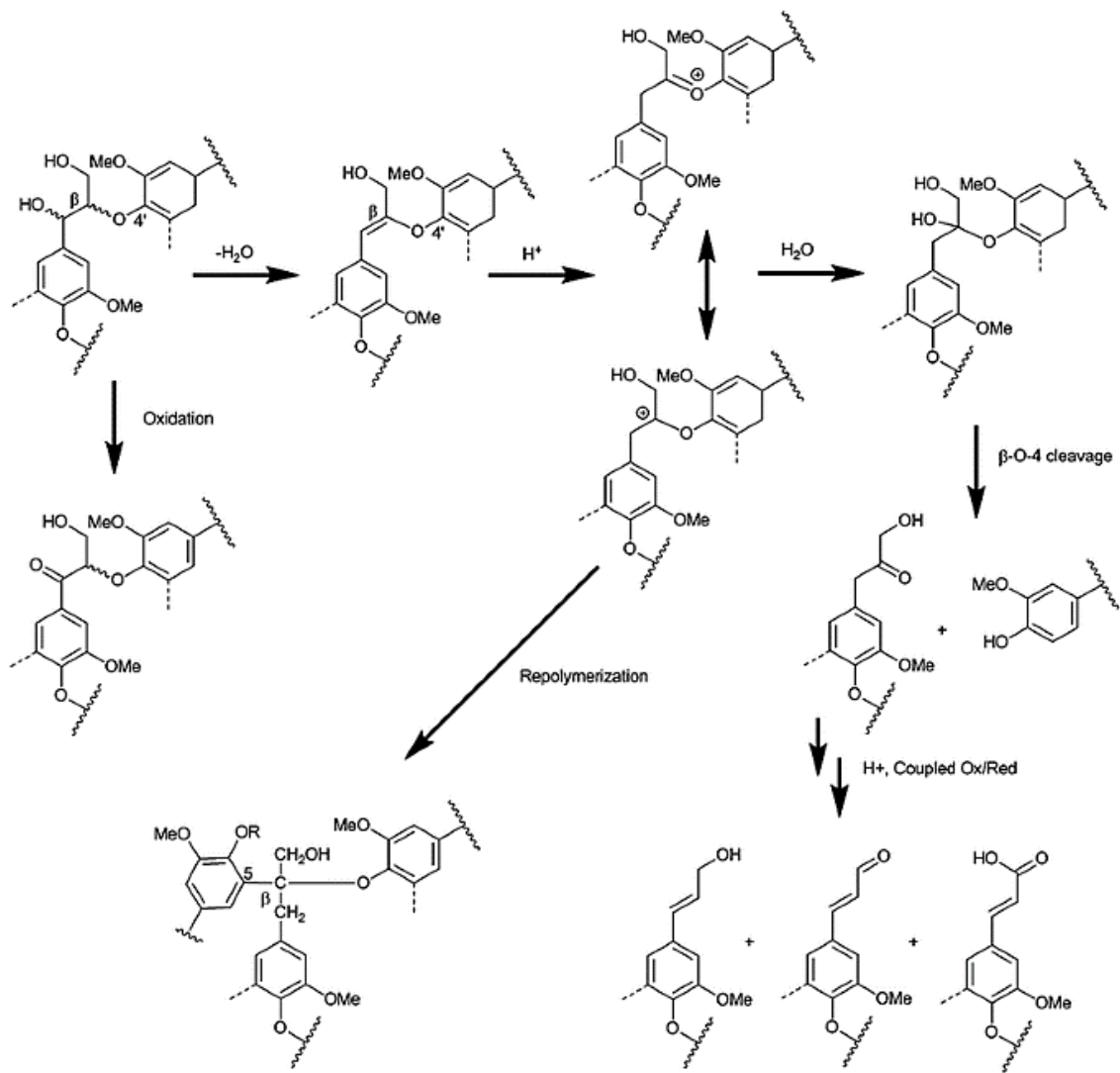


Figura 26. Posibles caminos de reacción (hidrólisis y condensación) de la lignina. Tomado de (Zhang y otros, 2015)

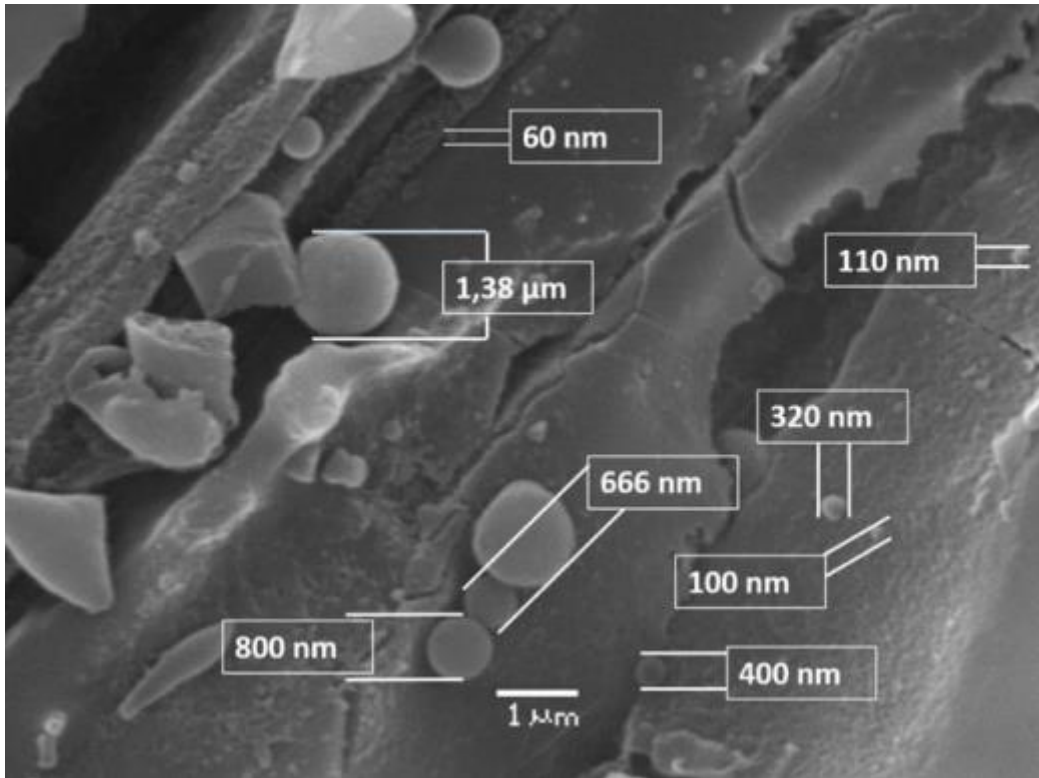


Figura 27. Gotas de lignina y sus diferentes diámetros. Imagen obtenida mediante microscopio electrónico de barrido de la superficie de paredes celulares de *Eucalyptus globulus* luego de pretratamiento con explosión por vapor. Tomado de (Troncoso-Ortega y otros, 2021)

La rotura de los enlaces éster y/o éter es un factor importante para la obtención de productos con grupos $-OH$, $-C=O$, o $-COOH$ (Hoang, Nizetic y otros, 2021). Entre los compuestos fenólicos simples comúnmente encontrados en la fracción líquida de estos pretratamientos se encuentran el ácido sirínico, vanillina, ácido ferúlico, ácido p-hidroxibenzoico, siringaldehído, ácido vanílico, ácido trans-cinámico, y ácido cumárico, además de productos de condensación (Ko y otros, 2015). En la Figura 28 se puede ver representada esquemáticamente la vía de formación de estos compuestos.

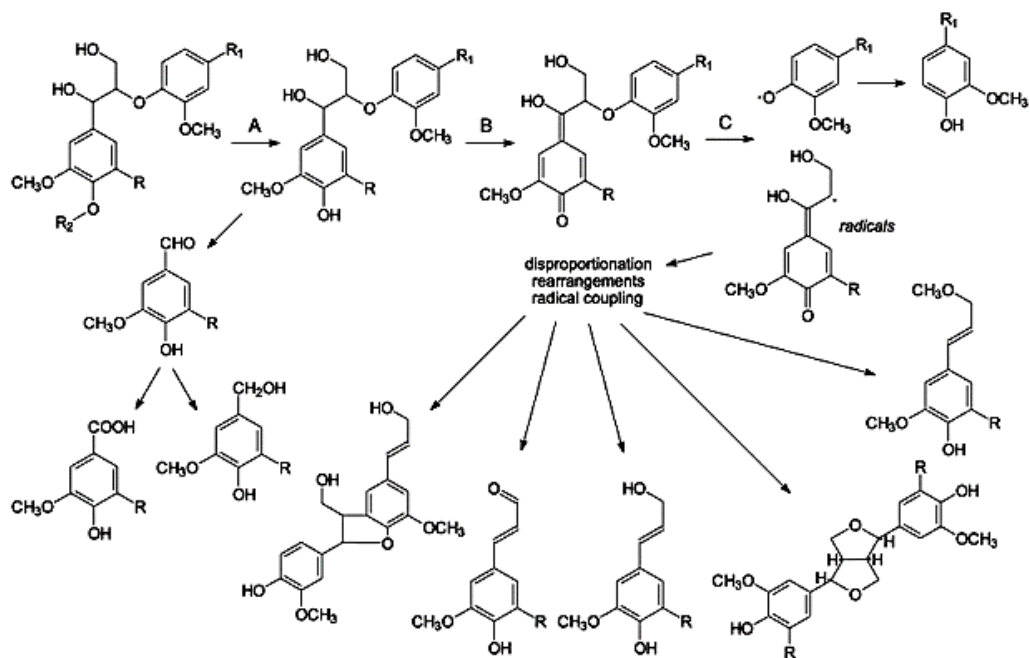


Figura 28. Degradación de la lignina por explosión por vapor. Los grupos fenólicos son generados por hidrólisis ácida (paso A) de las subestructuras β -O-4 generando quinonas a partir de estas (paso B). Esto facilita la rotura de los enlaces β -O-4 (paso C), generando radicales que sufren desproporción o dismutación y acoplado de radicales (condensación) para generar variedad de compuestos como fenoles, ácidos carboxílicos y oligolignoles. Tomado de (Ramos, 2003)

En cuanto a la celulosa, los cambios que sufre durante la explosión por vapor tienen que ver con cambios en la cristalinidad, además de generarse un medio ácido producto de los iones hidronio y la generación de ácido acético (Auxenfans y otros, 2017). Esto genera la solubilización de oligómeros de celulosa, que pueden llegar hasta un grado de polimerización de 15 unidades (Yu, Long y Wu, 2016). Los compuestos de degradación de la celulosa son principalmente los oligómeros de glucosa celohexosa, celopentosa, celotetraosa, celotriosa y celobiosa, además de los monómeros glucosa y fructosa. En la fracción líquida también se encuentran otros productos de degradación de la glucosa, como 1,6-anhidroglucosa, gliceraldehído, eritrosa, glicolaldehído, dihidroxiacetona, pirualdehído y 5-HMF y así como los ácidos derivados, principalmente acético y fórmico (Sasaki y otros, 2000). La hidrólisis subsecuente del 5-HMF resulta en la obtención de ácido levulínico y ácido fórmico, como se puede observar en la Figura 29 (Gallo y Trapp, 2017).

En la hidrólisis ácida el ácido penetra directamente a la biomasa lignocelulósica con velocidad de hidrólisis más rápida que la hidrólisis enzimática, aunque como desventaja también la glucosa se degrada rápidamente en condiciones ácidas (Lenihan y otros, 2010).

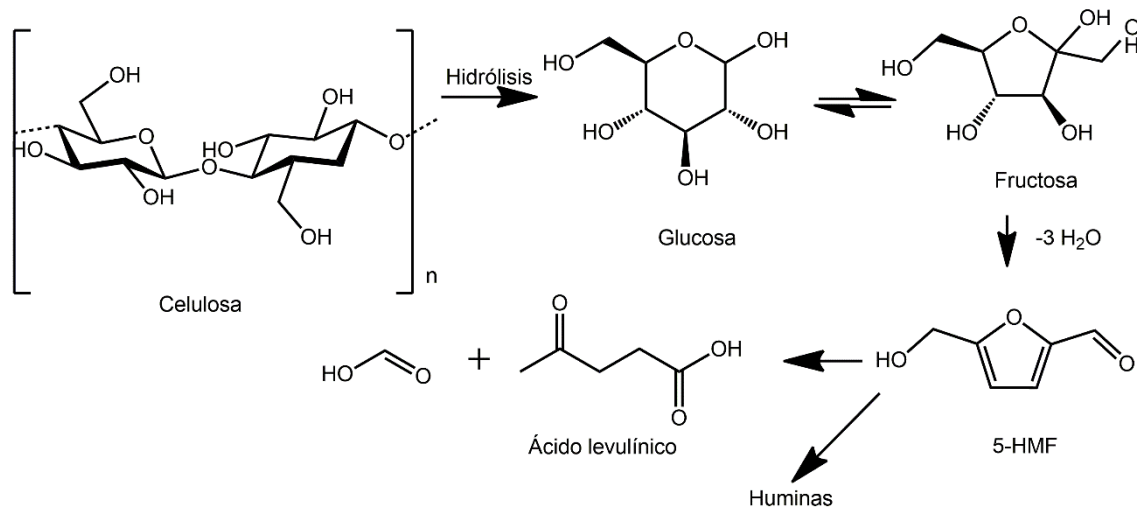
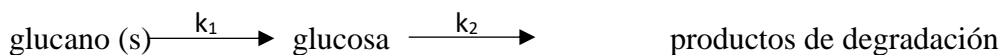
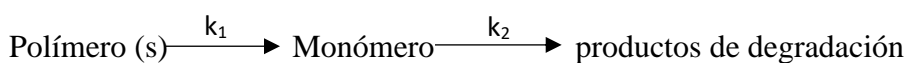


Figura 29. Esquema simplificado de formación de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) a partir de la celulosa. Adaptado de (Gérardy y otros, 2020)

Para la cinética de hidrólisis de la celulosa, se debe considerar que el sustrato se encuentra en fase sólida y el catalizador en la fase líquida, y se ven afectadas por variables como la temperatura, la concentración de ácido, el tiempo, la concentración del sustrato y la composición del sustrato. Los modelos propuestos en la hidrólisis de celulosa generalmente son reacciones irreversibles pseudo-homogéneas de primer orden, con un primer paso del polímero glucano de celulosa siendo degradado a glucosa y un siguiente paso de conversión a los productos de descomposición (Lenihan y otros, 2010):



donde k_1 es la velocidad de conversión de glucano a glucosa y k_2 es la velocidad de degradación de la glucosa, considerando a las dos reacciones de primer orden e irreversibles, por lo que las unidades de las constantes son min^{-1} . Esta reacción puede ser generalizada



Utilizando este modelo de reacción se podría estimar la concentración del monómero como una función del tiempo mediante la siguiente ecuación (asumiendo que la concentración inicial del monómero es 0) (Lenihan y otros, 2010):

$$M = \left[\frac{k_1 P_0}{k_1 k_2} \right] e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}$$

En la Figura 30 se puede ver esquemáticamente los productos de degradación de la celulosa y del xilano (4-O-metilglucuronoxilano).

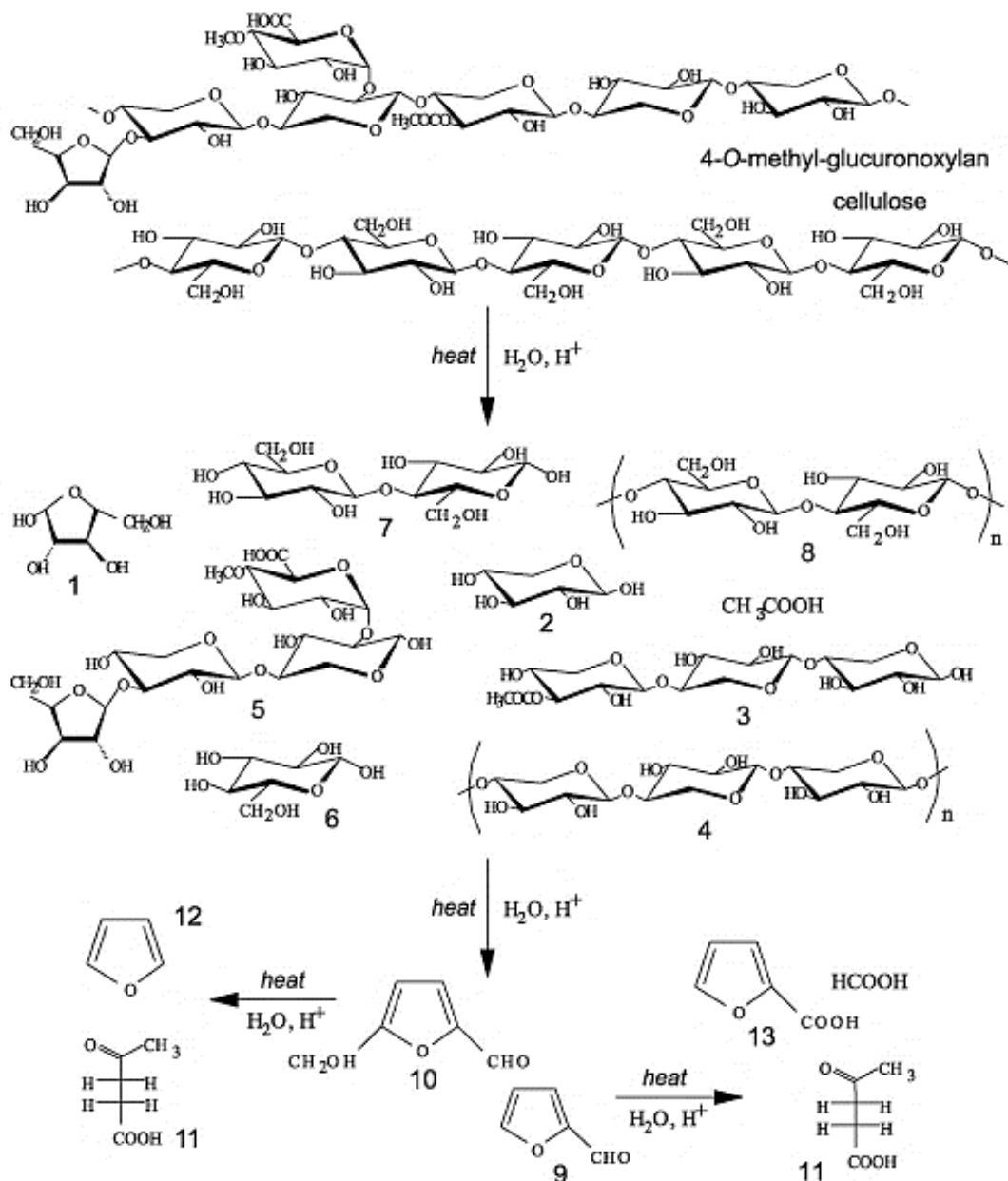


Figura 30. Hidrólisis de 4-O-metilglucuronoxilano y celulosa de maderas duras pretratadas con explosión por vapor. Los compuestos indicados son: 1- Arabinosa, 2- xilosa, 3-xilo-oligómeros acetilados, 4-xilo-oligómeros no acetilados de mayor grado de

polimerización, 5-oligosacáridos ácidos y ramificados, 6-glucosa, 7-celobiosa, 8-celo-oligómeros, 9-furfural, 10-hidroximetilfurfural, 11-ácido levulínico, 12-furano, 13-ácido 2-furoico. También están presentes ácido acético y ácido fórmico. Tomado de (Ramos, 2003)

1.3.3.2.2 Inhibidores que surgen de la explosión por vapor

La liberación de fragmentos de la lignina, junto con las posibles reacciones de condensación entre lignina, hemicelulosa, subproductos de la degradación de la celulosa y hemicelulosas son inhibidores o desactivadores de los pasos siguientes de hidrólisis enzimática y fermentación (Kim y otros, 2011). Estos productos y los mecanismos de inhibición de enzimas y microorganismos se representan esquemáticamente en la Figura 31 y Figura 32.

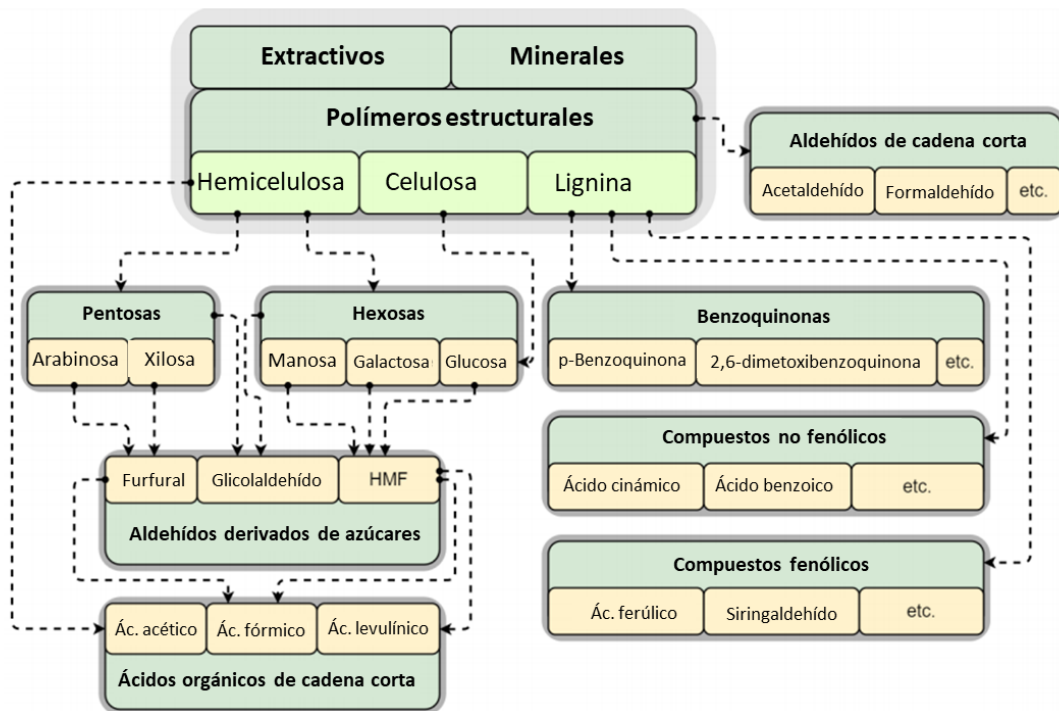


Figura 31. Representación esquemática del origen de algunos inhibidores, Adaptado de (Sjulander y Kikas, 2020)

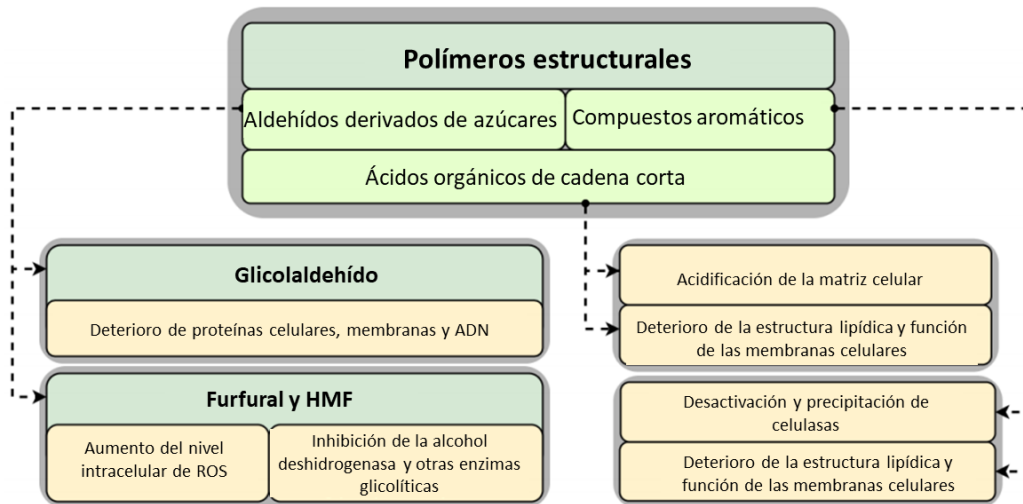


Figura 32. Posibles mecanismos de inhibición de algunos inhibidores derivados de la biomasa lignocelulósica. Adaptado de (Sjulander y Kikas, 2020)

El tipo y concentración de los productos de inhibición depende no solo de las condiciones de pretratamiento sino también de la biomasa lignocelulósica. Por ejemplo, el furfural es un aldehído derivado de los azúcares que se encuentra luego de la explosión por vapor es el furfural, producto de degradación de pentosas como xilosa y arabinosa (Gérardy y otros, 2020). Por su parte, el hidroximetilfurfural es el producto de degradación de la glucosa (Sasaki y otros, 2000). Estos aldehídos pueden ingresar al citoplasma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, inhibiendo enzimas como la alcohol deshidrogenasa. Como se presenta luego en la sección 1.5 Fermentación alcohólica de la glucosa, esta enzima es encargada de reducir el acetaldehído utilizando NADH como agente reductor, para dar etanol y regenerar el NAD⁺. Este NAD⁺ ingresa en la ruta glucolítica (o ruta Embden-Meyerhoff-Parnas) donde se produce el ATP intracelular que es esencial para el crecimiento de la levadura encargada *Saccharomyces cerevisiae*. Al no poder regenerarse el NAD⁺ y por lo tanto el ATP, el furfural y el 5-HMF inhiben el metabolismo celular (Mills, Sandoval y Gill, 2009; Chandel, da Silva y Singh, 2013). Además, el furfural favorece la acumulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) que dañan la mitocondria, membranas de la vacuola, el citoesqueleto de actina y la cromatina nuclear de la levadura, reduciendo su supervivencia y reproducción (Sjulander y Kikas, 2020). Sin embargo, debe considerarse que existe cierta tolerancia de la levadura a estos aldehídos, e incluso puede favorecerse la producción de etanol si se encuentran en concentraciones bajas (Z. L. Liu, 2018; Ylitervo, Franzén y Taherzadeh, 2013; Z. Liu, 2021). Por otra parte, tanto el furfural como el 5-HMF no parecen inhibir a

las celulasas durante la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica (Kim y otros, 2011).

Otro grupo de inhibidores son los compuestos aromáticos (que a su vez se pueden clasificar en compuestos fenólicos, compuestos no fenólicos, y benzoquinonas), que son derivados mayoritariamente de la lignina, aunque algunos pueden originarse de las hemicelulosas o de ciertos extractivos (Ko y otros, 2015; Zhang y otros, 2015). Los compuestos aromáticos inhiben tanto a las celulasas como a los microorganismos. Estos compuestos causan pérdida de la integridad de la membrana celular de los microorganismos y por lo tanto dañan la barrera natural que estos poseen. Los compuestos aromáticos también afectan las celulasas desactivándolas y causando su precipitación. (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000; Sjulander y Kikas, 2020)

También se forman en el pretratamiento ácidos orgánicos de cadena corta, como los ácidos fórmico, acético, láctico y levulínico, que tienen efectos inhibitorios sobre las levaduras y bacterias fermentativas, pero no sobre las celulasas. El ácido acético está presente luego del pretratamiento independientemente de las condiciones, ya que resulta de la hidrólisis de los grupos acetilos presentes principalmente en la hemicelulosa, así como también es posible encontrarlos en la lignina y en extractivos (Garrote, Domínguez y Parajó, 2001). En particular, como la hemicelulosa de las maderas duras está más acetilada, en general se encuentra mayor concentración de ácido acético en el prehidrolizado luego del pretratamiento (Sixta, 2006). El ácido acético inhibe la toma de nutrientes de *Saccharomyces cerevisiae* y acidifica la matriz intracelular de los microorganismos como también lo hace el ácido fórmico, cuya presencia deriva de la degradación de 5-HMF y furfural. (Sjulander y Kikas, 2020; Li y otros, 2020).

La optimización del proceso busca el máximo aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica, lo que significa la recuperación de la celulosa en la fracción sólida con buena susceptibilidad a la hidrólisis enzimática posterior, la recuperación de la fracción hemicelulósica en la fracción líquida, y baja formación de los compuestos de degradación (A. Duque y otros, 2016). Sin embargo, las condiciones operativas para satisfacer estos parámetros suelen ser opuestas, por lo que es necesario evaluar niveles aceptables para cada uno de estos parámetros, y considerar otras opciones posteriores como aprovechamiento de los productos de degradación.

1.3.3.2.3 Variables que afectan la explosión por vapor

Los principales factores que afectan el pretratamiento de explosión por vapor son el tamaño de partícula, la humedad, la temperatura, y el tiempo de residencia en el reactor.

En general, tamaños de partículas chicos en la biomasa resultan en mejor transferencia de calor dentro del reactor, mientras que partículas grandes pueden presentar diferencias de reacciones entre lo que sucede en la superficie y como queda la biomasa en el interior, con la biomasa poco pretratada. Sin embargo, también gran cantidad de partículas finas – o distribución de tamaño de partícula grande- puede generar significativas cantidades de productos de degradación, además de resultar en complicaciones operativas en el equipo de reactor de explosión por vapor, por lo que es necesario evaluar el tamaño adecuado (Z.-H. Liu y otros, 2013; Ciesielski y otros, 2015).

En cuanto a la humedad, si bien alto contenido de humedad parece favorecer la explosión por vapor, esto hará que se requiera más energía para el proceso debido al mayor calor específico del agua, además de que no sería posible transformar toda esa agua en vapor, incluso con alta carga de energía, lo que hará el proceso ineficiente y con necesidad de tiempos de pretratamiento más largos para alcanzar la optimización del proceso (L.-Y. Liu y otros, 2017; Hendriks y Zeeman, 2009). Por otra parte, bajo contenido de humedad es perjudicial para las reacciones de hidrólisis buscadas, lo que redundará en peor rendimiento en el paso posterior de sacarificación enzimática, además de aumentar el consumo de vapor (y energía) (Sui y Chen, 2015).

La temperatura y el tiempo de residencia son parámetros esenciales en el pretratamiento de explosión por vapor. Para predecir los resultados y comparar la eficiencia de pretratamientos realizados en diferentes condiciones experimentales se suele usar el factor de severidad (S_0), que resulta de aplicar el logaritmo a la siguiente ecuación donde se combinan los factores de temperatura (T) y tiempo de residencia (t) en la base de la ley de Arrhenius (y en forma similar al factor H de la industria de la pulpa de celulosa) (Overend y Chornet, 1987):

$$S_0 = \log_{10} \left(t \times e^{\frac{T-100}{14.75}} \right)$$

Ecuación 1

Tomando la base de esta ecuación y considerando la influencia de la hidrólisis ácida, también se suele definir el factor de severidad combinado (*CSF*, *Combined Severity*

Factor) donde se agrega el pH como otro factor (Chum y otros, 1990; Abatzoglou y otros, 1992):

$$CSF = \log_{10} \left(t \times e^{\frac{T-100}{14.75}} \right) - pH \quad \text{Ecuación 2}$$

Para las dos ecuaciones t es el tiempo de residencia en el reactor y T es la temperatura en °C.

De todas formas, como lo expusieron los autores de estos trabajos, estos parámetros sirven más bien como guía comparativa con base experimental que permite comparar en ciertos aspectos distintos procesos de explosión por vapor. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que estos parámetros no consideran otras variables como la fase de explosión, tamaño de partícula o humedad de la biomasa, además de diferencias tecnológicas entre los distintos equipos de explosión, como ser en *batch* o continuos, por lo que deben ser tomados con cautela (Yu y otros, 2012; Espirito Santo y otros, 2020; Monschein y Nidetzky, 2016). Por ejemplo, existe la hipótesis de que a valores equivalentes de CSF, el pretratamiento a altas temperaturas y tiempos de residencia cortos es mejor que bajas temperaturas y altos tiempos de residencia. En estas últimas condiciones existiría mayor acumulación de ácidos orgánicos, aldehídos, y compuestos fenólicos, además de reacciones secundarias de condensación que involucra a los carbohidratos, perdiendo rendimiento en el pretratamiento, además de que temperaturas muy bajas no son suficientes para remover las hemicelulosas (Espirito Santo y otros, 2020; Fockink, Sánchez y Ramos, 2018; Pielhop y otros, 2016).

1.3.3.3 Modificaciones a la explosión por vapor

Explosión por vapor catalizada con ácido

En la explosión por vapor catalizada por ácido se agrega un catalizador a la biomasa antes de entrar al reactor, en general H_2SO_4 o SO_2 y en proporciones que pueden ir de 0.3 % a 3 % masa/masa. Este catalizador acelera las reacciones de hidrólisis permitiendo operar a temperaturas más bajas o a tiempos de residencia menores, aunque el impacto de los catalizadores ácidos tanto en el equipo como a nivel ambiental puede ser perjudicial y deben ser tomado en cuenta (A. Duque y otros, 2016).

Explosión de fibra por amoníaco (Ammonia Fiber Explosion, AFEX)

En este pretratamiento la biomasa es sometida a alta presión (17-20 bar) y temperaturas medias (60-100 °C) junto a 1-2 kg de amonio líquido anhidro por kg de biomasa seca durante tiempos de residencia de 5 a 30 minutos, para luego liberar repentinamente la presión, de forma similar a la explosión por vapor (Capolupo y Faraco, 2016). Además de la baja temperatura comparada con la explosión por vapor –lo que determina menor consumo de energía– en este proceso el amoníaco es removido de la biomasa por evaporación y puede ser recuperado (Merrettig-Bruns y Sayder, 2016). Luego de este proceso la biomasa se encuentra pronta para la hidrólisis enzimática o cualquier otro proceso biotecnológico. A diferencia de la explosión por vapor, el proceso AFEX no remueve la fracción hemicelulósica ni genera por lo tanto una fracción líquida, por lo que también es necesario contar con hemicelulasas en el paso de hidrólisis enzimática (Merrettig-Bruns y Sayder, 2016; Capolupo y Faraco, 2016).

Durante el pretratamiento AFEX, el amoníaco penetra la pared celular y en presencia de agua suceden reacciones de amonólisis e hidrólisis rompiendo diversos enlaces éster (como los acetatos de las hemicelulosas, *p*-cumaratos, ferulatos, diferulatos, etc), generando las correspondientes amidas y ácidos (Figura 33) (Merrettig-Bruns y Sayder, 2016). La ruptura de los enlaces lignina – hemicelulosa remueve la hemicelulosa y los compuestos fenólicos que se redepositan en la superficie de la biomasa sin pérdida de masa, que junto con la descompresión expansiva del amoníaco genera poros mejorando la accesibilidad de las enzimas en los pasos posteriores (Chundawat y otros, 2011).

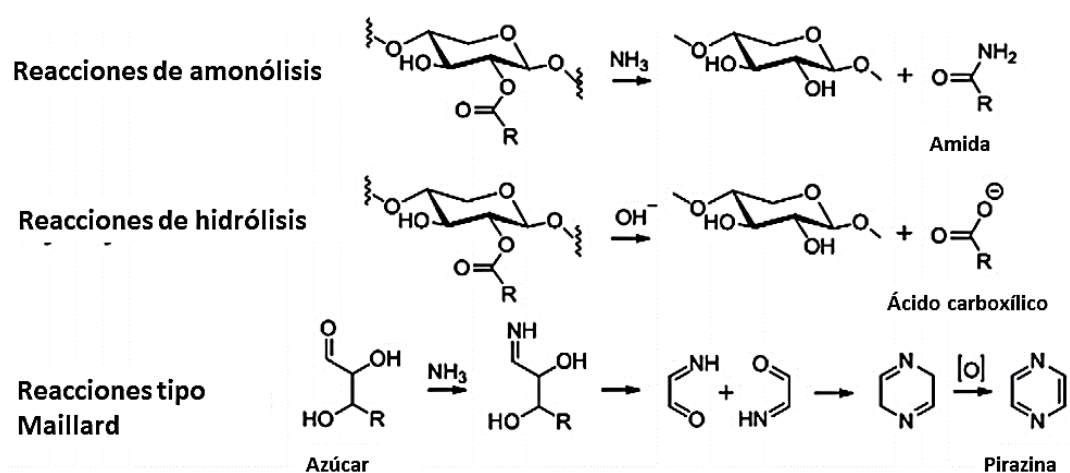


Figura 33. Representación esquemática de reacciones de amonólisis e hidrólisis de los enlaces éster carbohidrato-lignina y otras reacciones de tipo Maillard que pueden suceder en los pretratamientos basados en amoníaco. Adaptado de (Chundawat y otros, 2010)

Otro pretratamiento que utiliza amoníaco es “Percolación con reciclaje de Amoníaco”, ARP (por *Ammonia Recycle Percolation*). En este proceso, la biomasa es pretratada con 10-15 % en peso de amoníaco acuoso en un reactor de flujo continuo, con temperaturas que varían entre 150 y 200 °C, una velocidad de percolación de 5 mL/min y tiempo de residencia de 14 minutos para luego recuperar el amoníaco (Merrettig-Bruns y Sayder, 2016)

Explosión húmeda (wet explosion)

En esta variación de la explosión por vapor se utiliza un agente oxidante que aumenta la descomposición de la lignina, permitiendo mayor accesibilidad a la celulosa. La biomasa lignocelulósica acondicionada y calentada entre 55 y 110 °C (con agregado o no de ácido) por máximo 48 horas, luego la biomasa es calentada con vapor de agua entre 140 °C y 200 °C durante 5-30 minutos, y en la etapa final se calienta un poco más (a 170-210 °C) en presencia de oxígeno, peróxido de hidrógeno, o aire (en el entorno de 2 a 10 % de demanda química de oxígeno) aumentando la presión a 15-35 bar durante 1 a 30 minutos, para luego liberar la presión repentinamente. (A. Duque y otros, 2016)

1.3.4 Pretratamientos químicos

Los pretratamientos químicos más tradicionales se pueden clasificar en pretratamientos alcalinos y ácidos.

1.3.4.1 Pretratamientos alcalinos

Hidróxidos de sodio, potasio, calcio o amonio han sido utilizados históricamente para pretratar la biomasa lignocelulósica a baja temperatura y presión para remover la lignina y alterando la estructura cristalina de la celulosa, ya que es uno de los procesos utilizados en la industria pulpera y en particular en el proceso Kraft (Xu y Sun, 2016). Los principales problemas de estos procesos son el extenso tiempo para completar la reacción, pudiendo tomar hasta días, y los procesos necesarios para el correcto aprovechamiento de todas las fracciones, lo que suele encarecer el pretratamiento (Xu y Sun, 2016).

1.3.4.2 Pretratamientos ácidos

En estos pretratamientos, son usados tanto ácidos débiles como fuertes, siendo en general el ácido sulfúrico el más común, aunque también se ha investigado el ácido clorhídrico, el fosfórico y el nítrico. Los porcentajes de ácido utilizados van de 0.2 % a 2.5 % masa/masa con temperaturas de 130 °C a 210 °C, manteniendo la reacción por horas, liberando el material lignocelulósico hidrolizado, evitándose así un paso siguiente de hidrólisis. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la necesidad de excesivos lavados para remover impurezas y productos de degradación tóxicos, así como la necesidad de equipamiento especial para evitar la corrosión debida al ataque del ácido (Beig y otros, 2021)

1.3.4.3 Pretratamientos químicos no tradicionales

El uso de reactivos químicos para reducir la recalcitrancia de la matriz lignocelulósica implica la posibilidad de ser tóxicos y/o generar desechos peligrosos y contaminantes, por lo que sería conveniente que su uso tenga en cuenta estos inconvenientes. Los pretratamientos químicos que podrían considerarse que trabajan con químicos “verdes” – y por lo tanto más promisorios- serían los pretratamientos *Organosolv*, ozono, y líquidos iónicos.

Pretratamiento *Organosolv*

En el pretratamiento *Organosolv* se usan solventes orgánicos como metanol, etanol, acetona, etilenglicol, o fenoles, para solubilizar y aislar a la lignina, rompiendo enlaces internos de la lignina, así como los complejos lignocelulósicos, de forma que los solventes puedan ser recuperados, y utilizando a la lignina como punto de partida para otros químicos o como combustible. En este proceso se mezcla la biomasa con los solventes y se calienta entre 100 °C y 250 °C, agregándose a veces algún catalizador como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico. (Capolupo y Faraco, 2016; Mesa y otros, 2016)

Ozonólisis

El ozono es un oxidante químico altamente reactivo a compuestos con grupos funcionales con alta densidad electrónica, como es el caso de la lignina; el ozono deteriora la estructura de los anillos aromáticos liberando compuestos solubles como los ácidos acético, fórmico, p-hidroxibenzoico, vanílico, y aldehídos como p-hidroxibenzaldehído y vanillina (Capolupo y Faraco, 2016; Coca, González-Benito y García-Cubero, 2016). Este pretratamiento es altamente selectivo de la lignina sin pérdidas significativas de carbohidratos, acelerando la despolimerización de la hemicelulosa y exponiendo la celulosa para los pasos siguientes, además de ser un proceso que usa condiciones suaves, siendo realizado a temperatura y presión ambiente (Zhao y otros, 2021; Coca, González-Benito y García-Cubero, 2016). Como desventaja, se deben aplicar altas concentraciones de ozono, por lo que este proceso tiene que ser altamente optimizado para ser un proceso económica e industrialmente viable.

Líquidos Iónicos

Los líquidos iónicos son sales que existen en forma líquida a temperaturas menores de 100 °C y que tienen la capacidad de disolver la biomasa lignocelulósica. Por ejemplo, algunos líquidos iónicos tienen la capacidad de disolver a la celulosa sin necesidad de derivatizarla, mientras que otros disuelven lignina pero no celulosa (H. Rodríguez, 2021; Capolupo y Faraco, 2016). La estrategia en general para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica consiste en la disolución de la biomasa, seguida por el fraccionamiento de las distintas fracciones biopoliméricas disueltas para separar los estos compuestos. Debido a la propia naturaleza de los líquidos iónicos no es posible extraer los compuestos de interés mediante evaporación de los solventes, por lo que en general se agregan solventes miscibles con el líquido iónico que precipitan el biopolímero, como se puede

observar en el esquema de la Figura 34 (H. Rodríguez, 2021). Aunque existe gran cantidad de líquidos iónicos, los imidazólicos han recibido gran atención, aunque últimamente se ha encontrado que los líquidos iónicos con cationes colínicos y aniones aminoacídicos parecen tener mejor desempeño para disolver biomasa lignocelulósica (Capolupo y Faraco, 2016).

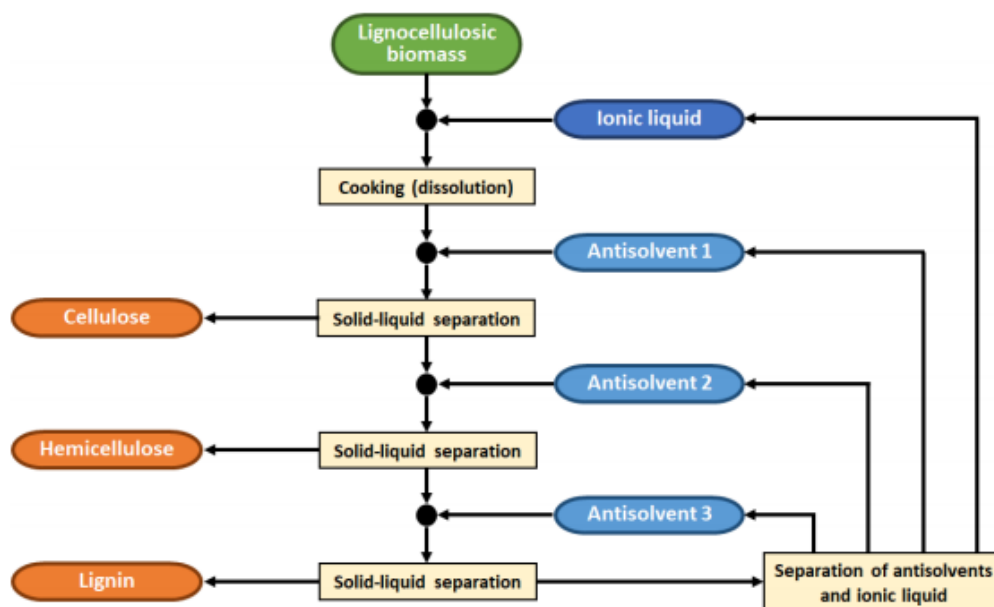


Figura 34. Una posible estrategia para el fraccionamiento de la biomasa utilizando líquidos iónicos. Tomado de (H. Rodríguez 2021)

1.3.5 Pretratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos utilizan microorganismos, como hongos, bacterias y actinomicetes que sintetizan sistemas celulolíticos, hemicelulolíticos, y lignolíticos para degradar los componentes principales de la biomasa lignocelulósica. En general, las investigaciones apuntan a la búsqueda de microorganismos capaces de degradar la lignina afectando lo menos posible a la celulosa. Por ejemplo, la bacteria *Streptomyces griseus* ha demostrado ser muy útil para la remoción de lignina y para la producción de celulasas específicas (Sato y otros, 2020; Saritha, Arora y Lata, 2012). De todas formas, son más comúnmente estudiados los hongos de pudrición de la madera, siendo los hongos de pudrición blanca los que han demostrado ser más efectivos para distintos tipos de biomasa (Kainthola y otros, 2021). En los hongos de pudrición blanca (un grupo diverso de basidiomicetos), el sistema lignolítico incluye lacasas, polifenol oxidasas, manganeso

peroxidasas y lignina peroxidasas con alto potencial redox que oxidan a la lignina directamente, teniendo la capacidad única de mineralizar la lignina a dióxido de carbón y agua (Ponnusamy y otros, 2019). En general, el pretratamiento con hongos es llevado a cabo mediante una fermentación en estado sólido (*solid-state fermentation*), donde los parámetros más importantes son temperatura, contenido de humedad y aireación, aunque también puede ser realizado con las enzimas directamente (Rodrigues y otros, 2020; Sánchez y Montoya, 2020). Dentro de estos hongos también se han estudiado otros como *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia radiata*, *Dichmitus squalens*, *Rigidosporus lignosus*, *Junguasepar ablima*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Irpex lacteus* y *Trametes versicolor* (Ponnusamy y otros, 2019; Capolupo y Faraco, 2016; Saihua Huang, 2020). Uno de los hongos de pudrición blanca más estudiado es *Phanerochaete chrysosporium*, aunque su sistema lignolítico no es el más efectivo (Kuppuraj y otros, 2021; Liu y otros, 2020).

Otros microorganismos usados son los hongos de pudrición parda (o marrón) de la madera, que degradan la celulosa o hemicelulosa afectando levemente a la lignina (Goodell, Winandy y Morrell, 2020; Zhu y otros, 2020). Dentro de los hongos que tienen esta capacidad se pueden citar a *Tyromyces balsemeus*, *Poria placenta*, *Lentinus lepideus*, *Fomitopsis pinicola* (Zhang y Schilling, 2017). Estos microorganismos poseen endo-celulasas, exo-celulasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas para degradar la celulosa, además de otras enzimas capaces de actuar sobre las hemicelulosas como endo-xilanasas, endo-arabinasas, β -galactosidasas y β -glucosidasas (Capolupo y Faraco, 2016; Sharma, Xu y Qin, 2019). Además de este sistema enzimático, también se postula que puede existir la ruptura de enlaces glicosídicos mediante la generación no enzimática de radicales hidroxilo por la reacción de Fenton ($\text{Fe}^{+3} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+2} + \bullet\text{OH} + \text{}^-\text{OH}$) (Arantes, Jellison y Goodell, 2012).

Los pretratamientos biológicos son ambientalmente más amigables, por la mínima producción de desechos, inhibidores y menor consumo de energía que los otros pretratamientos. Sin embargo, en general presentan baja eficiencia con largos tiempos de tratamiento.

1.4 Hidrólisis enzimática de la celulosa

1.4.1 Introducción

El pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, y en particular mediante explosión por vapor, genera un residuo sólido compuesto principalmente por celulosa y lignina, junto con cantidades menores de hemicelulosa. La hemicelulosa se solubiliza mayoritariamente, formando la fracción líquida junto con sus productos de degradación (como el furfural y el ácido acético), así como los productos resultantes de la degradación parcial de la lignina y de la celulosa, dependiendo de la severidad del pretratamiento. Los compuestos de degradación de la biomasa lignocelulósica pueden tener valor en sí mismos, pero también pueden ser perjudiciales en los pasos siguientes de procesamiento, por ejemplo como inhibidores de levaduras y/o enzimas.

En el caso de la fracción sólida, si bien el pretratamiento resulta en fibras de celulosa más accesibles, en el proceso de bioconversión de la celulosa para la producción de productos como el etanol es necesario liberar la glucosa a partir de la celulosa, proceso que generalmente es eficientemente realizado mediante enzimas. Este proceso enzimático generalmente se conoce como sacarificación o hidrólisis enzimática de la celulosa. Luego que la glucosa se encuentra libre, se puede proceder a la fermentación (también es posible realizar la sacarificación y fermentación simultáneamente, aspecto que será presentado en la sección 1.5.5 Sacarificación y Fermentación Simultáneas (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)). Este proceso es más eficientemente realizado mediante un consorcio de enzimas y proteínas auxiliares que actúen en la celulosa, pero también en los otros componentes principales de la biomasa (es decir, hemicelulosa y lignina).

En esta sección se detalla el complejo enzimático necesario para realizar la bioconversión de celulosa en glucosa.

Originalmente se postuló que la celulosa se degrada enzimáticamente en dos pasos, primero la conversión de la celulosa nativa y cristalina a una celulosa más corta y accesible mediante un componente enzimático llamado C_1 , y un segundo paso realizado mediante un componente llamado C_x para producir oligómeros y monómeros (Reese, Siu y Levinson, 1950). Posteriormente, de los secretomas de hongos se identificaron un grupo de glicosidasas o glicosil hidrolasas (GHs) activas sobre la celulosa. Este grupo

enzimático incluye a las celobiohidrolasas (CBHs, que desprende celobiosa desde los extremos de la celulosa), endoglucanasas (EGs, que rompen los enlaces de la celulosa en las regiones no cristalinas) y β -glucosidasas (BGs, que despolimerizan los oligosacáridos que liberaron las enzimas anteriores). Las glicosidasas se pueden clasificar de diversas maneras, una de ellas es de acuerdo con las semejanzas en la secuencia aminoacídica de los módulos catalíticos, determinando familias de proteínas con un plegado similar (Figura 35). (Davies y Henrissat, 1995; Østby y otros, 2020).

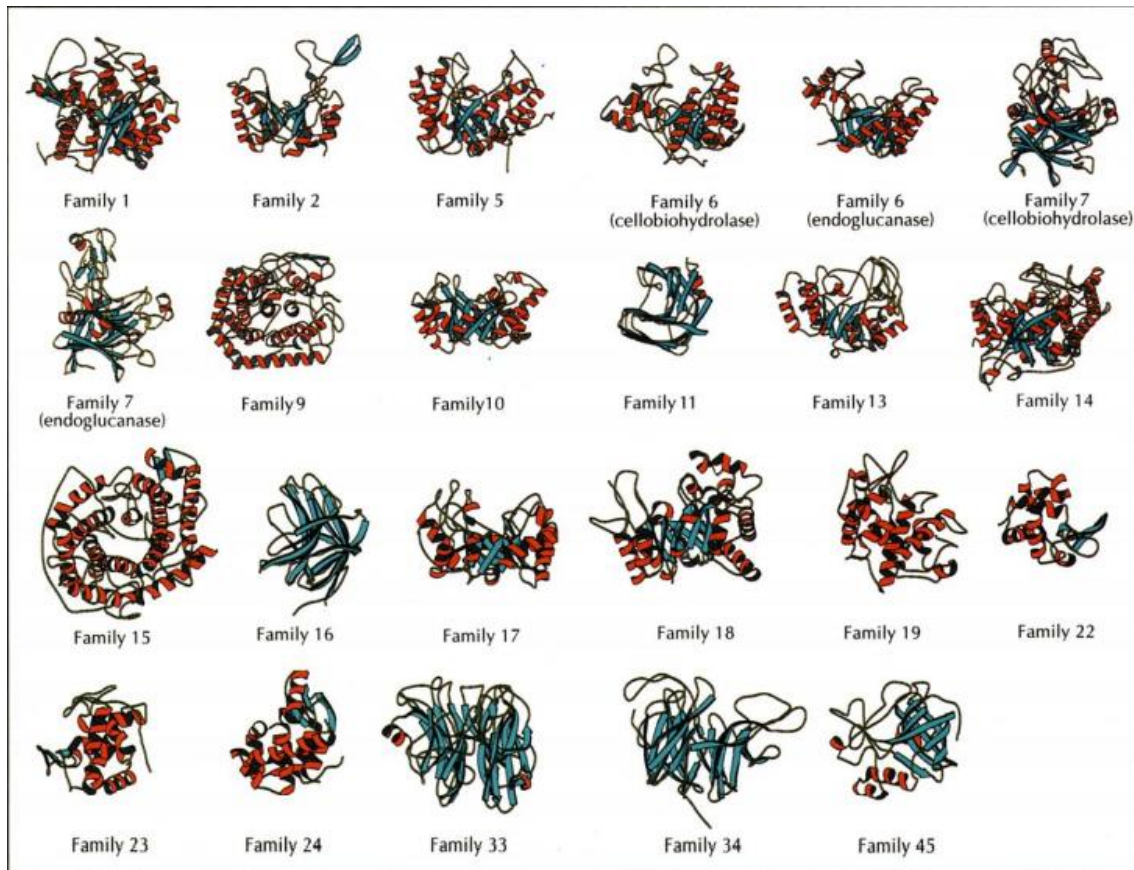


Figura 35. Representación del pliegue principal del sitio catalítico en varias familias de glicosil hidrolasas. Tomado de (Davies y Henrissat, 1995)

Dentro del esquema C_1 - C_x se había propuesto originalmente que las celobiohidrolasas eran parte del factor C_1 , rompiendo las uniones no covalentes entre cadenas adyacentes de celulosa sacando por lo tanto a la cadena de celulosa de su entorno cristalino. Este proceso de modificación de la celulosa era llamado “amorfogénesis” e incluía la combinación de distintos cambios estructurales en la celulosa, como la disrupción, hinchado, fibrilado, hacerla áspera, que las fibras estén más sueltas, o con huecos. (Kim y otros, 2014; Østby y otros, 2020).

Sin embargo, se demostró luego la existencia de proteínas auxiliares o *sinérgicas* que funcionan como agentes promotores para de la actividad de la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa, generalmente mediante la modificación de la estructura cristalina de la celulosa. Dentro de estas proteínas se encuentran las que se unen a carbohidratos (*Carbohydrate-binding modules, CBMs*), expansinas vegetales, proteínas similares a las expansinas, y monooxigenasas líticas de polisacáridos (proteínas de distintas familias de actividad auxiliar (AA) (Figura 36). (Kim y otros, 2014).

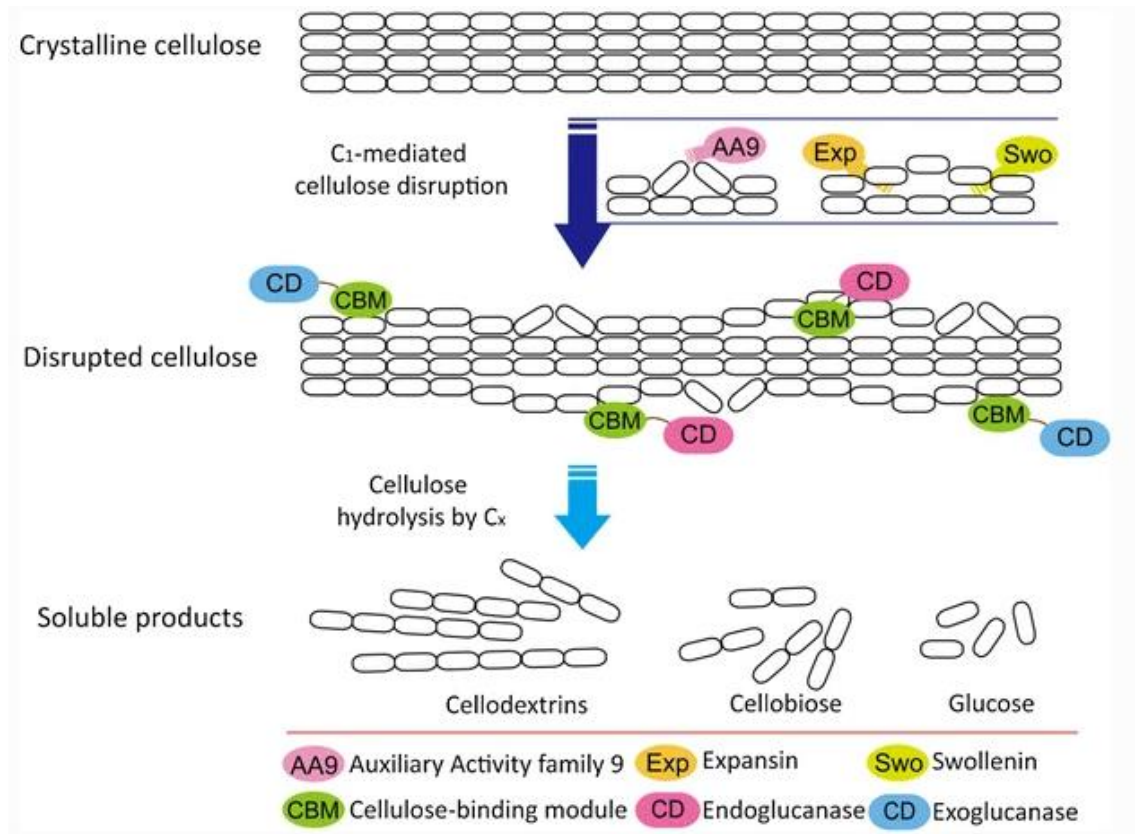


Figura 36. Representación esquemática de las acciones de las enzimas y las proteínas auxiliares en la hidrólisis de la celulosa. Tomado de (Kim y otros, 2014)

Por otra parte, la presencia de lignina en el material a tratar con enzimas celulolíticas, no solo resulta en una barrera física para la acción de las celulasas, sino que también produce un efecto inhibitorio sobre las enzimas, ya que estas tienden a unirse a la superficie de la lignina. Esta unión causa no solo la pérdida de actividad de las enzimas, además aumenta la dificultad a la hora de recuperar y reciclar las enzimas (Rahikainen y otros, 2013). La lignina se adsorbe en los sitios de la celulosa donde las celulasas también se conectan a través de los CBM, lo que resulta en mayor lentitud en su accionar. Se ha demostrado que lignina más hidrofóbica tiende a ser más perjudicial para el accionar de las enzimas, por

lo que diversas estrategias se han empleado para minimizar la inhibición por lignina, como el agregado de surfactantes o la inmovilización de las enzimas (Figura 37). (Agrawal, Verma y otros, 2021; Agrawal, Satlewal y otros, 2017)

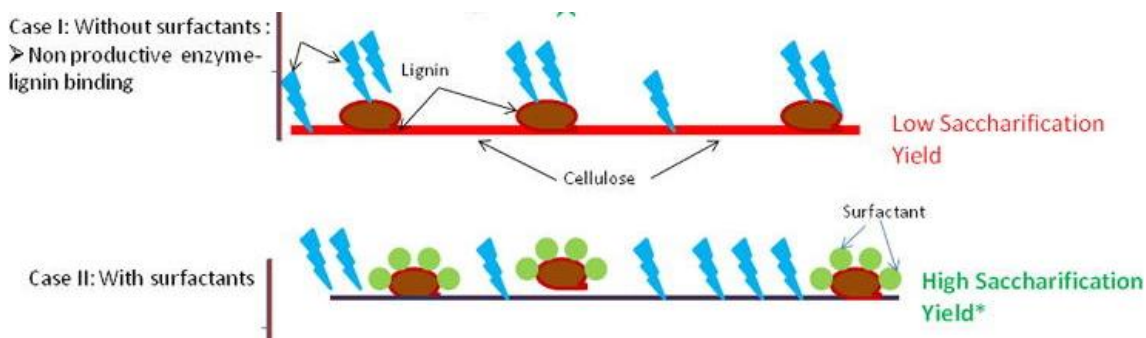


Figura 37. Unión no productiva entre lignina y celulosa (imagen superior, caso I) vs unión productiva con agregado de surfactantes (imagen inferior, caso II). Tomado de (Agrawal, Satlewal y otros, 2017)

1.4.2 Enzimas glicosil hidrolasas activas sobre la celulosa

1.4.2.1 Celobiohidrolasas (CBH)

Las celobiohidrolasas son también llamadas exoglucanasas, porque actúan desde los extremos de las cadenas de celulosa. Atacan las partes cristalinas del sustrato produciendo principalmente celobiosa y por lo tanto bajando levemente el grado de polimerización de la celulosa. En general se producen dos tipos de celobiohidrolasas, CBHI y CBHII, como es el caso *T. reesei*; sin embargo, algunas bacterias aeróbicas pueden no producir CBHI. Originalmente se pensaba que las celobiohidrolasas actuaban solo desde el extremo no reductor de la celulosa, pero la existencia de distintos tipos de exoglucanasas demostró que las CBHI prefieren el extremo reductor (Teeri, 1997).

Las CBHs logran una buena actividad hidrolítica gracias a la estructura única del dominio catalítico, que consiste en sitios de unión al sustrato en forma de túnel cubiertos por bucles o *loops*. El túnel permite pasar una cadena de polisacáridos a través de él, y junto con los bucles permite a la enzima liberar el producto mientras se encuentra firmemente unida a la cadena de polisacárido, lo que le permite también procesar varias unidades de celobiosa antes de desprenderse de la celulosa, fundamental en la eficiencia que presentan frente a la celulosa cristalina (Borisova y otros, 2018; Davies y Henrissat, 1995).

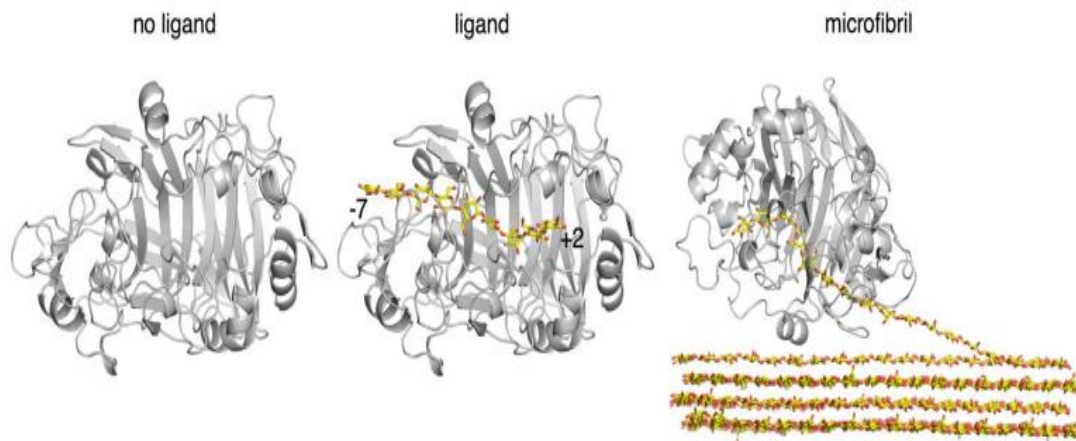


Figura 38. Ilustración de la unión de la celulosa a los sitios activos de una celobiohidrolasa (Borisova y otros, 2018)

1.4.2.2 Endoglucanasas

Las endoglucanasas atacan a la cadena de celulosa de forma no sistemática, aleatoriamente y produciendo un efecto sinérgico con las celobiohidrolasas, al generar nuevos extremos terminales en la cadena de celulosa. Estas enzimas actúan rompiendo los enlaces glicosídicos β 1-4 en las regiones amorfas, generadas a su vez por la acción de las celobiohidrolasas que resulta en un sustrato más accesible (Jalak y otros, 2012; Akram y otros, 2018). La acción de las endoglucanasas por sí solas disminuye el grado de polimerización de la celulosa, aunque existe una estabilización a valores altos de polimerización, mayores a 400 unidades de glucosa (Väljamäe, 1999).

La estructura encontrada en las endoglucanasas es generalmente la de hendidura o surco, lo que permite a la estructura abierta unirse aleatoriamente a varias unidades de carbohidratos en la cadena celulósica (Xu y otros, 2011).

Desde el punto de vista industrial, la producción de estas enzimas a partir de microorganismos termófilos reviste particular importancia, lo que permite su utilización a altas temperaturas y a valores extremos de pH (Akram y otros, 2018).

1.4.2.3 β -glucosidasas

Las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa y otros oligosacáridos derivados de celulosa, liberando glucosa; es la enzima involucrada en el paso final para la completa degradación de la celulosa y determina la velocidad de conversión total de la lignocelulosa en glucosa, además de que su presencia disminuye la inhibición por productos de las celobiohidrolasas (Srivastava y otros, 2019).

El mecanismo de acción mediante el cual estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos formados entre el grupo hemiacetal-OH de una aldosa o una glucosa y el grupo OH de otro compuesto como ser otro azúcar, aminoalcohol, aril-alcohol o alcoholes primarios, secundarios o terciarios, consta de tres pasos (Figura 39) (Bhatia, Mishra y Bisaria, 2002; Meleiro y otros, 2017):

- 1) un nucleófilo de la enzima ataca el C₁ anomérico, al tiempo que otro residuo activo de la enzima actúa de catalizador ácido-base y dona un H⁺ al oxígeno glicosídico, liberando la glicona. Esto resulta en la formación de un enlace covalente α (y por lo tanto se invierte la configuración)
- 2) el intermediario glucosil-enzima es hidrolizado en presencia de agua
- 3) la glucosa es liberada al medio y la enzima es restaurada.

En ciertas condiciones especiales, el ataque en el intermediario glucosil-enzima no es hecho por agua, sino que puede ser realizado por otro azúcar o distintos alcoholes, resultando en una reacción de transglicosilación (no mostrada) (Meleiro y otros, 2017).

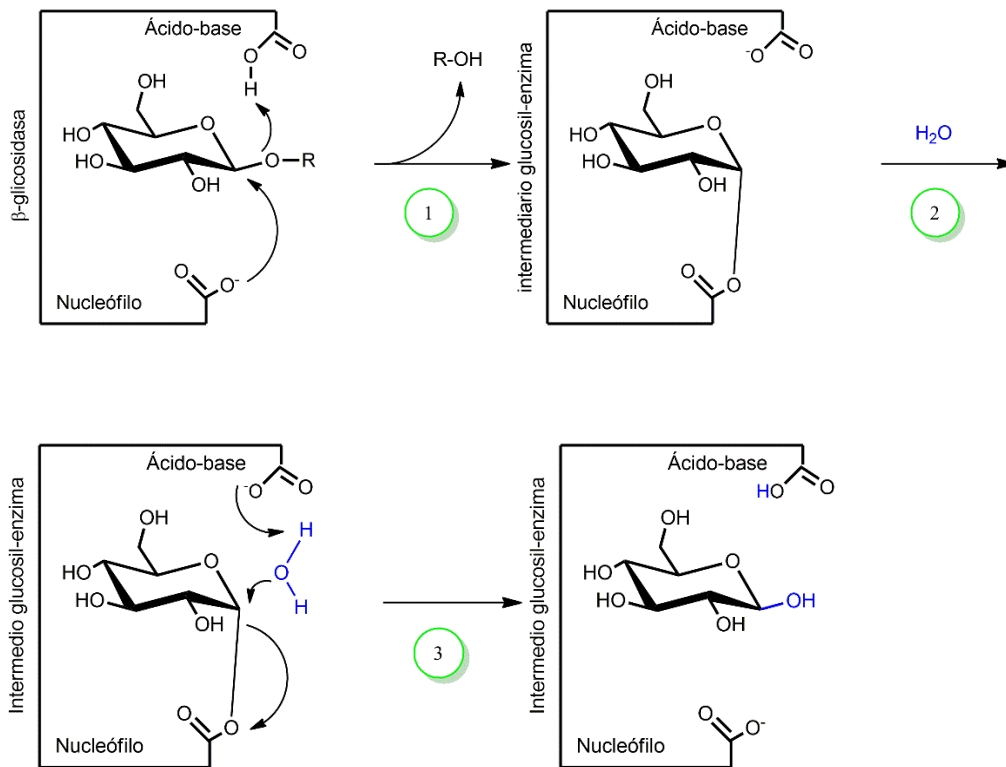


Figura 39. Mecanismo de reacción de la β-glicosidasa, adaptado de (Meleiro y otros, 2017; Bhatia, Mishra y Bisaria, 2002)

Aunque es una enzima casi universal producida por diferentes organismos, no todos producen β -glucosidasas en proporciones adecuadas para hidrolizar efectivamente a la celulosa; por ejemplo, *Trichoderma reesei* produce β -glucosidasa, pero en pocas cantidades, además de ser sensible a la inhibición por la glucosa, por lo que se acumula celobiosa y generando a su vez la inhibición por producto de las celobiohidrolasas (Singhania y otros, 2013). Por esta razón, distintos esfuerzos se han realizado para desarrollar organismos productores de β -glucosidasas tolerantes a la inhibición por glucosa (Zada y otros, 2021). Los hongos filamentosos han demostrado ser buenos productores de β -glucosidasas y varias se han purificado y caracterizado a partir de distintas especies de *Aspergillus*, como *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae* y *A. versicolor*, aunque los hongos endofíticos parecen ser mayores productores de β -glucosidasas (Huang y otros, 2021)

Las β -glucosidasas pueden ser clasificadas en tres clases según la especificidad de sustrato. La Clase I son aril β -glucosidasas (que actúan sobre aril-glucósidos), la Clase II, son “verdaderas” celobiosas (que actúan sobre la celobiosa para liberar glucosa), y la Clase III, son enzimas que tienen una amplia especificidad de sustrato rompiendo enlaces β -glicosídicos entre residuos glicósidos y una gran variedad de agliconas (Fusco y otros, 2018). También pueden ser clasificadas según el esquema de identidad de secuencia de nucleótidos, que se basa en la agrupación según similitudes en la ubicación de las alfa hélices y las hojas beta en la posición plegada (Singhania y otros, 2013).

Las β -glucosidasas tienen estructura de bolsillo o cráter y dos ácidos carboxílicos en el sitio activo involucrados en la catálisis, lo que les permite unirse al extremo no reductor de la celobiosa y liberar la glucosa (Zhang y Zhang, 2013; Singhania y otros, 2013).

1.4.3 Proteínas auxiliares (sinérgicas)

1.4.3.1 Módulos de unión a carbohidratos (*Carbohydrate-binding modules*, CBM)

Varias celulasas y otras glicosidasas (xilanasas, quitinasas, amilasas) están compuestas por dos dominios diferentes: un dominio propiamente catalítico y uno o más dominios no catalíticos llamados Módulos de unión a carbohidratos o CBMs, por el inglés *Carbohydrate-binding modules*. Estos dos dominios se unen mediante una estructura secundaria flexible que permite que haya un amplio espacio entre los dominios. La función molecular principal de los CBMs es unirse a los carbohidratos, permitiendo que

aumente la concentración del dominio catalítico de la celulasa en la superficie del sustrato insoluble, regulando las velocidades de unión y disociación enzima-sustrato incrementando la velocidad de catálisis; la remoción de los CBMs ha demostrado tener una reducción significativa en la actividad enzimática (Nakamura y otros, 2020; Oded, Ziv y Ilan, 2006). Los CBMs reconocen el sitio específico en el sustrato e inducen la disrupción de la celulosa, facilitando la actividad catalítica de la celulasa. La disrupción no hidrolítica de la celulosa fue observada por cambios en las propiedades físicas de la celulosa, como la reducción de la cristalinidad, la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las distintas cadenas, y la formación de estructuras rugosas en la superficie de la celulosa (Kim y otros, 2014)

Los CBMs son proteínas estructuralmente diversas, que se unen a diferentes tipos de carbohidratos con diferente morfología, lo que ha hecho que los CBMs pertenecientes a distintas familias se dividan en tres tipos –A, B y C- basados en la semejanza funcional (Figura 40). Los CBMs tipo A son proteínas de unión a la superficie, que pueden unirse a la celulosa altamente cristalina con poca o ninguna afinidad con carbohidratos solubles (Georgelis, Yennawar y Cosgrove, 2012). El CBM1 es el más típico de las proteínas de este tipo, junto con el también típico CBM3, que presenta una estructura de sándwich β (Figura 41) (Zhang y otros, 2020). Los CBMs tipo B son proteínas de unión a la cadena de glucano, en particular a cadenas de hasta seis monómeros, siendo insignificante la interacción con oligosacáridos con un grado de polimerización menor a tres. Finalmente, los CBMs tipo C se unen a oligómeros chicos, de mono- a tri- sacáridos. (Boraston y otros, 2004)

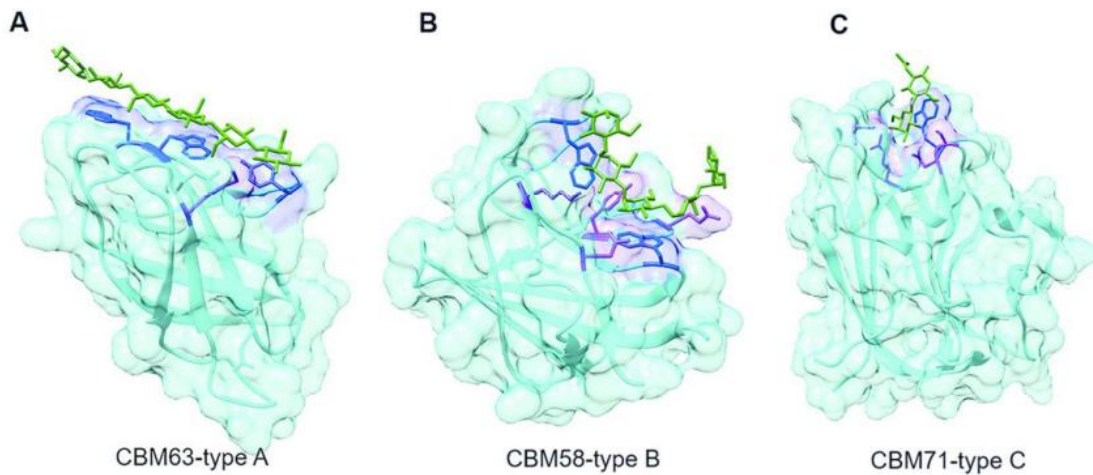


Figura 40. Topología de los sitios de unión de los tres tipos de CBM. Tipo A: unión a celulosa cristalina, tipo B: unión a cadenas de 3 a 6 unidades monoméricas, tipo C: oligómeros de 1 a 3 unidades. En verde se muestra el sustrato. Tomado de (Armenta y otros, 2017).

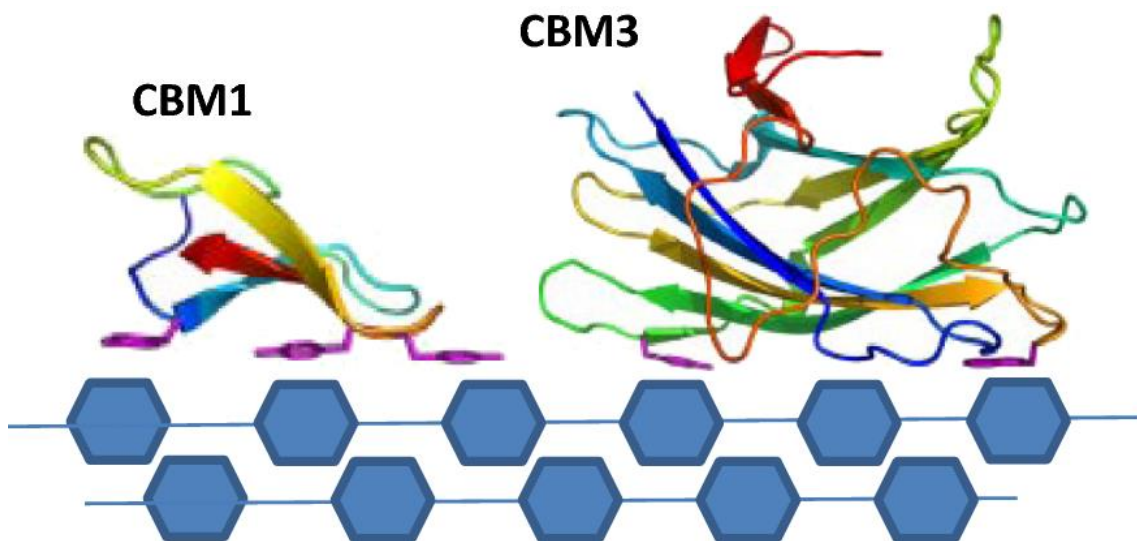


Figura 41. Ilustración esquemática de las estructuras tridimensionales de CBM1 y CBM3 y su adsorción en la superficie de la celulosa cristalina vía interacciones del tipo A. Tomado de (Zhang y otros, 2020)

1.4.3.2 Expansinas vegetales

Las expansinas son proteínas extracelulares no hidrolíticas que se encuentran en las paredes celulares de prácticamente todas las plantas terrestres y cumplen la función de mediar el agrandamiento de las células durante el crecimiento de las plantas, además de otras funciones similares independientemente del desarrollo de las plantas. Las expansinas inducen la extensión y relajación de las paredes celulares (no

hidrolíticamente) lo que resulta en el desbloqueo de la red de microfibrillas celulósicas (Zhang y otros, 2021a). Las expansinas pueden romper los puentes de hidrógeno entre las cadenas de celulosa así como entre las microfibrillas celulósicas, además de los que existen en los complejos celulosa-hemicelulosa, lo que abre la estructura de la celulosa e incrementando la accesibilidad a la celulosa (producto del “deslizamiento” de los polisacáridos, lo que es conocido como “actividad de fluencia” o *creep activity*) (Zhang y otros, 2021b; Kim y otros, 2014)

1.4.3.3 Expansinas microbiales (o Expansin-like, similar a expansinas vegetales)

Además de en plantas, las expansinas también se pueden encontrar en amebas, mejillones, nematodos, hongos y bacterias. Se supone que la función de las expansinas de hongos y bacterias es la de ayudar a estos microorganismos a penetrar las plantas como patógenos o colonizadores, extendiendo los componentes de la pared celular y debilitando a la celulosa, de forma similar a las expansinas propias de las plantas (Santos y otros, 2017; Kim y otros, 2014).

Dentro de estas proteínas se encuentra la swolenina (derivada del inglés *swelling*, hinchazón), una proteína secretada por el hongo *Trichoderma reesei*. Esta proteína puede descomponer la estructura de la celulosa, aumentando la accesibilidad y laxitud de la celulosa, mediante la eliminación de los puentes de hidrógeno. Otros microorganismos, como *Penicillium oxalicum* y algunas bacterias también son productores de swolenina. (Meng y otros, 2020; Kang y otros, 2013).

1.4.3.4 Monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO)

Las monooxigenasas líticas de polisacáridos, en inglés *Lytic Polysaccharide Monooxygenases* (LPMO) forman las familias de actividad auxiliar AA9, -10, -11, -13, -14, y -15 (Bissaro y otros, 2021). En particular, las enzimas fúngicas que degradan la lignocelulosa corresponden a la familia AA9, mientras que las AA10 son enzimas bacterianas (Johansen, 2016). Las LPMO son enzimas dependientes de cobre que se unen a las regiones cristalinas en la celulosa y causan la fibrilación de las cadenas de celulosa, aumentando el número de sitios de adsorción de las glicosidasas (Keller y otros, 2021). También ayudan a generar nuevos extremos terminales de celulosa desde sitios intermedios de la cadena de celulosa, así como a aumentar la adsorción y desorción de las celulasas aumentando la velocidad de procesamiento (Vermaas y otros, 2015; Eibinger y otros, 2017). Las LPMO catalizan la rotura oxidativa de los enlaces glicosídicos β -1,4

mediante una reacción monooxigenasa utilizando O₂ molecular y un reductor, o en una reacción peroxigenasa usando H₂O₂ (Figura 42) (Kont y otros, 2020). En el caso de la reacción monooxigenasa se supone que la LPMO consume un equivalente reductor en cada ciclo catalítico, mientras que en la peroxigenasa solo requiere cantidades iniciales de reductor para reducir la LPMO a su estado catalíticamente activo. Es interesante notar que el poder reductor que necesitan las LPMO puede ser obtenida de moléculas como ácido ascórbico y compuestos fenólicos, así como algunas enzimas redox. (Østby y otros, 2020).

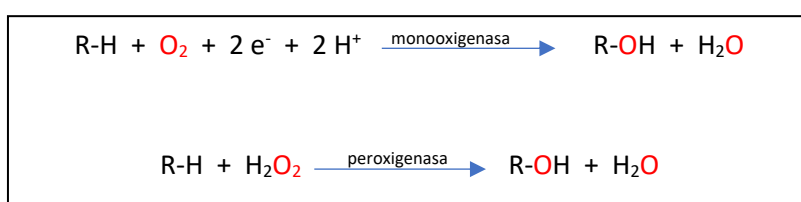


Figura 42. Esquema simplificado de la reacción para las posibles reacciones de las LPMO. Adaptado de (Østby, y otros 2020)

1.4.3.5 Sinergismo entre celulasas y proteínas auxiliares

Diversos estudios han demostrado que no solo existe un efecto complementario entre las distintas glicosilasas y las proteínas auxiliares, sino que también hay un efecto sinérgico, donde la actividad de las distintas proteínas se ve potenciada. (Jalak y otros, 2012). Se puede diferenciar cooperatividad de sinergismo: mientras que en el primer caso la acción coordinada de dos o más enzimas da rendimientos de sacarificación superiores a los rendimientos obtenidos en las reacciones con enzimas individuales, en el caso del sinergismo el resultado de esa acción coordinada da rendimientos mayores a la suma de los rendimientos individuales (Figura 43) (Østby y otros, 2020).

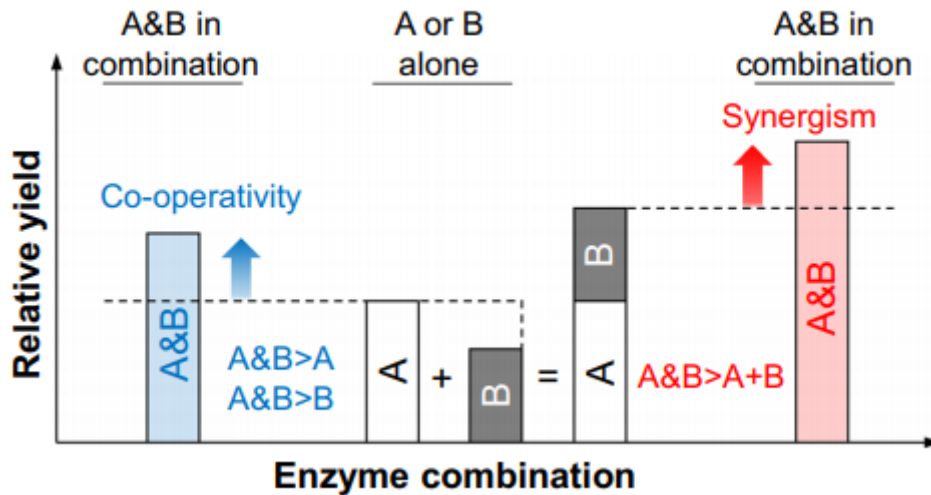


Figura 43. Cooperatividad y sinergismo entre glicosil hidrolasas y proteínas auxiliares. Tomado de (Østby y otros, 2020)

1.4.4 Enzimas hemicelulolíticas

La presencia de hemicelulosas que no fueron removidas por el pretatamiento puede ejercer también un efecto perjudicial sobre la degradación de la celulosa, debido a la formación de subestructuras copoliméricas recalcitrantes. Por esta razón, dentro del cóctel enzimático es común recurrir a enzimas hemicelulolíticas como las enzimas específicas para xilano y/o para glucomanano, que son las más utilizadas. Estas enzimas rompen los enlaces de la cadena polisacárida, como las endo- β -1,4-xilanasas y las endo- β -1,4-mananasas, además de enzimas que remueven las ramificaciones de la cadena principal, como son las deacetilasas, arabinosidasas y galactosidasas. (Malgas y otros, 2019)

Algunas de las enzimas *desramificadoras* pueden ser particularmente útiles, ya que también actúan sobre los enlaces covalentes a la lignina. Algunos de los sustituyentes del xilano pueden ser grupos hidroxicinamoil y glucuronil, que forman parte de los enlaces covalentes entre xilano y lignina. Dentro de estas enzimas se pueden encontrar las feruloil esterases y glucuronil esterases. (Monrad y otros, 2018).

1.4.5 Sistema lignocelulolítico

Si bien se pueden identificar a los grupos de enzimas y proteínas auxiliares con funciones diferenciadas, en la naturaleza las proteínas secretadas por los microorganismos actúan sobre la biomasa lignocelulósica de forma coordinada, ya que también deben actuar sobre la lignina, modificándola y despolimerizándola. Por ejemplo, uno de los organismos

productores de la batería de proteínas lignocelulíticas es el hongo *Trichoderma reesei* (nombrado así en honor a uno de los pioneros en el estudio de las celulasas y que postuló lo de los componentes C₁-C_x, Elwyn T. Reese). Este hongo secreta dos CBHs, cuatro EGs, y cuatro BGs. Otras dos enzimas fueron originalmente denominadas como EGs, pero son en realidad LPMO. En la Figura 44 se puede ver una representación esquemática de las enzimas claves involucradas en la despolimerización de una fibrilla de celulosa recubierta con hemicelulosa y lignina. (Østby y otros, 2020). En esta figura también se muestra la presencia de enzimas activas sobre las hemicelulosas y sobre la lignina.

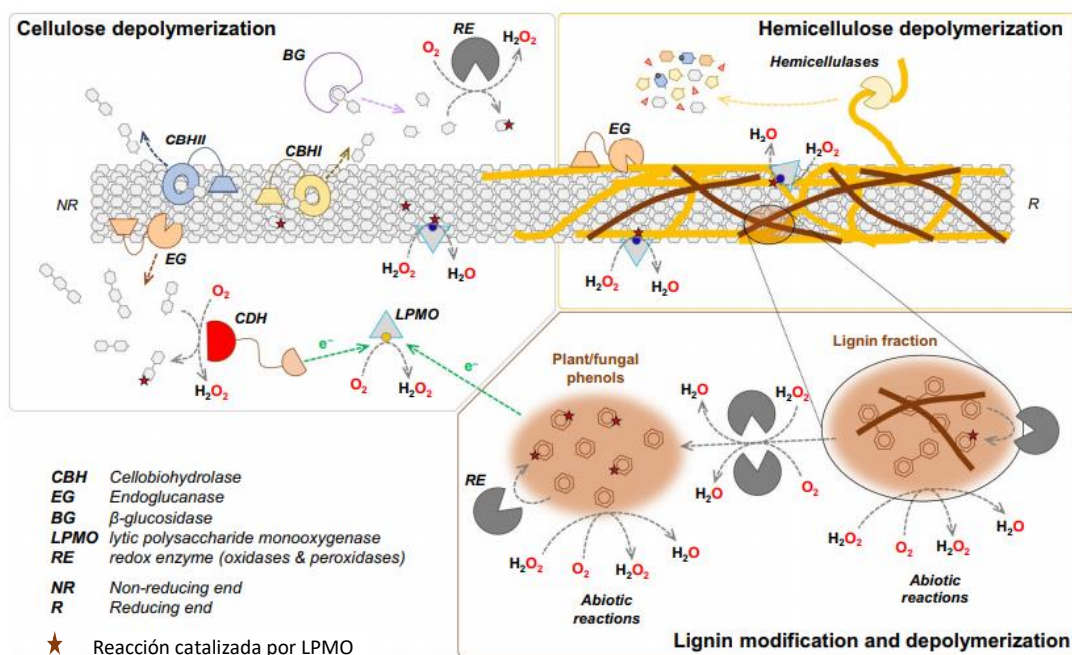
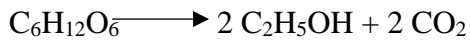


Figura 44. Representación esquemática de una fibrilla de celulosa recubierta con hemicelulosa y lignina y las enzimas clave involucradas en la despolimerización de los polisacáridos de la pared celular de las plantas. Tomado de (Østby y otros, 2020).

1.5 Fermentación alcohólica de la glucosa

1.5.1 Introducción

La fermentación alcohólica es definida como un proceso bioquímico donde distintos microorganismos (en particular levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, pero también otros hongos y bacterias) degradan azúcares convirtiéndolos en etanol y dióxido de carbono a través de una secuencia de reacciones químicas (Vázquez y Dacosta, 2007). La ecuación de conversión es:



1.5.2 Microorganismo – Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

El microorganismo más comúnmente utilizado para realizar la fermentación alcohólica es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras han sido utilizadas por el ser humano desde la antigüedad para elaborar pan, cerveza y vino, aunque la caracterización y análisis sistematizado de las características de la levadura comenzó recién en el siglo XIX. El genus *Saccharomyces* fue introducido por Meyen en 1838 y definido por Rees en 1870, con la descripción de la levadura de la cerveza *S. cerevisiae* hecha por Hansen en 1888. (G. Stewart, 2014).

Las levaduras son eucariotas, hongos unicelulares cuyas células son generalmente ovaladas, aunque hay de varias formas. Son más grandes que las bacterias y alcanzan un diámetro máximo de entre cuatro y cinco μm . Las levaduras se pueden reproducir de forma asexual mediante gemación o mediante reproducción sexual. Las células vegetativas de *Saccharomyces cerevisiae* son globosas, ovoidales o cilíndricas, con apariencia mantecosa y de color crema, con una superficie lisa y plana (Figura 45). *Saccharomyces cerevisiae* se duplica cada 1.25 – 2 horas a 30 °C (G. Stewart, 2014; Vázquez y Dacosta, 2007).



Figura 45. Levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Izquierda: Placa de agar con colonias de levaduras (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Yeast_agar_plate-01.jpg). Derecha: *S. cerevisiae* en gemación observada mediante microscopía electrónica de barrido. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Saccharomyces_cerevisiae_SEM.jpg)

S. cerevisiae presenta tolerancia al etanol, generalmente en el entorno de 8 a 12 % v/v, incluso sobreviviendo en concentraciones en el entorno de 15 % de etanol. La sensibilidad al etanol incrementa cuando la temperatura es mayor a 30 °C o menor a 10 °C. Durante las fermentaciones para la producción de etanol, temperaturas 5 o 10 °C mayores a la temperatura óptima resultan en menor crecimiento celular pero mayor producción de etanol, siendo la temperatura óptima generalmente en el entorno de 25-35 °C. Temperaturas muy bajas provocan un estado de latencia en la célula, deteniendo su desarrollo. (Torija y otros, 2003; G. Stewart, 2014)

El pH óptimo para las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* es en general levemente ácido, entre 4.5 y 6.5, aunque es posible obtener levaduras con tolerancia a pHs más extremos, por ejemplo, mediante sobre-expresión de algunos genes involucrados en mantener la integridad de la pared celular (Matsushika y otros, 2017; Matsushika y Sawayama, 2012; Kong y otros, 2018). Presenta inhibición por ácidos como el benzoico, sórbico, *p*-cumárico y ferúlico, debido principalmente a la alteración de la funcionalidad de la permeabilidad de la membrana celular (Almeida y otros, 2007). La desecación y la luz son perjudiciales para las levaduras, inhibiendo las actividades de transporte de azúcares y aminoácidos y de crecimiento (Woodward, Cirillo y Edmunds, 1978).

Además de la conversión anaerobia, la levadura utiliza la glucosa y otros nutrientes para crecer y reproducirse, por lo que, si bien el rendimiento estequiométrico de esta reacción sería de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por gramo de glucosa, el rendimiento experimental se encuentra generalmente entre el 90 % y el 95 % del valor teórico (Vázquez y Dacosta, 2007).

1.5.3 Reacciones fermentativas

La glucólisis o vía Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) es la ruta metabólica para la conversión de glucosa en piruvato y así satisfacer las necesidades de energía por las levaduras (Figura 46). Esta vía involucra una serie de reacciones, en la que hay distintas enzimas implicadas (Nelson y Cox, 2005; Garrett y Grisham, 2010; Folch, Bisschops y Weusthuis, 2021):

- 1- La glucosa es fosforilada con ATP para dar glucosa-6-fosfato (enzima hexoquinasa)

- 2- La glucosa-6-fosfato se isomeriza mediante la apertura del anillo y tautomerización ceto-enol para dar fructosa-6-fosfato (enzima fosfoglucosa isomerasa)
- 3- La fructosa-6-fosfato es nuevamente fosforilada con ATP para convertirse en fructosa-1,6-bifosfato (enzima fosofructoquinasa)
- 4- La fructosa-6-bifosfato es dividida en gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato (mediante una reacción retro-aldol) (enzima aldolasa)
- 5- La dihidroxiacetona fosfato es convertida en gliceraldehído-3-fosfato (enzima triosa fosfato isomerasa)
- 6- Los gliceraldehído-3-fosfato son oxidados y fosforilados en el C1 para dar 1,3-bisfosfoglicerato (enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)
- 7- El fosfato en la posición 1 es transferido a una molécula de ADP para dar 3-fosfoglicerato y ATP (enzima fosfoglicerato quiinasa)
- 8- El 3-fosfoglicerato se isomeriza para dar 2-fosfoglicerato (enzima fosfoglicerato mutasa)
- 9- El 2-fosfoglicerato se deshidrata para dar fosfoenolpiruvato (enzima enolasa)
- 10- El fosfato es transferido a una molécula de ADP para dar piruvato y ATP (enzima piruvato quiinasa)

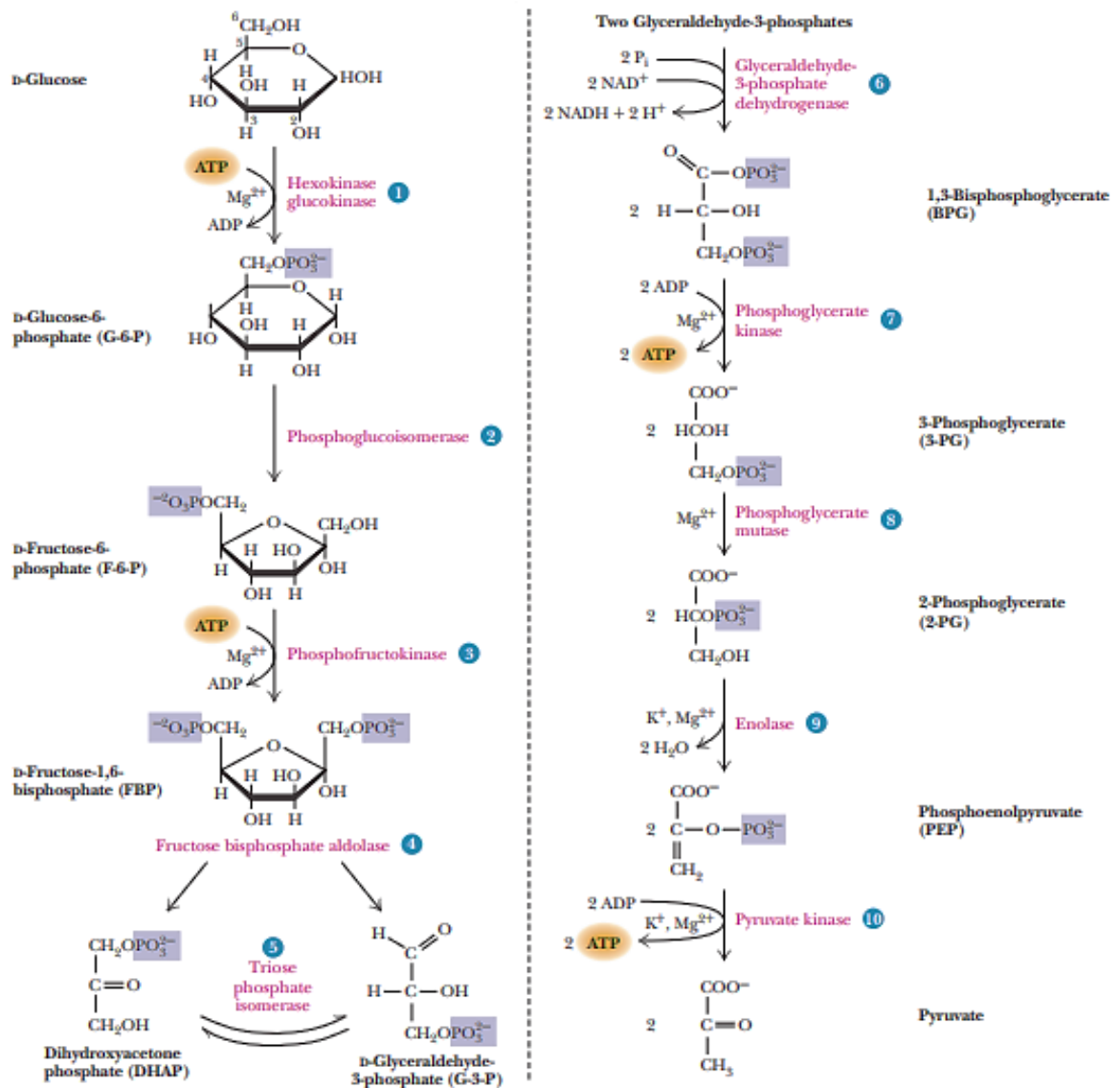
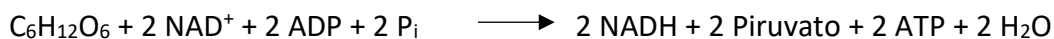


Figura 46. Vía glicolítica o Embden-Meyerhoff-Parnas. A la izquierda se presentan las reacciones “preparatorias”, y a la derecha las de obtención de ATP. Tomado de (Garrett y Grisham, 2010)

El balance final de estas reacciones es:



Luego de esta vía glicolítica, en condiciones anaerobias el piruvato es reducido a etanol en dos pasos. En el primer paso el piruvato es descarboxilado para dar acetaldehído, una reacción catalizada por la piruvato descarboxilasa (enzima que requiere Mg²⁺) y usando tiamina pirofosfato como cofactor. En el segundo paso el acetaldehído es reducido a etanol mediante la enzima alcohol deshidrogenasa con NADH como agente reductor,

regenerando el NAD^+ que puede volver a entrar a la vía EMP (Figura 47) (Nelson y Cox, 2005).

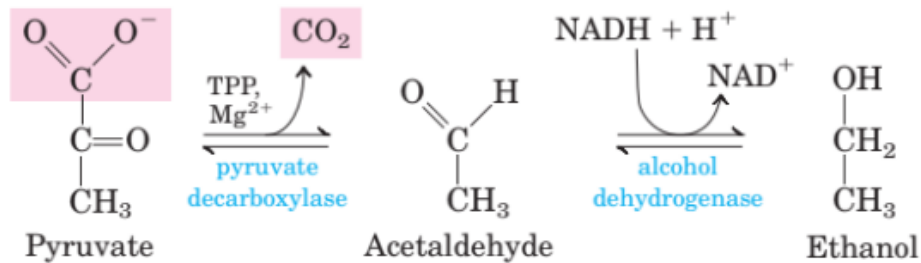


Figura 47. Reducción de piruvato a etanol. Tomado de (Nelson y Cox, 2005)

En condiciones aeróbicas el piruvato entra en el ciclo del ácido cítrico, donde es oxidado a CO_2 con la producción adicional de NADH y FADH_2 (Garrett y Grisham, 2010).

La demanda de nitrógeno de la *S. cerevisiae* depende de la cepa, el contenido de azúcar y las condiciones de fermentación. En general se acepta que se requieren 120-140 mg/L de nitrógeno asimilable por la levadura. Para prevenir la deficiencia de nitrógeno es común el agregado de amonio. (Gobert y otros, 2017).

Típicamente, la fermentación consta de cuatro etapas (Figura 48). En la primera fase de fermentación –fase de latencia- las levaduras utilizan los azúcares y otros nutrientes como nitrógeno para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Luego de la adaptación, las levaduras comienzan la fase de crecimiento utilizando los nutrientes en la generación de biomasa. Una vez que se acaba el nitrógeno, las levaduras comienzan la fase estacionaria, donde el azúcar presente es convertido en etanol con alta viabilidad de las células. A medida que el etanol comienza a incrementarse y a terminarse los azúcares las levaduras comienzan a morir. (Zamora, 2009).

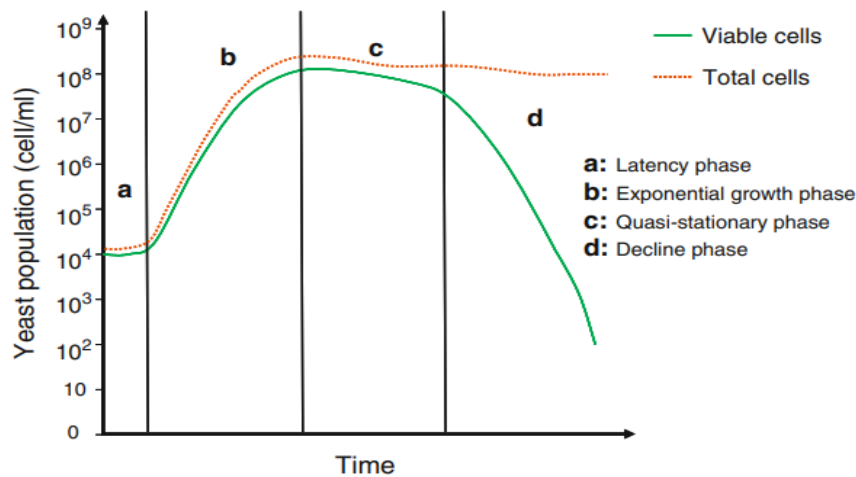


Figura 48. Ciclo de crecimiento de las levaduras, a: fase de latencia; b: fase de crecimiento exponencial; c: fase estacionaria (o casi estacionaria); d: fase de muerte. Tomado de (Zamora, 2009)

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de producir etanol en presencia de oxígeno y alta concentración de azúcares. En la fase de crecimiento, el oxígeno disuelto es utilizado para la producción de ergosterol y ácidos grasos insaturados que serán incorporados al diacilglicerol, el precursor de los fosfolípidos de la membrana celular. El etanol producido luego es tolerado por la levadura gracias a particularidades de su membrana celular, lo que supone una ventaja competitiva frente a otros microorganismos. Esta capacidad con base evolutiva se conoce como el efecto *Crabtree*. (Albergaria y Arneborg, 2016; Henderson, Block y Müller, 2014; Pfeiffer y Morley, 2014).

En condiciones industriales, la difusión de aire u oxígeno durante la fermentación alcohólica es una práctica aceptada y relativamente común; el agregado de oxígeno incrementa la síntesis de biomasa, lo que acelera la fermentación. De todas formas, este agregado de oxígeno es eficiente si es agregado al final de la fase de crecimiento y en niveles bajos de oxígeno (5-10 mg/L). (Salmon 2006; Mauricio, Millán y Ortega, 1998)

1.5.4 Inhibidores de la fermentación derivados del pretratamiento

Como fue explicado anteriormente (en la sección 1.3 Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica) luego que la biomasa lignocelulósica es procesada para liberar azúcares se generan compuestos derivados de la lignina y otros, productos de degradación de los azúcares. Algunos de estos compuestos pueden ser inhibitorios de la fermentación por

Saccharomyces cerevisiae, como el ácido acético, furfural y 5-HMF, y compuestos fenólicos como la vainillina o el ácido 4-hidroxibenzoico (Figura 49).

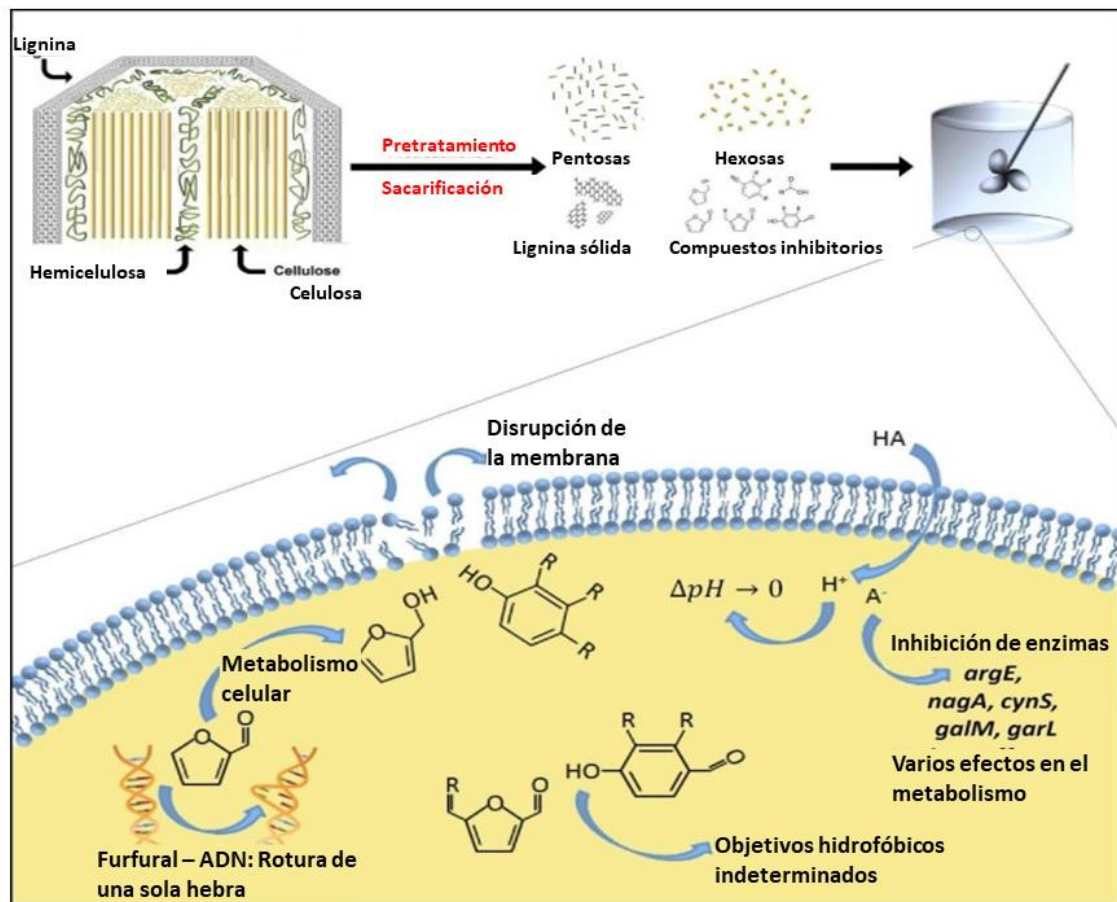


Figura 49. Interacción de los inhibidores con las distintas funciones celulares. Adaptado de (Mills, Sandoval y Gill, 2009)

Estos inhibidores pueden afectar el crecimiento celular de varias maneras, como ser provocando la mutación del ADN, disrupción de la membrana, caída del pH intracelular, así como probablemente afectando otros objetivos celulares (Mills, Sandoval y Gill, 2009)

El furfural y 5-HMF generalmente inhiben la replicación de las células deteniendo el crecimiento celular, un efecto que es también dependiente de la concentración de estos compuestos; por ejemplo, en algunos microorganismos concentraciones del orden de 0.5 g/L de estos aldehídos no causaron inhibición, mientras que concentraciones de 2 g/L sí (Chandel, da Silva y Singh, 2013). Es posible que *S. cerevisiae* asimile o convierta al furfural y el 5-HMF en compuestos menos dañinos, como por ejemplo reduciéndolos a furanmetanol y furandimetanol por medio de la enzima aldehído reductasa que se

encuentra en el citosol de *S. cerevisiae* es capaz de reducir varios aldehídos (Figura 50) (Lewis Liu, 2011). Además de esta detoxificación la levadura también sufre varios cambios fisiológicos y metabólicos, como por ejemplo rearrreglos en la membrana celular. (Allen y otros, 2010; Brandt y otros, 2019; J. T. Cunha y otros, 2019)

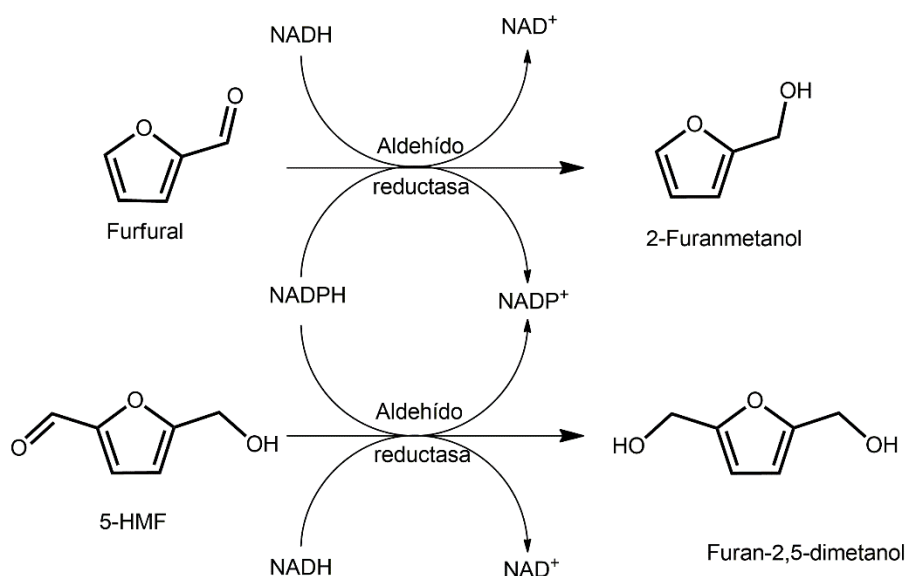


Figura 50. Vías de conversión de furfural y 5-HMF catalizadas por aldehído reductasas. Adaptado de (Lewis Liu 2011)

El mecanismo de inhibición por el ácido acético se explica por la liposolubilidad de la forma sin disociar que puede difundir a través de la membrana celular; una vez dentro del citosol, el ácido acético se disocia debido al pH neutro, disminuyendo el pH citosólico y afectando a la levadura (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

Los compuestos fenólicos derivados de la lignina actúan como inhibidores debido a que distorsionan las membranas celulares, impidiendo que actúen como barreras naturales. (Mussatto y Roberto, 2004; Chandel, da Silva y Singh, 2013). La acción inhibitoria sobre los microorganismos generalmente es en forma proporcional a su peso molecular, siendo los compuestos con menor peso más letales que los de alto peso molecular (Andary y otros, 2013; Hou y otros, 2018).

Los inhibidores pueden actuar en conjunto, existiendo un efecto sinérgico por la interacción entre los distintos compuestos e incrementando el efecto inhibitor, más que cada compuesto por separado. (López y otros, 2021; Almeida y otros, 2007).

Aparte de los inhibidores antes nombrados, el etanol también produce un efecto de inhibición por producto sobre las levaduras (Ansanay-Galeote y otros, 2001). El etanol inhibe el crecimiento y viabilidad de las levaduras, afectando varios sistemas de transporte como el de la permeasa general de aminoácidos y de los procesos de toma de glucosa. El etanol actúa además sobre la fluidez de la membrana plasmática, afectando sus funciones y propiedades fisicoquímicas (Arroyo-López y otros, 2010; Navarro-Tapia, Querol y Pérez-Torrado, 2018).

Como fue comentado anteriormente, las levaduras han desarrollado diversas estrategias para contrarrestar el daño causado por el etanol (efecto *Crabtree*), aumentando por ejemplo la insaturación de los ácidos grasos de la membrana o acumulando trehalosa (un disacárido) que actúa como un protector natural frente a condiciones de estrés y previene la desnaturalización de proteínas (Elbakush y Güven, 2021).

1.5.5 Sacarificación y Fermentación Simultáneas (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)

La fermentación del hidrolizado enzimático puede ser realizada en forma secuencial (*Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF*) o en forma simultánea (*Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF*). El proceso SSF minimiza la inhibición por glucosa de celulasas y β -glucosidasas porque los microorganismos consumen los azúcares en cuanto son producidos (Valles y otros, 2020). Si bien el proceso SSF es más eficiente al combinar dos procesos, el mezclamiento de los residuos de lignina con las levaduras hace que la inhibición por estas moléculas sobre las levaduras sea aún mayor que cuando los procesos se realizan por separado. Sumado a esto, en el caso de usar LPMOs (*Lytic Polysaccharide Monooxygenases*, sección 1.4.3.4 Monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO)), como estas monooxigenasas necesitan de oxígeno, la fermentación anaerobia resulta en un ambiente perjudicial para las LPMOs (Althuri y otros, 2018). Por otra parte, la temperatura óptima para las enzimas hidrolíticas y las levaduras generalmente es distinta, por lo que las condiciones pueden no ser óptimas para los dos procesos, algo que sí es posible en la SHF, ya que se puede optimizar cada etapa por separado. (Öhgren y otros, 2007; Zhu y otros, 2012; García-Aparicio y otros, 2011; Fernandes y otros, 2015).

En un enfoque más abarcativo, también podrían aplicarse otras configuraciones en el bloque hidrólisis enzimática – fermentación (Figura 51) para la producción de etanol a

partir de la biomasa lignocelulósica. Aprovechando la fracción hemicelulósica también para producir etanol, existe la co-fermentación de pentosas junto con la glucosa, lo que se denomina CF (Co-Fermentation). De forma análoga a la SSF, se puede adoptar la configuración en la que se realiza la sacarificación y co-fermentación simultáneas o SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*), donde se aprovechan las dos fracciones (celulósica y hemicelulósica) para producir etanol en una única etapa, lo que es ventajoso económicamente y en tiempos, pero también se hace más difícil encontrar microorganismos que trabajen óptimamente para todas las etapas (Liu y otros, 2019; Westman y otros, 2017). En el BioProceso Consolidado o CBP (*Consolidated BioProcess*) se considera la posibilidad de utilizar microorganismos diseñados especialmente que produzcan las celulasas y etanol en un solo paso, reduciendo todo el costo de la bioconversión (Sarabana, Ramadan y Eldin, 2018; Althuri, Gujjala y Banerjee, 2017). Otra posibilidad sería producir las enzimas localmente, pero realizar la fermentación separadamente, pudiendo optimizar cada una de las etapas por separado, como en el proceso de bio-sacarificación consolidada, CBS (*Consolidated Bio-Saccharification*). (Patel y Shah, 2021; Liu y otros, 2020).

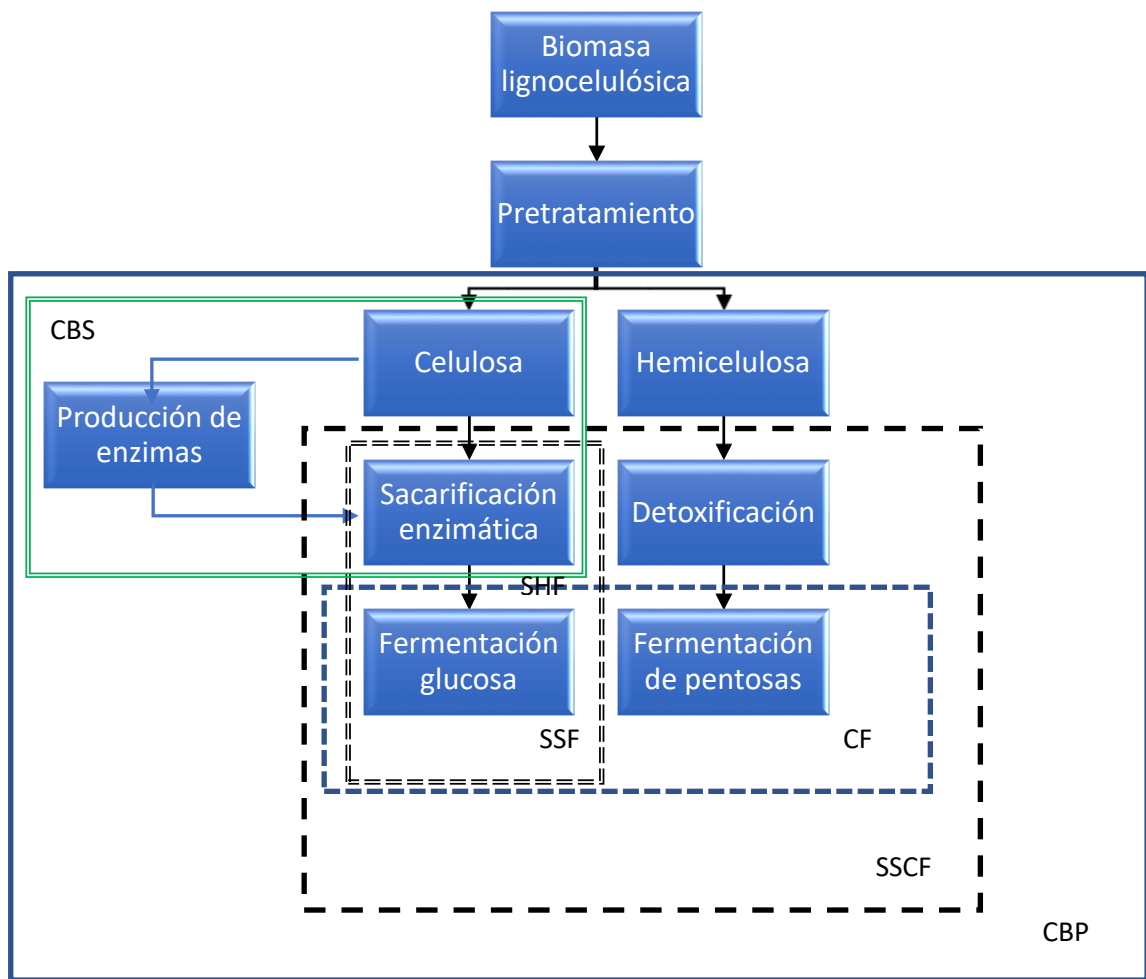


Figura 51. Diagrama de combinaciones de los diferentes procesos para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica: SHF Hidrólisis y Fermentación Separadas; SSF Sacarificación y Fermentación Simultáneas; CF Co-fermentación; SSCF Sacarificación y Co-Fermentación Simultáneas; CBP BioProceso Consolidado; CBS Bio-Sacarificación Consolidada. Adaptado de (Patel y Shah, 2021)

1.6 Posibles coproductos a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada

1.6.1 Introducción

Además de obtener etanol a partir de la fracción celulósica, también es posible obtener una gran variedad de productos, tanto de la fracción hemicelulósica como de la lignina teniendo en algunos casos valor por sí mismos, y en otros casos valor como *building block*, o precursor para otros compuestos químicos. En un concepto de biorrefinería se busca aprovechar todo lo posible todas las fracciones la biomasa lignocelulósica. Una biorrefinería es similar a una refinería de petróleo en el sentido que produce energía y químicos. La International Energy Agency (IEA) definió a la biorrefinería como “el procesamiento sustentable de biomasa en un espectro de bio-productos (alimentos, alimentos para animales, productos químicos y/materiales) y bioenergía (biocombustibles, energía y/o calor” (IEA Bioenergy Task 42, 2009) y fue definida por el proyecto Biorefinery Euroview (Biorefinery Euroview, 2009) como “el integrado de industrias de base biológica que utilizan una variedad de tecnologías para fabricar productos como químicos, biocombustibles, ingredientes de alimentos para seres humanos y animales, biomateriales, fibras, calor y energía, con el objetivo de maximizar el agregado de valor a lo largo de los tres pilares de la sostenibilidad (Medio Ambiente, Economía y Sociedad)”, entre otras definiciones realizadas por distintas instituciones y autores que pueden incluir materias primas, tamaño de procesamiento, productos, etc (Cherubini y otros, 2009; Aristizábal-Marulanda y Cardona Alzate, 2019; Ferreira, 2017; Fava y otros, 2015). Esta sección presenta algunos de los productos que se pueden obtener a partir de la fracción hemicelulósica o de la lignina.

1.6.2 Productos que se pueden obtener de la hemicelulosa

De la hemicelulosa también se puede hacer etanol, aunque presenta algunos desafíos distintos a la producción a partir de celulosa/glucosa. Sin embargo, además del etanol también pueden obtenerse otros productos de valor a partir de la fracción hemicelulósica. Por ejemplo, solo de la xilosa se pueden producir gran cantidad de productos químicos (Figura 52).

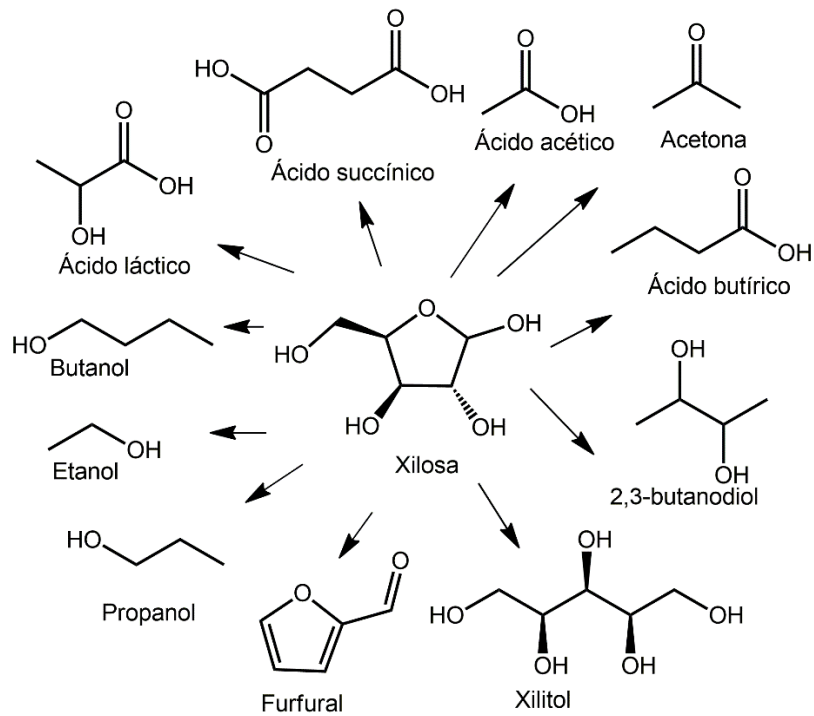


Figura 52. Compuestos que pueden ser obtenidos de xilosa. Adaptado de (Delgado Arcaño y otros, 2020).

1.6.2.1 Ácido láctico

El ácido láctico es posible utilizarlo para la producción de productos de alto valor agregado, como el ácido poli-láctico (*poly-lactic acid, PLA*). Se estima el precio del ácido láctico en alrededor de 2000 US\$/ton, con un mercado en el 2020 evaluado en 2700 millones de dólares y en continuo crecimiento. El ácido láctico presenta algunas ventajas como alternativa a los plásticos hechos a partir la industria petroquímica (Li y otros, 2021; Grand View Research, 2021). Su alta biodegradabilidad y biocompatibilidad, lo hace útil no solo para su uso como empaque, sino también para la producción de prótesis y en sistemas de liberación de fármacos (S. Liu y otros, 2020).

El ácido láctico puede producirse mediante síntesis química a partir de fuentes petroquímicas o mediante fermentación por microorganismos, siendo actualmente más del 90 % del ácido láctico disponible comercialmente producido por esta última vía (Mazzoli, 2020). Una de las ventajas de la producción de ácido láctico mediante fermentación es que el microorganismo produce un único isómero (L ó D), mientras que la obtención del ácido láctico mediante síntesis química produce una mezcla de los dos isómeros (Naidu, Hlangothi y John, 2018). La fermentación se produce principalmente a partir de bacterias del ácido láctico (*Lactic Acid Bacteria, LAB*) que fermentan

preferencialmente glucosa, pero también pueden fermentar xilosa (Doran-Peterson, Cook y Brandon, 2008; Abdel-Rahman, Tashiro y Sonomoto, 2011) como es el caso de las bacterias heterofermentativas (Patel y Shah, 2021; Cubas-Cano y otros, 2020; Ajala y otros, 2020). También es de destacarse distintos estudios que investigaron la producción de ácido láctico a partir de xilosa mediante quimiocatálisis (Wu y otros, 2021; Xu y otros, 2020)

A partir del ácido láctico también se pueden obtener otros productos químicos importantes, como ser el ácido pirúvico (o ácido oxopropanoico), ácido acrílico (o ácido prop-2-enoico), el propilenglicol (o propano-1,2-diol) y ésteres de lactato (Figura 53) (Gao, Ma y Xu, 2011).

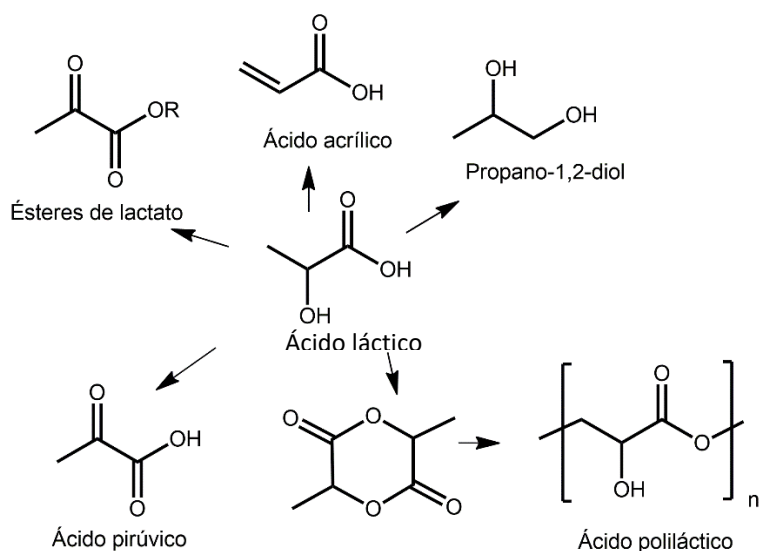


Figura 53. Algunos productos químicos que se pueden obtener a partir del ácido láctico. Adaptado de (Gao, Ma y Xu, 2011)

1.6.2.2 Xilitol

El xilitol ($C_5H_{12}O_5$) es un edulcorante de bajas calorías que se utiliza en la industria alimenticia, en pastas de dientes, chicles, productos para diabéticos y usado para la prevención de caries dentales (Patel y Shah, 2021). El xilitol es menos fermentable que otros polioles, lo que impide a los microorganismos cariogénicos usarlo como fuente de energía y producir ácidos perjudiciales para la placa dental. También se ha postulado que los complejos de Ca (II)-xilitol son importantes en la remineralización de los dientes (Figura 54) (K. Mäkinen, 1978; K. Mäkinen, 2011).

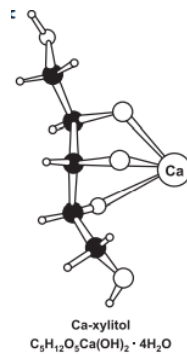


Figura 54. Representación de un complejo Ca(II)-xilitol. Tomado de (K. Mäkinen, 2011)

También es beneficioso para la prevención de otitis, infecciones respiratorias y osteoporosis (S. Mussatto, 2012; Ahuja y otros, 2020; Kong y otros, 2020). El xilitol ha sido usado para reducir el número de *Staphylococcus* coagulasa negativa mediante la disminución de la concentración de sal en la fina capa de líquido que recubre superficialmente las vías respiratorias, mejorando la defensa natural (Zabner y otros, 2000). En cuanto a las propiedades para prevenir la osteoporosis, el mecanismo de acción es similar al observado en la remineralización del esmalte dental: los complejos xilitol-calcio facilitan la absorción de calcio en toda la pared intestinal (Vasilescu y otros, 2011). Además, el xilitol puede inhibir la expresión de citoquinas inflamatorias que son disparadas por lipopolisacáridos; estas respuestas inflamatorias están involucradas en la angiogénesis, un proceso que ocurre durante la formación de tumores y metástasis (Gasmi Benahmed y otros, 2020). Asimismo, se ha reportado un estudio reciente indicando que el xilitol podría ser usado como ayuda terapéutica para el manejo y tratamiento de la Covid-19 (Go y otros, 2020).

El xilitol ha ido ganando más interés a lo largo de los años, siendo que la producción mundial de xilitol pasó de 6000 toneladas en 1978 a casi 171000 toneladas en el 2016, por un valor de 725.9 millones de dólares (Delgado Arcaño y otros, 2020). En particular, el xilitol producido por fermentación a partir de biomasa lignocelulósica utilizada con otros fines es uno de los productos químicos renovables más valiosos, con una expectativa de ser una industria de 1400 millones de dólares para el 2025 (Hernández-Pérez y otros, 2019).

Aunque actualmente prácticamente todo el xilitol comercial se sintetiza químicamente mediante la hidrogenación catalítica de xilosa, un proceso que requiere alta demanda de

energía, existen varios microorganismos que pueden fermentar xilosa para producir xilitol. Estos microorganismos pueden ser inhibidos por la presencia de compuestos como ácidos orgánicos y compuestos fenólicos en forma análoga a la fermentación de glucosa para producir etanol (Naidu, Hlangothi y John, 2018).

El proceso de producción de xilitol mediante procesos biotecnológicos a partir de biomasa se muestra esquemáticamente en la Figura 55.

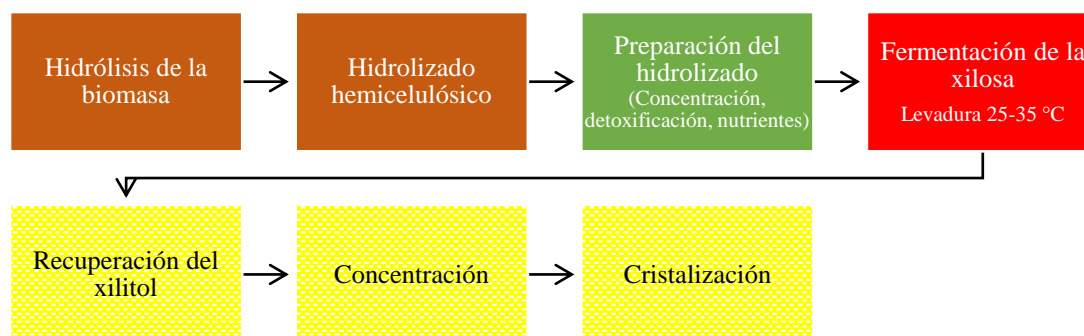


Figura 55. Proceso de producción de xilitol mediante fermentación. Basado en (Hernández-Pérez y otros, 2019)

A nivel celular la transformación de xilosa en xilitol se muestra esquemáticamente en la Figura 56. La producción biotecnológica se aprovecha del metabolismo natural de las levaduras. Primero, una xilosa reductasa dependiente de NADPH reduce la xilosa a xilitol, que en condiciones “normales” es oxidado a xilulosa por una xilitol deshidrogenasa, para luego es fosforilada por una xiluloquinasa a xilulosa fosfato. Esta xilulosa fosfato entra en la ruta de la pentosa fosfato (*PPP, Pentoses Phosphate Pathway*) que regenera cofactores, y produce energía y biomasa celular. La acumulación de xilitol es promovida restringiendo la disponibilidad de oxígeno que limita la regeneración de NAD^+ que es un cofactor de la xilitol deshidrogenasa. (Granström, Izumori y Leisola, 2007)

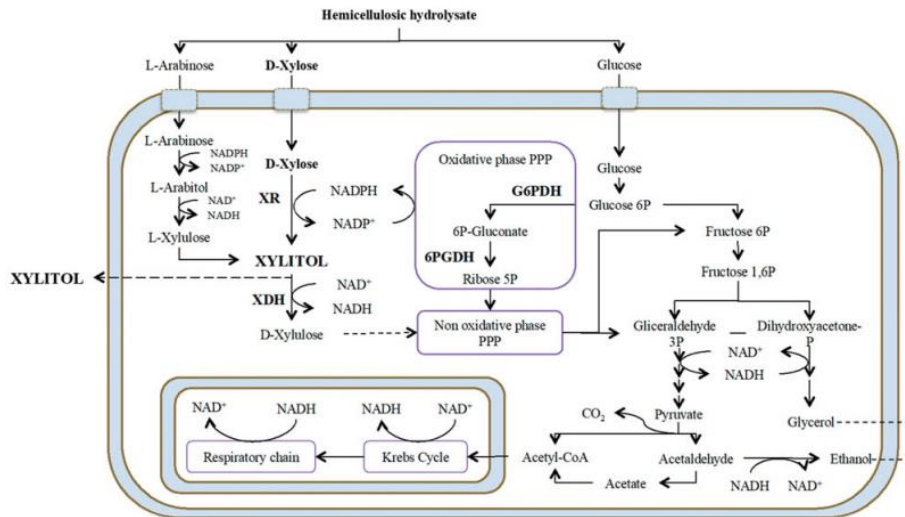


Figura 56. Modelo del metabolismo de la xilosa y la formación de xilitol por las levaduras. XR: xilosa reductasa, XDH: xilitol deshidrogenasa. Tomado de (Hernández-Pérez y otros, 2019).

El xilitol también puede ser usado como precursor para la producción de otros productos químicos (*building block*), como glicerol, ácido xilónico y ácido láctico, como se muestra en la Figura 57.

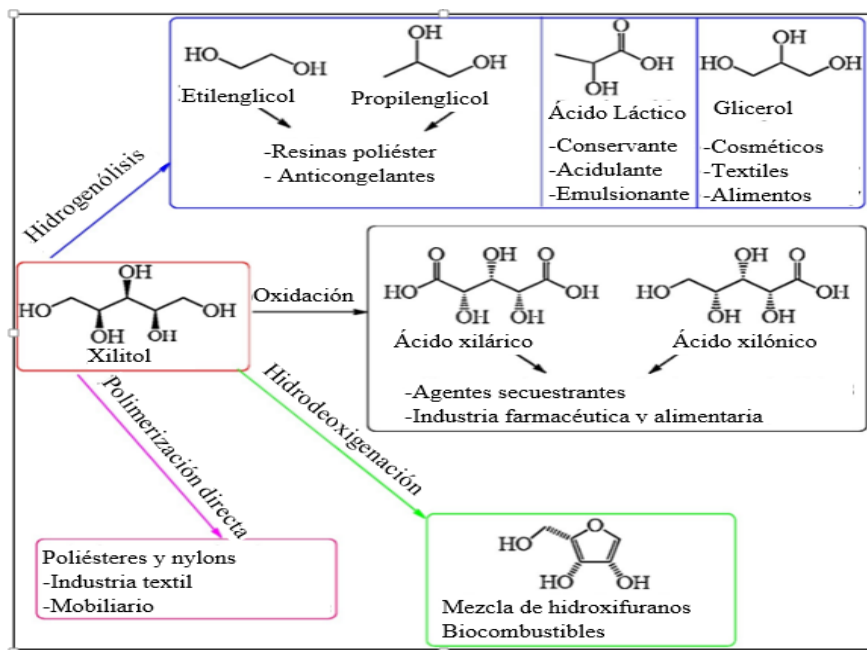


Figura 57. Xilitol como precursor para otros productos químicos. Adaptado de (Delgado Arcaño y otros, 2020)

1.6.3 Furfural

El furfural se obtiene a partir de la deshidratación de la xilosa, siendo uno de los mecanismos propuestos en su formación el que se muestra en la Figura 58.

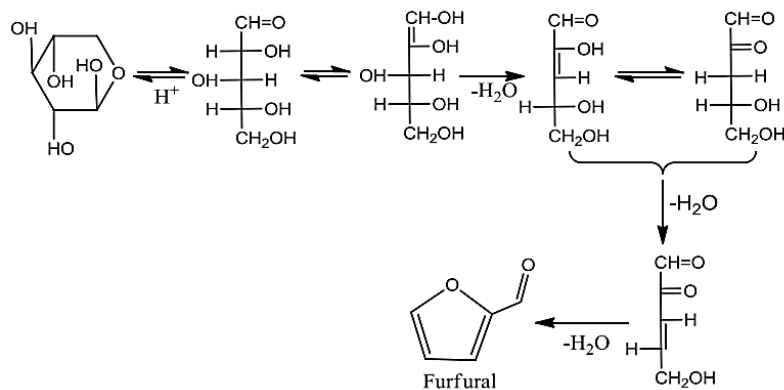


Figura 58. Representación esquemática de la obtención de furfural a partir de xilosa. Tomado de (Yan y otros, 2014).

El furfural tiene múltiples usos como precursor de otros productos químicos muy utilizados en el refinado del petróleo, plásticos, industria farmacéutica y agroindustria (Luo y otros, 2019), como se muestra en la Figura 59 y en la Tabla 5.

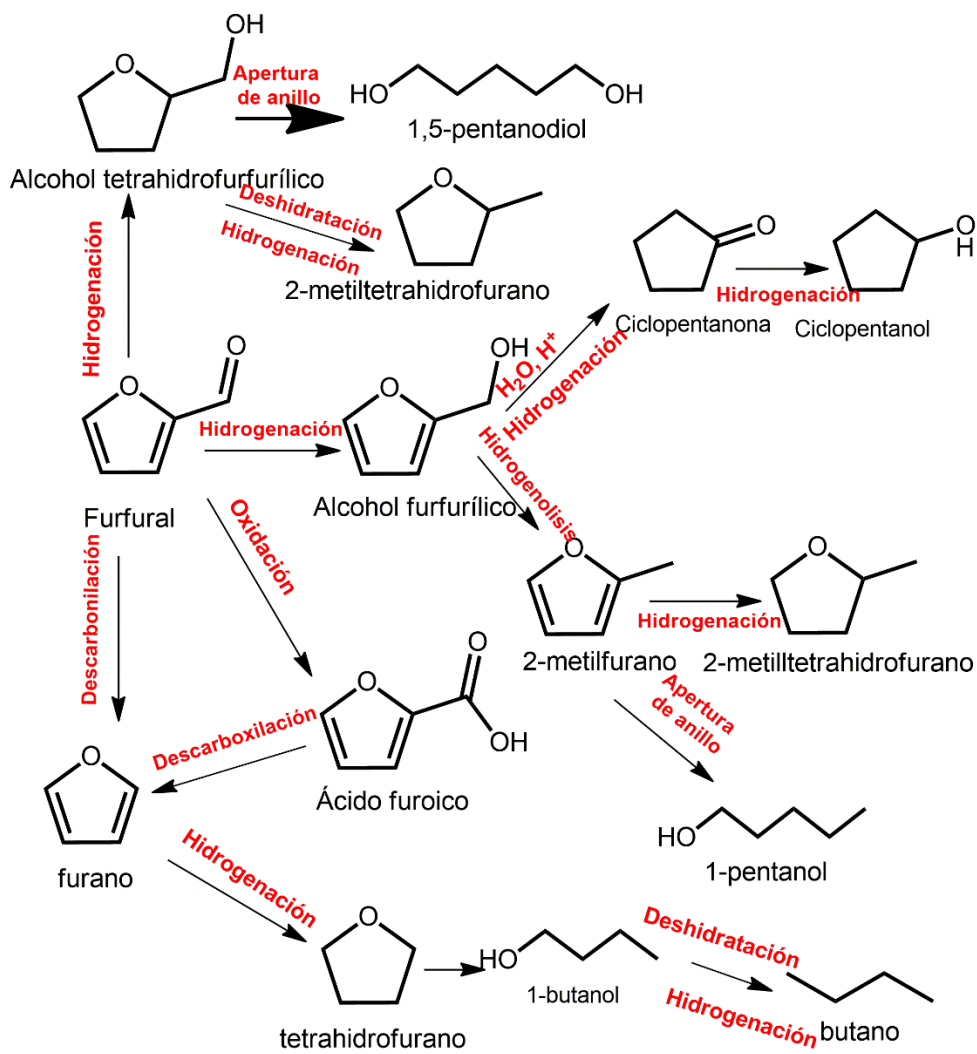
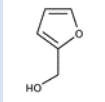

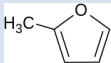

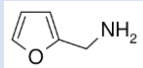
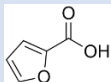
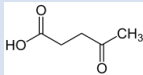
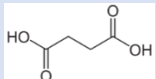


Figura 59. Conversión de furfural en diferentes productos químicos. Adaptado de (Yan y otros, 2014).

Tabla 5. Conversión de furfural en diferentes productos químicos. Adaptado de (Machado y otros, 2016).

Derivados	Producción	Utilización
Alcohol furfurílico 	Hidrogenación catalítica de furfural	Producción de resinas y alcohol tetrahydro-furfuril: intermedio en la producción de fragancias, lisina y vitamina C
Furano 	Descarbonilación catalítica de furfural	Producción de tetrahydrofurano y acetilfurano, intermediarios de la producción de productos farmacéuticos
2-metilfurano 	Descarbonilación de furfural y 5-metil- furfural	Solvente
Tetrahydrofurano 	Hidrogenación de furano	Solvente industrial, fabricación de solventes y polímeros, adhesivos, productos farmacéuticos
Furfurilamina 	Aminación reductiva de furfural	Producción de sustancias con actividad farmacológica y pesticida
Ácido furoico 	Oxidación de furfural	Síntesis de medicamentos y perfumes
Ácido levulínico 	Hidrólisis ácida de alcohol furfural, hidrólisis del éster de acetil succinato	Producción de ácido succínico y ácido δ -aminolevulínico
Ácido succínico 	Fermentación alcohólica	Aditivo para alimentos y síntesis de productos farmacéuticos

El furfural es el producto químico industrial derivado de la biomasa lignocelulósica, con una producción anual estimada en el 2019 de aproximadamente 340.000 toneladas por un valor de 551 millones de dólares (Rodríguez-Montaña y otros, 2020). La producción industrial del furfural se realiza únicamente mediante la conversión catalizada por ácido de las pentosas presentes en la biomasa lignocelulósica (Shinde, Hengne y Rode 2020).

1.6.4 Otros compuestos

1.6.4.1 Ácido acético

A nivel industrial el ácido acético se obtiene principalmente de la carbonilación de metanol y su precio está dominado por los mercados del gas natural (Murali, Srinivas y Ahring 2017). La producción y consumo mundial de ácido acético continúa en ascenso, y se espera un consumo de 20,2 millones de toneladas para el año 2024 (Polotskaya y otros, 2020). Además de provenir de fuentes fósiles, este proceso presenta algunas desventajas como limitaciones en la solubilidad del catalizador y pérdida de catalizadores caros en los pasos de separación (Yoneda y otros, 2001). El ácido acético tiene importantes aplicaciones en la industria alimenticia como vinagre y en distintas preparaciones (Li y otros, 2015; Jonas De Roos, 2018). También es usado en la producción de monómeros de acetato de vinilo para luego ser polimerizado en poliacetato de vinilo o PVA, que a su vez es usado en distintos plásticos, y en la producción de ácido tereftálico y acetato de etilo (Budiman y otros, 2016). Entre otras importantes aplicaciones del ácido acético se destaca la producción de acetato de celulosa, que a su vez puede ser usado en la producción de distintos productos, desde ropa a aparatos electrónicos pasando por distintos tipos de filtros (Rustemeyer, 2004; Steinmann, 1998; Suetsugu, Kotera y Nishino, 2009; Yang y otros, 2014).

El ácido acético se puede obtener de la hidrólisis los grupos acetilo de las hemicelulosas en la biomasa lignocelulósica pero también mediante bacterias que producen ácido acético a partir de la materia orgánica. Se pueden distinguir dos grupos de bacterias productoras de ácido acético: las bacterias del ácido acético (que lo producen aeróbicamente) y las bacterias acetogénicas, que lo producen anaeróbicamente. Las bacterias del ácido acético oxidan al etanol para dar ácido acético en medio ácido o neutro y las más comunes se encuentran en los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter* (Vidra y Németh, 2018). Las bacterias acetogénicas convierten el H₂ y el CO₂ disponible en ácido acético a través de la ruta Wood-Ljungdahl o ruta reductora de la acetil-CoA (Murali, Srinivas y Ahring, 2017). Las bacterias acetogénicas más comunes son de los grupos *Acetobacterium* y *Clostridium* (Vidra y Németh, 2018).

1.6.4.2 Carotenoides

Los carotenoides (Figura 60) son pigmentos naturales liposolubles responsables de los colores amarillo, rojo, naranja y morado, por lo que son utilizados como aditivos de alta calidad en los alimentos, además de ser precursores de la vitamina A (Leong y otros, 2018; dela Seña y otros, 2014; Simpson, 1983; Chandi y Gill, 2011). También son usados en la industria farmacológica como compuestos anticarcinogénicos y se ha demostrado que reducen el riesgo de ataque cardíaco, hígado graso, Alzheimer y diabetes asociada a obesidad e hipertensión (Frengova y Beshkova, 2009; Tanaka, Shnimizu y Moriwaki, 2012; De Stefani y otros, 2000; Liu y otros, 2001; Clugston, 2020; Bhatia y otros, 2020). Aunque no puede estimarse el mercado de carotenoides con precisión, algunos reportes indican un crecimiento sostenido, ubicándolo en el entorno de 1200 millones de dólares para el 2026, con un 60 % del mercado compartido por astaxantina, β -caroteno, y luteína, siendo también importantes licopeno y zeaxantina, entre otros (Figura 60) (Valuates Reports, 2021; Barreiro y Barredo, 2018). Los precios de carotenoides tienen un amplio rango, pudiendo valer desde 250 a 2000 dólares por kg si son producidos mediante síntesis química o de 350 a 7500 dólares por kg si son de origen natural (Fior Markets, 2019).

La fuente tradicional de carotenoides ha sido el aislamiento de fuentes naturales, pero actualmente alrededor del 80-90 % de los carotenoides se producen mediante síntesis química, representando un 76 % del mercado frente al 24 % del mercado de los carotenoides naturales (Ram y otros, 2020). Los carotenoides se pueden obtener de levaduras oleaginosas, que son capaces de metabolizar hexosas y pentosas (Cabral y otros, 2011; Liu, Feist y otros, 2020; Mussagy y otros, 2020).

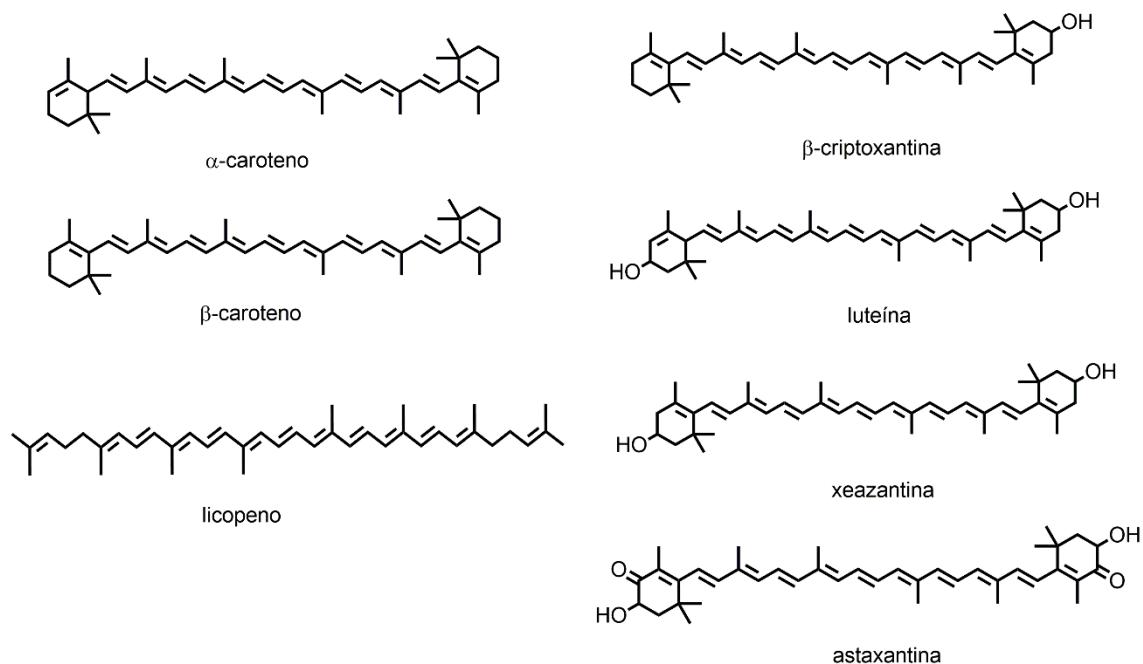


Figura 60. Estructuras químicas de algunos carotenoides más comúnmente encontrados en la dieta humana.

1.6.5 Productos a partir de la lignina

Hay un viejo dicho que se suele repetir que dice “se puede hacer cualquier cosa a partir de la lignina... excepto plata”, una especie de axioma que tiene su origen en la industria de la pulpa y papel (D. Stewart, 2008; Wenger, Haas y Stern, 2020). Aunque quizás originalmente esta frase pueda haber tenido su sustento, se han hecho innumerables avances para aprovechar el potencial de la lignina y no utilizarla únicamente como fuente de combustible (es decir, utilizada en la caldera de recuperación para generar energía para el proceso Kraft) (Coz y otros, 2016; Zhang, Tu y Paice, 2011). Mientras que el valor de la lignina usada como combustible sería de aproximadamente 0,18 US\$/kg, el valor más conservador de la lignina usada en conversión química puede ser de 1,08 US\$/kg pudiendo llegar hasta 15 US\$/kg, como es el caso de la vainillina (Macfarlane y otros, 2009). La relación de precios y volumen de la valorización de la lignina en general – no teniendo en cuenta fluctuaciones o valores específicos – sigue el esquema que se presenta en la Figura 61.

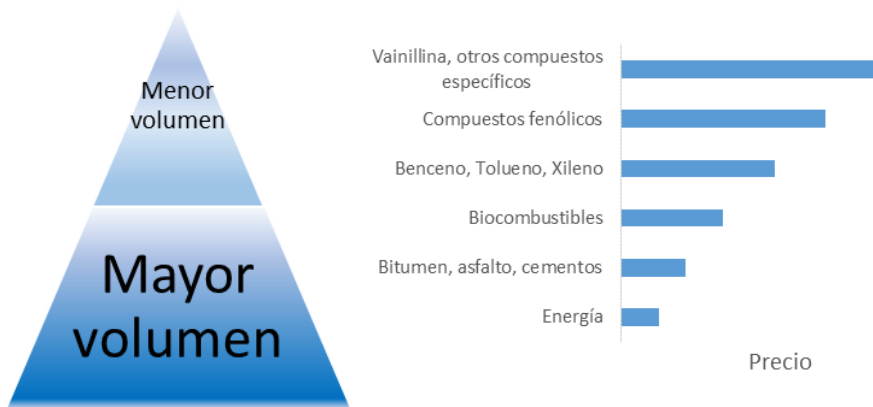
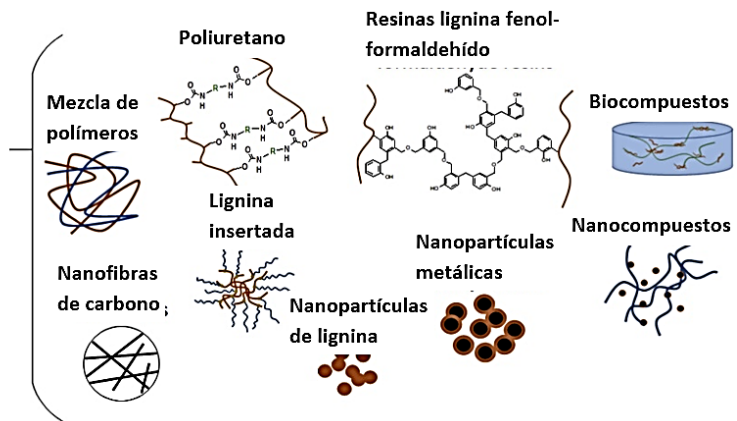


Figura 61. Relación entre volumen y precios de los productos derivados de la lignina. Basado en (Vijay Kumar Garlapati y otros, 2020)

En general, se pueden seguir dos estrategias de valorización de la lignina (Figura 62). En la **primera estrategia** se usa la lignina como **componente macromolecular**, mejorando su compatibilidad y su rendimiento en mezclas de compuestos, copolímero, adhesivos, resinas y fibras de carbono. En la **segunda estrategia**, se producen **químicos de bajo peso molecular**, en general como alternativa a los químicos derivados de la industria de combustibles fósiles, mediante despolimerización o transformación biotecnológica (Zevallos Torres y otros, 2020).

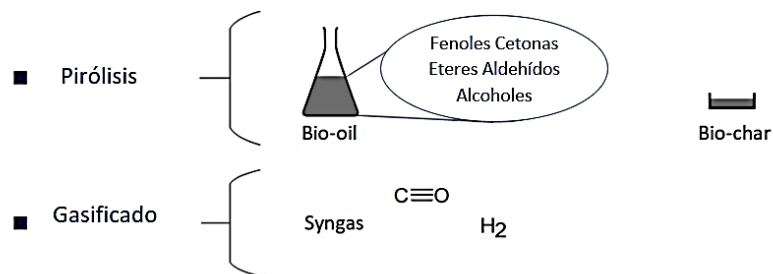
➤ 1 - Como macromolécula

Con/sin modificación química



➤ 2- Mediante despolimerización

Despolimerización no catalítica termoquímica



Despolimerización catalítica

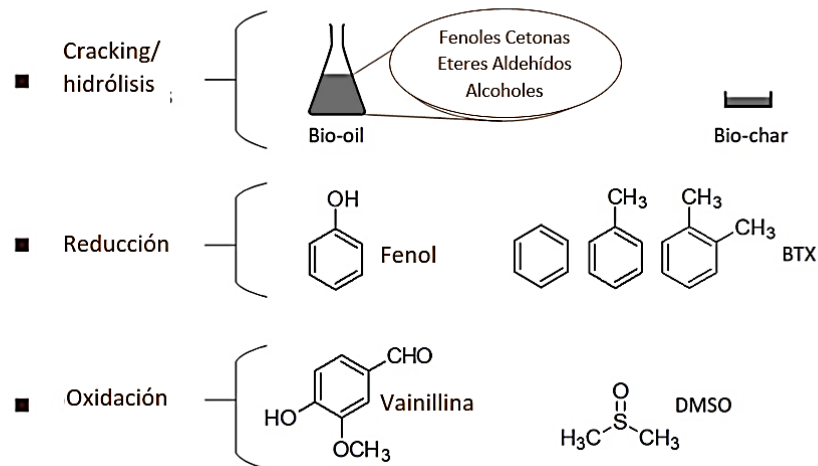


Figura 62. Esquema de estrategias de valorización de la lignina. Adaptado de (Zevallos Torres y otros, 2020)

1.6.5.1 Usos de la lignina como macromolécula (Estrategia 1)

Polímeros de lignina

En el campo de los polímeros, se han hecho importantes avances en el desarrollo de mezclas (bitumen, asfalto, cemento) y biocompuestos de lignina para reemplazar los compuestos poliméricos derivados del petróleo sin afectar las propiedades mecánicas.

En el poliuretano la lignina puede ser usada como un polirol directamente, ajustando las condiciones de reacción y modificación química para incorporar la lignina al poliuretano, (Duong y otros, 2014). Esto contribuye a la disminución de las materias primas (polioles e isocianatos) del poliuretano que generalmente son hechas utilizando productos químicos derivados del petróleo (Ma y otros, 2021). El agregado de lignina al poliuretano resulta en mayor resistencia a la compresión, menor densidad y excelentes propiedades térmicas. Las principales aplicaciones del poliuretano son la producción de adhesivos, láminas, y espumas (Banu y otros, 2021). Un ejemplo de formación de poliuretano-lignina se puede observar en la Figura 63.

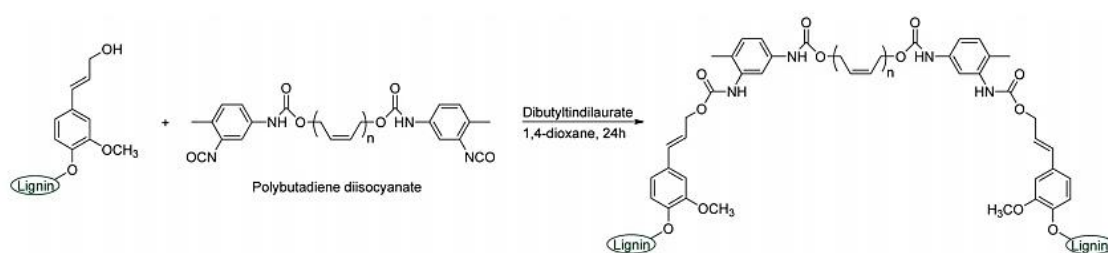


Figura 63. Síntesis de poliuretano-lignina. Tomado de (Saito y otros, 2013)

La resina de fenol-formaldehído con lignina modificada también es otro de los posibles usos de la lignina como macromolécula, donde la lignina es previamente modificada, en general mediante el aumento del contenido de grupos fenólicos o metilación. Las resinas de fenol-formaldehído se forman por la reacción del formaldehído en las posiciones orto- y para- del fenol, generando una red tridimensional de enlaces entrecruzados, por lo que la lignina puede ser utilizada como fuente de fenol. La presencia de sustituyentes en los grupos fenólicos de la lignina (siempre en la posición para- por la cadena alifática, pero también en las posiciones orto- dependiendo de si son unidades guaiacil o siringil) reduce la reactividad por lo que es necesario modificar la lignina (Duval y Lawoko, 2014). Una de las posibles estrategias se esquematiza en la Figura 64. Estas resinas tienen alta tolerancia al calor y humedad, además de alta resistencia, por lo que son utilizadas en diferentes campos, como adhesivos, aislamiento, electrónica y en las industrias de la construcción, aeroespacial o de trenes (Hodásová y otros, 2015).

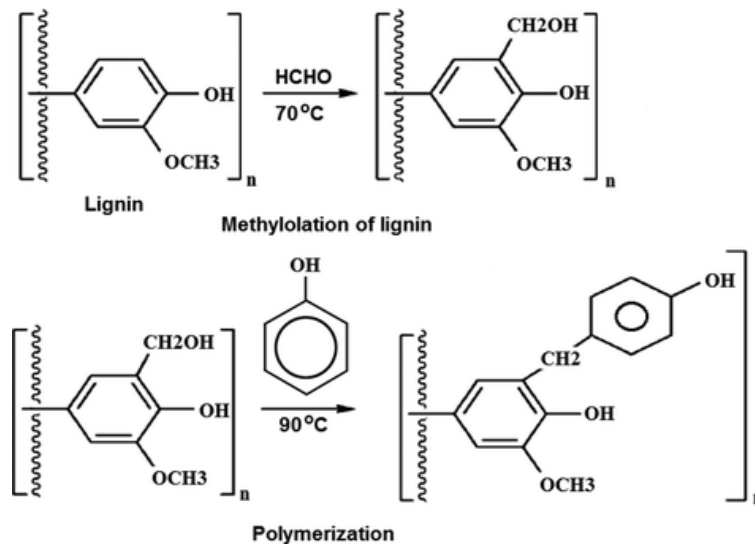


Figura 64. Formación de resina fenol-formaldehído en dos etapas, metilación y polimerización. Tomado de (Xu y Ferdosian, 2017)

Las fibras de carbono (Figura 65) que se pueden obtener a partir de la lignina son de gran interés para la industria automotriz, aeroespacial, energía eólica a entre otras, debido a su gran resistencia y liviandad (Zevallos Torres y otros, 2020). La producción de fibras de carbono a partir de lignina implica primero la conversión de lignina en fibras precursoras. Estas fibras se pueden preparar mediante diversos métodos, por ejemplo, disolviendo la lignina en líquidos iónicos y formando hilos de lignina mediante equipamiento específico (Bengtsson y otros, 2019). Los hilos de lignina obtenidos se convierten en fibras de carbono mediante un tratamiento térmico en dos pasos: primero una estabilización oxidativa a 200-350 °C y luego una carbonización a más de 800 °C en atmósfera inerte (Fang y otros, 2017).

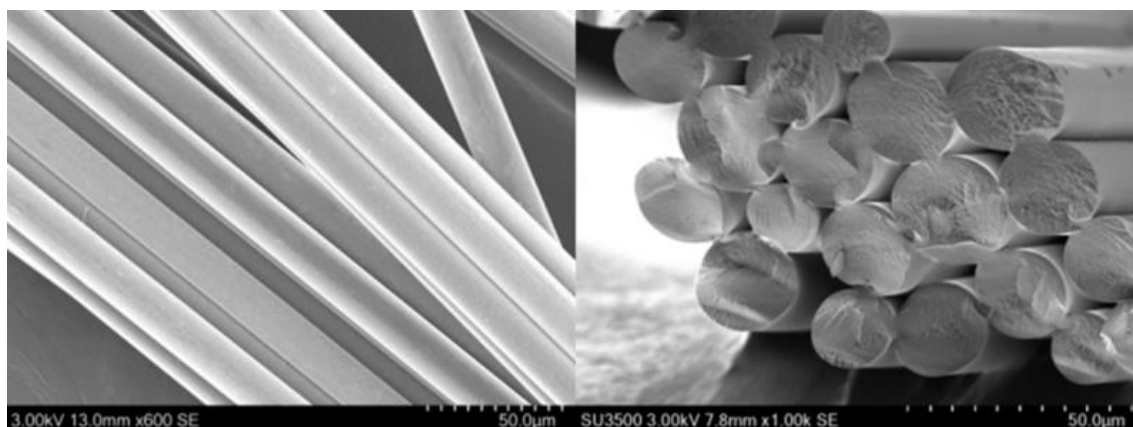


Figura 65. Imágenes SEM de la superficie y la sección de corte de fibras de carbono obtenidas por carbonización de hilos de lignina. Tomado de *(Bengtsson y otros, 2019)*

Nanolignina

Los nanocompuestos de lignina (es decir, utilizando la lignina en tamaños nanométricos), han demostrado ser de valor en la producción de películas anti-UV, antioxidante y antimicrobianos, además de servir para la encapsulación de pesticidas contaminantes del ambiente (Sipponen y otros, 2019). El uso de la nanolignina tiene las ventajas de ser un producto biodegradable y biocompatible, por lo que ha sido probada como protectora para la piel, sellado de heridas e ingeniería de tejidos, además de servir como soporte para diversos sistemas, como ser de transporte de fármacos en el organismo o incluso genes (Danti y otros, 2019; Henn y Mattinen, 2019; Zevallos Torres y otros, 2020).

Una de las estrategias para la utilización de la lignina como nanopartículas es usarla en forma de partículas coloidales que son estables en amplio rango de pH (4 a 11) y son fácilmente dispersables en solventes orgánicos (Henn y Mattinen, 2019; Qian y otros, 2014). En la Figura 66 se puede observar esquemáticamente el proceso de formación. En los pasos 1 a 3 las partículas chicas (30 nm) se van formando mediante agrupamiento y auto ensamblaje, para formar agregados más grandes (paso 4). En el quinto paso, las partículas adquieren forma esférica estable de aproximadamente 200 nm. Las partículas siguen creciendo en los pasos 6 a 8, y este crecimiento puede llevar al colapso de algunas partículas huecas, como se observa en el paso 6 (Henn y Mattinen, 2019).

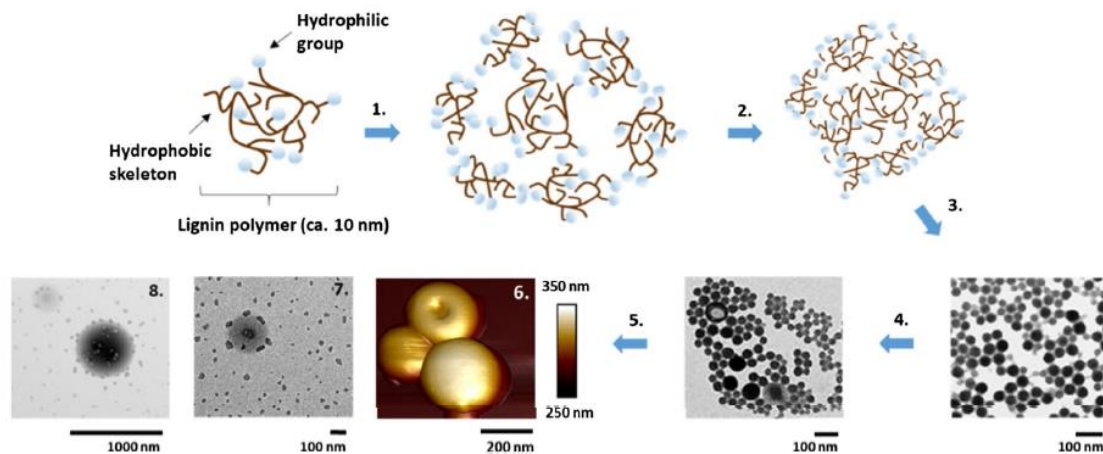


Figura 66. Formación de las partículas coloidales de lignina. La imagen 6 es tomada con un microscopio de fuerza atómica, mientras que las imágenes 7 y 8 corresponden a microscopio electrónico de transmisión. Tomado de (Henn y Mattinen, 2019).

1.6.5.2 Productos de bajo peso molecular derivados de la lignina (Estrategia 2)

Transformaciones termoquímicas: Bio-oil, Bio-carbón, syngas

La transformación de la lignina mediante pirólisis genera distintos compuestos aromáticos. En la pirólisis la lignina se calienta en atmósfera inerte a temperaturas que van de 250 a 900 °C. Mientras que entre 250 a 300 °C la modificación de la lignina es leve, entre 300 y 500 °C se empieza a descomponer mediante la rotura de los enlaces β -O-4 y enlaces carbono-carbono inestables, con pérdida significativa de masa y cambios químicos entre 400 y 500 °C (Laurichesse y Avérous, 2014; Diehl y otros, 2013). Los productos resultantes de la pirólisis son agua, gases, sólidos (bio-carbón o *bio-char*) y líquidos (biocrudo o *bio-oil*), en distintas proporciones, dependiendo de las condiciones aplicadas (Tabla 6).

Tabla 6. Rendimientos típicos de pirólisis de madera según las condiciones (o modo). Porcentaje en m/m base seca de entrada. Tr: tiempo de reacción. Adaptado de (Bridgwater, 2018).

Modo	Condiciones	Líquido	Sólido	Gas
Rápida	Aprox. 500 °C Tr < 10 segundos	75 % (<i>bio-oil</i>)	12 %	13 %
Intermedia	Aprox. 400 °C Tr < 20 minutos	40 % (en dos fases)	40 % (bio-carbón)	20 %
Lenta (carbonización)	Aprox. 400 °C Tr > 1 hora	30 % (en dos fases)	35 % (bio-carbón)	35 %
Gasificación (<i>syngas</i>)	750-900 °C Tr = 5 segundos	Mínima	Hasta 2 %	Hasta 98 %

El *bio-oil* está compuesto fenoles, cetonas, aldehídos, éteres, alcoholes y ácidos carboxílicos, aunque también depende de la materia prima y el proceso aplicado, siendo favorecida la producción de *bio-oil* principalmente mediante la pirólisis rápida (Choi y Meier, 2013). El *bio-oil* presenta varias ventajas ambientales respecto al combustible fósil, ya que es CO₂ neutral, no contribuyendo al efecto invernadero. Además, como la biomasa contiene cantidades insignificantes de azufre, no genera emisiones SO_x (Xiu y Shahbazi, 2012).

Por su parte, el bio-carbón o *bio-char* es generalmente aplicado en suelos por sus propiedades en la retención de nutrientes y agua, y presenta algunos beneficios como aumentar el pH del suelo, reducir la toxicidad del aluminio, reduce la fuerza de tensión del suelo, mejora las condiciones para poblaciones de gusanos, y mejora la eficiencia de los fertilizantes, dependiendo también del proceso aplicado para obtenerlo (Kookana y otros, 2011).

Otra transformación termoquímica es la gasificación, que a diferencia de la pirólisis sucede en una atmósfera reactiva (como aire, oxígeno o vapor). En la gasificación se produce *syngas* o gas sintético, compuesto casi exclusivamente de CO y H₂, y puede ser

utilizado como combustible o para la síntesis de otros productos químicos (Figura 67) (Fiore, Magi y Viggiano, 2020).

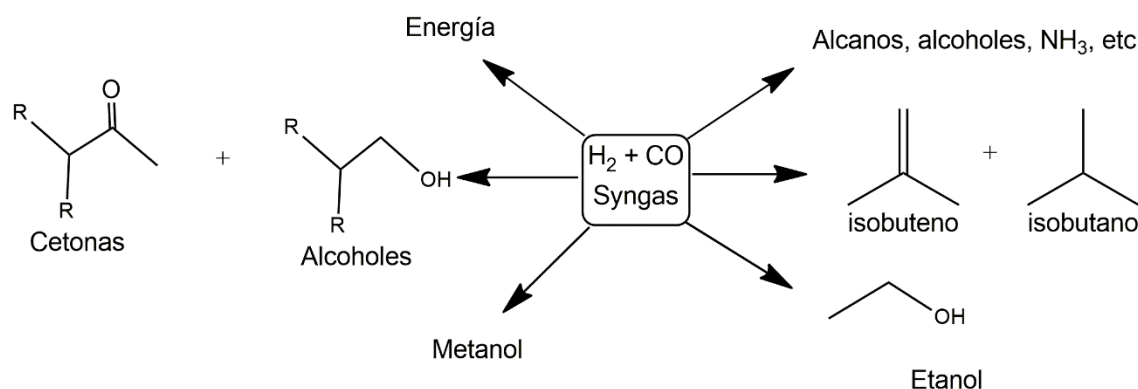


Figura 67. Syngas como plataforma química. Adaptado de (Shinde, Hengne y Rode, 2020)

Compuestos derivados de la lignina como monómeros

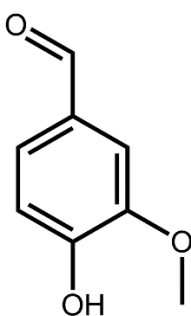
Los compuestos fenólicos pueden ser usados para distintas aplicaciones. Algunas de estas aplicaciones se basan en su actividad antioxidante frente a especies reactivas involucradas en el envejecimiento y en distintas enfermedades crónicas, autoinmunes, inflamatorias, coronarias y degenerativas, así como potenciales propiedades preventivas del cáncer (Goncalves y Romano, 2017; Perrone, Sampaolo y Melone, 2020; Dias y otros, 2020; Rice-Evans, Miller y Paganga, 1997). Como fue presentado previamente, los compuestos fenólicos son inhibidores de la actividad de los microorganismos, por lo que pueden ser utilizados como biocidas o conservantes en distintos campos, pero también pueden obtenerse compuestos variados específicos de valor agregado (Christ-Ribeiro y otros, 2019; Ferreira-Santos y otros, 2020).

Benceno, Tolueno y Xileno, Fenol

El benceno, tolueno y xileno –denominados generalmente en grupo como BTX- se producen principalmente del petróleo, por lo que producir estos compuestos a partir de lignina puede ser una estrategia medioambientalmente amigable. Para la producción de estos compuestos, además del primer paso de depolimerización de la lignina, es necesario un segundo paso de hidrodeoxigenación y demetoxilación (Luo y Abu-Omar, 2017). Además de la aplicación de fenoles en resinas de fenol-formaldehído y poliuretano, los fenoles son importantes para la producción de plásticos y otros materiales, además de ser precursores de importantes derivados como los nitrofenoles (Hodásová y otros, 2015).

Vainillina

Dentro de los compuestos que pueden ser obtenidos mediante oxidación de la lignina, la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) (Figura 68) es el más conocido y valioso. La vainillina es ampliamente usada en la industria alimenticia como agente saborizante y como preservante, en la industria farmacéutica por sus propiedades como compuesto fenólico y por ser precursor de drogas como dopamina y L-dopa. También es usada en las industrias de los polímeros, perfumera y en distintos productos de limpieza, entre otras aplicaciones. (Laurichesse y Avérous, 2014; Banerjee y Chattopadhyay, 2019).



Vainillina

Figura 68. Representación del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído o vainillina

La producción mundial se estima en más de 37000 toneladas, con un crecimiento anual del 8 %, previéndose un mercado de más de 50000 toneladas por un valor de 724,5 millones de dólares para el 2025 lo que implica un valor de casi 15000 dólares por tonelada (Grand View Research, 2017; Research and Markets, 2019).

Tradicionalmente la vainillina se extraía de la planta de vainilla (*Vanilla planifolia*), aunque actualmente menos del 1 % de la vainillina a nivel mundial se obtiene por esta vía (Chattopadhyay, Banerjee y Sen, 2018). En la actualidad, la mayor parte de la vainillina (80 a 90 %) se produce sintéticamente a partir de la materia prima petroquímica guaiacol o eugenol (Figura 69) (Wongtanyawat y otros, 2018; Martău, Călinoiu y Vodnar, 2021).

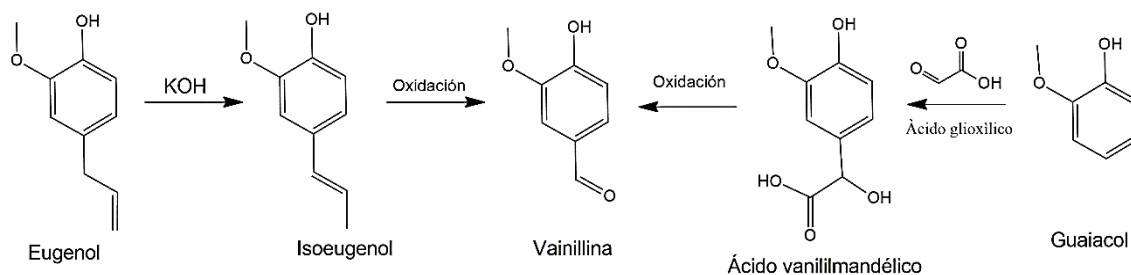


Figura 69. Síntesis de vainillina a partir de eugenol y guaiacol. Adaptado de (Martău, Călinoiu y Vodnar, 2021; Yu Selikhova y otros, 2019)

El restante 10 a 20 % de vainillina es producida a partir de lignina, y en particular la lignina obtenida luego de los procesos para producir pasta de celulosa (lignosulfonato y lignina Kraft) (Y. Wang y otros, 2018). La conversión de estas ligninas incluye la depolimerización y oxidación a altas presiones y temperaturas en solución alcalina con utilización de distintos oxidantes y aunque su mecanismo de formación no está completamente elucidado, se ha propuesto como posible mecanismo el que se presenta en la Figura 70 (Fache, Boutevin y Caillol, 2016; Hodásová y otros, 2015; Pacek y otros, 2013).

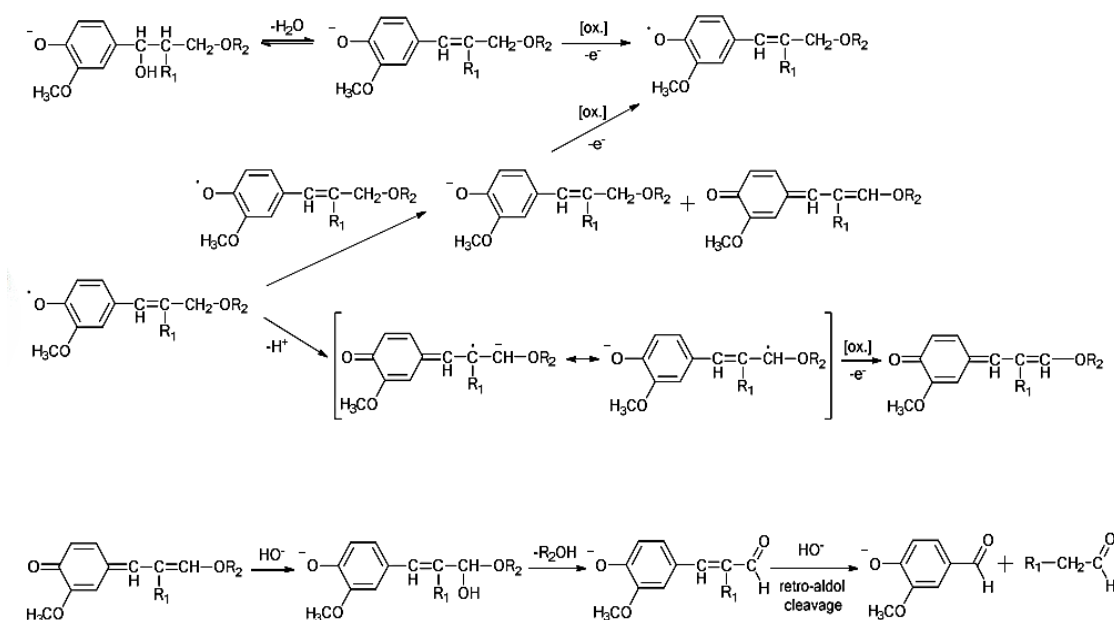


Figura 70. Mecanismo propuesto para la depolimerización y formación de vainillina a partir de lignina. Tomado de (Fache, Boutevin y Caillol, 2016).

Debe tenerse en cuenta que las vainillinas derivadas del petróleo, de la lignina Kraft y de los lignosulfonatos en general no son aceptables para consumo humano (es decir, en alimentos y bebidas o en productos farmacéuticos) debido a que pueden contener mezclas de otros subproductos que pueden causar problemas de salud (Banerjee y Chattopadhyay, 2019). Por esta razón, también es que cada día es más intenso el estudio de la producción de vainillina mediante bioconversión de la lignina y compuestos fenólicos utilizando microorganismos y enzimas específicas, (Martău, Călinoiu y Vodnar, 2021; Chattopadhyay, Banerjee y Sen, 2018).

A partir de la oxidación de la vainillina se pueden producir otros compuestos (Figura 71), entre los que se encuentra el ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) que también es usado como aromatizante. (Bajwa y otros, 2019).

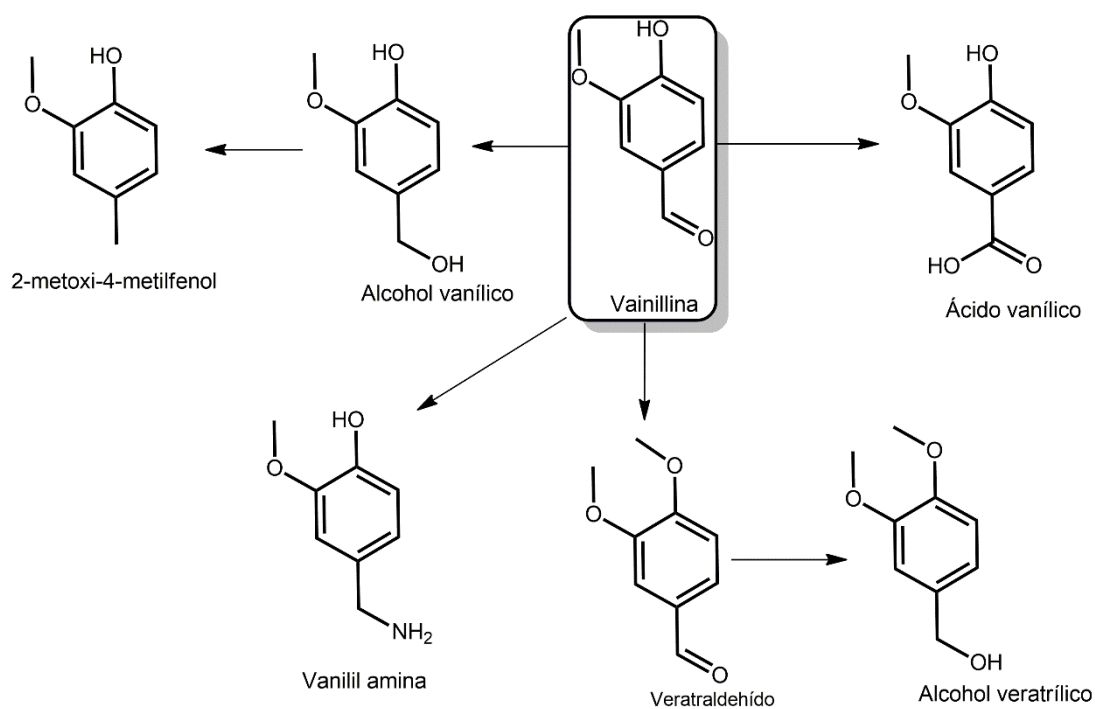


Figura 71. Ejemplos de vainillina como plataforma química. Adaptado de (Shinde, Hengne y Rode, 2020).

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

Porque como ambos sabemos, sin propósito, nosotros no existiríamos

Agent Smith, The Matrix - 1999

2.1 Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo es contribuir a la producción sostenible de bioetanol y otros productos de valor en el marco conceptual de biorrefinería en Uruguay, evaluando dos materias primas lignocelulósicas distintas – switchgrass (*Panicum virgatum*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) – sometidas a pretratamiento de explosión por vapor en un equipo continuo a escala pre-piloto y desarrollando estrategias para aprovechar las distintas fracciones generadas mediante la producción de productos de valor.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar las materias primas.
2. Evaluar el comportamiento de las materias primas frente al pretratamiento de explosión por vapor, analizando las distintas fracciones generadas.
3. Evaluar la hidrólisis enzimática (sacarificación) y fermentación de la fracción sólida lignocelulósica para la producción de bioetanol.
4. Estudiar la producción de compuestos de alto valor agregado.

2.3 Esquema gráfico

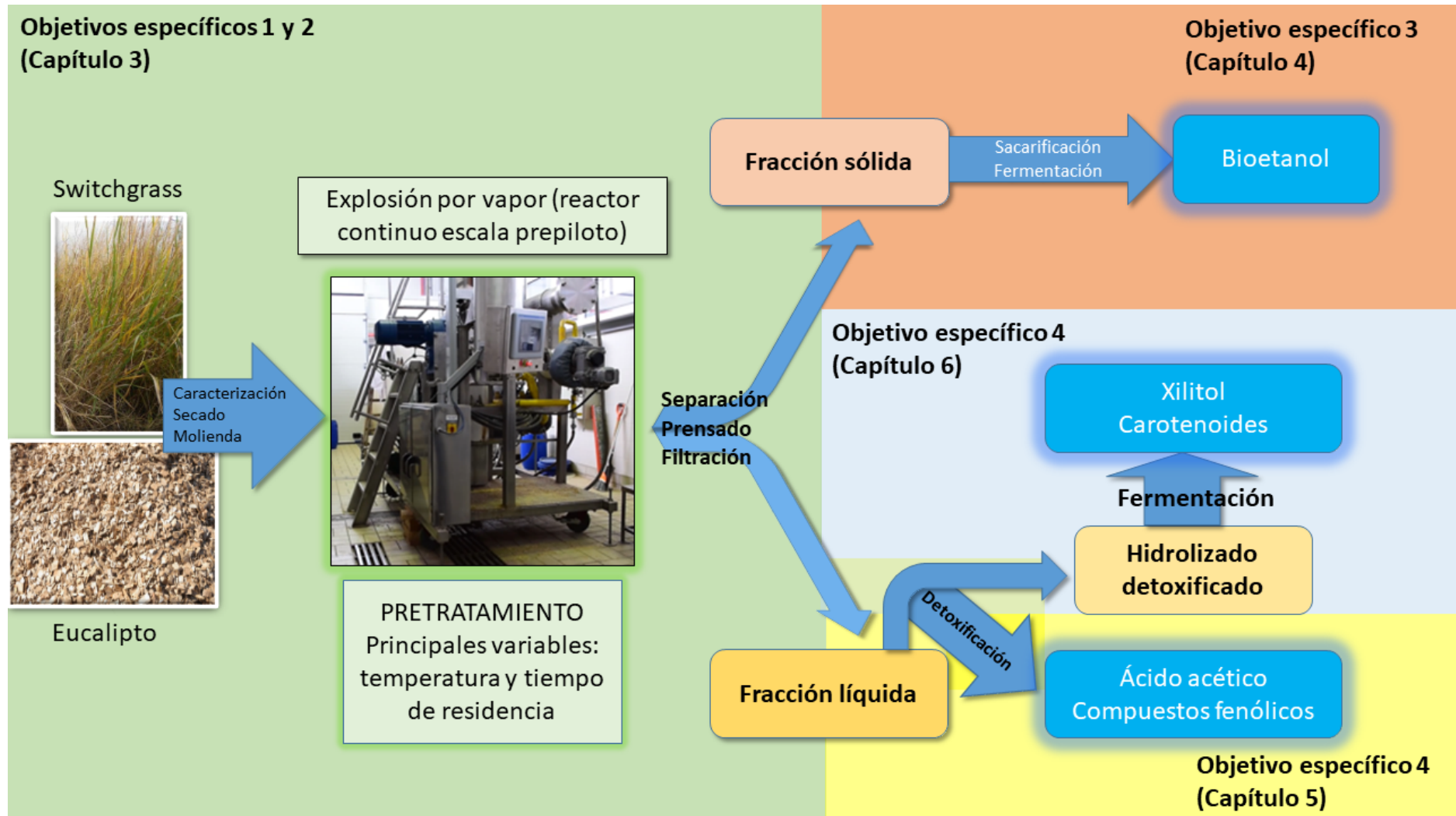
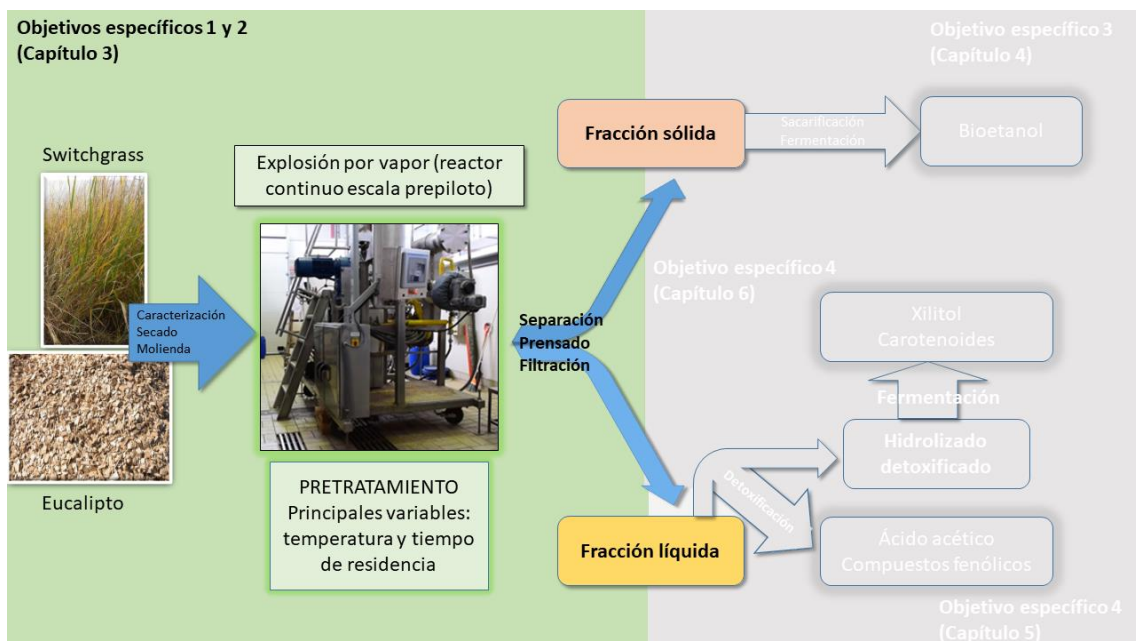


Figura 72. Esquema gráfico de la tesis

CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN Y PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA



3.1. Introducción

Este capítulo está enfocado en la caracterización de las dos biomásas y su comportamiento frente a la explosión por vapor continua, lo que corresponde a los objetivos específicos 1 y 2.

En este trabajo, el equipo utilizado para la explosión de vapor fue un reactor pre-piloto semicontinuo (Figura 73). Algunas de las ventajas de este tipo de reactor en comparación con los reactores discontinuos a escala de laboratorio incluyen una mayor producción de biomasa pretratada por tiempo con menos manipulación operativa. Sin embargo, aunque altamente automatizado, la operación de este equipo presenta algunos desafíos. Por ejemplo, la alimentación uniforme de biomasa es un aspecto crítico, ya que a su vez afecta al tapón dinámico para mantener la presión dentro del reactor. Además, la liberación de presión a pequeños intervalos podría afectar la producción homogénea de biomasa pretratada. Sin embargo, dicho sistema y condiciones son más similares a lo que se espera que suceda en una producción industrial a gran escala.

En este capítulo se presentarán los distintos ensayos realizados a escala prepiloto con el equipo de explosión por vapor. Se investigó la recuperación y análisis de las distintas fracciones generadas, evaluando la influencia de los principales parámetros de la explosión por vapor, es decir la temperatura y el tiempo de residencia.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Materias primas

El switchgrass (*Panicum virgatum*) fue suministrado por ANCAP. La materia prima se cosechó en la Estación Experimental Mario Cassinoni, departamento de Paysandú en setiembre de 2016. La biomasa se secó a 40 °C hasta un contenido de humedad menor al 10 % y se molió en un molino de martillos.

Chips de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) fueron donados por la empresa uruguaya Chipper. Se le aplicó el mismo procedimiento, secando la biomasa a 40 °C hasta un contenido de humedad menor al 10 % y se molió en un molino de martillos.

Luego de la molienda se determinó la distribución de tamaño de partículas tomando una muestra y haciéndola pasar por un set de tamices con distintos tamaños de poros, se pesó cada fracción, se midieron los tamaños de partículas y se relacionó con el peso total.

3.2.2. Pretratamiento con explosión por vapor

La explosión por vapor fue llevada a cabo en un equipo pre-piloto semi-continuo (siendo *semi* por la liberación de la presión cada 5 segundos) instalado en la Planta Piloto del Latitud – Fundación LATU (Figura 73). El equipo (Advance Bio Systems LLC, modelo S1401-D2011) cuenta con una capacidad aproximada de procesamiento de 10 kg/h (dependiendo de las condiciones de pretratamiento), una presión de trabajo máxima de 15 bar, y un tornillo con velocidad variable para regular el tiempo de residencia. La temperatura máxima de trabajo fue 200 °C, que fue regulada según la presión de trabajo (ya que el equipo trabaja con vapor saturado) y controlado mediante una PLC que también regula otros tornillos del equipo (tornillo de la tolva, tornillo de alimentación y tornillo del reactor). En la Figura 74 se puede ver una representación esquemática del equipo de explosión por vapor.



Figura 73. Imagen del equipo de explosión por vapor usado para el pretratamiento de las biomásas.

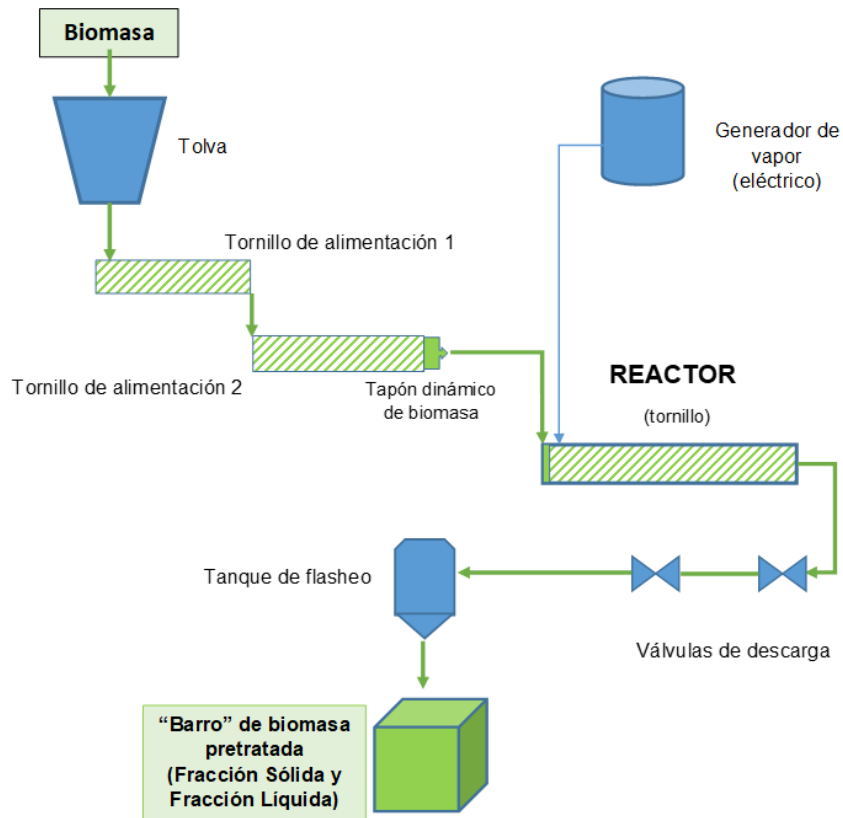


Figura 74. Representación esquemática del equipo de explosión por vapor.

Previo a las explosiones por vapor, la biomasa fue hidratada durante 24 horas a aproximadamente 30 % m/m con agua corriente a temperatura ambiente. Este contenido de humedad, además de permitir el procesamiento fluido de la biomasa y con formación adecuada del tapón dinámico, también es similar al punto de saturación de fibra, que se considera el ideal ya que no hay agregado extra ni incompleto de agua (Sui y Chen, 2016). La biomasa hidratada fue agregada al reactor de explosión por vapor y sometida a diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia.

Luego de la explosión por vapor, la biomasa fue filtrada usando una tela (65 % polyester y 35 % algodón, 180 g/m², 405 hilos de urdimbre en 10 cm y 194 hilos de trama en 10 cm) y una prensa para separar el sólido restante de la fracción líquida. A continuación, la fracción líquida se congeló para su posterior análisis y procesamiento. La fracción sólida se lavó tres veces con agua corriente a 60 °C en una proporción 5:1 (agua: biomasa seca en kg), utilizando una hormigonera portátil durante 5 min, repitiendo el procedimiento de prensa y filtrado. Luego, muestras de la fracción sólida fueron tomadas para análisis adicionales y el resto se refrigeró para realizar la hidrólisis enzimática.

3.2.3. Diseño experimental de pretratamiento del switchgrass

Se evaluaron tres niveles de temperatura (170, 185 y 200 °C) y tres niveles de tiempo de residencia (5, 10 y 15 min) para el pretratamiento de explosión por vapor del switchgrass. Estos valores se combinaron a través de un diseño compuesto central de 2^2 , lo que dio lugar a un total de 11 ensayos. El diseño incluyó tres ensayos en el punto central para estimar el error experimental necesario para el análisis de la varianza y para verificar la presencia de curvatura en las superficies de respuesta. El contenido de celulosa en el sólido resultante después del pretratamiento se consideró como respuesta para el diseño experimental. Para el análisis de los datos se utilizó el software Statistica versión 12.

3.2.4. Diseño experimental de pretratamiento del eucalipto

Se evaluaron dos temperaturas (180 °C y 200 °C) y dos tiempos de residencia (10 y 20 minutos), realizando cada explosión por duplicado. Para cada componente se realizó el test de Tukey para evaluar diferencias significativas.

3.2.5. Cálculo del factor de severidad

El factor de severidad (S_0) se calculó para cada combinación de temperatura y tiempo de residencia utilizado para la explosión de vapor. S_0 se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$S_0 = \log_{10}\left(t \times e^{\frac{T-100}{14.75}}\right) \quad \text{Ecuación 1}$$

donde t es el tiempo de residencia en minutos, T es la temperatura de reacción en °C y 14,75 es un valor ajustado (Overend y Chornet, 1987).

3.2.6. Microscopía electrónica de barrido

En el caso del switchgrass, se observaron tres muestras de biomasa mediante microscopía electrónica de barrido (SEM): dos muestras pretratadas en diferentes condiciones de proceso (la menos severa y la más severa) y una muestra sin tratar. Para el eucalipto también se observaron tres muestras: la de severidad más baja, la de severidad media, y la más severa. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico JEOL modelo JSM-5900LV. Para el análisis, las muestras secas se cubrieron con una película

de oro y luego se sometieron a un voltaje de aceleración de 20 kV. Las imágenes se obtuvieron con aumentos de 75 y 370 veces.

3.2.7. Caracterización de las ligninas mediante pirólisis (Py-GC-MS)

Las muestras de switchgrass y eucalipto (original y explotadas) fueron molidas a 40-60 mesh y se peletizaron para su pirólisis. Estas se pirolizaron en un pirolizador PYROJECTOR II (SGE) acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard HP 5890 II plus conectado a un espectrómetro de masas Hewlett-Packard HP 5971. La temperatura de pirólisis fue de 450 °C y los productos de la pirólisis se separaron en una columna OPTIMA 1701 (Macherey-Nagel, 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm de espesor de film). Las condiciones de cromatografía fueron las siguientes: helio como gas carrier, flujo 1mL/min, split 1:20, una temperatura del inyector de 250 °C temperatura inicial 45 °C por 4 minutos, un incremento de 4 °C/min hasta 240 °C y luego un incremento de 25 °C/min hasta 280 °C manteniendo esta temperatura por 5 min. La línea de transferencia entre el GC y el espectrómetro de masa se mantuvo a 290 °C. El espectrómetro operó en modo de impacto electrónico a 70 eV y una temperatura de 180 °C. Los productos de la pirólisis se identificaron utilizando las bibliotecas de espectros de masa NIST, Wiley y datos de literatura con datos literarios (Faix, Meier y Fortmann, 1990a; Faix, Meier y Fortmann, 1990b; Faix, Fortmann y otros, 1991a; Faix, Fortmann y otros, 1991b).

3.2.8. Espectroscopía infrarroja (Fourier Transform Infrared - FTIR)

Las muestras secas fueron analizadas en un equipo IRPrestige-21 FTIR Shimadzu equipado con accesorio de Reflectancia Total Atenuada (ATR) Pike Technologies GladiATR. Cada muestra fue uniformemente presionada contra la superficie de diamante usando un mecanismo de prensa acoplado al accesorio ATR. Los espectros FTIR fueron obtenidos promediando 64 escaneos de 4000 a 400 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹.

3.2.9. Determinación de la composición química

El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en las muestras sólidas se determinaron de acuerdo al informe técnico del Laboratorio Nacional de Energías Renovables de Estados Unidos NREL/TP-510-42618 (Sluiter, Hames y otros, 2012). El contenido de cenizas se determinó de acuerdo con el método estándar ASTM D1102-84 (ASTM 2013).

La proteína se estimó multiplicando el contenido de nitrógeno por 6.25. El contenido de nitrógeno se determinó usando un analizador elemental orgánico CHN Analyzer Flash 2000 (ThermoScientific). Los extractivos se determinaron de acuerdo con el informe técnico NREL / TP-510-42619 (Sluiter, Ruiz y otros, 2005).

En las muestras líquidas la concentración de azúcares y productos de degradación fueron determinadas como se describe en el informe técnico NREL/TP-510-42623 (Sluiter, Hames y otros, 2008).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Switchgrass

3.3.1.1 Caracterización

Composición química

La composición química del switchgrass o pasto varilla usado en el presente estudio se muestra en la Tabla 7. Como puede verse, la materia prima original tenía una cantidad elevada de carbohidratos (aproximadamente 57 % m/m), presente en forma de celulosa y hemicelulosa. La celulosa fue la fracción más abundante, siendo la cantidad encontrada en este estudio similar a la reportada por otros autores (Hu y otros, 2010). El contenido de hemicelulosa estuvo dentro del rango de valores reportados para el switchgrass y otros pastos (Kataria y otros, 2017; Lindsey y otros, 2013). El porcentaje mayoritario de las hemicelulosas correspondió a xilano, con un porcentaje minoritario de arabinano. Se detectó manano, pero su contenido fue bajo, menor al límite de cuantificación. La lignina se encontró comparativamente en mayor cantidad, aproximadamente 31 % en este estudio frente a un máximo de 23 % en el trabajo de Lindsey y otros (2013) o 21 % en el estudio de Mann y otros (2009). Sin embargo, Larnaudie, Ferrari y Lareo (2021) informaron que el contenido de lignina se encuentra generalmente en el rango de 19 a 29 %, más próximo al valor informado aquí. Estas diferencias podrían explicarse por la variabilidad natural de la especie, la época de cosecha y las condiciones de almacenamiento (Lindsey y otros, 2013). El contenido de cenizas, proteínas y extractivos en el switchgrass fueron comparables a los contenidos reportados para otros tipos de gramíneas y biomasa lignocelulósica similares. La ceniza consiste de elementos inorgánicos y sílice, mientras que los extractos de agua y etanol están compuestos por una multitud de compuestos, que

incluyen ceras, aceites, grasas, resinas, azúcares no estructurales, clorofila, entre otros (Lindsey y otros, 2013).

Tabla 7. Composición química del switchgrass usado en el presente estudio

Componente	Composición (% en masa seca)	
Celulosa	31,8 ± 0,8	
Hemicelulosa	25,0 ± 1,2	
	<i>Xilano</i>	21,6 ± 1,2
	<i>Arabinano</i>	2,7 ± 0,1
	<i>Manano</i>	Menor a 0,7
Lignina	31,2 ± 0,8	
	<i>Lignina insoluble o Klason</i>	26,9
	<i>Lignina soluble</i>	4,3
Cenizas	3,2 ± 0,3	
Proteína	1,8 ± 0,3	
Extractivos	7,4 ± 1,1	
	<i>Extractivos en agua</i>	5,0 ± 0,4
	<i>Extractivos en etanol</i>	2,4 ± 0,4

Espectroscopía Infrarroja (FTIR-ATR)

La asignación de bandas se realizó en base a distintos trabajos de espectroscopía infrarroja sobre biomasa lignocelulósica (Tabla 8) (Yan y otros, 2021; Reis y otros, 2020; Meng y otros, 2016; Xu, Yu y otros, 2013).

Tabla 8. Asignación de bandas de vibración en IR. Tomado de (Reis y otros, 2020)

Frecuencia (cm ⁻¹)	Tipo de vibración
3335	Estiramiento de enlace O-H
2910	Estiramiento de enlace C-H presente en la hemicelulosa y celulosa
1730	Estiramiento asimétrico de enlace C=O de grupo acetilo presente en la hemicelulosa.
1512	Vibración del anillo de benceno presente en la lignina
1450 y 1245	Estiramiento de los C-H y C-O de grupo acetilo
1375	Deformación angular de grupos C-H característicos de celulosa
1160	Deformación angular de enlaces C-O de alcoholes primarios
1020	Absorción de enlaces C-O-C característicos de la vibración del anillo de piranosa de la celulosa

En la Figura 75 se puede observar el espectro FTIR-ATR de la muestra sin tratar de switchgrass.

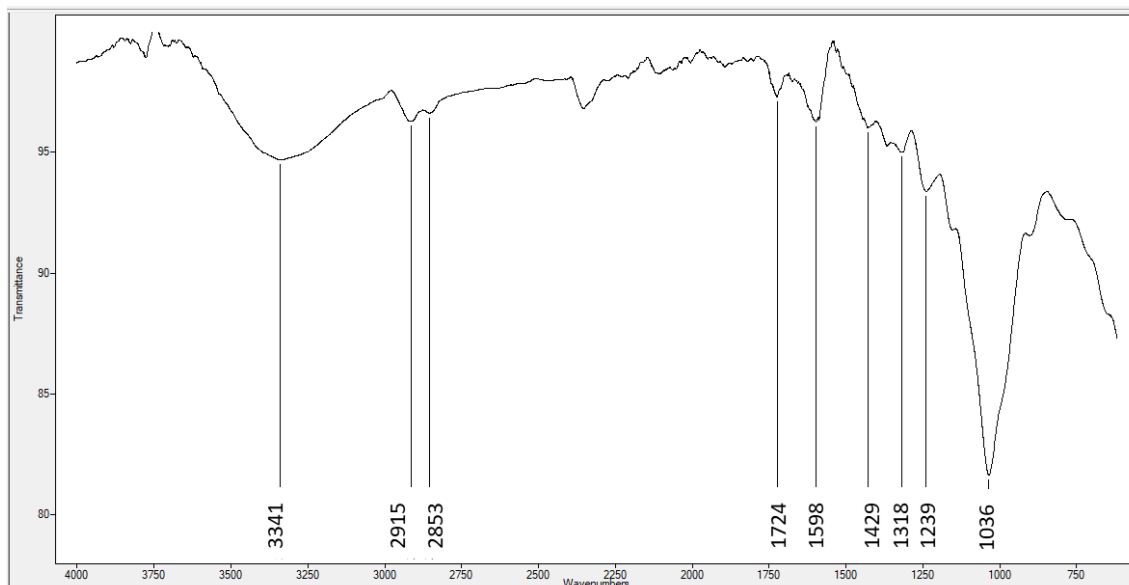


Figura 75. Espectro infrarrojo del switchgrass sin pretratar.

La banda señalada con el pico a 3341 cm^{-1} corresponde al estiramiento de los grupos OH, mientras que los picos a 2915 y 2853 cm^{-1} se atribuyen típicamente al estiramiento C-H de los metilenos de la celulosa y las hemicelulosas. Los grupos acetilo de la hemicelulosa se ven reflejados en la banda con el pico a 1724 cm^{-1} (correspondiente al estiramiento del enlace C=O), aunque también es posible asignarlo al enlace carbonil-éster de la unidad de ácido *p*-cumárico (Nazir y otros, 2013). La banda con el pico a 1598 cm^{-1} se atribuye al anillo aromático de la lignina. El pico a 1429 cm^{-1} correspondería a la deformación del C-H metil y metileno de la lignina siringílica, aunque algunos autores lo atribuyen a la celulosa (Auxenfans y otros, 2017; Traoré, Kaal y Martínez Cortizas, 2018). El pico a 1318 cm^{-1} también es atribuible a las unidades siringílicas de la lignina. A 1239 cm^{-1} se observa la banda correspondiente al estiramiento de los enlaces C-O, indicando la presencia de los grupos acetilo de las hemicelulosas. Finalmente, la banda a 1036 cm^{-1} es debida a la absorción de enlaces característicos del anillo de piranosa de la celulosa.

Pirólisis

La caracterización de la lignina se realizó mediante la técnica Py-GC-MS, donde se descompone la muestra en distintos productos, derivados de los polisacáridos o de la descomposición de lignina. Estos últimos se pueden agrupar según la unidad de origen de

la lignina (siringílicas, guaiacílicas o *p*-hidroxifenílicas). En la Figura 76 se muestran los diferentes compuestos que se obtuvieron en la pirólisis, siendo los del comienzo del cromatograma los derivados de carbohidratos (hasta el tiempo de retención de 17,85 minutos) y luego aparecen los compuestos aromáticos derivados de la lignina (con algunos derivados de los carbohidratos intercalados). En la Tabla 9 se observan los compuestos identificados y el porcentaje relativo al total de unidades derivadas de la lignina. Como se observa, la lignina estaba compuesta mayoritariamente por unidades guaiacílicas (G) y unidades *p*-hidroxifenílicas (H), con un porcentaje minoritario de unidades siringílicas (S). La relación relativa encontrada de estas unidades fue 43 % G, 28 % H y 28 % S. Estos valores son coherentes con los encontrados por (Yan y otros, 2010), cuya relación promedio fue 42 % G, 26 % H, y 32 % S. La relación S/G fue 0,67, mientras que la relación G/H fue 1,50. Como se puede observar en la Tabla 9, de las unidades *p*-hidroxifenílicas el 4-vinilfenol fue el más abundante, de las unidades guaiacílicas el 4-vinilguaiacol, mientras que de las unidades siringílicas fue el siringol.

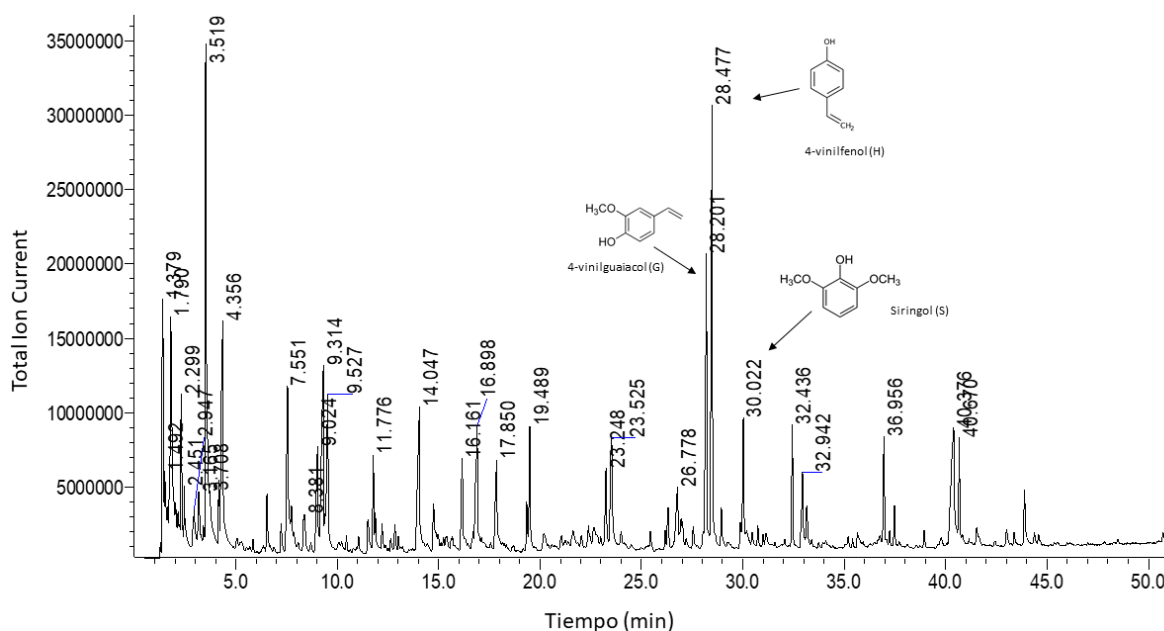


Figura 76. Cromatograma de los productos de pirólisis del switchgrass sin pretratar.

Tabla 9. Compuestos derivados de la pirólisis de switchgrass sin pretratar y su abundancia relativa (% del total de compuestos derivados de la lignina identificados). Origen H: unidades p-hidroxifenílicas, G: unidades guaiacílicas, S: unidades siringílicas

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Origen	Abundancia relativa (% lignina)
Fenol	19.339	H	2,47
Guaiacol	19.489	G	6,17
Guaiacol, 4-metil	23.248	G	4,71
Guaiacol, 4-vinil	28.201	G	17,90
Fenol, 4-vinil	28.477	H	25,85
Eugenol	28.937	G	1,88
Siringol	30.022	S	7,25
Isoeugenol (<i>cis</i>)	32.436	G	5,64
Siringol, 4-metil	32.942	S	5,39
Vanillina	33.149	G	2,73
Siringol, 4-vinil	36.956	S	5,15
Siringol, 4-alil	37.472	S	1,74
Siringol, 4-propenil (<i>cis</i>)	38.943	S	0,77
Siringol, 4-propenil (<i>trans</i>)	40.670	S	4,93
Siringaldehído	41.542	S	1,06
Acetosiringona	43.383	S	0,83
Coniferil alcohol (<i>trans</i>)	43.884	G	3,47
Coniferaldehído	44.383	G	0,62
Siringil acetona	44.583	S	0,47
Sinapil alcohol (<i>trans</i>)	50.725	S	0,60
Sinapaldehído	50.975	S	0,37

3.3.1.2 Tratamiento de explosión por vapor de switchgrass

Tamaño de partícula

La distribución del largo de partícula luego de la molienda en molino de martillos y previo a ingresar en el equipo de explosión por vapor se muestra en la Figura 77, con el 80 % de los “pins” con largo de 2 a 12 mm. El espesor y ancho del pin fueron de 0,5 a 2 mm. Este

tamaño fue adecuado para el trabajo en el equipo de explosión por vapor, manteniendo el tapón dinámico fluido.

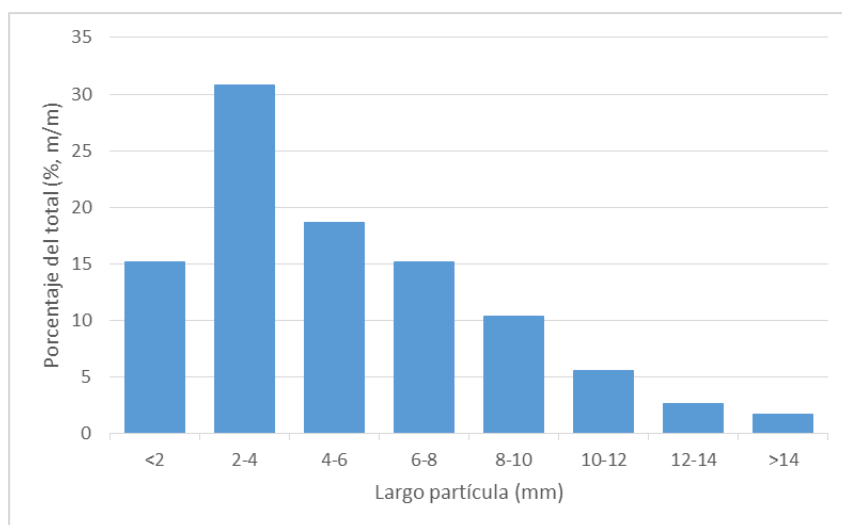


Figura 77. Distribución del largo de partícula de switchgrass

Composición de la Fracción Sólida del material explotado

La Tabla 10 resume la composición del material sólido obtenido bajo las diferentes condiciones de explosión de vapor. Como era de esperar, la hemicelulosa fue la principal fracción afectada durante el pretratamiento, variando la composición en el sólido pretratado entre el 2,5 y el 27,9 % (m/m) según las condiciones empleadas para la reacción. La cantidad de esta fracción en el sólido pretratado disminuyó junto con el aumento en la severidad de la reacción, aumentando en consecuencia las cantidades relativas de celulosa y lignina.

Tabla 10. Composición del material sólido obtenido luego del pretratamiento con explosión por vapor de switchgrass en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia

Corrida	Variables de pretratamiento (valores originales y (código))		Factor de severidad	Composición de la fracción sólida (% masa)		
	Temperatura (°C)	Tiempo de residencia (min)		Celulosa	Hemi- celulosa	Lignina
1	170 (-1)	5 (-1)	2,76	33,8 ± 1,0	25,5 ± 3,7	34,8 ± 1,9
2	170 (-1)	10 (0)	3,06	35,4 ± 1,1	25,4 ± 3,7	35,0 ± 2,0
3	185 (0)	5 (-1)	3,20	36,2 ± 1,1	22,3 ± 3,2	36,8 ± 2,0
4	170 (-1)	15 (+1)	3,24	34,9 ± 1,1	27,9 ± 4,0	36,6 ± 2,0
5	185 (0)	10 (0)	3,50	42,1 ± 1,3	15,5 ± 2,2	34,7 ± 1,9
6	185 (0)	10 (0)	3,50	44,3 ± 1,3	15,8 ± 2,5	38,8 ± 2,0
7	185 (0)	10 (0)	3,50	41,2 ± 1,3	21,0 ± 2,2	34,4 ± 1,9
8	200 (+1)	5 (-1)	3,64	44,4 ± 1,4	14,0 ± 2,0	42,2 ± 2,4
9	185 (0)	15 (+1)	3,68	44,4 ± 1,4	13,9 ± 2,0	40,8 ± 2,3
10	200 (+1)	10 (0)	3,94	49,1 ± 1,5	5,1 ± 0,7	45,3 ± 2,5
11	200 (+1)	15 (+1)	4,12	50,9 ± 1,6	2,5 ± 0,4	50,6 ± 2,8

El análisis estadístico de los datos reveló que la temperatura fue la variable más importante que afectó los resultados (Figura 78). El efecto de esta variable fue positivo para las respuestas de celulosa y lignina (Figura 78A y C) y negativo para hemicelulosa (Figura 78B), demostrando que se obtuvieron más celulosa y lignina, y menos hemicelulosa en el sólido cuando la temperatura utilizada para el pretratamiento se incrementó. El tiempo de reacción también promovió efectos similares en la composición del sólido final pero con mucha menos intensidad en comparación con la temperatura.

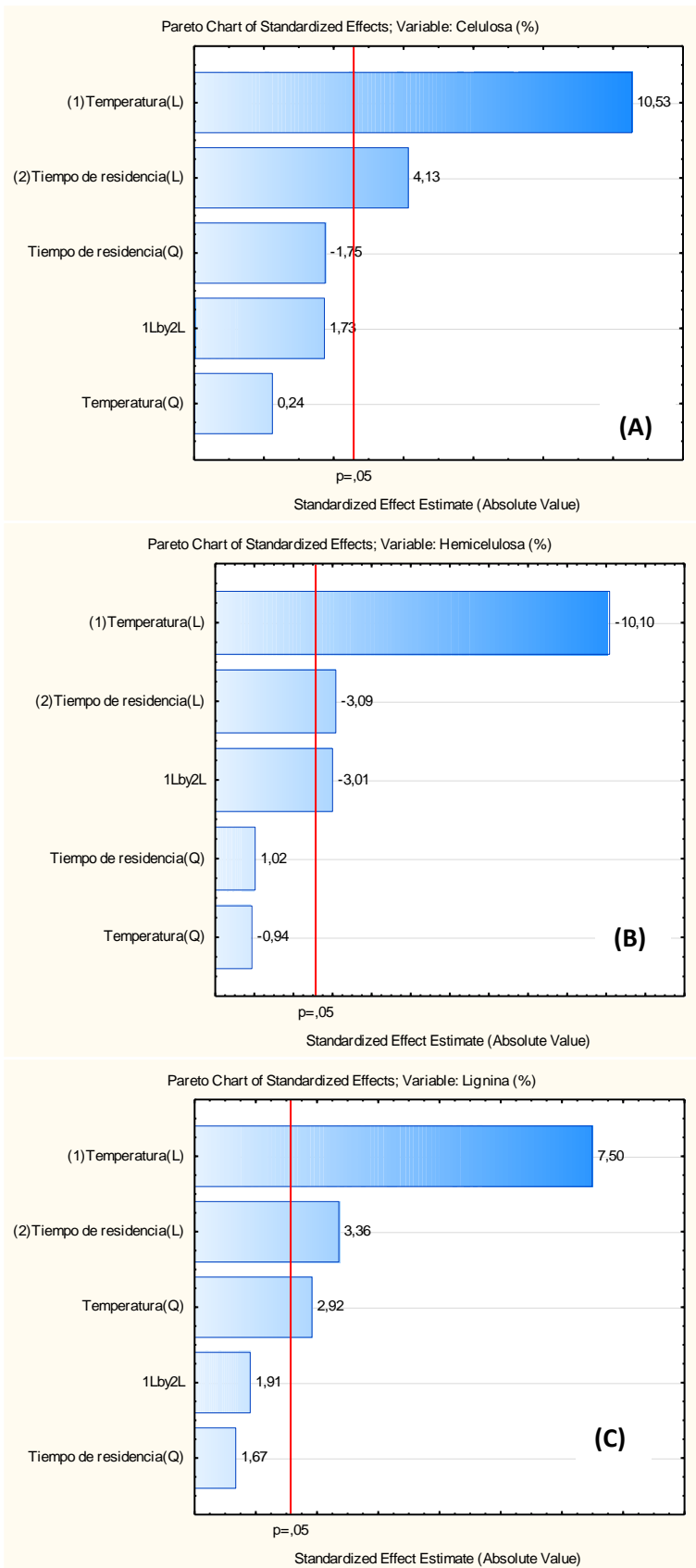


Figura 78. Diagrama de Pareto de los efectos de la temperatura y el tiempo de residencia y sus interacciones en los contenidos de celulosa (A), hemicelulosa (B) y lignina (C) en el sólido obtenido luego de la explosión por vapor de switchgrass.

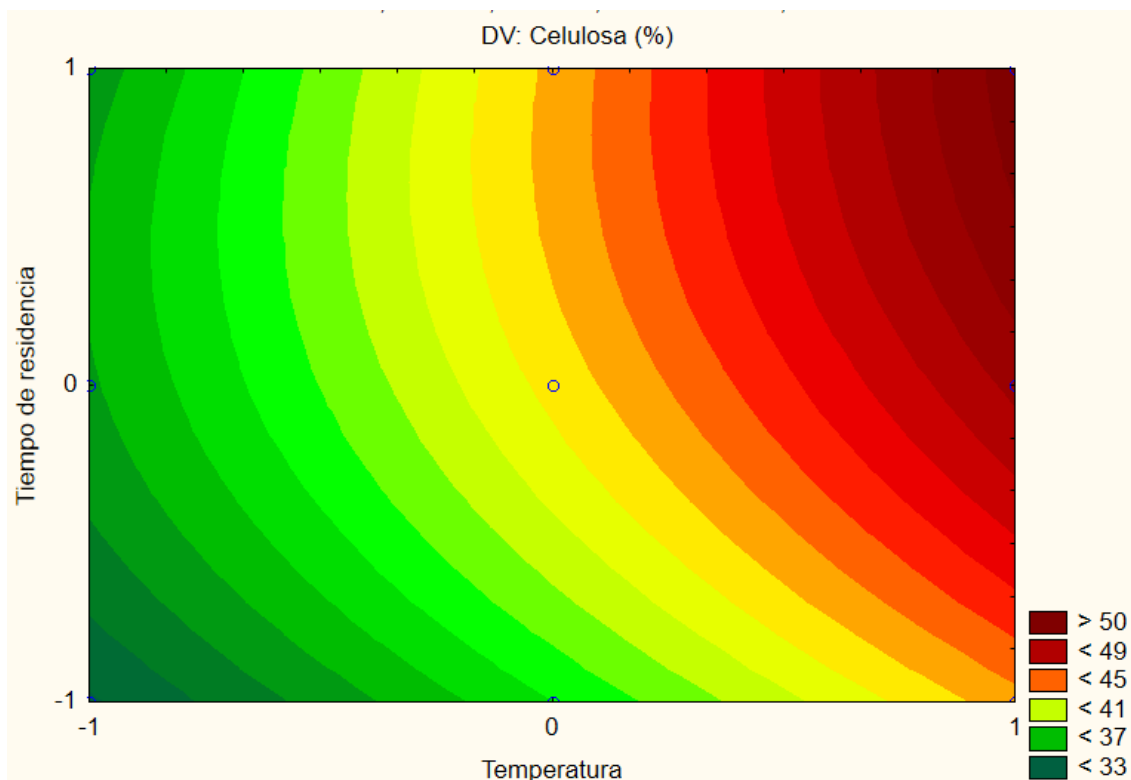


Figura 79. Gráfico de líneas de contorno representando la variación del contenido de celulosa en el switchgrass pretratado con explosión por vapor a las diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia (valores codificados)

Como se puede observar en el gráfico de líneas de contorno (Figura 79) los mayores contenidos de celulosa se obtienen en las condiciones de temperatura más alta (200 °C). Realizando un análisis de varianza de los datos experimentales y eliminando las variables con la significancia menor en las respuestas, se puede obtener la siguiente ecuación modelo para predecir los valores celulosa en el sólido pretratado, dentro de los rangos estudiados:

$$\text{Celulosa (\% m/m)} = -19,00 + 0,268 T - 1,481 t - 0,0661 t^2 + 0,018 T \times t \quad (R^2 = 0,96)$$

Donde T es la temperatura en °C y t el tiempo de residencia en minutos. El alto valor de R^2 demuestra una alta concordancia entre los valores experimentales y los obtenidos por la ecuación modelo.

Espectroscopía Infrarroja (FTIR-ATR)

Como se puede observar en la Figura 80, los espectros de las distintas muestras pretratadas de switchgrass presentan bandas de absorción similares, además de presentar semejanzas con otros estudios realizados (Liu y otros, 2017).

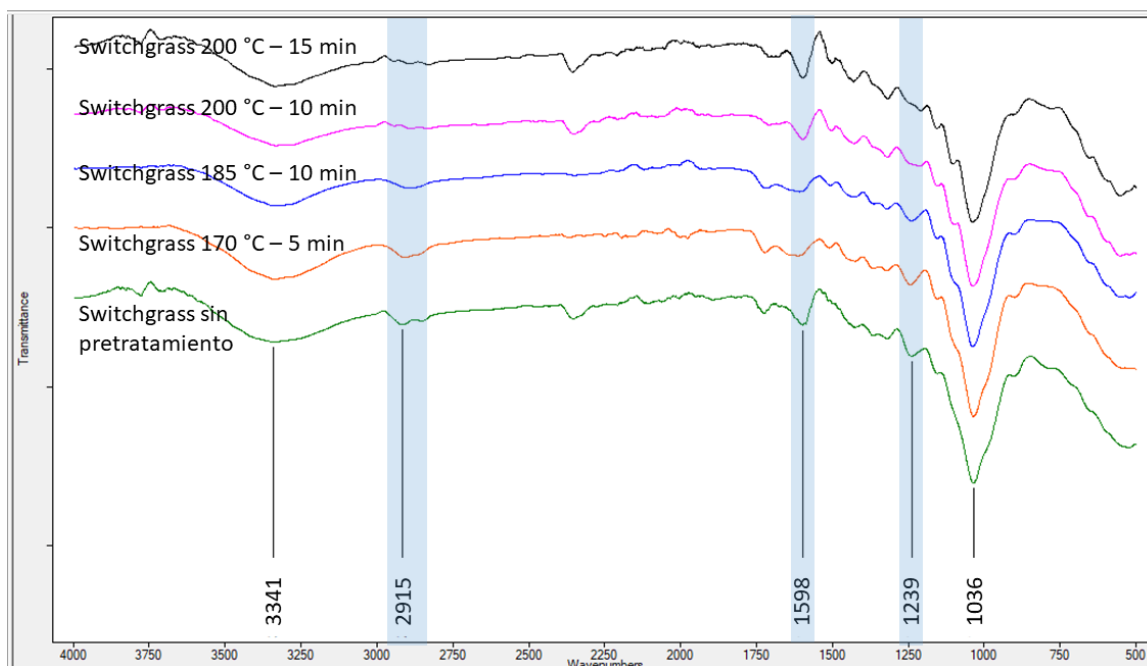


Figura 80. Espectro FT-IR de distintas muestras de switchgrass, sin tratar y pretratadas. Cada espectro fue normalizado a 2907 cm^{-1} .

Se destaca la progresiva disminución de la intensidad de la banda correspondiente al pico señalado a 1239 cm^{-1} . Esta banda es debida a los grupos acetilo, lo que indica que estos grupos se fueron hidrolizando a mayor severidad en el pretratamiento de explosión por vapor, por lo que no permanecieron en la fracción sólida. El pico a 1598 cm^{-1} debido a las unidades siringílicas de la lignina se hace más intenso a mayor severidad, lo que puede ser explicado por el aumento relativo de lignina en la muestra analizada, ya que como se verá en la pirólisis de las muestras, no hubo un aumento en la abundancia relativa de estas unidades. La banda a 2915 cm^{-1} debido a los metilenos de los azúcares se hace menos intenso, probablemente explicado por la menor proporción de hemicelulosas en las muestras pretratadas. Permanece la banda inespecífica correspondiente a los O-H (3341 cm^{-1}) y la banda a 1036 cm^{-1} debida al anillo de piranosa de la celulosa.

Por otra parte, algunos autores (Oh y otros, 2005) han propuesto determinar el índice de cristalinidad de la celulosa mediante la relación de picos (en particular la absorbancia del pico a 1430 cm^{-1} vs el pico a 900 cm^{-1}), pero los valores obtenidos en este trabajo no permiten establecer tendencias claras. Sin embargo, debe considerarse que estos autores trabajaron con muestras de celulosa purificada; en muestras con matrices complejas - como las estudiadas en la presente tesis- existe superposición de picos de la celulosa con

los correspondientes a la lignina y a la hemicelulosa, por lo que no es posible atribuirlos únicamente a la cristalinidad de la celulosa (Barnette y otros, 2012). Este aspecto se puede constatar en la disparidad de criterios entre distintos autores para la asignación de algunos picos: (Auxenfans y otros, 2017) asignan la banda entre 1420-1430 cm^{-1} a la celulosa y su cristalinidad, (Traoré, Kaal y Martínez Cortizas, 2018) atribuyen esa banda a la lignina, mientras que por su parte (Silva y otros, 2018) directamente no asignan esa banda a ninguno de los componentes principales de la biomasa lignocelulósica.

Caracterización de la lignina de las fracciones sólidas explotadas

Los resultados del análisis de la caracterización mediante pirólisis de la lignina de los sólidos de switchgrass obtenidos luego del pretratamiento se pueden observar en la Tabla 11.

Tabla 11. Contenidos de monolignoles respecto al total de la lignina. S= Siringilo; G= Guaiacilo; H= *p*-Hidroxifenilo

Variables de pretratamiento		Porcentaje del total de lignina (%)				
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	S	G	H	Relación S/G	Relación G/H
170	5	14,2	44,8	41,0	0,32	1,09
170	10	10,9	50,5	38,6	0,22	1,31
170	15	11,1	53,7	35,3	0,21	1,52
185	5	15,8	48,2	36,0	0,33	1,34
185	10	17,0	48,1	35,0	0,35	1,38
185	15	24,2	45,2	30,6	0,53	1,48
200	5	17,0	48,7	34,2	0,35	1,42
200	10	17,1	53,2	29,7	0,32	1,79
200	15	21,3	50,9	27,7	0,42	1,84

No se observaron tendencias claras en el análisis de la relación S/G respecto a las variables de pretratamiento, que podría explicarse por el bajo contenido de unidades siringílicas en esta biomasa. En cuanto a la relación G/H se observó un efecto positivo con la temperatura, aumentando esta relación a medida que aumenta la temperatura (Figura 81). Esto indicaría que las unidades *p*-hidroxifenílicas son más susceptibles que las unidades guaiacílicas a la ruptura durante la explosión por vapor, aumentando el contenido relativo de estas últimas en el sólido pretratado.

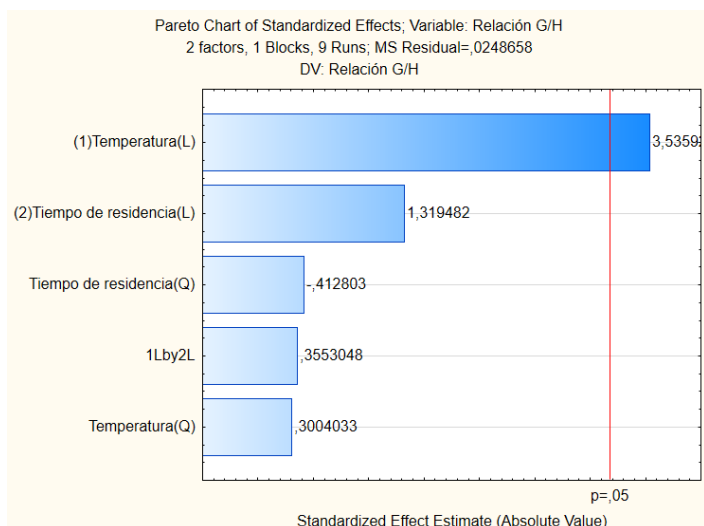


Figura 81. Diagrama de Pareto de los efectos de la temperatura y el tiempo de residencia y sus interacciones en la relación G/H en el sólido obtenido luego de la explosión por vapor de switchgrass.

En la Figura 82 se puede observar el cromatograma con los compuestos obtenidos de la pirólisis de la fracción sólida de switchgrass pretratada a 200 °C y 15 minutos, mientras que en la Tabla 12 se identifican los compuestos derivados de la lignina y su abundancia relativa. Se puede observar que el pico debido al 4-vinilguaiacol (derivado de las unidades guaicílicas) presenta la misma intensidad que el 4-vinilfenol, mientras que en la muestra sin pretratar (Figura 76) este último presentaba mayor intensidad. El siringol sigue estando presente, siendo el más abundante de los compuestos derivados de las unidades siringílicas, al igual que en la muestra sin pretratar.

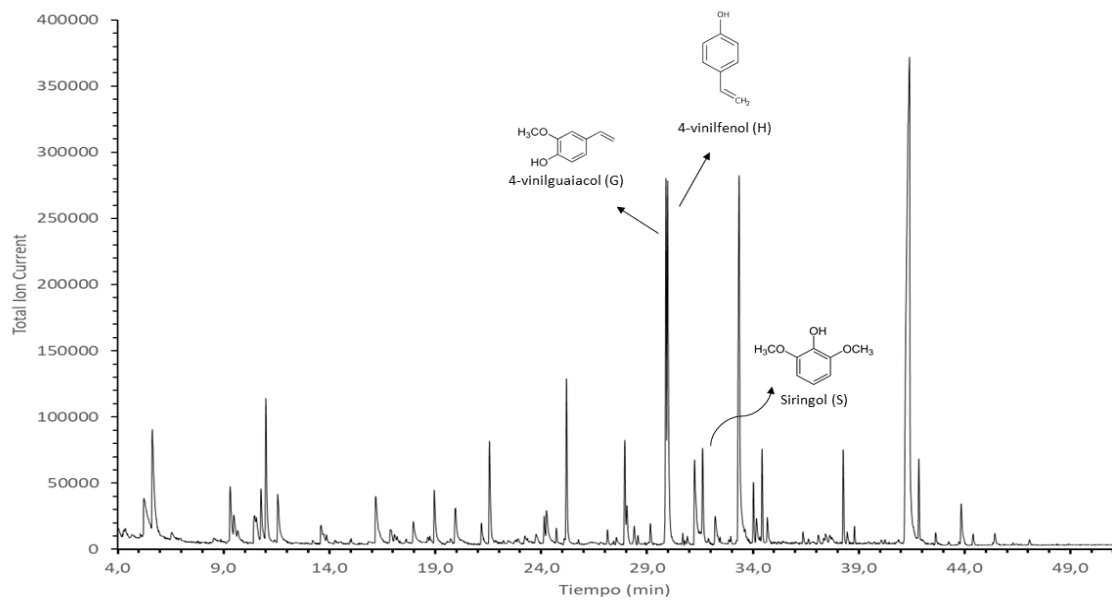


Figura 82. Cromatograma de los productos de pirólisis del switchgrass pretratado a 200 °C y 15 minutos.

Tabla 12. Compuestos derivados de la pirólisis de switchgrass pretratado a 200 °C y 15 minutos y su abundancia relativa (% del total de compuestos derivados de la lignina identificados). Origen H: unidades p-hidroxifenílicas, G: unidades guaiacílicas, S: unidades siringílicas.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Origen	Abundancia relativa (% lignina)
Phenol	21,17	H	1,68
Guaiacol	21,56	G	7,84
4-Methylguaiacol	25,19	G	10,22
4-Vinylguaiacol	29,89	G	19,19
Phenol, 4-vinyl-	29,97	H	26,03
Syringol	31,63	S	6,71
Isoeugenol (<i>cis</i>)	32,22	G	2,60
Isoeugenol (<i>trans</i>)	34,03	G	3,55
4-methylsyringol	34,44	S	4,99
Vanillin	34,68	G	2,13
Syringol, 4-vinyl	38,26	S	5,17
Syringol, 4- allyl-	38,8	S	0,99
Coniferyl alcohol (<i>trans</i>)	41,84	G	4,60
Coniferaldehyde	42,63	G	0,79
Syringyl acetone	43,84	S	3,49

Microscopía electrónica

En la Figura 79 se puede observar en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) el efecto del pretratamiento en las fibras lignocelulósicas de switchgrass. En las imágenes obtenidas a un aumento de 75 veces (a la izquierda) se puede observar el efecto general en la deconstrucción de la biomasa, mientras que con aumento de 370 veces (a la derecha) se puede observar más detalladamente el efecto a nivel de fibras. Bajo las condiciones de pretratamiento más severas, es evidente que ocurrió una mayor deconstrucción de la estructura de la biomasa, siendo este efecto buscado para hacer que las fibras de celulosa sean más accesibles por las enzimas celulolíticas (Figura 79C). De todas formas, en la condición de severidad mayor se pueden observar ciertas estructuras depositadas en las fibras de celulosa, que podrían deberse a lignina recondensada, en concordancia con lo demostrado por (Troncoso-Ortega y otros, 2021).

Por otro lado, se pudo observar que el pretratamiento en las condiciones menos severas promovió pequeños efectos en la estructura de la biomasa, observándose estructuras similares a la biomasa original (Figura 79A y 79B).

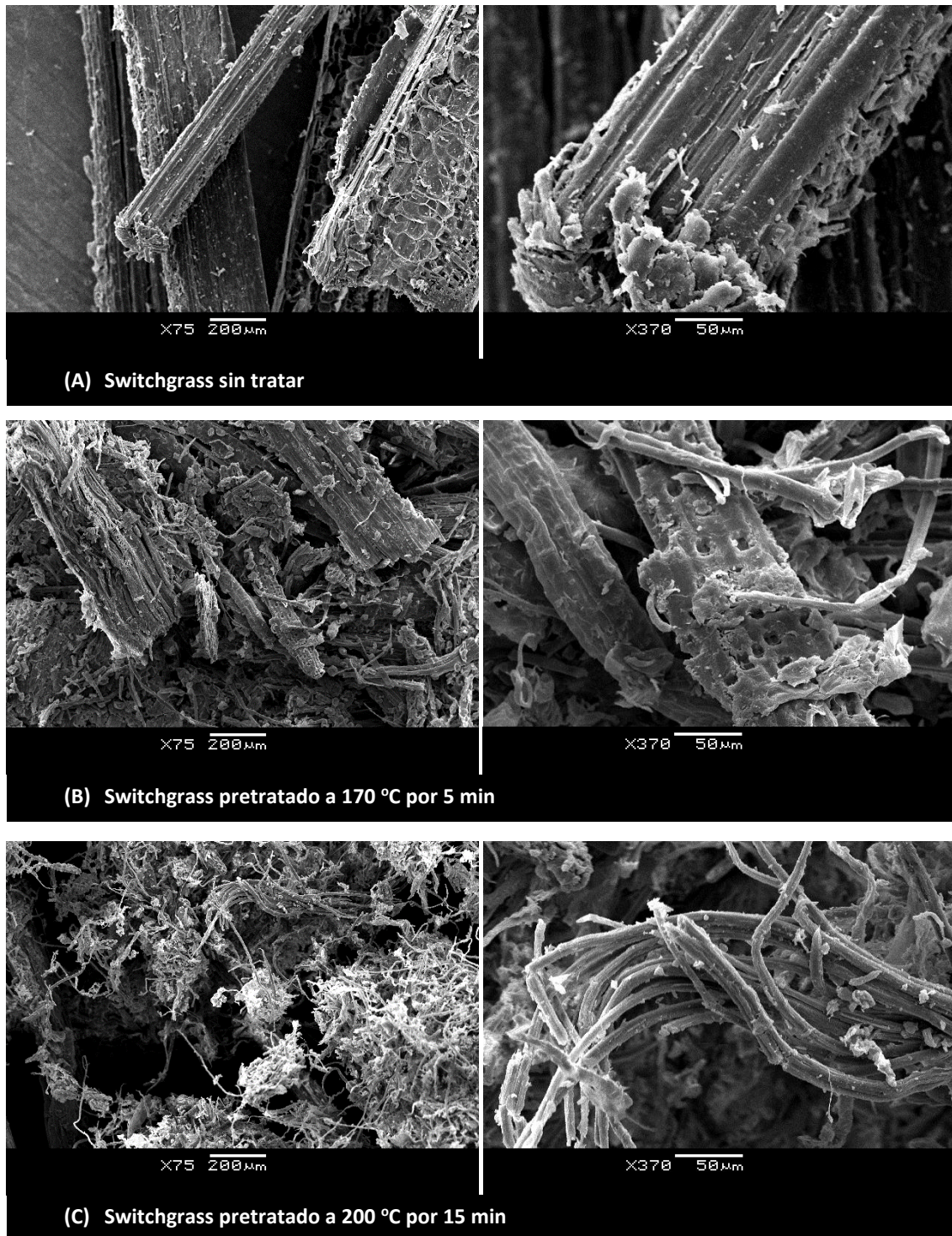


Figura 83. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica (SEM) de las muestras de switchgrass. (A) muestra sin tratar, (B) muestra pretratada en la condición de proceso menos severa, (C) muestra pretratada en la condición de proceso más severa. Imágenes tomadas con aumentos de 75 y 370 veces.

Composición de la Fracción Líquida

La determinación de la composición de la fracción líquida se muestra en la Tabla 13. Como se puede observar, debido a la solubilización de la hemicelulosa durante la explosión por vapor, también se obtuvo mayor concentración de xilosa en la fracción líquida junto con el aumento del factor de severidad, y también se observó una mayor concentración de ácidos orgánicos, principalmente ácido acético, ya que este ácido también está presente en la estructura hemicelulósica. Por otro lado, las bajas concentraciones observadas de glucosa e hidroximetilfurfural (5-HMF) en los licores finales confirman que las condiciones de reacción atacaron más selectivamente a la hemicelulosa que a la celulosa presente en el switchgrass. De todas formas, es interesante señalar que en el punto de explosión de 200 °C y 15 minutos que la concentración de glucosa observada fue casi cuatro veces mayor que en el punto anterior (200 °C y 10 minutos), indicando que tuvo lugar la degradación de la celulosa en la fracción sólida, pasando en forma de monómeros y oligómeros de glucosa a la fracción líquida. Esto también se ve confirmado por la mayor concentración de furfural, hidroximetilfurfural y ácido fórmico. Esta mayor degradación de la fracción celulósica también fue tomada en cuenta al momento de descartar este punto en la sacarificación y fermentación simultáneas, como se discutirá en el Capítulo 4.

Tabla 13. Composición de la fracción líquida obtenida luego del pretratamiento de explosión por vapor de switchgrass en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia

Corrida	Variables de pretratamiento (valores originales y (código))			Composición de la fracción líquida (g/L)					
	Temperatura (°C)	Tiempo de residencia (min)	Factor de severidad	Glucosa	Xilosa	Ácido fórmico	Ácido acético	5- HMF ^a	Furfural
1	170 (-1)	5 (-1)	2.76	0,47 ± 0,18	0,6 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	nd	nd
2	170 (-1)	10 (0)	3.06	0,31 ± 0,11	1,1 ± 0,4	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,3	0,03	0,0
3	185 (0)	5 (-1)	3.20	0,38 ± 0,16	1,8 ± 0,4	2,1 ± 0,3	2,5 ± 0,3	0,04	0,1
4	170 (-1)	15 (+1)	3.24	0,16 ± 0,08	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,2	0,04	0,0
5	185 (0)	10 (0)	3.50	0,27 ± 0,12	3,3 ± 0,5	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,3	0,05	0,2
6	185 (0)	10 (0)	3.50	0,51 ± 0,18	4,8 ± 0,5	3,8 ± 0,3	4,1 ± 0,4	0,07	0,3
7	185 (0)	10 (0)	3.50	0,12 ± 0,05	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,03	0,1
8	200 (+1)	5 (-1)	3.64	0,18 ± 0,08	2,9 ± 0,5	2,1 ± 0,3	1,7 ± 0,2	0,07	0,2
9	185 (0)	15 (+1)	3.68	0,14 ± 0,06	3,4 ± 0,5	2,0 ± 0,3	2,7 ± 0,3	0,05	0,2
10	200 (+1)	10 (0)	3.94	0,69 ± 0,19	15,7 ± 0,5	4,2 ± 0,3	6,1 ± 0,4	0,39 ± 0,03	1,3 ± 0,1
11	200 (+1)	15 (+1)	4.12	2,60 ± 0,30	20,3 ± 0,5	7,7 ± 0,3	10,6 ± 0,4	0,54 ± 0,05	2,3 ± 0,2

^a5-HMF: 5-hidroximetilfurfural; nd: no detectado.

3.3.2 Eucalipto

3.3.2.1 Caracterización

Composición química

La composición del *Eucalyptus globulus* utilizado en este estudio se presenta en la Tabla 14.

Tabla 14. Composición química del eucalipto

Componente	Composición (% en masa seca)	
Celulosa	47,9 ± 1,0	
Hemicelulosa	16,0 ± 0,8	
	<i>Xilano</i>	14,6 ± 0,6
	<i>Galactano</i>	Menor a 0,6
	<i>Arabinano</i>	0,2
	<i>Manano</i>	0,7 ± 0,1
Lignina	26,0 ± 0,8	
Cenizas	0,4 ± 0,1	
Proteína	0,6 ± 0,3	
Extractivos	3,1	
	<i>Extractivos en agua</i>	2,6 ± 0,3
	<i>Extractivos en etanol</i>	0,5 ± 0,2

Presentó alto contenido de celulosa, y bajo en hemicelulosas y lignina, en concordancia con otros estudios con la misma especie y similares (Troncoso-Ortega y otros, 2021; Carrillo y otros, 2018; Sixta, 2006; Cebreiros, Guigou y Cabrera, 2017). Comparando la composición obtenida con la composición de switchgrass se puede observar que el eucalipto presentó mayor porcentaje de celulosa y menor porcentaje de hemicelulosa y lignina. La hemicelulosa estuvo compuesta mayoritariamente por xilano. Se detectó presencia de galactano; aunque en bajo porcentaje, se destaca que el switchgrass no presentó esta hemicelulosa. Mientras en el switchgrass el arabinano se encontraba en cantidad significativa (2,7 %), se observa que en el caso del eucalipto el porcentaje de arabinano fue menos de la décima parte de la encontrada para switchgrass (0,2 %). Por otra parte, el switchgrass presentó mayor porcentaje de extractivos, 7,4 % switchgrass y 3,1 % en el eucalipto. En cuanto al contenido de cenizas, el switchgrass tuvo casi 10 veces más cenizas que el eucalipto. Este bajo contenido de cenizas en el eucalipto coincide con el mínimo reportado para *E. globulus* por Viana y otros (2018). Un menor contenido de cenizas puede tener dos ventajas: por un lado a nivel agrícola, menor cantidad de nutrientes a ser agregados, y por otro si alguna fracción fuera a ser sometida a combustión, se requeriría menor limpieza y mantenimiento de las calderas (Pérez y otros, 2006).

En la Figura 84 se puede observar el espectro infrarrojo obtenido para el eucalipto sin pretratar.

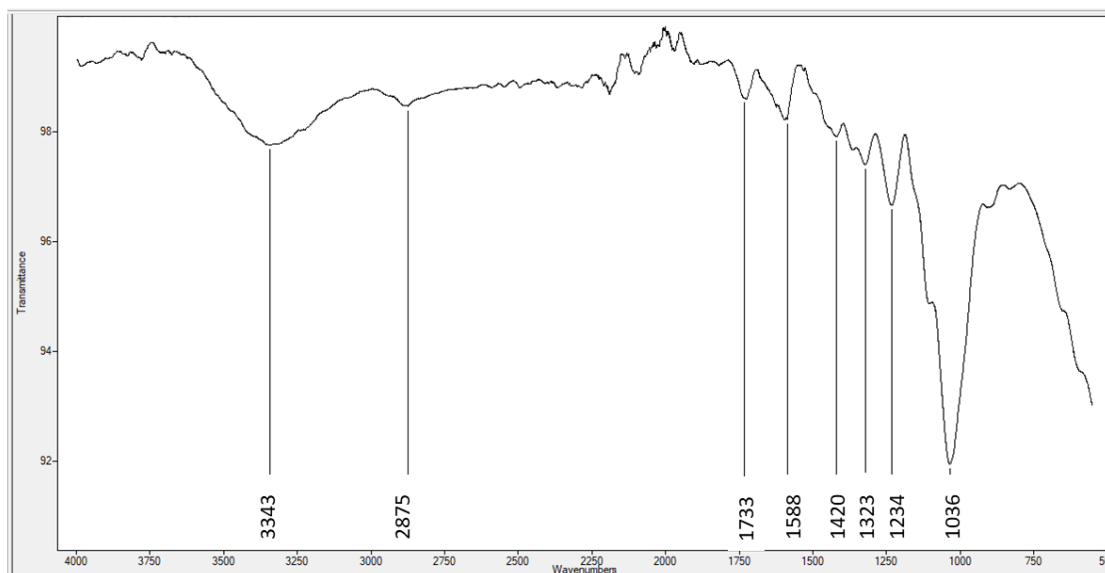


Figura 84. Espectro infrarrojo del eucalipto sin pretratar

De forma similar al switchgrass, en este espectro se observa la banda inespecífica señalada con el pico a 3343 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos OH, mientras que el pico a 2875 cm^{-1} corresponde a los metilenos de la celulosa y las hemicelulosas. Los grupos acetilo de la hemicelulosa se ven reflejados en la banda con el pico a 1733 cm^{-1} , también responsables del pico a 1234 cm^{-1} . Si bien se esperaría que estas bandas fueran bastante más fuertes que en el caso del switchgrass (Figura 75) por la mayor presencia de grupos acetilo en las hemicelulosas, debe tenerse en cuenta que en el switchgrass el porcentaje de hemicelulosas fue mayor que en el caso del eucalipto, por lo que probablemente haya existido un efecto de compensación en estas bandas. Al igual que en el switchgrass, la banda con el pico a 1588 cm^{-1} se atribuye al anillo aromático de la lignina; las intensidades son similares, lo que puede estar explicado por el contenido de lignina similar en las dos biomásas. La banda con el pico a 1429 cm^{-1} probablemente corresponde al solapamiento de señales debidas a la lignina y a la celulosa. Como era de esperar, el pico a 1323 cm^{-1} atribuible a las unidades siringílicas de la lignina, presenta mayor intensidad que en el caso del switchgrass debido al mayor contenido de estas

unidades, como se verá en el análisis mediante pirólisis. La banda a 1036 cm^{-1} es típica de la absorción de los enlaces del anillo de piranosa de la celulosa.

Pirólisis

En la Figura 85 se presenta el cromatograma obtenido de la pirólisis del eucalipto, mientras que en la Tabla 15 se muestran los compuestos identificados derivados de la lignina y la clasificación según su origen. Como se observa, la diferencia más significativa con el switchgrass es que el eucalipto estaba compuesto mayoritariamente por unidades siringílicas (S), con una menor proporción de unidades guaiacílicas (G) y sin presencia de unidades *p*-hidroxifenílicas (H). La relación encontrada de estas unidades fue 79 % S y 21 % G, con una relación S/G 3,8. Esta relación S/G se encuentra en el rango informado por distintos estudios sobre eucaliptos (Nunes y otros, 2010; Ohra-aho y otros, 2013; Ramadevi y otros, 2016; Henriksson, 2009). Los principales compuestos derivados de las unidades siringílicas fueron el 4-vinilsiringol, siringol y el 4-metilsiringol. Es interesante destacar que al igual que en el caso del switchgrass el 4-vinilguaiacol fue el compuesto más abundante de las unidades guaiacílicas (aunque en una abundancia relativa mucho menor).

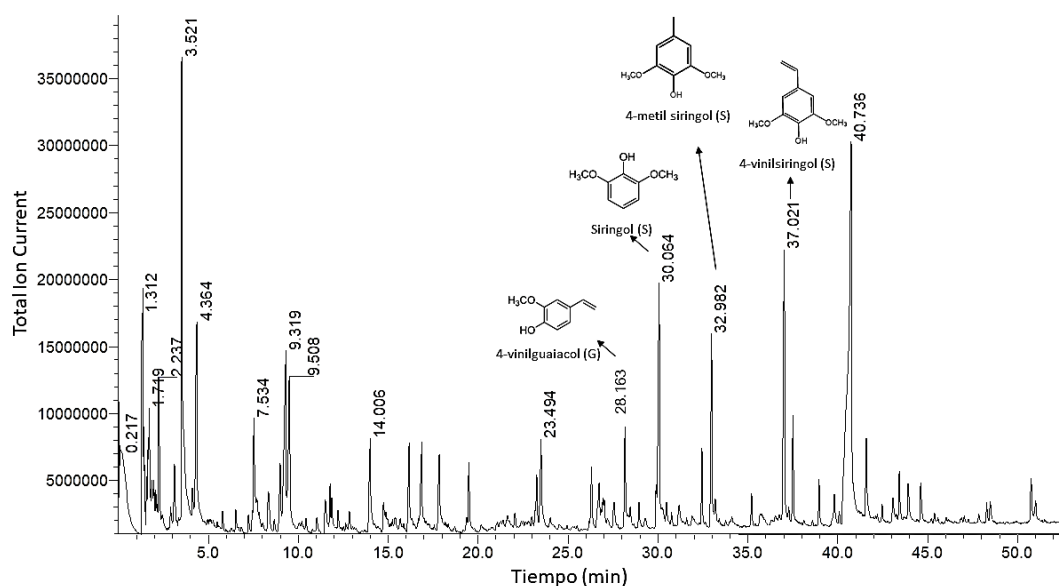


Figura 85. Cromatograma de los productos de pirólisis del eucalipto sin pretratar.

Tabla 15. Compuestos derivados de la pirólisis de eucalipto y su abundancia relativa (% del total de compuestos derivados de la lignina identificados). Origen G: unidades guaiacílicas, S: unidades siringílicas

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Origen	Abundancia relativa (% lignina)
Guaiacol	19,486	G	3,68
Guaiacol, 4-metil	23,255	G	3,23
Guaiacol, 4-vinil	28,163	G	6,70
Siringol	30,064	S	18,36
Isoeugenol (<i>trans</i>)	32,441	G	4,58
Siringol, 4-metil	32,982	S	14,75
Siringol, 4-vinil	37,021	S	22,45
Siringol, 4-propenil (<i>cis</i>)	37,503	S	6,00
Siringol, 4-propenil (<i>trans</i>)	38,953	S	2,74
Siringaldehído	40,736	S	6,14
Acetosiringona	43,422	S	3,09
Coniferil alcohol (<i>trans</i>)	43,906	G	2,64
Siringil acetona	44,604	S	2,71
Sinapil alcohol	50,747	S	2,95

3.3.2.2 Tratamiento de explosión por vapor de eucalipto

Tamaño de partícula

La distribución del largo de partícula luego de la molienda en molino de martillos y previo a ingresar en el equipo de explosión por vapor se muestra en la Figura 86, con el 70 % de los “pins” con largo de 2 a 12 mm. El espesor y ancho del pin fueron de 0,5 a 2 mm. Este tamaño fue adecuado para el trabajo en el equipo de explosión por vapor, manteniendo el tapón dinámico fluido.

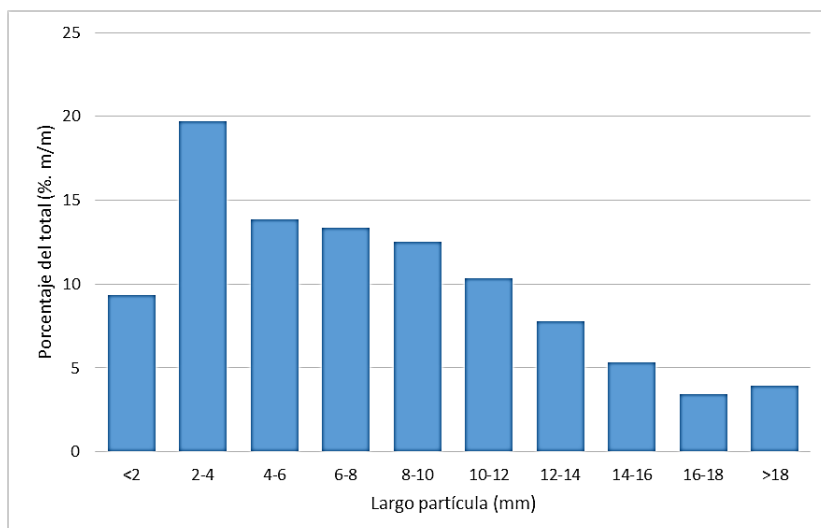


Figura 86. Distribución del largo de partícula de eucalipto.

Composición de la Fracción Sólida del material explotado

La composición de la fracción sólida para los distintos puntos de explosión realizados para la biomasa de eucalipto puede observarse en la Tabla 16 y en la Figura 87. De forma similar a lo ocurrido en el pretratamiento del switchgrass, se puede observar que la fracción hemicelulósica es la primera en verse afectada, por lo que baja su porcentaje, aumentando las cantidades proporcionales de los otros compuestos. Evaluando los diagramas de Pareto (Figura 88) se puede observar que el efecto que más afectó a la hemicelulosa y la lignina fue la temperatura en el rango estudiado, positivamente para la lignina y negativamente para la hemicelulosa. En cambio, la celulosa se vio más afectada por la combinación de la temperatura y el tiempo de residencia, y en menor medida por la temperatura, en el rango y los puntos estudiados. En el caso del tiempo de residencia, afectó positivamente para la lignina y la celulosa, y negativamente para la hemicelulosa. Los puntos donde se observa mayor porcentaje en masa de celulosa (que es lo que se pretende conservar mayoritariamente para la hidrólisis enzimática y fermentación) son 180 °C – 20 minutos y 200 °C – 10 minutos, sin diferencias significativas en el contenido de celulosa entre estos dos puntos. Sin embargo, se puede observar que el punto 180 °C – 20 minutos conservó mayor porcentaje de hemicelulosas, lo que indica una deconstrucción insuficiente de la biomasa, como se discutirá en el siguiente capítulo (CAPÍTULO 4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA (SACARIFICACIÓN) Y FERMENTACIÓN DE LA FRACCIÓN SÓLIDA LIGNOCELULÓSICA). Por otro lado, la disminución del contenido de celulosa para el punto de 200 °C – 20 minutos indica degradación excesiva de la celulosa. De todas formas, es interesante destacar que este punto de explosión contiene aún hemicelulosas

en el residuo sólido, pese a que ya existe degradación de celulosa. Este hecho quizás pueda ser explicado por la presencia de los complejos lignocelulósicos lignina-hemicelulosa, cuya estabilidad es mayor que los propios enlaces glicosídicos β -1,4 (Mosbech y otros, 2019; Yao y otros, 2018).

Tabla 16. Composición del material sólido obtenido luego del pretratamiento con explosión por vapor de eucalipto en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia.

Temperatura (°C)	Tiempo de residencia (min)	Factor de severidad	Composición de la fracción sólida (% masa)		
			Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
180	10	3.4	44,0 ± 4,5	6,5 ± 1,4	30,3 ± 1,7
180	20	3.7	54,5 ± 3,2	5,4 ± 0,3	35,2 ± 3,6
200	10	3.9	50,3 ± 3,0	3,4 ± 0,1	37,1 ± 0,6
200	20	4.3	45,4 ± 3,8	2,6 ± 0,2	43,3 ± 3,6

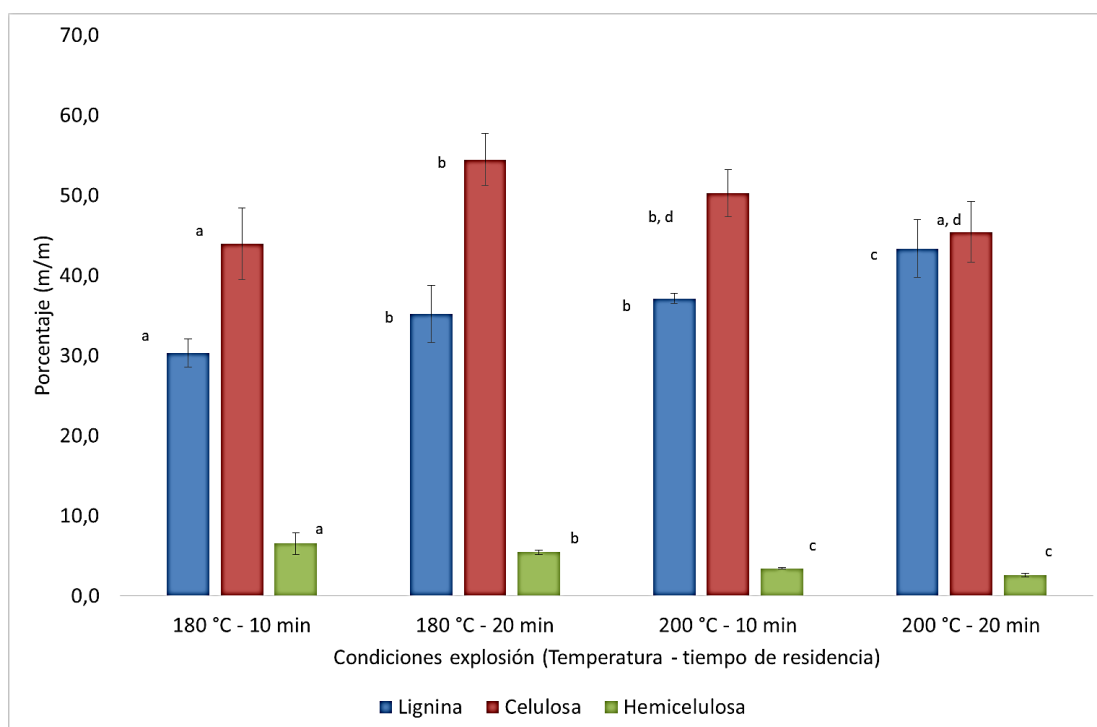


Figura 87. Composición del material sólido obtenido luego del pretratamiento con explosión por vapor de eucalipto en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia. Las letras próximas a las barras muestra diferencias significativas o no entre los distintos puntos (misma letra: no hay diferencias significativas).

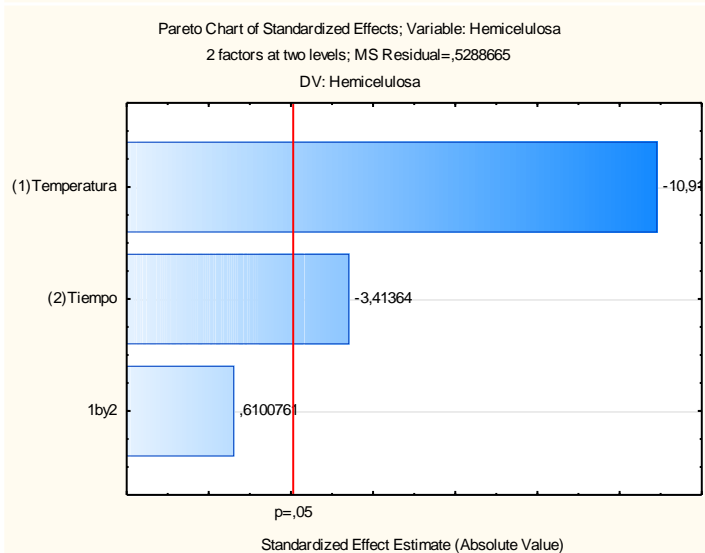
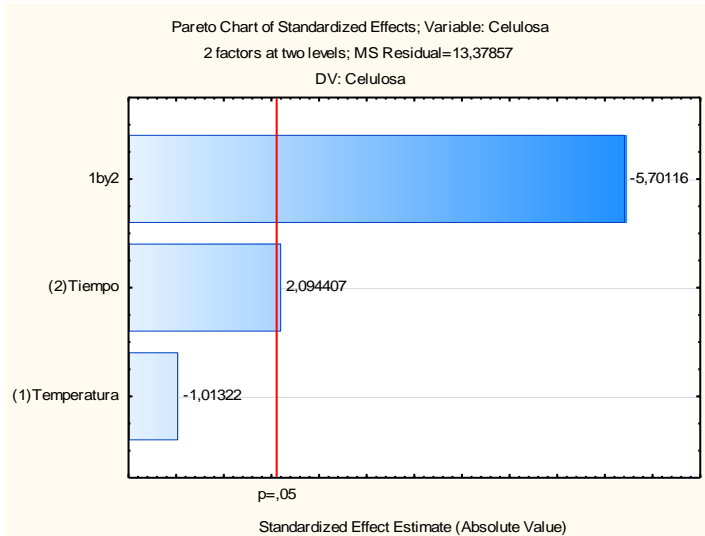
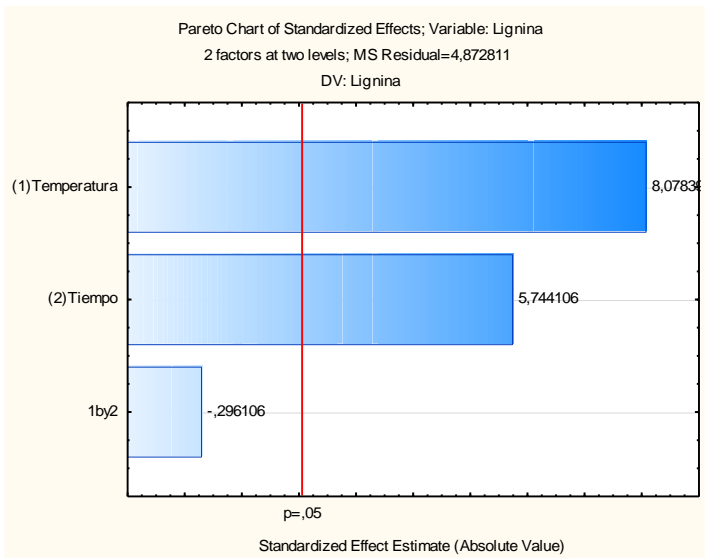


Figura 88. Diagrama de Pareto de los efectos de la temperatura y el tiempo de residencia y sus interacciones en los contenidos de celulosa (A), hemicelulosa (B) y lignina (C) en el sólido obtenido luego de la explosión por vapor de eucalipto.

En la Figura 89 se observan los espectros de las muestras pretratadas de eucalipto.

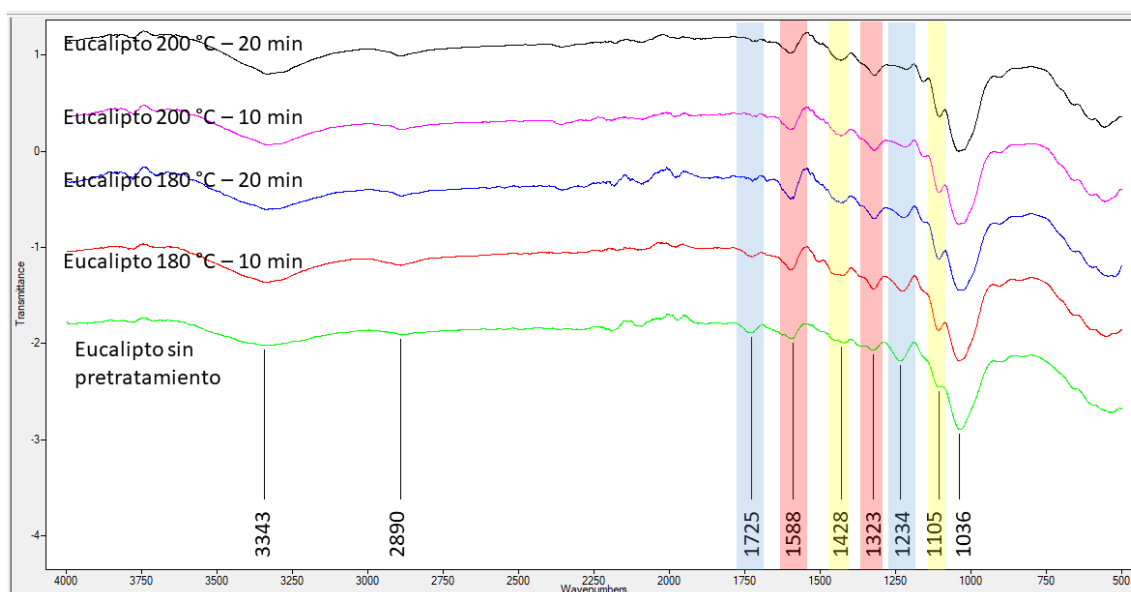


Figura 89. Espectro FT-IR de las distintas muestras de eucalipto, sin pretratar y pretratadas. Cada espectro fue normalizado a 2907 cm^{-1} .

Se destaca la progresiva disminución de la intensidad de las bandas correspondientes a los picos a 1725 y 1234 cm^{-1} (señaladas en azul en la Figura 89). Estas bandas son debidas a los grupos acetilo, por lo que la desaparición de los picos indica que los grupos acetilo se hidrolizaron en las severidades altas de explosión por vapor. La banda del pico a 1588 cm^{-1} (en rojo) se intensifica para las condiciones de mayor severidad de pretratamiento; este pico es debido a las unidades siringílicas de la lignina, por lo que un aumento de su intensidad puede explicarse por el aumento relativo de lignina en las muestras pretratadas, además de un mayor porcentaje de estas unidades en la lignina de eucalipto. Una explicación similar puede aplicarse al aumento de la intensidad de la banda del pico a 1323 cm^{-1} , también derivado de las unidades siringílicas de la lignina (en rojo en la Figura 89). La banda del pico a 1428 cm^{-1} (en amarillo) correspondiente al solapamiento de señales debidas a la celulosa y a la lignina se va intensificando a mayor severidad de explosión, lo que podría ser explicado por un aumento relativo de estos dos componentes en el sólido explotado, en detrimento de las hemicelulosas. También a medida que se hace mayor la severidad de explosión por vapor, se observa la aparición de un pico más marcado a 1105 cm^{-1} (banda señalada en amarillo) que en la muestra sin pretratar se observa como un hombro sobre el pico a 1036 cm^{-1} . Este pico también es atribuido a la

celulosa, que probablemente por el mayor contenido de hemicelulosas en la muestra sin pretratar se observa como una banda de absorción más ancha (Silva y otros, 2018). Permanecen las bandas correspondientes a los O-H (3341 cm^{-1}), a los metilenos (2890 cm^{-1}) y al anillo de piranosa de la celulosa (1036 cm^{-1}).

Caracterización de la lignina de la fracción sólida explotada

Los resultados del análisis de la caracterización mediante pirólisis de la lignina de los sólidos de eucalipto obtenidos luego del pretratamiento se pueden observar en la Tabla 11. En el caso de eucalipto –a diferencia de switchgrass– son mayoritarias las unidades siringílicas y se puede observar cual fue su comportamiento en los distintos puntos de explosión. Mientras que la relación S/G en el eucalipto sin tratar era de 3,8, se observa que en la explosión por vapor a 180 °C y 10 minutos esta relación disminuyó a 2,8 (1,7 para el eucalipto pretratado a 180 °C y 20 minutos). Esto implica que el pretratamiento despolimerizó prioritariamente a las unidades siringílicas. La menor capacidad de formar enlaces C-C de las unidades siringílicas frente a las unidades guaiacílicas podría explicar este comportamiento, en concordancia con otros trabajos (Davison y otros, 2006; Boudet y otros, 1998; Lourenço y otros, 2013). Sin embargo, al aumentar la temperatura de la explosión por vapor se observó un aumento de la relación S/G. Esto podría deberse a que hayan sucedido reacciones de re-condensación de las unidades siringílicas favorecidas por la temperatura (Zhang y otros, 2015; Troncoso-Ortega y otros, 2021). Por otra parte, como se observa en la Figura 90 el tiempo de residencia tiene un efecto negativo sobre esta relación (es decir, la relación disminuye a mayor tiempo), continuando con la ruptura predominante de unidades siringílicas frente a las guaiacílicas.

Tabla 17 Contenidos de monolignoles respecto al total de la lignina. S= Siringilo; G= Guaiacilo; H=p-Hidroxifenilo

Variables de pretratamiento		Porcentaje del total de lignina (%)			
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	S	G	H	Relación S/G
180	10	73,8	26,2	0	2,8
180	20	63,1	36,9	0	1,7
200	10	79,4	20,6	0	3,9
200	20	70,2	29,8	0	2,4

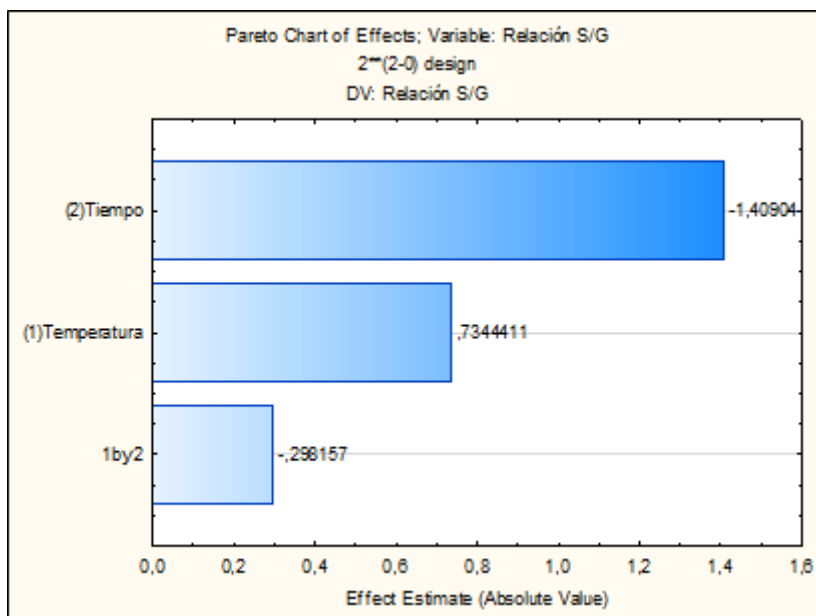


Figura 90. Diagrama de Pareto de los efectos de la temperatura y el tiempo de residencia y sus interacciones en la relación S/G en el sólido obtenido luego de la explosión por vapor de eucalipto.

En la Figura 91 se puede observar el cromatograma de los productos de pirólisis del eucalipto pretratado a 200 °C y 20 minutos, mientras que en la Tabla 18 se identifican los compuestos derivados de la lignina y su abundancia relativa en ese punto de explosión. Comparando con el eucalipto sin pretratar (Figura 85) se puede ver que el vinilsiringol disminuyó su abundancia relativa respecto al eucalipto sin pretratar (22,45 % a 9,57 %) (Tabla 15), mientras que el siringol aumentó su abundancia relativa en la lignina (de 18,36 % a 25,11 %) indicando que dentro de las unidades siringílicas también existió preferencia en la despolimerización durante el pretratamiento por explosión por vapor.

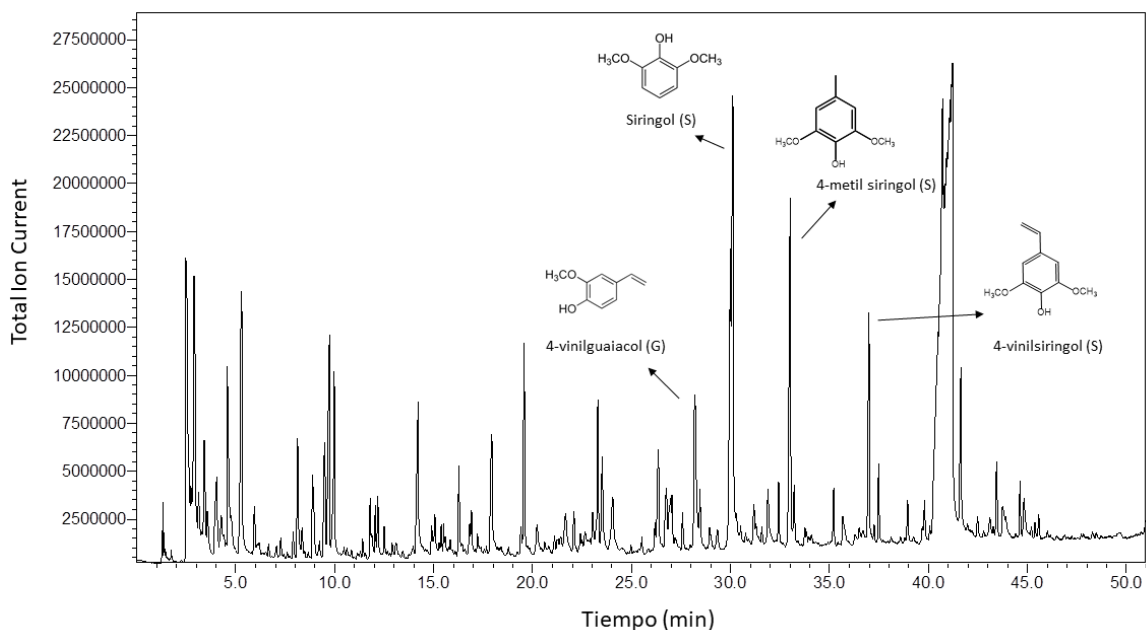


Figura 91. Cromatograma de los productos de pirólisis del eucalipto pretratado a 200 °C y 20 minutos.

Tabla 18. Compuestos derivados de la pirólisis de eucalipto pretratado a 200 °C y 20 minutos y su abundancia relativa (% del total de compuestos derivados de la lignina identificados). Origen H: unidades p-hidroxifenílicas, G: unidades guaiacílicas, S: unidades siringílicas.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Origen	Abundancia relativa (% lignina)
Guaiacol	19.572	G	8,36
Guaiacol, 4-metil	23.293	G	5,35
Guaiacol, 4-vinil	28.182	G	12,07
Siringol	30.114	S	25,11
Eugenol	32.434	G	2,03
Siringil, 4-metil	33.013	S	17,81
Vanillina	33.214	S	2,42
Siringol, 4-etil	35.206	G	1,99
Siringol, 4-vinil	36.984	S	9,57
Siringol, 4-alil	37.486	S	2,69
Siringaldehído	41.629	S	7,22
Acetosiringona	43.435	S	3,08
Propiosiringona	44.619	S	2,30

De forma similar a lo observado para switchgrass, en las imágenes tomadas mediante microscopía electrónica de la biomasa pretratada de eucalipto también se puede observar que en la condición menos severa existe poca deconstrucción de la biomasa, manteniéndose estructuras de la fibra lignocelulósica que impiden un acceso homogéneo a las fibras de celulosa (Figura 92A). En contraste, en una condición intermedia de pretratamiento (Figura 92B), se observa a la mayoría de las fibras de celulosa en forma individual. Por último, en la condición de mayor severidad de pretratamiento (Figura 92C) se observa un deterioro generalizado de las fibras, con fragmentos indistinguibles de celulosa y de lignina.

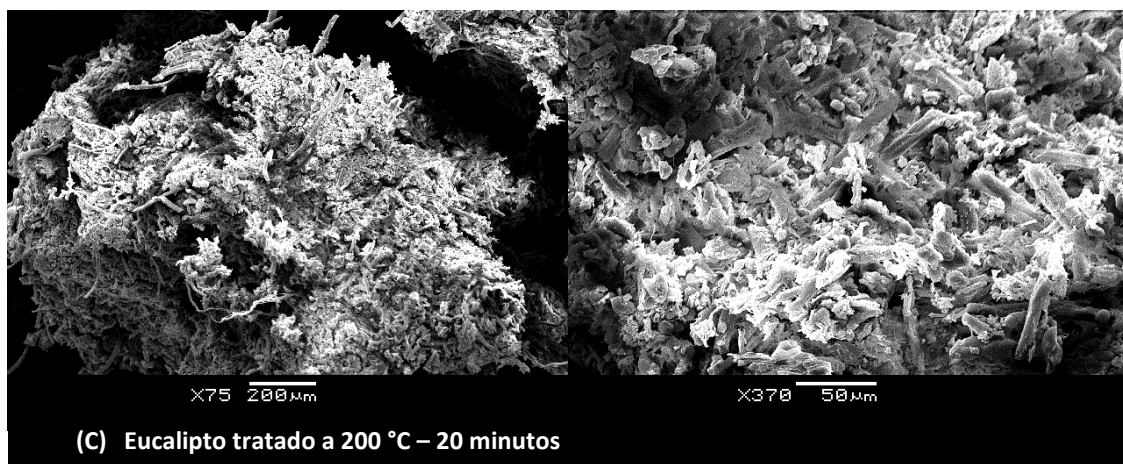
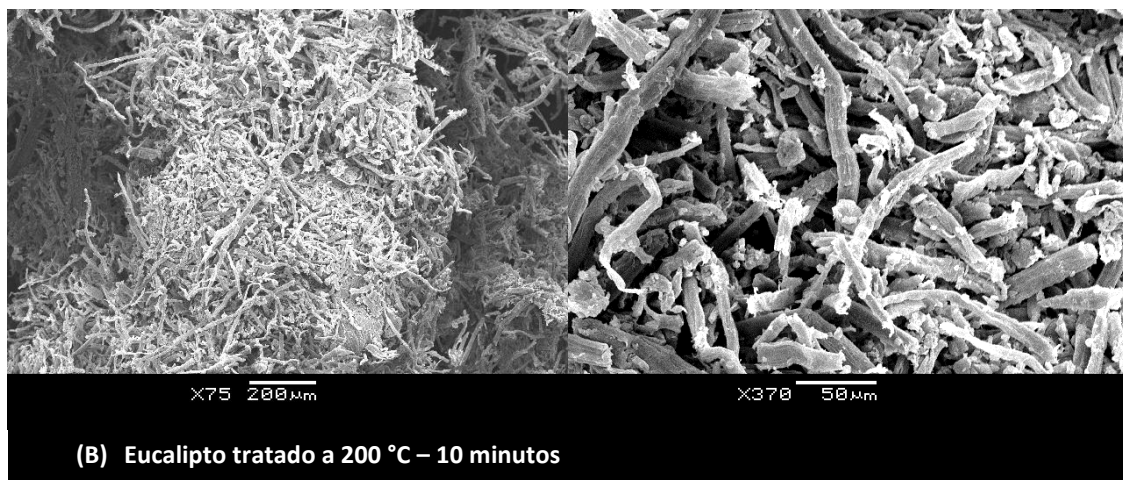
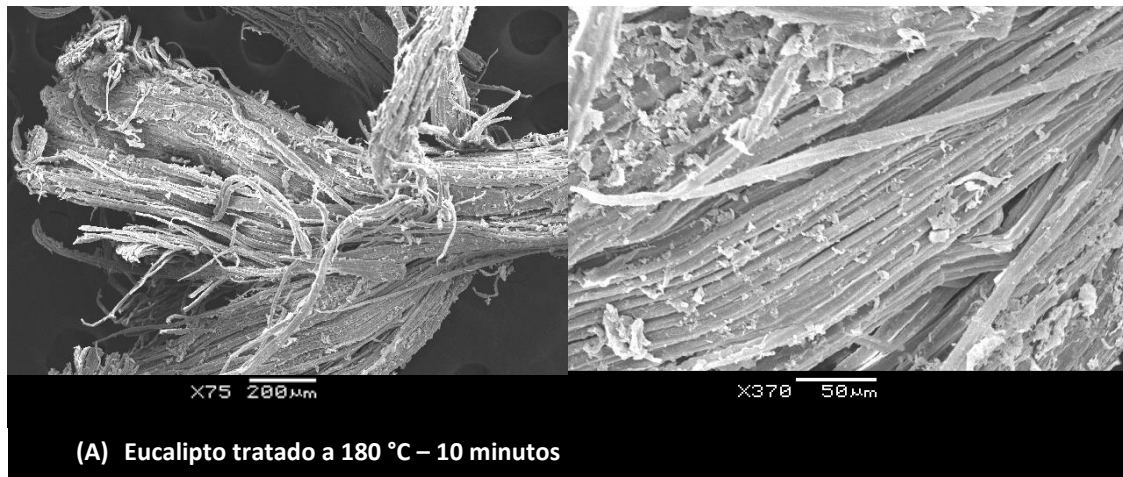


Figura 92. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica (SEM) de las muestras de eucalipto. (A) muestra pretratada en la condición menos severa, a 180 °C durante 10 minutos, (B) muestra pretratada en la condición de proceso menos severa, (C) muestra pretratada en la condición de proceso más severa. Imágenes tomadas con aumentos de 75x y 370x.

Composición de la Fracción Líquida

La composición de la fracción líquida de eucalipto obtenida luego de la explosión por vapor a distintas condiciones se puede ver en la Tabla 19. En la Figura 93 se puede observar comparativamente la concentración de los distintos azúcares según las condiciones de explosión. En primer lugar, la xilosa aumentó su concentración en los puntos de explosión de 180 °C – 20 minutos y 200 °C – 10 minutos, disminuyendo en el punto de explosión de 200 °C – 20 minutos. Este aumento de concentración está en concordancia con lo observado en la fracción sólida, donde el contenido de hemicelulosas disminuyó a medida que aumentó la severidad de explosión. La disminución final de xilosa se explica por la excesiva degradación de la xilosa formando furfural, como se observa en la Figura 94. La degradación de hemicelulosas también está indicada por el aumento progresivo de la concentración de ácido acético, que se encuentra esterificando al xilano. La aparición de glucosa y celobiosa en los puntos de 200 °C – 10 minutos y 200 °C – 20 minutos es también un indicador de que tuvo lugar la hidrólisis parcial de la fracción celulósica del sólido, como también se observó en los valores de composición previamente discutidos.

Tabla 19. Composición de la fracción líquida obtenida luego del pretratamiento de explosión por vapor de switchgrass en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia

Temp. (°C)	Tiempo de residencia (min)	Factor de severidad	Composición de la fracción líquida (g/L)						
			Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Ácido fórmico	Ácido acético	5-HMF ^a	Furfural
180	10	3.4	nd	nd	8,3 ± 0,4	1,0 ± 0,5	2,33 ± 0,04	0,1	0,1
180	20	3.7	nd	nd	16,8 ± 1,1	0,8 ± 0,1	4,74 ± 0,23	0,3	0,4
200	10	3.9	1,70 ± 0,17	1,5 ± 0,3	17,2 ± 1,0	1,0 ± 0,1	7,16 ± 0,49	0,7	0,9 ± 0,2
200	20	4.3	1,02 ± 0,17	4,2 ± 1,6	9,7 ± 0,5	1,5 ± 0,6	9,94 ± 3,98	1,5 ± 0,5	1,5 ± 0,9

nd: no detectado

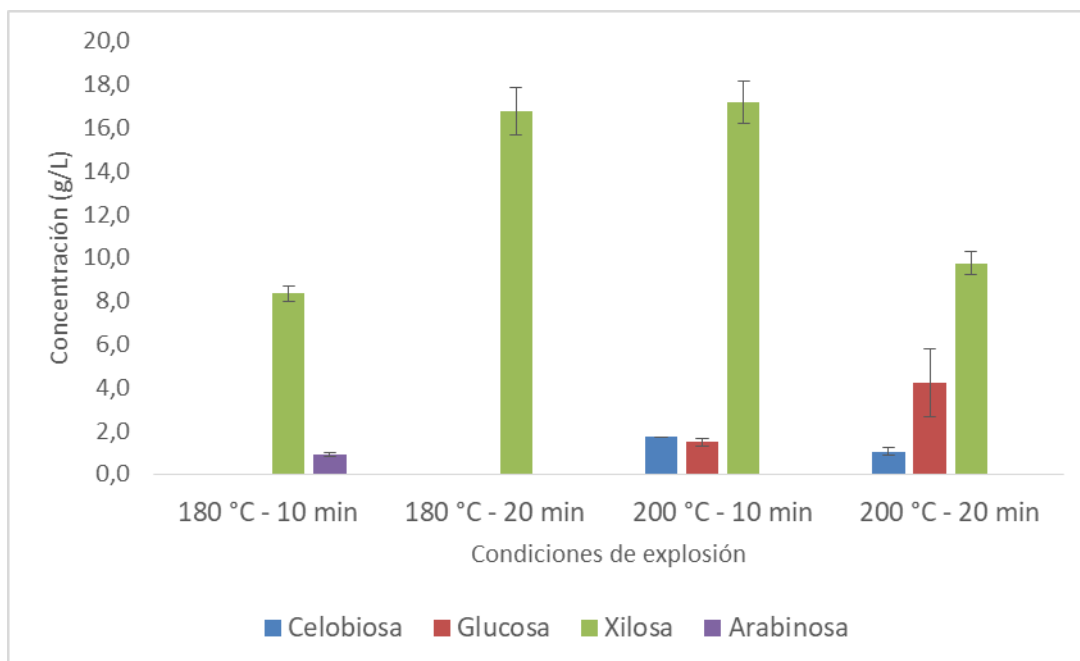


Figura 93. Concentración de carbohidratos en la fracción líquida resultante de la explosión por vapor de eucalipto, según las condiciones de explosión.

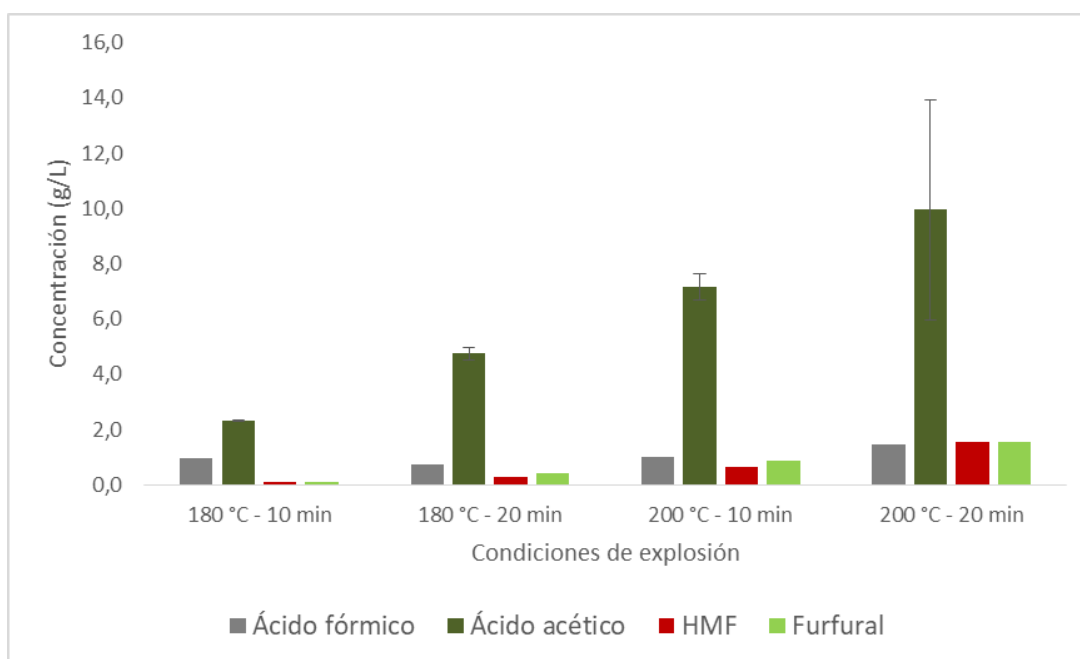


Figura 94. Concentración de ácidos orgánicos y productos de degradación en la fracción líquida resultante de la explosión por vapor de eucalipto, según las condiciones de explosión.

Aguas de lavado

La concentración de azúcares en las aguas de obtenidas luego de realizar el lavado sobre la fracción sólida se muestra en la Tabla 20. Como era de esperar, los compuestos derivados de las hemicelulosas (que pasaron a la fracción líquida) son los que se encuentran en mayor concentración, y dependiendo también de la severidad de la

explosión por vapor. En la explosión a 200 °C y 10 minutos se puede observar 2,46 g/L de xilosa en el primer lavado, 0,67 g/L en el segundo lavado y 0,32 g/l en el tercero. Considerando como fue llevado a cabo el lavado (5 a 1 relación agua a sólido, en masa) se puede estimar que en las aguas de lavado se “pierden” 17,25 g de xilosa por kg de sólido explotado (17,25 kg xilosa por tonelada).

Tabla 20. Concentración de azúcares en las aguas de lavado (g/L). T= Temperatura, t= tiempo de residencia, Lav.= Lavado.

T (°C)	t (min)	Celobiosa			Glucosa			Xilosa			Arabinosa		
		Lav. 1	Lav. 2	Lav. 3	Lav. 1	Lav. 2	Lav. 3	Lav. 1	Lav. 2	Lav. 3	Lav. 1	Lav. 2	Lav. 3
180	10	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	1,73	0,38	0,10	0,18	0,04	0,01
180	20	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	1,88	0,40	0,09	0,00	0,00	0,00
200	10	0,31	0,09	0,05	0,22	0,06	0,00	2,46	0,67	0,32	0,00	0,00	0,00
200	20	0,16	0,05	0,02	0,46	0,13	0,00	1,50	0,43	0,13	0,00	0,00	0,00

Por otra parte, en la Tabla 21 se observan las concentraciones de ácido fórmico, ácido acético, hidroximetilfurfural y furfural en las aguas de lavado. Como se puede observar, en cada lavado la concentración de los distintos compuestos fue disminuyendo, alcanzando valores mínimos en el último lavado. En el caso del ácido acético, se puede estimar que en el sólido quedaría una cantidad mínima de ácido y que seguir repitiendo lavados no sería eficiente ya que la remoción sería proporcionalmente cada vez menor.

Tabla 21. Concentración de ácidos y productos de degradación en las aguas de lavado (g/L). T= Temperatura, t= tiempo de residencia, Lav.= Lavado

T (°C)	t (min)	Ácido acético			Ácido fórmico			5-HMF			Furfural		
		Lav. 1	Lav. 2	Lav. 3	Lav. 1	Lav. 2	Lav. 3	Lav. 1	Lav. 2	Lav. 3	Lav. 1	Lav. 2	Lav. 3
180	10	0,56	0,18	0,11	0,07	0,00	0,00	0,09	0,02	0,00	0,06	0,03	0,02
180	20	0,80	0,22	0,11	0,08	0,00	0,00	0,06	0,01	0,00	0,13	0,05	0,02
200	10	1,11	0,38	0,21	0,13	0,02	0,00	0,14	0,05	0,02	0,23	0,11	0,06
200	20	1,59	0,51	0,19	0,19	0,03	0,00	0,32	0,12	0,04	0,38	0,19	0,08

Estas concentraciones observadas permiten por un lado apreciar el efecto del lavado de la fracción sólida y por otro indican que las aguas de lavado deberían recuperarse y ser aprovechadas.

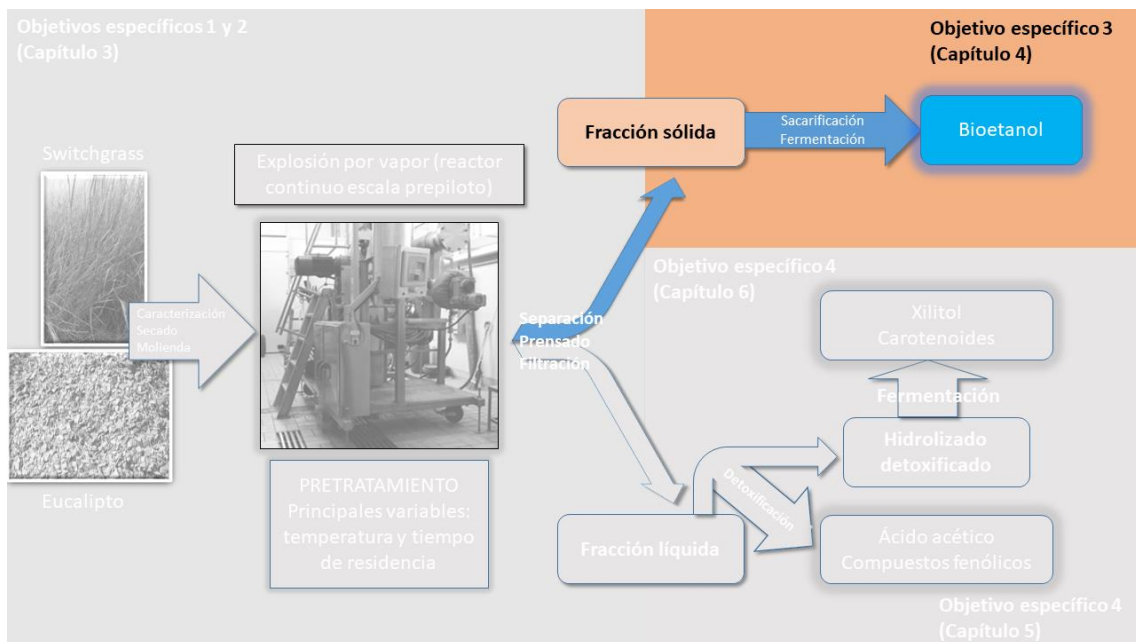
3.4 Conclusiones

El switchgrass tuvo menor contenido de celulosa (31,8 %) que el eucalipto (47,9 %). En cuanto a las hemicelulosas, el switchgrass tuvo mayor contenido que el eucalipto (25,0 % switchgrass y 16,0 % eucalipto), e igualmente mayor contenido de lignina (31,2 % switchgrass y 26,0 % eucalipto). El análisis mediante pirólisis permitió establecer la abundancia relativa de las distintas unidades de la lignina, siendo para switchgrass mayoritariamente unidades guaiacílicas, con unidades *p*-hidroxifenílicas y siringílicas en cantidades similares, mientras que para eucalipto fueron mayormente unidades siringílicas con unidades guaiacílicas en menor cantidad. Este estudio también permitió establecer como afectó la explosión por vapor a las distintas unidades que componían la biomasa. El análisis mediante FTIR permitió corroborar el efecto de la explosión por vapor sobre la celulosa, hemicelulosa y lignina, aunque la complejidad de la matriz puede eclipsar alguna información extraíble directamente del espectro. El análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear podría aportar información relevante sobre los distintos enlaces en la matriz lignocelulósica.

El pretratamiento de las dos biomásas en el equipo de explosión continuo a escala pre-piloto permitió obtener distintas fracciones sólidas con contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina relacionados con la severidad del pretratamiento, siendo la temperatura el parámetro que más influyó en los rangos estudiados. Para las dos biomásas se observó una mayor deconstrucción de la biomasa con menor degradación de celulosa a 200 °C y 10 minutos de tiempo de residencia.

Por otra parte, la eliminación total de las hemicelulosas no solo no fue necesaria, sino que fue perjudicial para el proceso, ya que severidades mayores degradaron la celulosa necesaria para la fermentación (reduciendo el rendimiento a partir de la biomasa original) y además generando compuestos tóxicos o inhibitorios que se solubilizaron en la fracción líquida.

CAPÍTULO 4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA (SACARIFICACIÓN) Y FERMENTACIÓN DE LA FRACCIÓN SÓLIDA LIGNOCELULÓSICA



4.1 Introducción

El pretratamiento aplicado a la biomasa afecta la accesibilidad de las enzimas durante la hidrólisis enzimática, por lo que en este capítulo se estudió la hidrólisis enzimática necesaria para luego realizar la fermentación para producir bioetanol. También se investigó la sacarificación y fermentación simultáneas y como afectaron las variables de carga enzimática y carga de sólidos, en particular sobre uno de los puntos de explosión para las dos biomásas.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Hidrólisis enzimática (sacarificación)

La sacarificación enzimática fue realizada para todos los sólidos obtenidos luego del pretratamiento de explosión por vapor. En el caso de switchgrass, los ensayos también fueron realizados usando la muestra sin pretratar. Además, como control positivo se realizó la hidrólisis enzimática sobre una muestra comercial de pulpa de celulosa Kraft de UPM. Para las reacciones, la biomasa (2 % m/v) fue mezclada con 100 mL de buffer de citrato de sodio (pH 4.8) en matraces Erlenmeyer. Luego, se agregaron las enzimas (Cellulase Enzyme Blend, Sigma Aldrich código SAE0020) en cantidad de 50 FPU/g de biomasa. Los experimentos fueron mantenidos en una incubadora a 50 °C y 200 rpm por 96 horas. Al final de la sacarificación, las muestras fueron centrifugadas (15000 rpm, 10 min) y se determinó el contenido de azúcares según NREL (Resch, Baker y Decker, 2015). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

El rendimiento de sacarificación se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de Hidrólisis (\%)} = \frac{([Glucosa]_f - [Glucosa]_i) \times V}{m_b \times f_{celulosa} \times 1.111} \times 100$$

Donde $[Glucosa]_f$ es la concentración de glucosa al final de la hidrólisis (g/L); $[Glucosa]_i$ es la concentración de glucosa inicial debido a la solución en la que se encontraban las enzimas, contenía glucosa (g/L); V es el volumen de sacarificación (L); m_b es la biomasa seca sometida a hidrólisis (g); $f_{celulosa}$ es la fracción de celulosa en la biomasa seca (g/g); y 1.111 es el factor de conversión de celulosa a equivalentes de glucosa.

4.2.2 Fermentación

El hidrolizado enzimático obtenido en 4.2.1 se centrifugó a 15000 g y 5 °C durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante (aproximadamente 50 mL) y se colocó en matraces de 125 mL. A cada uno se le agregó extracto de levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para obtener concentraciones en los matraces de 1,5 g/L, 5 g/L y 0,5 g/L, respectivamente. Se esterilizó a 121°C durante 15 min. Se inoculó con 1 mL de *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc Dry (Lallemand) con 1×10^7 células/mL. La fermentación se llevó a cabo a 36°C y 110 rpm durante 48 h en incubadora INNOVA 44 R (New Brunswick). Se determinó glucosa y etanol según NREL 42623.

El rendimiento de etanol se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento fermentación (\%)} = \frac{[\text{EtOH}]_f}{0,51 \times [\text{Glucosa}]_i}$$

Donde $[\text{EtOH}]_f$ es la concentración final de etanol obtenido en la fermentación (g/L); $[\text{Glucosa}]_i$ es la concentración de glucosa al inicio de la fermentación y 0,51 es el factor de conversión de glucosa a etanol basado en la estequiometría bioquímica de la levadura.

El rendimiento global de la sacarificación y fermentación separadas (SHF) fue calculado según:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento global SHF (\%)} \\ = \frac{\text{Rendimiento Hidrólisis (\%)} \times \text{Rendimiento fermentación (\%)}}{100} \end{aligned}$$

4.2.3 Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF)

Se realizaron pruebas de sacarificación y fermentación simultáneas para las dos biomásas pretratadas con explosión por vapor a 200 °C y 10 minutos de tiempo de residencia. Se probaron dos condiciones de carga de sólidos (2 % y 10 %) y dos cargas enzimáticas (25 FPU/g biomasa y 50 FPU/g biomasa) en un diseño factorial de 2^2 .

En viales de 10 mL a la biomasa pretratada de switchgrass o eucalipto correspondiente a cada experimento se le agregaron 7 mL de buffer citrato pH 4.8 conteniendo 1.5 g/L de extracto de levadura, 1.5 g/L extracto de malta, 5.0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y 0.5 g/L de $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$, 2 mL de la solución correspondiente de celulasa (Cellulase Enzyme Blend Sigma Aldrich SAE0020), y 1 mL de inóculo de *S. cerevisiae* con una

concentración tal para que la concentración inicial en el vial de sacarificación y fermentación fuera 1×10^8 levaduras/mL. Los viales fueron tapados con tapones y precintos. La SSF fue realizada a 38 °C y 150 rpm en una incubadora INNOVA 44 R (New Brunswick). Se tomaron muestras (retirándose el vial) a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. A las 8 horas se introdujo una aguja de jeringa para retirar el dióxido de carbono liberado por la fermentación (Figura 95). En cada punto se determinó la concentración de etanol, glucosa, xilosa y ácido acético.



Figura 95. Viales en incubadora para la sacarificación y fermentación simultáneas (izquierda: condiciones iniciales; derecha: con agujas colocadas a las 8 horas)

El rendimiento de fermentación respecto a la celulosa presente en la biomasa pretratada se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento SSF (\%)} = \frac{[EtOH]_t}{0,51 \times \frac{m_s}{V} \times f_{celulosa} \times 1.111} \times 100$$

Donde $[EtOH]_t$ es la concentración de etanol al tiempo t menos el etanol producido a partir de la solución de las enzimas (g/L); m_s es la masa seca puesta a fermentar (g); V es el volumen de fermentación (L); $f_{celulosa}$ es la fracción de celulosa en la biomasa seca (g/g); 0.51 es el factor de conversión de glucosa a etanol basado en la estequiometría bioquímica de la levadura; 1.111 es el factor de conversión de celulosa a equivalentes de glucosa.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Switchgrass

4.3.1.1 Hidrólisis enzimática (sacarificación)

En este estudio, la fracción sólida obtenida para todas las condiciones de pretratamiento se sometió a hidrólisis enzimática con el fin de liberar glucosa para su uso posterior en el proceso de fermentación. La Tabla 22 muestra el rendimiento de sacarificación obtenido para cada muestra.

Tabla 22. Rendimiento de sacarificación obtenido de las distintas muestras pretratadas de switchgrass, junto con una muestra sin pretratar y una muestra de celulosa comercial como control positivo.

Corrida	Variables de pretratamiento (valores originales y (codificados))		Factor de Severidad	Rendimiento Hidrólisis (%)
	Temperatura (°C)	Tiempo de residencia (min)		
1	170 (-1)	5 (-1)	2,76	19,8 ± 0,8
2	170 (-1)	10 (0)	3,06	26,3 ± 1,1
3	185 (0)	5 (-1)	3,20	50,6 ± 2,0
4	170 (-1)	15 (+1)	3,24	21,6 ± 0,9
5	185 (0)	10 (0)	3,50	73,0 ± 2,9
6	185 (0)	10 (0)	3,50	53,1 ± 2,1
7	185 (0)	10 (0)	3,50	64,9 ± 2,6
8	200 (+1)	5 (-1)	3,64	71,3 ± 2,9
9	185 (0)	15 (+1)	3,68	64,0 ± 2,6
10	200 (+1)	10 (0)	3,94	88,3 ± 3,5
11	200 (+1)	15 (+1)	4,12	72,5 ± 2,9
	Switchgrass sin pretratar			0,0
	Pulpa de celulosa comercial			84,8 ± 1,4

Este rendimiento varió fuertemente según la muestra utilizada (de 19,8 a 88,3 %), confirmando que las condiciones utilizadas para el pretratamiento tuvieron gran influencia en la etapa posterior de hidrólisis enzimática de celulosa para la obtención de glucosa. En general, los resultados de los rendimientos de hidrólisis fueron mejores cuando se utilizaron sólidos pretratados con los valores más altos de severidad.

El análisis estadístico de estos datos reveló que la temperatura utilizada durante el pretratamiento tuvo el efecto más significativo en esta respuesta (Figura 96), confirmando que los sólidos obtenidos por explosión de vapor en las condiciones de temperatura más alta contenían más celulosa en la composición y a su vez tales fibras estaban más disponibles para la acción de las enzimas hidrolíticas (Capítulo 3, 3.3.1.2).

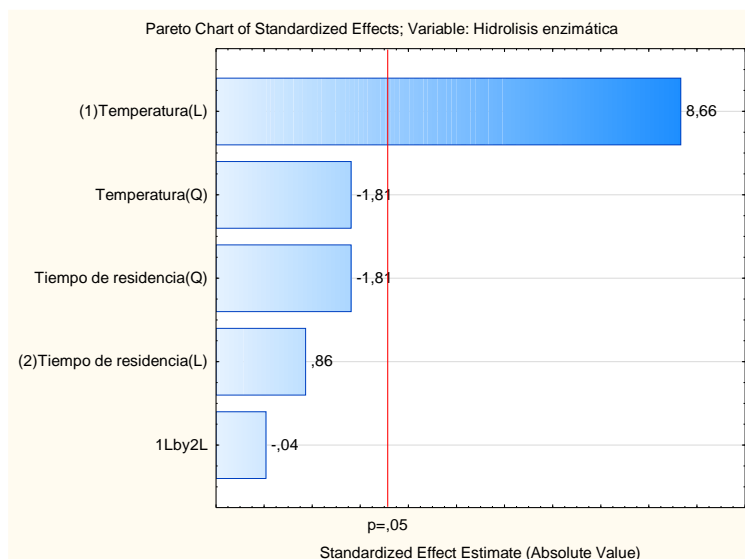


Figura 96. Diagrama de Pareto de los efectos de la temperatura y el tiempo de residencia y sus interacciones en el rendimiento de sacarificación obtenido usando las fracciones sólidas de switchgrass pretratado.

Aunque el objetivo de este estudio no fue la optimización de las condiciones utilizadas para la hidrólisis enzimática, es interesante destacar algunos aspectos. Como se observa en la Tabla 22, también se realizó el ensayo de sacarificación sobre una muestra de celulosa comercial y sobre la muestra de switchgrass sin pretratar. En el primer caso se obtuvo un rendimiento de hidrólisis 84,7 %, mientras que en el caso de la muestra sin pretratar directamente no hubo acción de las enzimas, por lo que el rendimiento fue 0 %. Los rendimientos de estas muestras permiten dimensionar la magnitud de los valores obtenidos y del efecto del pretratamiento de explosión por vapor sobre los rendimientos de hidrólisis enzimática. Como puede observarse en la Tabla 22, en el caso de la muestra pretratada a 200 °C durante 10 minutos tiempo de residencia (factor de severidad 3,94) fue posible obtener un rendimiento de sacarificación similar al que se logra cuando se usa una muestra pura de celulosa. Estos resultados son de gran relevancia y demuestran que fue posible obtener un sólido pretratado con buenas características (alta digestibilidad) para su uso en el proceso de sacarificación. Además, al tener en cuenta la composición del sólido obtenido en estas condiciones de pretratamiento, es decir 49,1 % de celulosa, 5,1 % de hemicelulosa y 45,3 % de lignina (Tabla 10, Capítulo 3) es posible concluir que no es necesario remover toda la hemicelulosa y lignina de la estructura de la biomasa para lograr resultados eficientes de sacarificación. Como se puede observar, este sólido contiene baja cantidad de hemicelulosa y alta cantidad de lignina en la composición (45 % m/m), revelando que la presencia de lignina no es perjudicial para el rendimiento de

sacarificación, sino que los complejos lignocelulósicos (*LCC* por sus siglas en inglés), junto con la naturaleza de la hemicelulosa y lignina residual son factores más importantes que afectan la sacarificación (Mussatto y otros, 2008; Rollin y otros, 2011; Jiang y otros, 2018).

En el gráfico de líneas de contorno de la Figura 97 se puede ver confirmada la obtención de los mayores rendimientos de sacarificación para la temperatura más alta (200 °C). En particular, con el tiempo de residencia de 10 minutos se obtuvieron los rendimientos mayores. Realizando el análisis de varianza de los datos experimentales y eliminando las variables con la menor significancia en las respuestas, se puede obtener la siguiente ecuación de modelo que permite predecir el rendimiento de sacarificación o hidrólisis:

$$\text{Rendimiento de Hidrólisis (\%)} = -1993 + 20,36T - 0,05T^2 - 0,02t^2 \quad (R^2 = 0.90)$$

Para esta ecuación, T es la temperatura y t es el tiempo de residencia en el rango de valores estudiados.

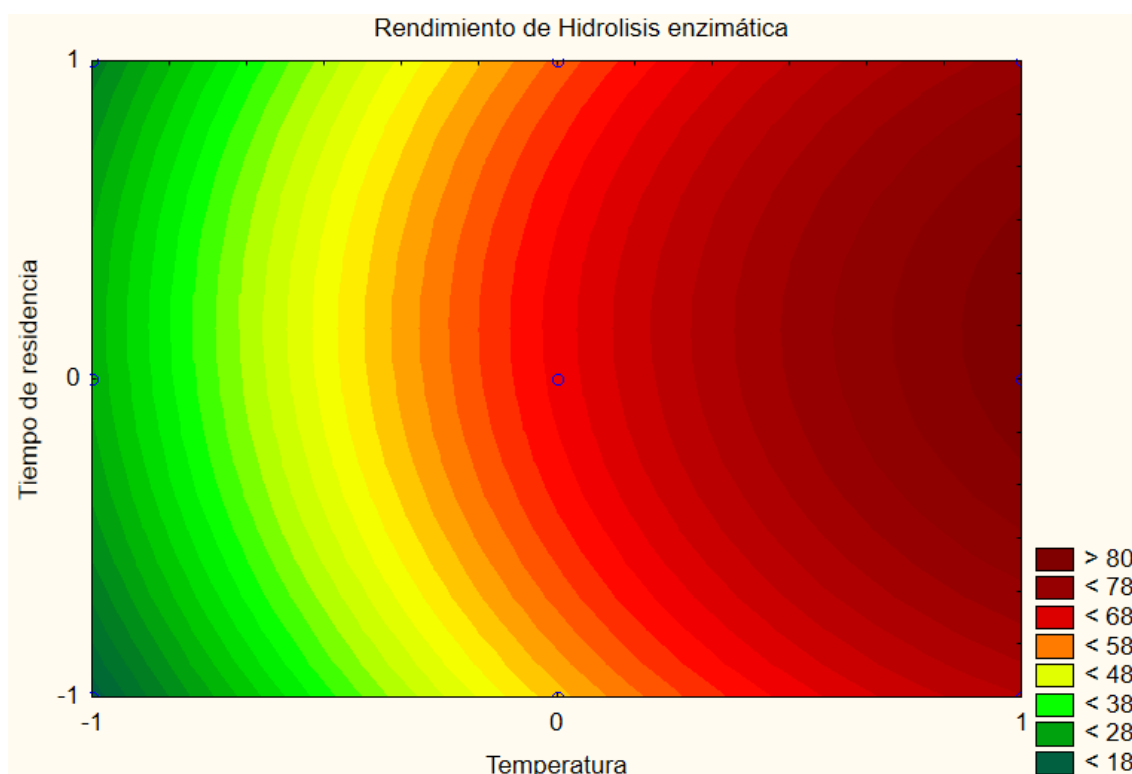


Figura 97. Gráfico de líneas de contorno representando el rendimiento de sacarificación del switchgrass pretratado con explosión por vapor a las diferentes condiciones de temperatura y tiempo de residencia (valores codificados)

Estos resultados implican un aspecto muy importante desde un punto de vista económico, ya que evita el uso de condiciones de pretratamiento más severas (temperatura más alta y/o adición de productos químicos, o incluso un paso de pretratamiento adicional) para eliminar la fracción de lignina de la biomasa.

4.3.1.2 Fermentación

Se procedió a la fermentación de puntos seleccionados de la sacarificación enzimática previamente realizada (con sólidos al 2 % m/m), descartándose los puntos de explosión a 170 °C, ya que presentaban valores muy bajos de sacarificación. Como se puede observar en la Tabla 23 y en la Figura 98 no existió diferencia significativa entre los rendimientos de fermentación de la glucosa liberada por la hidrólisis enzimática de las biomásas pretratadas a distintas condiciones de temperatura y tiempo de residencia. Sin embargo, debe notarse que en el punto de sacarificación de 200 °C y 15 minutos de tiempo de residencia existió una disminución apreciable en el rendimiento de fermentación. Este aspecto podría explicarse por la liberación durante la hidrólisis enzimática de compuestos fenólicos derivados de lignina, probablemente por la ruptura de los complejos lignocelulósicos. Estos compuestos fenólicos pueden haber afectado la levadura distorsionando la membrana celular.

Tabla 23. Fermentación del hidrolizado enzimático de switchgrass pretratado por explosión por vapor a distintas condiciones.

Temperatura (°C)	Tiempo de residencia (minutos)	Concentración final etanol (g/L)	Rendimiento fermentación (%)	Rendimiento global (%)
185	5	1,3 ± 0,1	74,8 ± 3,7	37,8
185	10	2,5 ± 0,3	76,0 ± 3,8	48,4
185	15	3,4 ± 0,3	73,9 ± 3,6	47,3
200	5	3,1 ± 0,3	71,5 ± 3,5	51,0
200	10	4,8 ± 0,5	76,5 ± 3,8	67,6
200	15	4,2 ± 0,4	66,8 ± 3,3	48,4



Figura 98. Rendimiento de la fermentación del hidrolizado enzimático de switchgrass y concentración final de etanol alcanzada

En el mismo sentido que en la hidrólisis enzimática previamente discutida, este estudio no apuntó a la optimización de las condiciones de fermentación sino a verificar la producción de etanol a partir del hidrolizado enzimático. El rendimiento de fermentación del punto de explosión de 200 °C y 10 minutos tiempo de residencia (76,5 %) se encuentra por debajo del 90 % de rendimiento que en general se obtiene en la industria del etanol como combustible con *Saccharomyces cerevisiae* (Vázquez y Dacosta, 2007; Dien, 2010). Si se considera que el máximo teórico de etanol que se puede producir por gramo de glucosa es 0,51 gramos (o a partir de celulosa 0,57 gramos), el rendimiento global del punto de explosión por vapor previamente considerado (67,6 %, Tabla 23) indica que se obtuvieron 0,39 g etanol/g celulosa. Tomando en cuenta la correspondiente fracción de celulosa para ese punto (200 °C y 10 minutos), es posible afirmar que se obtuvieron aproximadamente 0,19 gramos de etanol por gramo de biomasa pretratada. Aunque la comparación con otros estudios no es directa (dependiendo del contenido de celulosa de la fracción estudiada, pretratamiento y levadura utilizada, etc), este valor de etanol producido puede compararse con otros estudios (Antunes y otros, 2021; Gonçalves, Sanjinez-Argandona y Fonseca, 2013; Wu y otros, 2018). Mientras Antunes y otros, (2021) obtuvieron rendimientos máximos de 0,46 g etanol/g celulosa en switchgrass pretratado, Wu y otros (2018) informaron 0,19 g etanol/g switchgrass utilizando pretratamiento de explosión por vapor con remojo previo en 1 % m/m de ácido fosfórico. Por otra parte, en la revisión realizada por Gonçalves, Sanjinez-Argandona y Fonseca

(2013) encontraron rendimientos de 0,30 a 0,49 g etanol/g celulosa para distintas biomazas lignocelulósicas.

4.3.1.3 Sacarificación y Fermentación simultáneas (SSF)

Las sacarificaciones y fermentaciones simultáneas fueron ensayadas para el switchgrass pretratado por explosión por vapor a 200 °C y 10 minutos tiempo de residencia. Este punto fue el seleccionado para este estudio debido a que fue el que tuvo mayor contenido de celulosa en la fracción sólida y menor concentración de compuestos de degradación en la fracción líquida (y por lo tanto menor deterioro de la fracción celulósica) (Capítulo 3), además de mayor rendimiento de sacarificación. Estos ensayos se realizaron variando la carga de sólidos en dos niveles (2 % y 10 % m/m) y la carga enzimática también en dos niveles (25 FPU/g biomasa y 50 FPU/g biomasa). Los experimentos con menor carga de sólidos (2 % m/m) fueron identificados como Condición 1 y 2, con carga enzimática de 25 y 50 FPU/g biomasa, respectivamente. Los experimentos con la mayor carga de sólidos (10 % m/m) fueron identificados como Condición 3 y 4, con 25 y 50 FPU/g biomasa de carga enzimática, respectivamente.

Los rendimientos de la sacarificación y fermentación simultáneas de switchgrass fueron altos (próximos al 90 %) para las distintas combinaciones de carga de sólidos y carga enzimática (Tabla 24), y el análisis estadístico demostró que no hay diferencias significativas en este aspecto. Esto implica que, en términos de eficiencia de recursos, es posible una buena hidrólisis enzimática utilizando una baja carga enzimática (25 FPU/g de biomasa), junto con una alta carga de sólidos.

Tabla 24. Concentración de etanol a las 96 horas y el rendimiento de fermentación para switchgrass en el proceso SSF

Condición	Carga de sólidos (%)	Carga enzimática (FPU/g biomasa)	Etanol (g/L)	Rendimiento de fermentación (%)
1	2	25	5,85 ± 0,27	90,0 ± 3,6
2	2	50	5,97 ± 0,16	90,4 ± 3,9
3	10	25	29,03 ± 0,12	89,7 ± 0,8
4	10	50	28,58 ± 1,64	88,1 ± 5,2

Respecto a los perfiles de fermentación para los experimentos con baja carga de sólidos (condiciones 1 y 2, carga de sólidos de 2 % y 25 y 50 FPU/g biomasa) (Figura 99), ambas SSF presentan comportamientos similares con aspectos a destacar. En particular, las dos

presentaron disminución de la concentración de etanol a las 48 respecto a las 24 horas, para luego volver a aumentar a las 72 horas. Sumado a esto, se observó una importante producción de ácido acético alcanzando valores próximos a 8 g/L con un aumento importante a las 48 horas. La xilosa se mantuvo en valores bajos, menores a 0.5 g/L, lo que indica que este ácido acético no provino de las hemicelulosas presentes en la biomasa pretratada. La producción de ácido acético también ha sido informada por (Pessani y otros, 2011), aunque utilizando una levadura distinta (*Kluyveromyces marxianus*). Estos autores obtuvieron menor producción de ácido acético a menor temperatura (37 °C); sin embargo, en los experimentos de esta tesis, la menor producción de ácido acético se vio influenciada por la carga de sólidos. Como se observa en la Figura 100, en las condiciones de mayor carga de sólidos hubo significativamente menor producción de ácido acético. Si bien no puede descartarse completamente un efecto puntual, es llamativo que el efecto de disminución de concentración de etanol a las 48 horas no se haya repetido en las condiciones de alta carga de sólidos. La baja de la concentración de etanol a las 48 horas para estas dos condiciones puede haberse debido la baja concentración de glucosa para ser utilizada por la levadura, por lo que la levadura podría haber adaptado su metabolismo utilizando el etanol presente como fuente de carbono, en concordancia con el trabajo presentado por Gasmi y otros (2014). Finalmente, la glucosa a las 96 horas tuvo una concentración de 2.8 g/L para el experimento con menor carga enzimática (condición 1) y 2.4 g/L para el experimento con mayor carga enzimática (condición 2), siendo esta diferencia no significativa.

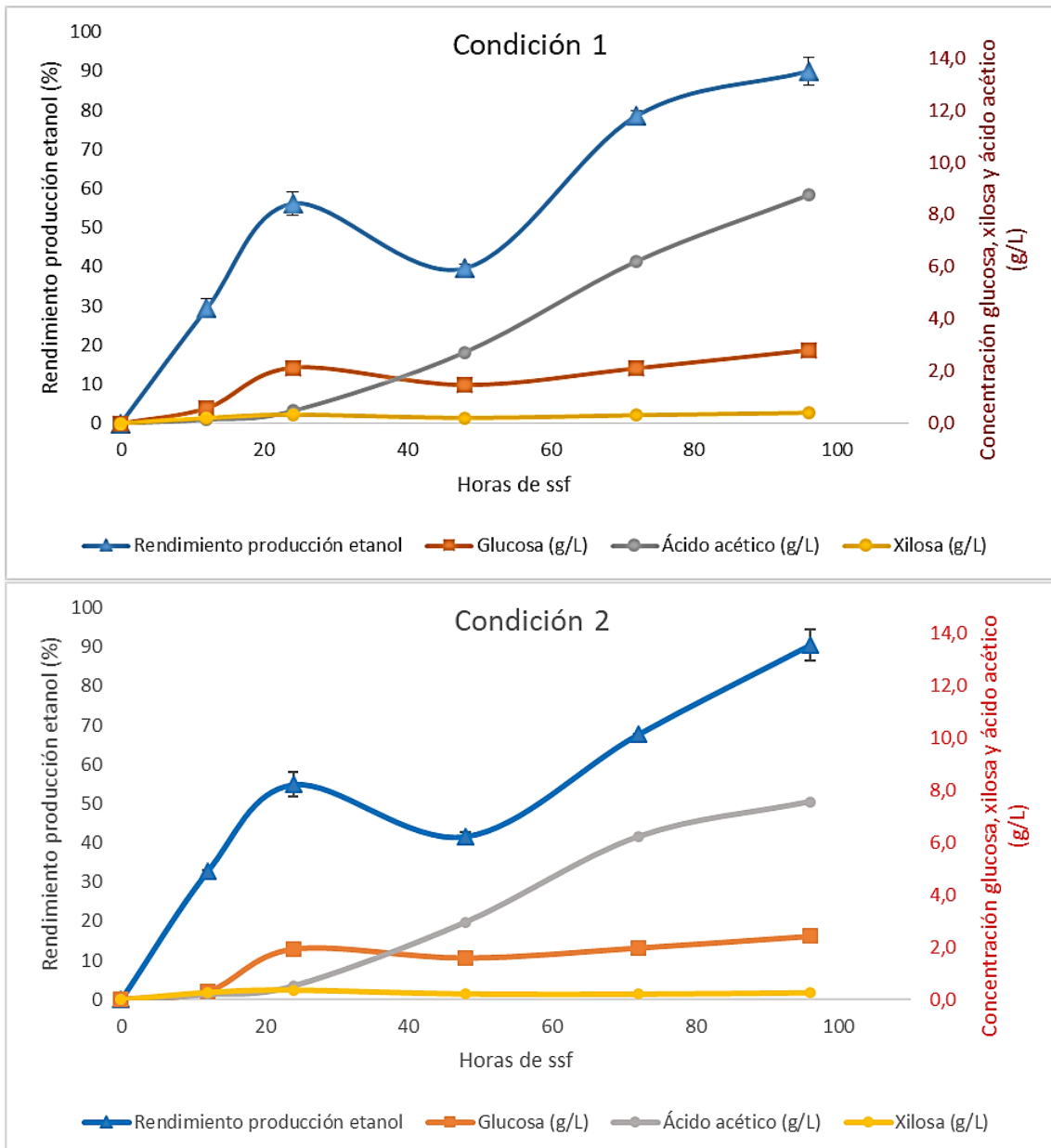


Figura 99. Perfil de sacarificación y fermentación simultáneas de switchgrass pretratado a 200 °C y 10 minutos, con 2 % carga de sólidos, 25 FPU/g biomasa (Condición 1) y 50 FPU/g biomasa (Condición 2)

Por otra parte, observando los perfiles de fermentación para las condiciones con mayor carga de sólidos (10 %) (Figura 100) se puede observar que si bien presentaron perfiles similares entre sí, estos son claramente diferentes a los de las condiciones con menor carga de sólidos. Como se observa en la Figura 100 la producción de etanol comenzó luego de las 12 horas. Esto podría ser explicado por una menor accesibilidad inicial de las enzimas al sólido, coincidiendo con otros estudios para alta carga de sólidos (McIntosh y otros, 2017; Romaní, Garrote y Parajó, 2012). Por otro lado, el etanol no disminuyó a las 48 horas de fermentación como en las condiciones de baja carga de sólidos, aunque

claramente se observa un estancamiento de la producción de etanol en este punto, manteniéndose en valores prácticamente similares a los de las 24 horas de fermentación, para luego registrarse un aumento en la concentración de etanol a las 72 horas.

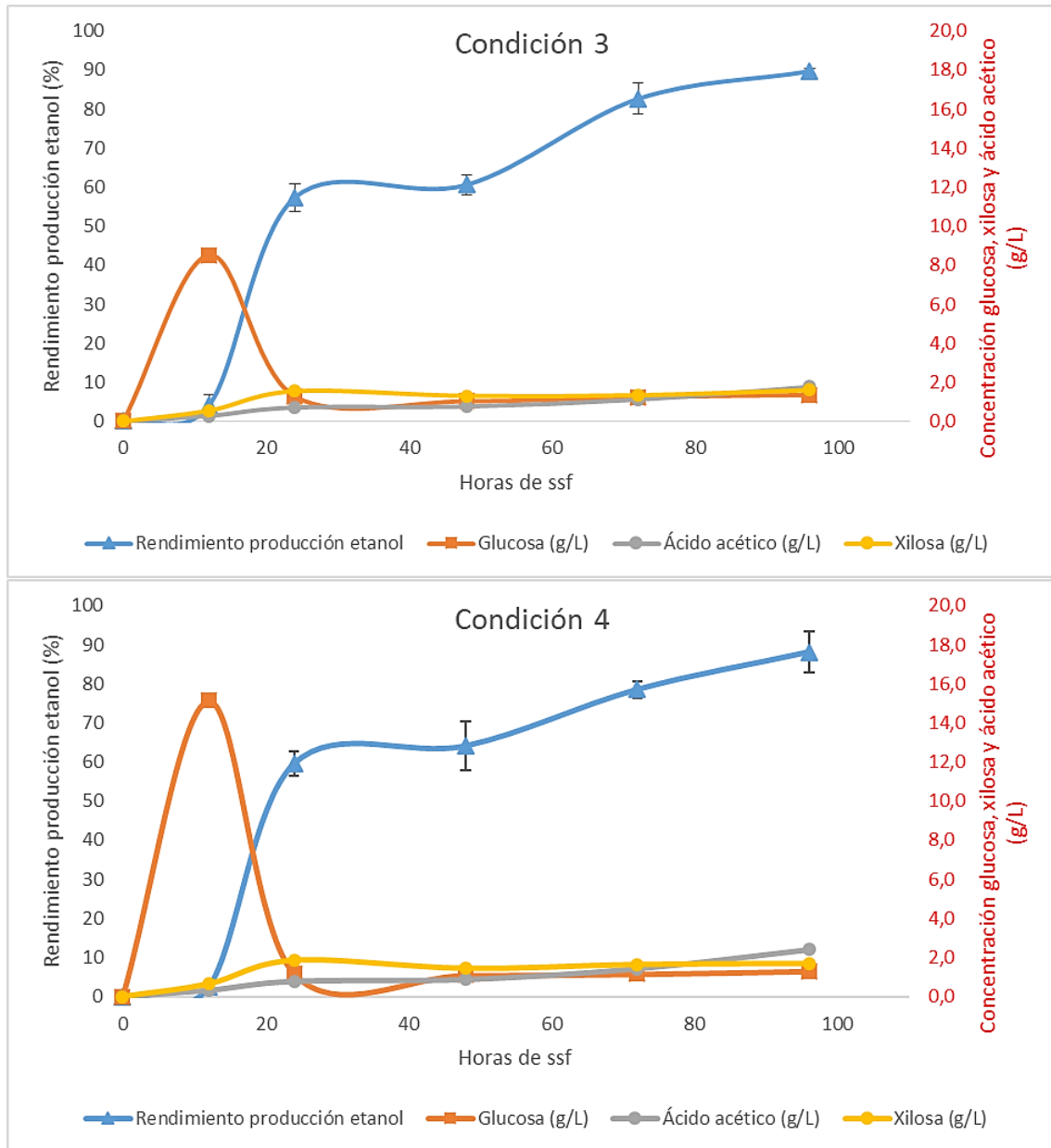


Figura 100. Perfil de sacarificación y fermentación simultáneas de switchgrass pretratado a 200 °C y 10 minutos, con 10 % carga de sólidos, 25 FPU/g biomasa (Condición 3) y 50 FPU/g biomasa (Condición 4)

Probablemente, este comportamiento puede explicarse por el cambio en las concentraciones de glucosa presente en el medio (en gran cantidad a las 12 horas de proceso, consumiéndose rápidamente para luego encontrarse en baja concentración). La escasez de glucosa luego de las 12 horas podría haber llevado a una readaptación a las condiciones de estrés por parte de la levadura, retomando la producción de etanol luego.

En el caso del ácido acético, la concentración fue aumentando progresivamente desde 0,3 g/L a las 12 horas a 1,8 g/L a las 96 horas cuando la fermentación fue llevada cabo con alta carga de sólidos y baja carga enzimática (condición 3), mientras que para esa misma carga de sólidos y alta carga enzimática aumentó de 0,3 g/L a 2,4 g/L, siendo esta diferencia final entre las dos condiciones no significativa. En el caso de la xilosa, la concentración aumentó de 0,5 y 0,6 g/L a las 12 horas de fermentación, a 1,6 y 1,7 g/L a las 96 horas para las condiciones de alta cargas de sólidos. Esta concentración final de xilosa fue aproximadamente cinco veces mayor que la concentración de xilosa para las condiciones de baja carga de sólidos. Considerando un aumento en cinco veces de la carga de sólidos, este aumento en la concentración de xilosa fue coherente con lo esperado, indicando que hubo una hidrólisis enzimática de la hemicelulosa pero sin consumirse. La glucosa tuvo un máximo de concentración a las 12 horas, llegando a 8,5 g/L en el experimento con baja carga enzimática (condición 3) y 15,1 g/L en el experimento con alta carga enzimática (condición 4), disminuyendo luego y manteniéndose en el entorno de 1,0 a 1,3 g/L para las dos condiciones. La diferencia a las 12 horas indica que la mayor carga enzimática tuvo un efecto en las condiciones iniciales liberando más glucosa. Sin embargo, la producción de etanol a las 24 horas fue prácticamente igual para los dos experimentos. Esto podría indicar que el proceso limitante en estas condiciones fue la capacidad fermentativa de la levadura y no por la disponibilidad de glucosa en el medio.

Microscopía electrónica de barrido de las muestras luego de la SSF

En la Figura 101 se puede observar en distintos aumentos como quedó el switchgrass luego de la sacarificación y fermentación simultánea de las biomásas pretratadas con explosión por vapor a 200 °C y 10 minutos. Se puede observar que las fibras celulósicas que se encontraban presentes en las Figura 83 fueron degradadas, observándose estructuras amorfas correspondientes a la lignina.

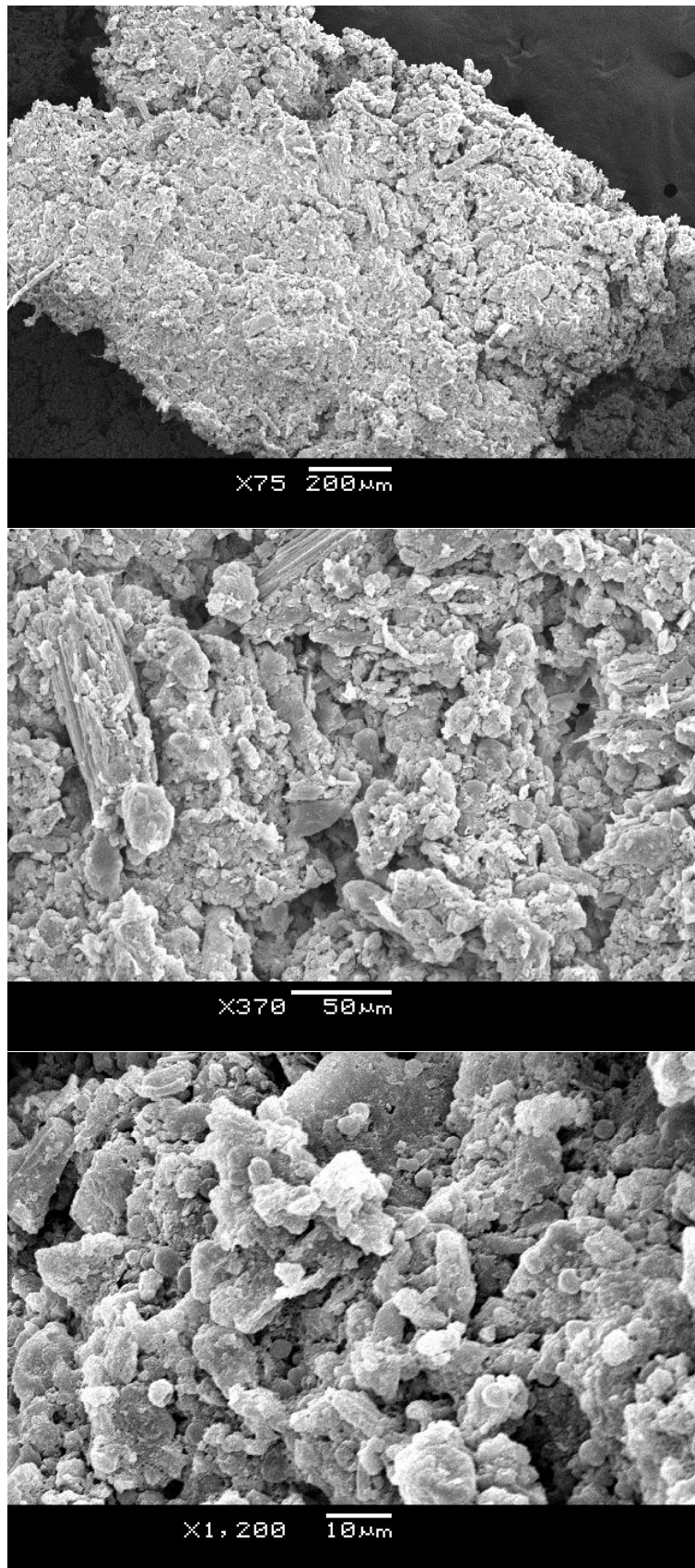


Figura 101. Microscopía electrónica de barrido de las muestras luego de la sacarificación y fermentación simultáneas de switchgrass pretratado a 200 °C y 10 minutos.

En la Figura 102 se observa el espectro FTIR del residuo de switchgrass luego de la SSF con alta carga de sólidos.

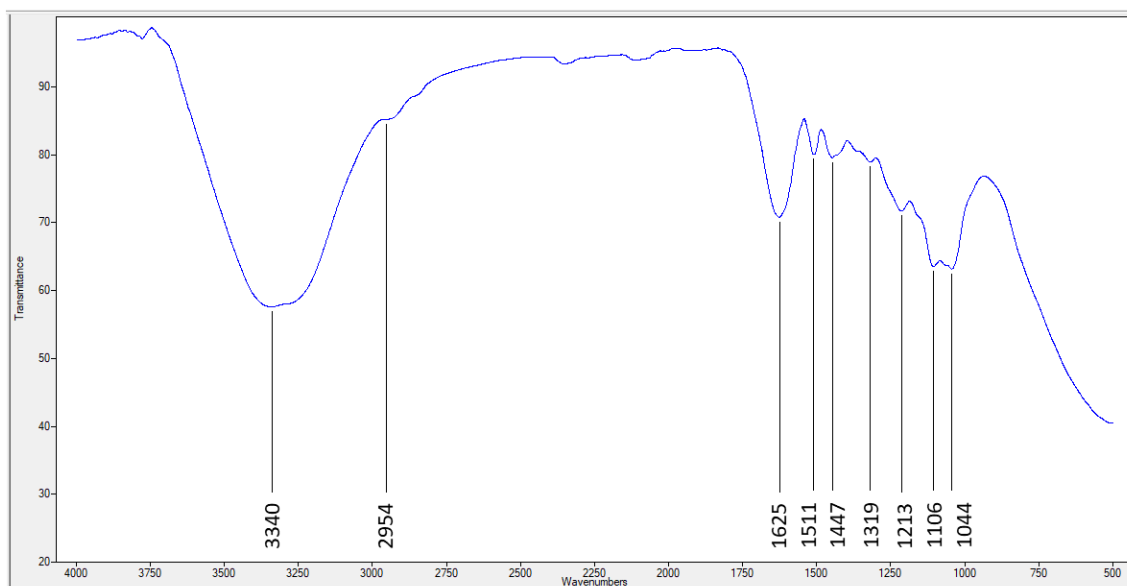


Figura 102. Espectro infrarrojo del residuo sólido luego de la SSF con 10 % carga de sólidos de switchgrass.

Se observan las bandas características de muestras lignocelulósicas pretratadas sometidas a sacarificación y fermentación simultáneas, como han sido informadas en otros trabajos (Althuri y Banerjee, 2019). Como en todas las muestras lignocelulósicas, se sigue observando la banda del pico a 3340 cm^{-1} que corresponde al estiramiento de los OH, debidos particularmente en este caso a los grupos fenólicos de la lignina. Se debe considerar la presencia de celulosa residual, evidenciada por dos bandas. Comparando con los espectros infrarrojos de las muestras pretratadas (Capítulo 3, Figura 80), se observa aún presente –aunque con baja intensidad– la banda a 2954 cm^{-1} , que se atribuye al estiramiento de los enlaces de los metilenos de la celulosa y hemicelulosa. La presencia de esta banda implica la presencia aún de celulosa o hemicelulosa. Sumado a esto, se observan las bandas a 1106 y 1044 cm^{-1} que se deben a la absorción de los enlaces del anillo de piranosa de la celulosa, confirmando que aún había celulosa en el residuo luego de la SSF. Debe destacarse la desaparición de la banda en el entorno de los 1724 cm^{-1} que era debido a los grupos acetilo (o enlace éster del ácido *p*-cumárico), lo que implica que el residuo luego de la SSF ya no poseía estos grupos.

La notoria banda a 1625 cm^{-1} debida a los anillos aromáticos de la lignina (Althuri y otros, 2018) no era identificable en el switchgrass sin tratar (Capítulo 3, Figura 75). Una posible explicación es que esta banda se corresponda con la que se veía a 1598 cm^{-1} en el switchgrass sin tratar, y que haya ocurrido un corrimiento (*shift*) de esta señal. Mayor acoplamiento de los anillos aromáticos de la lignina (mayor interacción π - π) puede producir un corrimiento de la señal hacia números de onda mayores (Si y otros, 2018). En el switchgrass pretratado y luego de la SSF existe menor interferencia de otras moléculas con la lignina, por lo que puede haber existido este acoplamiento de los anillos aromáticos y generado este corrimiento. Los enlaces de la lignina también son responsables de las bandas a 1511 , 1447 , 1319 y 1213 cm^{-1} . La banda a 1322 cm^{-1} se atribuye a las unidades siringílicas (Xu, Yu y otros, 2013), por lo que su baja intensidad es coherente con el bajo porcentaje de unidades siringílicas para esta biomasa.

4.3.2 Eucalipto

4.3.2.1 Hidrólisis enzimática (sacarificación)

En la sacarificación de eucalipto (Tabla 25) se puede observar que los puntos de baja severidad correspondientes a la temperatura de 180 °C –tanto el de tiempo de residencia de 10 minutos como el de 20 minutos de residencia- presentan bajos rendimientos. Como fue discutido en el capítulo anterior, pese a presentar el mayor porcentaje de celulosa, la presencia de hemicelulosas indicaba baja deconstrucción de la biomasa lignocelulósica para estos puntos de explosión por vapor, lo que se ve reflejado en los bajos valores de rendimiento de hidrólisis.

Tabla 25. Rendimiento de hidrólisis enzimática obtenido de las distintas muestras pretratadas de eucalipto.

Temperatura (°C)	Tiempo de residencia (min)	Factor de Severidad	Rendimiento hidrólisis (%)
180	10	3.36	24.1 ± 2.5
180	20	3.66	44.7 ± 6.0
200	10	3.94	90.2 ± 0.8
200	20	4.25	91.9 a 100

4.3.2.2 Fermentación

En el caso de la fermentación del hidrolizado luego de la sacarificación enzimática de las distintas condiciones de explosión (Tabla 26), se puede observar que la fermentación del

sacarificado del punto de 180 °C y 10 minutos no generó etanol. Este resultado se puede deber a la baja concentración inicial de glucosa en este hidrolizado, resultando más difícil la fermentación de las levaduras. Por otra parte, también debe considerarse la posibilidad de que la levadura haya conseguido fermentar la baja glucosa presente, pero al consumir toda la glucosa haya utilizado al etanol como fuente de carbono para su metabolismo (Gasmi y otros, 2014).

Tabla 26. Fermentación del hidrolizado enzimático de eucalipto pretratado por explosión por vapor a distintas condiciones y luego hidrolizado enzimáticamente.

Temperatura (°C)	Tiempo de residencia (minutos)	Concentración final etanol (g/L)	Rendimiento fermentación (%)	Rendimiento global (%)
180	10	0	0	0
180	20	1,4 ± 0,1	57,0 ± 2,8	25,5 ± 1,3
200	10	3,4 ± 0,2	77,4 ± 3,9	69,8 ± 3,5
200	20	3,1 ± 0,2	86,0 ± 4,3	79,0 ± 4,0

En el caso del otro punto de explosión a 180 °C (tiempo de residencia 20 minutos) la fermentación tuvo un rendimiento de 57 %. Este bajo rendimiento de fermentación puede haberse debido a la baja concentración de glucosa en este hidrolizado. La levadura pudo fermentar glucosa por arriba de determinada concentración, pero cuando esta se hizo mínima ya no pudo seguir fermentando. Para los puntos de explosión a 200 °C, los valores de rendimiento de fermentación resultaron similares a los obtenidos para switchgrass.

Sin embargo, en la fermentación del eucalipto pretratado a 200 °C y 20 minutos presentó mayor rendimiento de fermentación que a 200 °C y 10 minutos. En este caso, la suposición realizada en el caso del switchgrass pretratado a 200 °C y 15 minutos no explicaría este comportamiento (los compuestos fenólicos que se puedan haber liberado durante la hidrólisis enzimática no afectaron a la levadura). Una explicación posible sería que la lignina de eucalipto pretratado a 200 °C y 20 minutos haya sufrido mayor recondensación, por lo que se liberaron menos compuestos fenólicos. Por otra parte, este punto de explosión es el que tenía menor cantidad de hemicelulosa en la fracción sólida (2,6 %, Tabla 16). Como fue dicho, las enzimas celulolíticas no están compuestas solamente por celulasas, sino que también existe presencia de hemicelulasas. Dentro de las hemicelulasas, se encuentran aquellas que hidrolizan los acetilos que ramifican al

xilano. En el punto de 200 °C y 20 minutos, la menor cantidad de hemicelulosa puede haber resultado en menor liberación de ácido acético al medio líquido durante la hidrólisis enzimática. El ácido acético puede haber tenido un doble rol dependiendo del punto de explosión afectando la fermentación: por un lado, inhibiendo levemente a la levadura en el caso del punto de explosión a 200 °C y 10 minutos, pero funcionando como un inductor del metabolismo fermentativo en el caso del punto 200 °C y 20 minutos, por su bajo nivel, ingresando en el ciclo TCA (o ciclo del ácido cítrico) de la levadura (Yang y otros, 2016; Giannattasio y otros, 2013) .

4.3.2.3 Sacarificación y Fermentación simultáneas (SSF)

En el caso del eucalipto, las sacarificaciones y fermentaciones simultáneas también fueron ensayadas para el punto de explosión de 200 °C y 10 minutos tiempo de residencia. Los ensayos se realizaron igual a la SSF de switchgrass: variando la carga de sólidos en dos niveles (2 % y 10 % m/m) y la carga enzimática en dos niveles (25 FPU/g biomasa y 50 FPU/g biomasa). Los experimentos con menor carga de sólidos (2 % m/m) fueron identificados como Condición 1 y 2, con carga enzimática de 25 y 50 FPU/g biomasa, respectivamente. Los experimentos con la mayor carga de sólidos (10 % m/m) fueron identificados como Condición 3 y 4, con 25 y 50 FPU/g biomasa de carga enzimática, respectivamente.

De forma similar a lo observado para switchgrass, en el caso de eucalipto se obtuvieron rendimientos globales de producción de bioetanol mayores realizando la sacarificación y fermentación simultáneas frente a la sacarificación y fermentación separadas (Tabla 27). Asimismo, no existieron diferencias significativas entre las distintas cargas de sólidos y cargas enzimáticas respecto al rendimiento final en la producción de bioetanol.

Tabla 27. Concentración final de etanol y el rendimiento de fermentación para eucalipto en el proceso SSF

Condición	Carga de sólidos (%)	Carga enzimática (FPU/g biomasa)	Etanol (g/L)	Rendimiento de fermentación (%)
1	2	25	4,95 ± 0,26	80,8 ± 3,3
2	2	50	4,83 ± 0,30	78,3 ± 4,4
3	10	25	23,53 ± 2,38	79,2 ± 5,6
4	10	50	25,10 ± 0,36	82,9 ± 1,1

Diversos estudios de SSF sobre eucaliptos han sido reportados utilizando alta carga de sólidos con rendimientos mayores a 90 % (Romaní, Garrote y Parajó, 2012; McIntosh y otros, 2017; Cunha y otros, 2018; Romaní y otros, 2013). En el estudio realizado sobre *Eucalyptus grandis* por McIntosh y otros (2017) obtuvieron un rendimiento de 90 % de bioetanol realizando una SSF con 20 % de carga de sólidos y carga enzimática de 40 FPU/g celulosa, sobre biomasa remojada en ácido sulfúrico y pretratada por explosión por vapor (*batch*) con un contenido de 55,5 % celulosa. Cunha y otros (2018) obtuvieron un rendimiento de 94 % de etanol, utilizando biomasa pretratada con un contenido de 63,4 % de celulosa en condiciones optimizadas de carga de sólidos, con una cepa genéticamente modificada y con una carga de enzimas combinada de aproximadamente 50 FPU/g celulosa. Por su parte, Romaní, Garrote y Parajó (2012) trabajaron sobre un material pretratado con un contenido de 61,5 % de celulosa, 20 % de sólidos y 16 FPU/g biomasa en condiciones optimizadas, obteniendo un rendimiento de 91 %. En el trabajo aquí presentado, tomando en cuenta que por la fracción celulósica de la biomasa de eucalipto pretratada los 25 FPU/g biomasa corresponden aproximadamente a 50 FPU/g celulosa, y con una carga de 10 % sólidos, se obtuvo un rendimiento de aproximadamente 80 %. Si bien comparar este resultado con los trabajos previamente citados puede ser complicado por diversos factores (contenido de celulosa, pretratamiento utilizado, agregado de aditivos en la SSF, condiciones de proceso, etc.), se debe considerar que se utilizó baja carga enzimática y no fue optimizado, por lo que es posible considerarlo un resultado promisorio.

En cuanto a los perfiles de SSF del eucalipto, en los experimentos con baja carga de sólidos (Figura 103) no se observó la disminución de etanol observada para switchgrass, pero sí un estancamiento entre las 24 y las 48 horas, para luego retomar la producción. Se observó aumento de concentración de ácido acético en particular luego de las 24 horas de fermentación, aunque el nivel máximo es un poco menor que en el caso de switchgrass, llegando en el caso de eucalipto a 5.8 y 5.7 g/L para las condiciones de baja carga de sólidos con 25 y 50 FPU, respectivamente. La glucosa final para estas condiciones (2 % carga de sólidos, condiciones 1 y 2) fue de 2.2 g/L y 2.1 g/L.

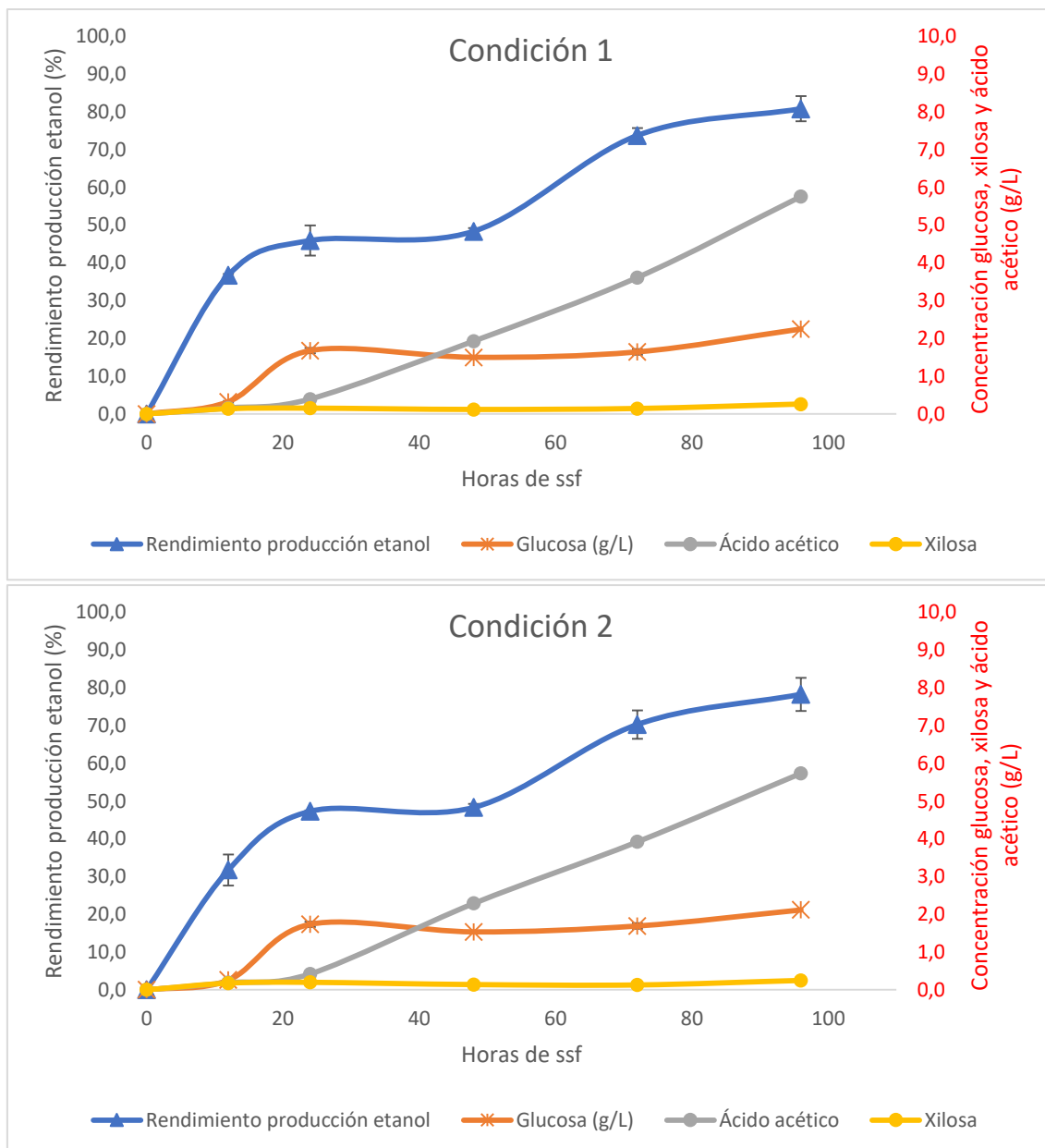


Figura 103. Perfil de sacarificación y fermentación simultáneas de eucalipto pretratado a 200 °C y 10 minutos, con 2 % carga de sólidos, 25 FPU/g biomasa (Condición 1) y 50 FPU/g biomasa (Condición 2)

En las condiciones con mayor carga de sólidos (3 y 4, 10 %) (Figura 104) también se observó un estancamiento en la producción de bioetanol entre las 24 y 48 horas, extendiéndose a las 72 horas en el experimento con menor carga enzimática (condición 3).

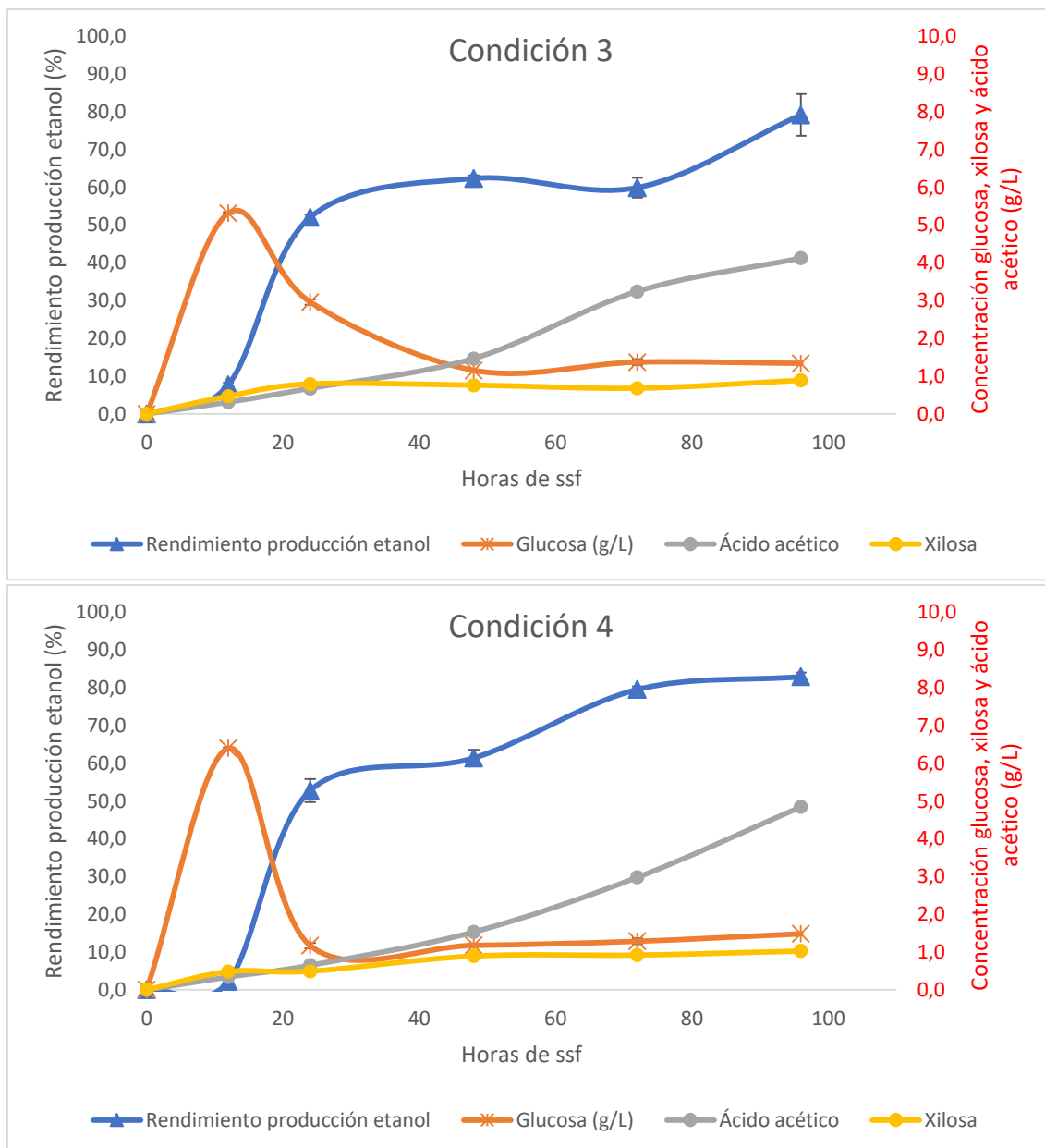


Figura 104. Perfil de sacarificación y fermentación simultáneas de eucalipto pretratado a 200 °C y 10 minutos, con 10 % carga de sólidos, 25 FPU/g biomasa (Condición 3) y 50 FPU/g biomasa (Condición 4)

En el caso de la glucosa, la concentración máxima se observó a las 12 horas, disminuyendo más lentamente cuando la carga enzimática era menor, lo que puede explicar ese mayor período de estancamiento en esta condición de alta carga de sólidos y baja carga enzimática. También se observó un aumento de ácido acético, pero menos marcado que para las condiciones de baja carga de sólidos (condiciones 1 y 2), llegando a concentraciones finales de 4,1 y 4,8 g/L, para los experimentos con alta carga de sólidos. Estas condiciones poseen cinco veces más carga de sólidos que en los experimentos con baja carga de sólidos, por lo que en estos experimentos la formación de ácido acético fue

significativamente menor. Sin embargo, comparando con las concentraciones finales de ácido acético en el caso de las SSF de switchgrass con alta carga de sólidos (Figura 100) puede observarse que el eucalipto generó mayor cantidad de ácido acético. En estas condiciones, es posible sugerir que su presencia está influida por la hidrólisis de las hemicelulosas presentes en la biomasa –con mayor contenido de grupos acetilo en el caso de eucalipto- aunque también derivada de una metabolización por parte de la levadura, pero menor que en el caso de los experimentos con baja carga de sólidos. Este aspecto también está apoyado por las concentraciones finales de xilosa, 0,3 g/L para las condiciones 1 y 2, y 1,0 g/L para las condiciones 3 y 4.

Microscopía electrónica de barrido de las muestras luego de SSF

Estas imágenes (Figura 105) son similares a las obtenidas para el switchgrass. Se puede observar que las fibras celulósicas que se encontraban presentes en las Figura 92 fueron degradadas, observándose estructuras amorfas correspondientes a la lignina.

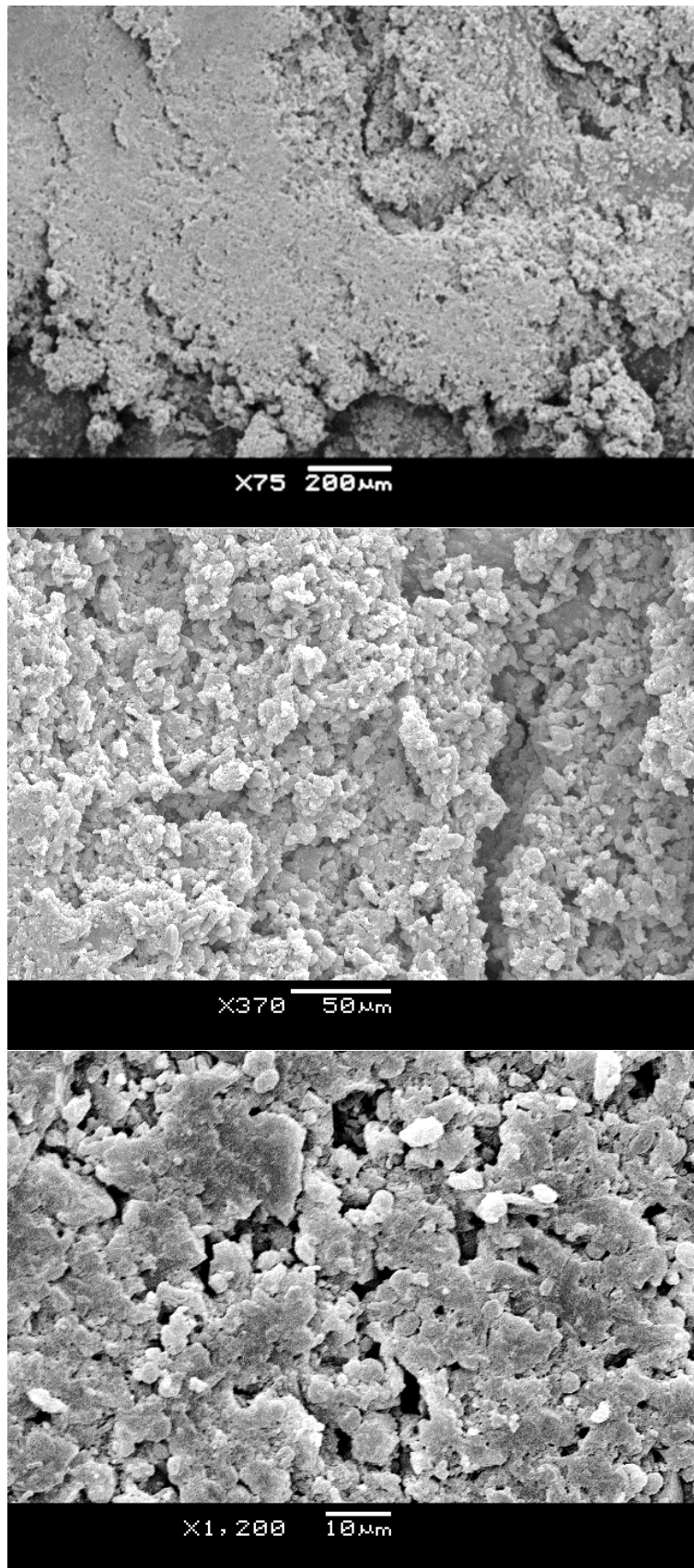


Figura 105. Microscopía electrónica de barrido de las muestras luego de la sacarificación y fermentación simultáneas de eucalipto pretratado por explosión por vapor a 200 °C y 10 minutos.

El espectro FTIR de la muestra de eucalipto (Figura 106) es similar a la obtenida para switchgrass.

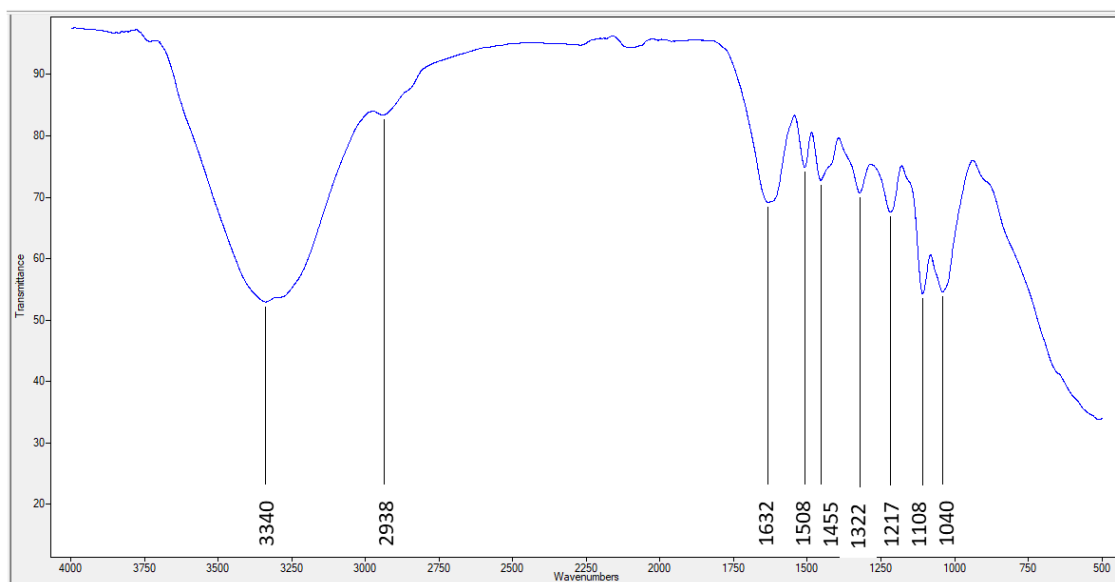


Figura 106. Espectro infrarrojo del residuo sólido de eucalipto luego de la SSF con 10 % carga de sólidos.

Este espectro es muy similar al obtenido para el switchgrass luego de la SSF (Figura 102). Como en ese caso, se observa la banda inespecífica de los OH a 3340 cm^{-1} , así como la banda con baja intensidad a 2938 cm^{-1} debida a los metilos y metilenos de los azúcares. Las bandas a 1040 y 1108 cm^{-1} que indican la presencia de celulosa se encuentran más marcadas que en el switchgrass luego de la SSF, lo que podría ser explicado por el menor rendimiento de fermentación en el caso del eucalipto, permaneciendo un poco más de celulosa en el residuo. En el espectro de eucalipto, al igual que en el de switchgrass, no se observa la banda en el entorno de los 1733 cm^{-1} que sí se observaba en la muestra sin tratar, por lo que el residuo luego de la SSF no tenía grupos acetilo de las hemicelulosas.

La banda a 1632 cm^{-1} que corresponde a los anillos aromáticos de la lignina, también en este caso puede deberse a una mayor interacción de los anillos aromáticos, produciendo el corrimiento de la señal que en la muestra sin tratar se observaba a 1588 cm^{-1} , como fue discutido en el switchgrass luego de la SSF. Los enlaces de la lignina también son responsables de las bandas a 1508 , 1455 , 1322 y 1217 cm^{-1} , siendo la de 1322 cm^{-1} en particular atribuible a las unidades siringílicas (Xu, Yu y otros, 2013).

4.4 Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo demostraron que la deconstrucción de la biomasa lignocelulósica en el equipo de explosión por vapor permitió hidrolizar y fermentar satisfactoriamente las biomásas estudiadas, sin necesidad de agregado de otros productos químicos. En particular, la condición de explosión por vapor de 200 °C y 10 minutos fue la que obtuvo mejor rendimiento de hidrólisis.

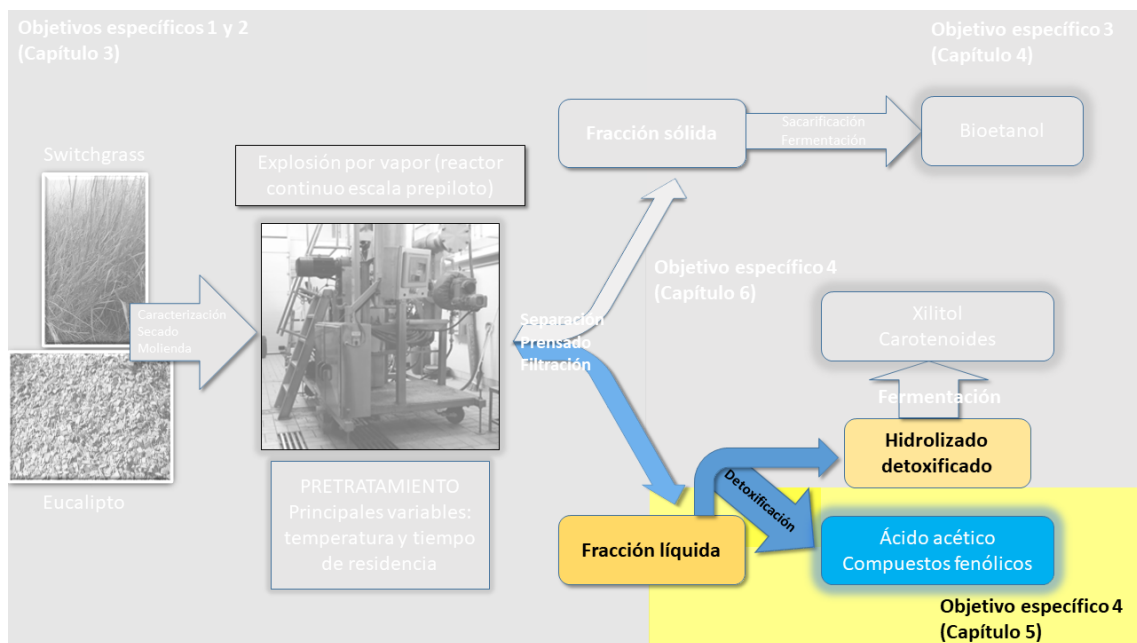
Estos experimentos permitieron demostrar que:

- Fue posible hidrolizar enzimáticamente la celulosa de las biomásas pretratadas, en particular en los puntos de mayor severidad. Cuando la severidad es baja, las enzimas no pueden hidrolizar efectivamente a la celulosa. Una severidad extrema parecería ser perjudicial para la hidrólisis enzimática en el caso del switchgrass.
- La glucosa liberada luego de la hidrólisis enzimática pudo ser fermentada por *Saccharomyces cerevisiae*, aunque es probable que esta levadura se viera afectada por algunos compuestos tóxicos liberados durante la hidrólisis, junto con una baja concentración de glucosa en la hidrólisis y fermentación separadas (SHF).
- La sacarificación y fermentación simultánea (SSF) de la biomasa lignocelulósica pretratada otorgó mejores rendimientos que realizar estos dos procesos separadamente.
- Además, al realizar estos dos procesos en un solo paso se evitó mayor manipulación y menores tiempos totales de sacarificación y fermentación, por lo que la SSF fue más eficiente.
- En la SSF, utilizar alta carga de sólidos no afectó el rendimiento de las enzimas ni de la fermentación, y permitió obtener alta concentración de etanol final.
- La utilización de menor carga enzimática tampoco afectó el rendimiento.

Es posible mejorar los rendimientos de fermentación, por lo que sería interesante investigar el efecto de aún mayor carga de sólidos y menor carga enzimática.

Estos resultados permiten mejorar la ecuación económica al producir bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica.

CAPÍTULO 5. DETOXIFICACIÓN Y RECUPERACIÓN DE COPRODUCTOS EN LA FRACCIÓN LÍQUIDA



5.1 Introducción

La fracción líquida resultante de la explosión por vapor está compuesta principalmente por la fracción hemicelulósica de la biomasa, es decir monómeros de azúcares –en particular xilosa- pero también se encuentran presentes oligómeros, además de ácido acético derivado del xilano, junto con distintos compuestos de degradación, como son los compuestos fenólicos, furfural, hidroximetilfurfural (5-HMF) y ácido fórmico. Para poder procesar la xilosa de modo que se pueda producir otros compuestos de valor se planteó como un primer paso aumentar su concentración mediante una *pos-hidrólisis* para luego reducir la cantidad de los compuestos de degradación, que son inhibidores de las levaduras, pero también pueden servir como compuestos de valor en sí mismos, por ejemplo ácido acético y compuestos fenólicos. La fracción líquida del punto óptimo de explosión por vapor -200 °C y 10 minutos de tiempo de residencia, determinado en los capítulos 3 y 4- fue considerada para estudiar las posibilidades de obtener coproductos.

Se pueden seguir diferentes enfoques para detoxificar los hidrolizados. La eliminación de los inhibidores mediante extracción en fase líquida es uno de los métodos más utilizados (Xavier y Cabrera, 2021). Otros métodos comunes son la adsorción en fase sólida con carbón activado (Deng, Cheong y Aita, 2018), nanofiltración (Nguyen y otros, 2015) y ósmosis inversa (Zhou, Wang y Wei, 2013). De todas formas, cierto nivel de estos compuestos puede contribuir a un proceso más eficiente de fermentación, como fue discutido previamente. Otra estrategia importante es “evolucionar” levaduras para tolerar los inhibidores; por lo tanto, puede no ser necesaria la remoción completa de compuestos tóxicos para lograr una bio-conversión eficiente a productos como etanol o xilitol (Casey y otros, 2010; Pereira, Mussatto y Roberto, 2011). Por otra parte, los compuestos de degradación pueden ser útiles en la industria como coproductos de valor, aumentando la sustentabilidad del proceso (Cebreiros, Guigou y Cabrera, 2017; Parajó y otros, 2008; Varanasi y otros, 2013). En el caso de los compuestos fenólicos, se ha demostrado que son muy beneficiosos para la salud, actuando como antioxidantes, antiinflamatorios, anti-hepatotóxicos, anti-carcinogénicos, además de antimicrobiales (Dzialo y otros, 2016; Santos y otros, 2013; Luthria 2008; Rice-Evans, Miller y Paganga, 1997).

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Pos-hidrólisis de la fracción líquida (o hidrolizados)

Los hidrolizados hemicelulósicos se sometieron a un proceso de pos-hidrólisis para convertir los oligómeros en monómeros utilizando ácido sulfúrico al 4 % (m/m) en autoclave a 121 °C durante 15 min (Sluiter, Hames y otros, 2008).

El pos-hidrolizado obtenido después de este proceso se centrifugó para eliminar las partículas negras del precipitado (humina). Luego, el hidrolizado se ajustó a pH 2,5 con gránulos de CaCO₃ o NaOH, se centrifugó y se filtró. Se analizó la composición de este pos-hidrolizado.

El residuo sólido se recuperó disolviéndolo en etanol absoluto y se analizó el contenido total de compuestos fenólicos.

5.2.2 Extracción en fase sólida

Se ensayó la retención de compuestos fenólicos en columnas empaquetadas de sorbente apolar C18 Sep-PAK de Waters® (una base de sílice unida químicamente con un grupo funcional octadecilo) (Figura 107). La columna consistía en un cilindro de 20 cc, con tamaño de partícula de 55-105 μm, y tamaño de poro de 125 Å, peso de sorbente de 5 g y un rango de pH de trabajo de 2 a 8. Sobre esta columna se realizó una prueba de saturación (para comprobar cuanto volumen de hidrolizado podía pasarse antes de necesitar recuperar la columna).

También se realizaron pruebas utilizando una columna C18 Sep-PAK más grande de 35 cc y un peso de sorbente de 10 g. Previo a la elución de la muestra, la columna se acondicionó con 30 mL de metanol y se equilibró con 60 mL de agua desionizada. Se eluyeron 15 mL de hidrolizado a través de la columna con un flujo de 7 mL/min con la ayuda de vacío (Figura 107). La recuperación de los compuestos fenólicos retenidos en la columna se realizó eluyendo 10-20 mL de etanol absoluto.

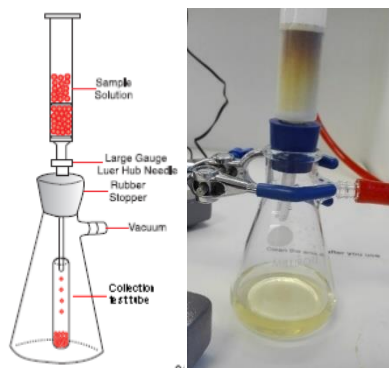


Figura 107. Configuración de la columna Sep-PAK C18

Para la extracción en fase sólida también se utilizó una columna de membrana de resina poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) de Chromabond® HR-X (Macherey-Nagel, Alemania) de 15 ml y 500 mg de sorbente. Antes de la prueba, la columna se acondicionó con 10 mL de metanol seguido de 15 de agua desionizada. La recuperación de los compuestos fenólicos se realizó eluyendo 10 ml de etanol al 5 % (v/v) seguido de etanol absoluto. Después de la recuperación, se eluyó de nuevo metanol para preacondicionar la columna. (Figura 108)

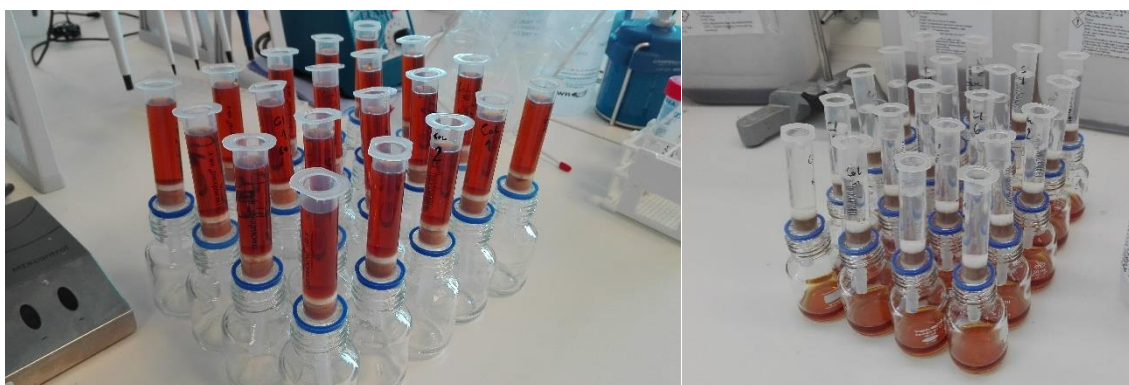


Figura 108. Extracción en fase sólida con columnas de PS-DVB. Izquierda: detoxificación. Derecha: recuperación compuestos fenólicos.

5.2.3 Extracción líquido-líquido

El pH del hidrolizado se ajustó a 2,5 con gránulos de CaCO_3 o NaOH . El hidrolizado se mezcló con acetato de etilo en matraces con deflectores de 250 ml con tapa cerrada y se agitó a 23°C y 250 rpm durante 40 min. Después de eso, la mezcla se transfirió a un embudo de decantación de 500 ml y se dejó durante 20 min para la separación de fases.

En pruebas donde se repitió la extracción líquido-líquido, la fase acuosa se recogió y se sometió nuevamente al mismo tratamiento.

Las fases orgánicas de la extracción líquido-líquido se pusieron en un evaporador rotatorio IKA a 45 °C, 250 mbar de vacío, 5-10 rpm y enfriamiento del condensador a 5 °C, hasta que no se observó más destilación. Se recogió el residuo acuoso resultante en el matraz rotatorio y se analizó la recuperación de ácido acético.

5.2.4 Métodos analíticos

La concentración de carbohidratos, ácidos orgánicos, furfural, 5-HMF y compuestos fenólicos en los hidrolizados se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se cuantificaron celobiosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético, ácido fórmico, furfural y 5-HMF utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución Dionex Ultimate 3000 UHPLC + Focused (Dionex Softron GmbH, Alemania) con una columna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) a 60 °C, y H₂SO₄ 5,0 mM como fase móvil a un flujo de 0,6 mL/min. Los azúcares y ácidos se detectaron usando un detector de índice de refracción Shodex RI-101, mientras que el 5-HMF y el furfural se detectaron usando medición UV a 254 nm. Se determinaron vainillina, ácido vanílico, ácido cumárico, 4-hidroxibenzaldehído, siringaldehído y ácido siríngico utilizando un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 (Dionex Softron GmbH, Alemania) equipado con una columna Zorbax eclipse plus C18, eluida con un método de gradiente con fase móvil Ácido acético al 0,05 % en agua y acetonitrilo (según Tabla 28), horno de columna a 30 °C, 1 mL/min, detección UV. El contenido de oligómeros en los hidrolizados se calculó como la diferencia entre la concentración de azúcares monoméricos en el pos-hidrolizado y en el hidrolizado original. Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron por método colorimétrico utilizando ácido gálico como estándar (Ballesteros, Teixeira y Mussatto, 2014).

Tabla 28. Gradiente de fase móvil para determinación de vainillina, ácido vanílico, ácido cumárico, 4-hidroxibenzaldehído, siringaldehído y ácido siríngico.

Minutos	Ácido acético 0,05 % (%)	Acetonitrilo (%)
0,0	95	5
1,5	88	12
2,5	88	12
4,5	70	30
5,5	70	30
8,0	30	70
9,0	30	70
9,5	95	5
11,0	95	5

5.2.5 Cálculos

Eficiencia de recuperación (ER)

$$\%ER = \frac{CC_f \times V_{rec}}{CC_i \times V_i}$$

Eficiencia de extracción (EE)

$$\%EE = 100 - \frac{CC_f \times V_{rec}}{CC_i \times V_i} \times 100$$

Donde CC_f es la concentración del compuesto en el hidrolizado analizado (g/L), V_{rec} es el volumen correspondiente recuperado (L), CC_i es la concentración de ese compuesto en el hidrolizado de referencia (original) (g/L), y V_i es el volumen original correspondiente (L).

5.3 Resultados y Discusión

5.3.1 Caracterización de los hidrolizados

La composición química de los hidrolizados originales producidos luego del pretratamiento a 200 °C y 10 minutos de tiempo de residencia a partir de switchgrass y eucalipto se muestra en la Tabla 29.

Tabla 29. Composición química de los hidrolizados de switchgrass y eucalipto obtenidos mediante pretratamiento de explosión por vapor.

Compuesto	Concentración en el hidrolizado (g/L)			
	Hidrolizado original		Luego de la pos-hidrólisis	
	Switchgrass	Eucalipto	Switchgrass	Eucalipto
Celobiosa	3,59 ± 0,08	11,89 ± 0,03	nd	nd
Glucosa	5,30 ± 0,09	7,82 ± 0,10	10,25 ± 0,13	10,08 ± 0,46
Xilosa	26,46 ± 0,10	36,01 ± 0,33	33,69 ± 0,26	50,18 ± 1,14
Arabinosa	7,81 ± 0,06	6,78 ± 0,13	3,72 ± 0,14	3,82 ± 0,02
Ácido Fórmico	8,82 ± 0,12	5,93 ± 0,07	8,72 ± 0,32	5,88 ± 0,05
Ácido Acético	15,39 ± 0,16	20,12 ± 0,09	19,62 ± 0,27	31,99 ± 0,05
Furfural	3,11 ± 0,28	3,42 ± 0,06	5,21 ± 0,01	6,97 ± 0,30
5-HMF	3,08 ± 0,12	2,74 ± 0,09	1,21 ± 0,29	1,27 ± 0,26
Compuestos fenólicos	9,12 ± 0,91	7,74 ± 0,64	5,91 ± 0,38	4,29 ± 0,98

El hidrolizado de eucalipto presentó azúcares monoméricos totales ($50,61 \pm 0,61$ g/L) en una concentración mayor que el hidrolizado de switchgrass ($39,57 \pm 0,25$ g/L), lo cual está de acuerdo con la caracterización de ambas materias primas. Aunque la mayoría de los monómeros correspondían a xilosa, también estaba presente algo de glucosa en los hidrolizados. Como se informó en estudios anteriores, el pretratamiento de explosión de vapor da como resultado la ruptura de la matriz lignocelulósica y la ruptura de los enlaces glicosídicos, lo que solubiliza monómeros y oligómeros principalmente de hemicelulosa, pero también glucosa y compuestos fenólicos de fracciones de celulosa y lignina, respectivamente (A. Duque y otros, 2016).

El contenido de ácido acético en el hidrolizado de eucalipto también fue mayor que en el hidrolizado de switchgrass, lo que puede explicarse por el hecho de que el esqueleto del xilano de eucalipto está más ramificada con grupos acetilo (Koch, 2008). La gran cantidad de ácido fórmico, 5-HMF y furfural en los hidrolizados revela que durante el pretratamiento ocurrieron reacciones de degradación de los azúcares. Aunque la formación de estos compuestos podría minimizarse optimizando las condiciones de pretratamiento, esto debe evaluarse cuidadosamente ya que el uso de un factor de severidad más bajo durante el pretratamiento de explosión de vapor da como resultado una menor formación de compuestos de degradación del azúcar, pero también promueve

una menor deconstrucción de la estructura de lignocelulosa, lo que afectará el acceso posterior de las enzimas celulolíticas a las fibras de celulosa durante el paso posterior de hidrólisis enzimática (Pielhop y otros, 2016; Auxenfans y otros, 2017).

El contenido de compuestos fenólicos también fue alto en ambos hidrolizados, revelando que la ocurrencia de reacciones de despolimerización de la lignina durante el pretratamiento de la biomasa. Es interesante notar la presencia de diferentes tipos de compuestos fenólicos en los hidrolizados según la materia prima utilizada (Tabla 30). Por ejemplo, el ácido cumárico y el 4-hidroxibenzaldehído (ambos derivados de unidades precursoras de lignina tipo *p*-hidroxifenil (H)) se encontraron en el hidrolizado de switchgrass, pero no en el hidrolizado de eucalipto. El principal precursor de la lignina en *Eucalyptus* spp. es la unidad siringil (S), lo que explica el mayor contenido de siringaldehído en el hidrolizado de eucalipto que en el hidrolizado de switchgrass. Para la vainillina y el ácido vanílico (ambos derivados de la unidad de guaiacilo (G)), se encontraron cantidades más altas en el hidrolizado de switchgrass, lo que se esperaba ya que no es un material de madera dura.

Tabla 30. Concentración de algunos compuestos fenólicos en los hidrolizados de switchgrass y eucalipto obtenidos mediante pretratamiento de explosión por vapor.

Compuesto	Concentración en el hidrolizado (g/L)			
	Hidrolizado original		Luego de la pos-hidrólisis	
	Switchgrass	Eucalipto	Switchgrass	Eucalipto
Vanillina	0,23	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,05
Ácido vanílico	0,15	0,03	0,14	0,05
Ácido cumárico	0,15	nd	0,04	nd
Siringaldehído	0,10	0,21	0,03	0,14 ± 0,01
Ácido siringico	0,09	0,09	0,09	0,10
4-Hidroxibenzaldehído	0,12	0,01	0,08	0,02

nd: no detectado

Como fue presentado en la Tabla 29, se detectó celobiosa en ambos hidrolizados, lo que, junto con el perfil cromatográfico de las muestras, indicó la presencia de oligómeros en el medio. Por esta razón, se realizó una pos-hidrólisis de los hidrolizados. La composición química de los hidrolizados después de la pos-hidrólisis reveló que los oligómeros se hidrolizaron en monómeros, lo que se evidenció por la ausencia de celobiosa y una mayor

cantidad de azúcares monoméricos, principalmente xilosa (Tabla 29). La cantidad de ácido acético también aumentó después de la pos-hidrólisis, más notablemente en el hidrolizado de eucalipto. Esto está de acuerdo con la estructura reportada de los xilanos de maderas duras donde los grupos acetilo esterifican las cadenas. En los hidrolizados pos-hidrólisis sulfúrica se observó una disminución de la concentración de 5-HMF. Esto se explica por la formación de huminas (observado experimentalmente por la formación de un precipitado negro). Aunque se proponen varios mecanismos para la formación de huminas, en general se acepta que las huminas son productos de polimerización principalmente de 5-HMF, y probablemente otros compuestos (Figura 109) (Heltzel, Patil y Lund, 2016; Filiciotto y otros, 2019). Es interesante destacar que también se investigan aplicaciones de las huminas, como materiales de la construcción o en la industria automotriz (Sangregorio y otros, 2019).

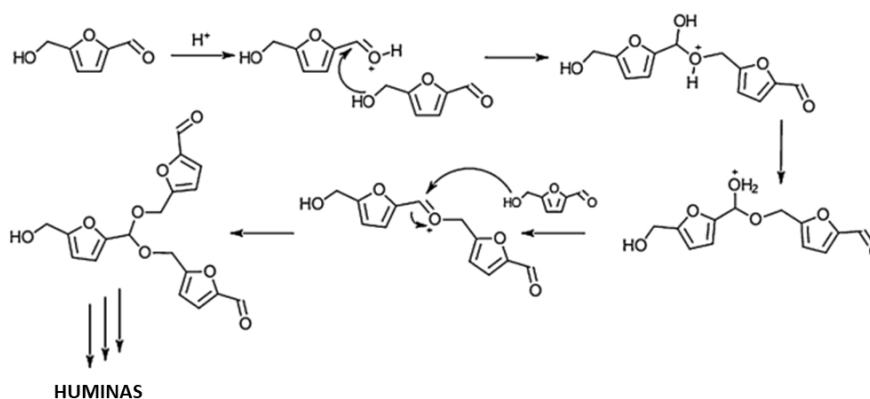


Figura 109. Uno de los mecanismos propuestos en la formación de huminas. Tomado de (Filiciotto y otros, 2019)

El contenido total de compuestos fenólicos en ambos hidrolizados disminuyó después de la pos-hidrólisis. Estos compuestos también parecen estar involucrados en la formación de huminas (van Zandvoort y otros, 2013).

5.3.2 Configuración (orden) de los distintos pasos involucrados: Pos-hidrólisis, Extracción en fase sólida, Extracción líquido-líquido

Con el fin de establecer la mejor metodología para detoxificar los hidrolizados con el objetivo ulterior de recuperar los compuestos tóxicos, se realizaron pruebas del orden (configuración) de los distintos pasos involucrados, es decir pos-hidrólisis (PH), extracción en fase sólida (SPE), extracción líquido-líquido (LLE).

Las pruebas realizadas con estos pasos se diagramaron de forma de determinar cuál configuración resultaba en la mejor secuencia para detoxificar los hidrolizados con la menor pérdida posible de carbohidratos. Se probaron cuatro configuraciones para hidrolizados de eucalipto y switchgrass:

- Configuración I: Pos-hidrólisis – Extracción en fase sólida – Extracción líquido-líquido con relación hidrolizado:acetato de etilo 1:4.
- Configuración II: Extracción en fase sólida – Pos-hidrólisis – Extracción líquido-líquido con relación hidrolizado:acetato de etilo 1:4.
- Configuración III: Extracción en fase sólida – Pos-hidrólisis – Extracción líquido-líquido con relación hidrolizado:acetato de etilo 1:8.
- Configuración IV: Extracción en fase sólida – Pos-hidrólisis – Dos extracciones líquido-líquido con relación hidrolizado:acetato de etilo 1:4.

También se probó realizar la extracción líquido-líquido antes de la extracción en fase sólida, pero en este caso el acetato de etilo residual en el hidrolizado interfirió con la extracción de la columna, por lo que no hubo retención de ningún compuesto (datos no mostrados). El mecanismo de retención de C18 depende de las fuerzas de Van Der Waals, los enlaces de hidrógeno y las interacciones dipolo-dipolo. La baja polaridad del acetato de etilo residual en el hidrolizado afectó la hidrofobicidad de los sorbentes C18, dificultando la interacción con los compuestos fenólicos (Pascual-Maté y otros, 2018; Galanakis y otros, 2013). La composición del hidrolizado de switchgrass para cada configuración y después de cada paso se puede ver en la Tabla 31, y la representación gráfica en la Figura 110. Por su parte, la composición del hidrolizado de eucalipto para cada configuración y luego de cada etapa se detalla en la Tabla 32, y se representa gráficamente en la Figura 111.

Tabla 31. Composición del hidrolizado de switchgrass según las distintas configuraciones y luego de cada etapa. Concentraciones en g/L. (PH: Pos-hidrólisis, SPE: Extracción en fase sólida, LLE: Extracción líquido-líquido)

Etapa Compuesto	Hidrolizado (composición original)	Configuración I			Configuración II			Configuración III			Configuración IV			
		PH	SPE	LLE (1:4)	SPE	PH	LLE (1:4)	SPE	PH	LLE (1:8)	SPE	PH	LLE (1:4)	LLE (1:4)
Celobiosa	3,59 ± 0,08	nd	nd	nd	1,14	nd	nd	1,14	nd	nd	1,14	nd	nd	-
Glucosa	5,30 ± 0,09	10,25 ± 0,13	8,30 ± 1,43	9,39 ± 0,15	1,72 ± 0,17	4,46 ± 0,20	5,06 ± 0,47	1,72 ± 0,17	4,46 ± 0,20	6,07 ± 0,11	1,72 ± 0,17	4,46 ± 0,20	5,06 ± 0,47	6,42 ± 0,24
Xilosa	26,46 ± 0,10	33,69 ± 0,26	28,06 ± 3,07	31,07 ± 0,32	14,92 ± 0,45	17,78 ± 0,68	19,03 ± 1,59	14,92 ± 0,45	17,78 ± 0,68	21,96 ± 0,34	14,92 ± 0,45	17,78 ± 0,68	19,03 ± 1,59	22,84 ± 0,94
Arabinosa	7,81 ± 0,06	3,72 ± 0,14	3,11 ± 0,09	3,21 ± 0,01	4,58 ± 0,22	2,16 ± 0,18	2,40 ± 0,10	4,58 ± 0,22	2,16 ± 0,18	2,61 ± 0,02	4,58 ± 0,22	2,16 ± 0,18	2,40 ± 0,10	2,66 ± 0,04
Ácido Fórmico	8,82 ± 0,12	8,72 ± 0,32	6,73 ± 0,07	1,47 ± 0,04	4,35 ± 0,16	4,19 ± 0,07	1,95 ± 0,06	4,35 ± 0,16	4,19 ± 0,07	1,19 ± 0,04	4,35 ± 0,16	4,19 ± 0,07	1,95 ± 0,06	0,89 ± 0,04
Ácido Acético	15,39 ± 0,16	19,62 ± 0,27	15,59 ± 2,16	4,45 ± 0,03	7,33 ± 0,37	8,39 ± 0,25	3,36 ± 0,03	7,33 ± 0,37	8,39 ± 0,25	2,38 ± 0,06	7,33 ± 0,37	8,39 ± 0,25	3,36 ± 0,03	1,71 ± 0,05
Furfural	3,11 ± 0,28	5,21 ± 0,01	1,32 ± 0,23	0,04 ± 0,00	nd	2,58 ± 0,08	0,07 ± 0,01	nd	2,58 ± 0,08	0,03 ± 0,01	nd	2,58 ± 0,08	0,07 ± 0,01	0,01
5-HMF	3,08 ± 0,12	1,21 ± 0,29	0,64 ± 0,09	0,01 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,05 ± 0,01	nd
Compuestos fenólicos	9,12 ± 0,91	5,91 ± 0,38	1,38 ± 0,25	0,73 ± 0,21	0,77 ± 0,05	1,08 ± 0,06	0,70 ± 0,05	0,77 ± 0,05	1,08 ± 0,06	0,68 ± 0,08	0,77 ± 0,05	1,08 ± 0,06	0,70 ± 0,05	0,55 ± 0,02

nd: no detectado

Tabla 32 Composición del hidrolizado de eucalipto según las distintas configuraciones y luego de cada etapa. Concentraciones en g/L. (PH: Pos-hidrólisis, SPE: Extracción en fase sólida, LLE: Extracción líquido-líquido)

Etapa Compuesto	Hidrolizado (composición original)	Configuración I			Configuración II			Configuración III			Configuración IV			
		PH	SPE	LLE (1:4)	SPE	PH	LLE (1:4)	SPE	PH	LLE (1:8)	SPE	PH	LLE (1:4)	LLE (1:4)
Celobiosa	11,89 ± 0,03	nd	nd	nd	1,70	nd	nd	1,70	nd	nd	1,70	nd	nd	-
Glucosa	7,82 ± 0,10	10,08 ± 0,46	9,29 ± 0,30	8,84 ± 0,21	3,07 ± 0,17	6,40 ± 0,20	6,80 ± 0,47	3,07 ± 0,17	6,40 ± 0,20	9,34 ± 0,11	3,07 ± 0,17	6,40 ± 0,20	6,80 ± 0,47	9,35 ± 0,23
Xilosa	36,01 ± 0,33	50,18 ± 1,14	47,96 ± 0,95	45,29 ± 0,06	22,16 ± 0,46	28,36 ± 0,68	29,51 ± 1,59	22,16 ± 0,46	28,36 ± 0,68	38,66 ± 0,34	22,16 ± 0,46	28,36 ± 0,68	29,51 ± 1,59	39,09 ± 0,34
Arabinosa	6,78 ± 0,13	3,82 ± 0,02	3,92 ± 0,05	3,69 ± 0,03	4,95 ± 0,22	2,89 ± 0,18	2,77 ± 0,10	4,95 ± 0,22	2,89 ± 0,18	3,33 ± 0,02	4,95 ± 0,22	2,89 ± 0,18	2,77 ± 0,10	3,32 ± 0,04
Ácido fórmico	5,93 ± 0,07	5,88 ± 0,05	5,70 ± 0,01	1,71 ± 0,02	3,35 ± 0,16	3,41 ± 0,07	1,58 ± 0,06	3,35 ± 0,16	3,41 ± 0,07	1,54 ± 0,04	3,35 ± 0,16	3,41 ± 0,07	1,58 ± 0,06	1,19 ± 0,04
Ácido acético	20,12 ± 0,09	31,99 ± 0,05	29,69 ± 0,40	9,29 ± 0,00	12,09 ± 0,37	14,97 ± 0,25	6,42 ± 0,03	12,09 ± 0,37	14,97 ± 0,25	3,86 ± 0,06	12,09 ± 0,37	14,97 ± 0,25	6,42 ± 0,03	2,01 ± 0,05
Furfural	3,42 ± 0,06	6,97 ± 0,30	5,02 ± 0,14	0,11 ± 0,00	nd	2,52 ± 0,08	0,06 ± 0,01	nd	2,52 ± 0,08	0,04 ± 0,00	nd	2,52 ± 0,08	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,00
5-HMF	2,74 ± 0,09	1,27 ± 0,26	0,92 ± 0,03	0,08 ± 0,08	0,14 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,45 ± 0,01	nd	0,14 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,05 ± 0,00	nd
Compuestos fenólicos	7,74 ± 0,64	4,29 ± 0,98	2,68 ± 0,21	1,55 ± 0,02	1,10 ± 0,04	1,47 ± 0,06	0,82 ± 0,10	1,10 ± 0,04	1,47 ± 0,06	0,76 ± 0,09	1,10 ± 0,04	1,47 ± 0,06	0,82 ± 0,10	0,76 ± 0,02

nd: no detectado

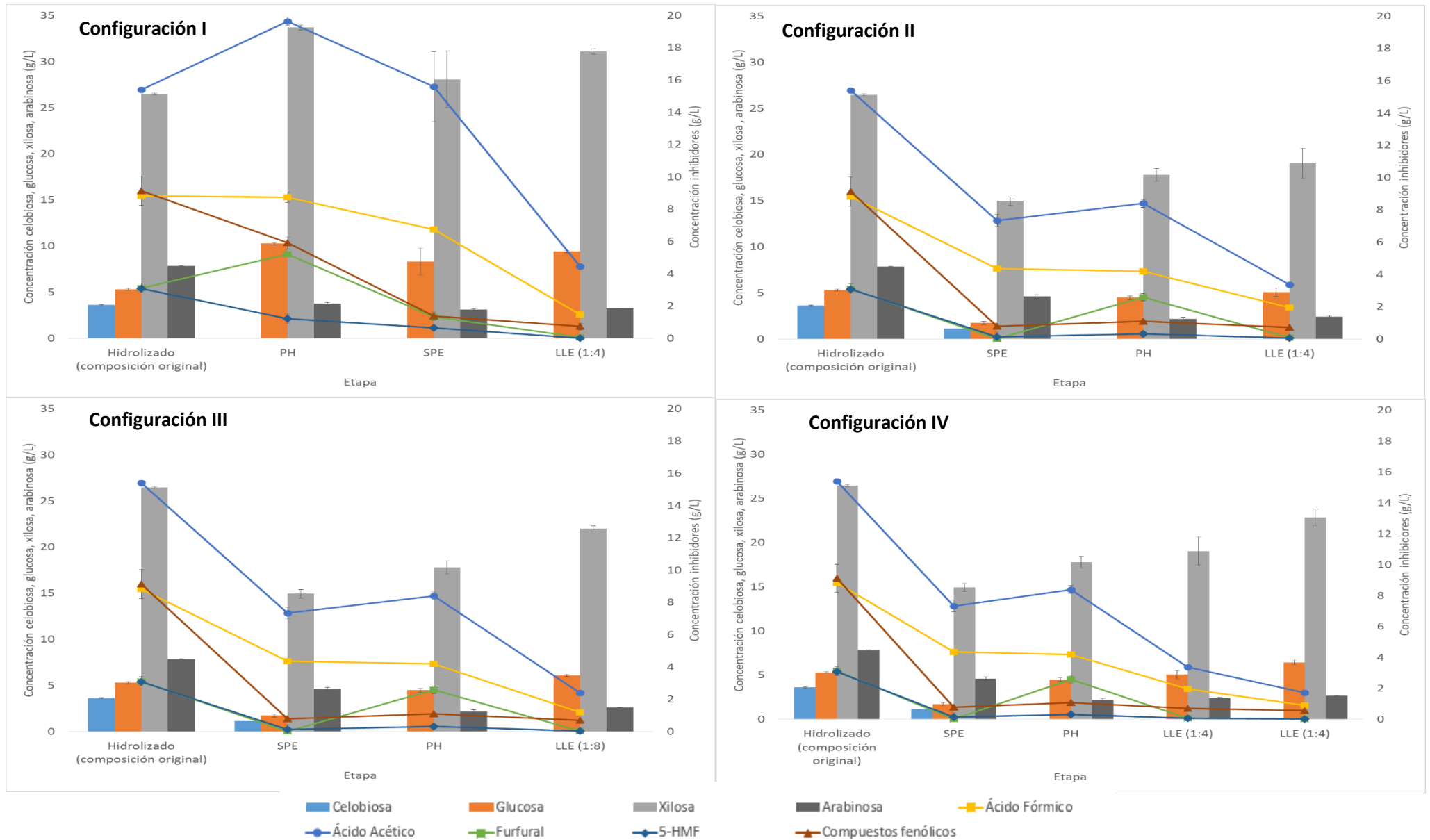


Figura 110. Composición del hidrolizado luego de las etapas de procesamiento del hidrolizado de switchgrass según las distintas configuraciones. PH: Pos-Hidrólisis. SPE: Extracción en fase sólida. LLE: Extracción Líquido-Líquido.

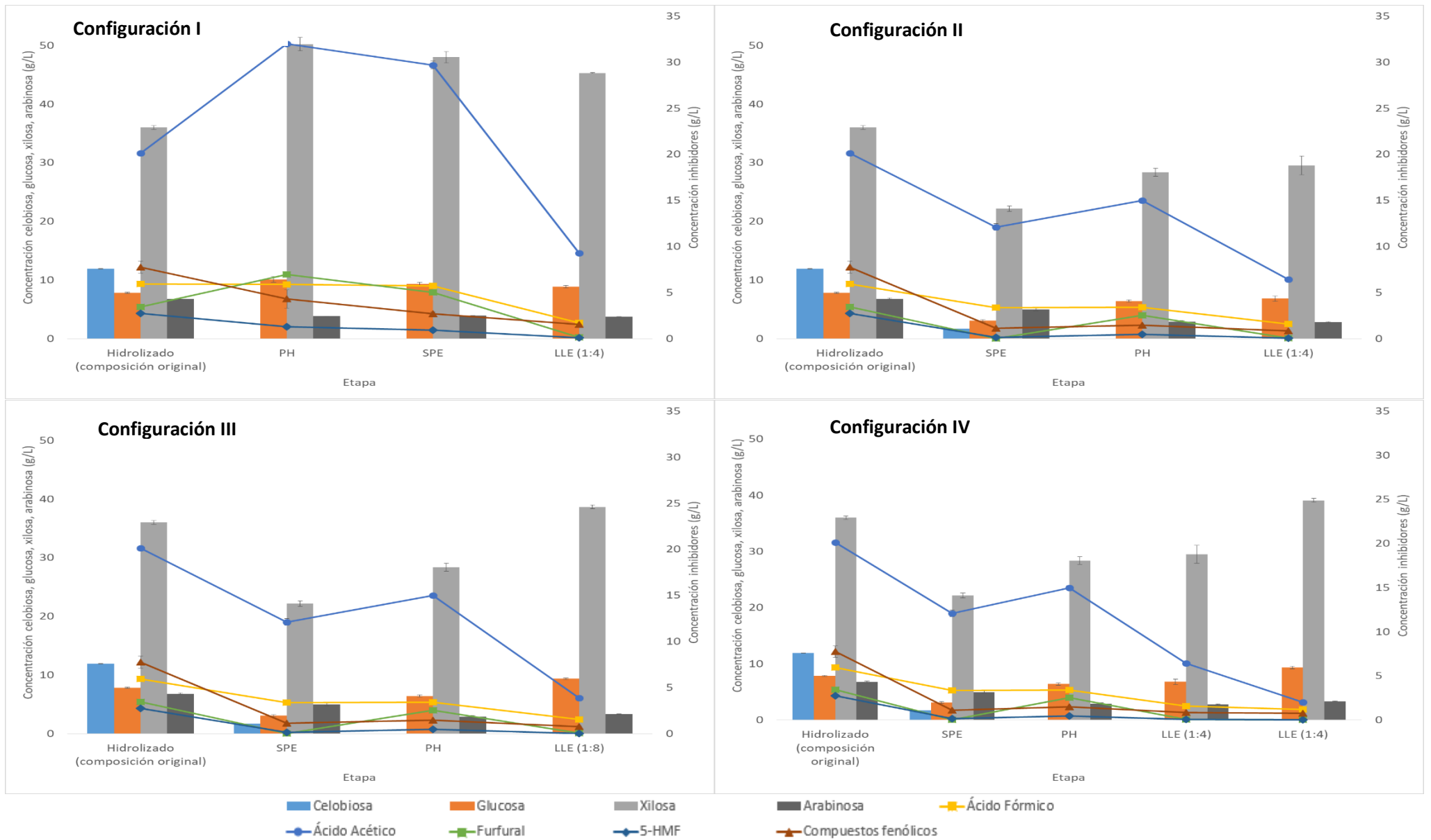


Figura 111. Composición del hidrolizado luego de las etapas de procesamiento del hidrolizado de eucalipto según las distintas configuraciones. PH: Pos-Hidrólisis. SPE: Extracción en fase sólida. LLE: Extracción Líquido-Líquido.

5.3.2.1 Pos-hidrólisis

Como fue discutido previamente, la realización de la pos-hidrólisis como primer paso resultó en un aumento significativo en la concentración de monómeros de azúcares después de la pos-hidrólisis. En el caso del hidrolizado de eucalipto, la glucosa aumentó de 7,8 g/L a 10,1 g/L (29 % más de glucosa después de la hidrólisis), la xilosa de 36,0 g/L a 50,2 g/L (39 % de concentración aumentada) y la celobiosa se hidrolizó totalmente, de 11,9 g/L a 0 g/L. Se observó un comportamiento similar en el hidrolizado de switchgrass, pero con un contenido de glucosa y xilosa menor en el hidrolizado original. La xilosa aumentó la concentración después de la pos-hidrólisis en un 27 % (de 26,5 g/L a 33,7 g/L) y la glucosa aumentó un 94 % (5,3 g/L a 10,3 g/L). La mayor presencia de oligómeros de glucosa en el switchgrass explica este mayor aumento en términos relativos.

El mayor aumento de ácido acético en el hidrolizado de eucalipto (de 20,1 g/L a 32,0 g/L, 59 % más) en comparación con el hidrolizado de switchgrass (de 15,4 g/L a 19,6 g/L, 27 % más) se explica por la mayor sustitución de los oligómeros de xilano con grupos acetilo en la biomasa de eucalipto, como se describió anteriormente.

En ambos hidrolizados, los compuestos fenólicos disminuyeron después de la pos-hidrólisis sulfúrica debido a la formación de humina y precipitación de diversos compuestos. En el caso del hidrolizado de eucalipto los compuestos fenólicos totales pasaron de 7,7 g/L a 4,3 g/L (44 % menos), mientras que en el hidrolizado de switchgrass de 9,1 g/L a 5,9 g/L (35 % menos). Como fue discutido previamente, este hecho se puede relacionar con la formación de huminas. Por otra parte, diferentes compuestos fenólicos (debido a la diferente estructura original de la lignina) que reaccionan de manera distinta a la temperatura y al pH pueden explicar esta diferencia en la reducción de la concentración de compuestos fenólicos entre los hidrolizados de eucalipto y switchgrass (Feng y otros, 2017).

El furfural aumentó significativamente, casi el doble de la concentración previa, debido a la deshidratación de la xilosa y arabinosa presentes en el hidrolizado. Dado que la concentración de arabinosa disminuyó, se podría suponer que la presencia de oligómeros de arabinosa en ambos hidrolizados era insignificante. Este efecto también señala que debería investigarse si se podría utilizar una menor cantidad de ácido sulfúrico, con el fin de minimizar esta degradación y ahorrar reactivos.

Cuando se realizó la pos-hidrólisis después de la extracción en fase sólida (configuración II) hubo un ligero aumento de los monómeros de azúcar en comparación con el paso anterior. Sin embargo, la extracción en fase sólida retuvo algunos de los oligómeros y, por lo tanto, el aumento en la concentración no fue tan significativo como cuando se hizo primero la pos-hidrólisis.

5.3.2.2 Extracción en fase sólida

Prueba de volumen a detoxificar

Para comprobar cuanto volumen de hidrolizado era posible pasar detoxificando satisfactoriamente y sin saturar la columna C18 Sep-PAK (5 g) se eluyeron 60 mL del hidrolizado con mayor carga de compuestos fenólicos (el hidrolizado original de switchgrass). A medida que el hidrolizado salía de la columna se fueron tomando fracciones de 15 mL (Figura 112).

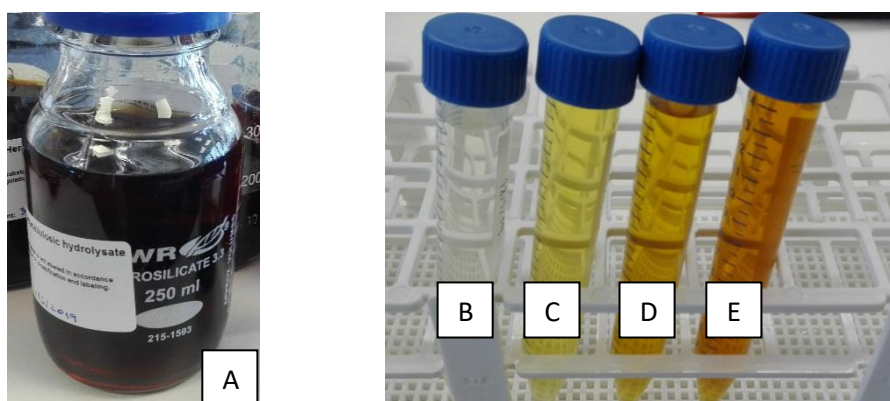


Figura 112. Hidrolizado original (A) y fracciones de 15 mL recuperadas luego de extracción en fase sólida con Sep-PAK (5 g). (B) Primera fracción; (C) segunda fracción; (D) tercera fracción; (E) cuarta fracción.

La concentración de compuestos fenólicos que tuvo cada fracción se muestra en la Figura 113. Estos valores indicaron que volúmenes mayores a 20 mL de hidrolizado resultaban en baja retención de compuestos fenólicos, por lo que llegado a ese volumen se debía proceder a recuperar la columna, eluyéndola con etanol, lo que a su vez permite recuperar los compuestos fenólicos retenidos.

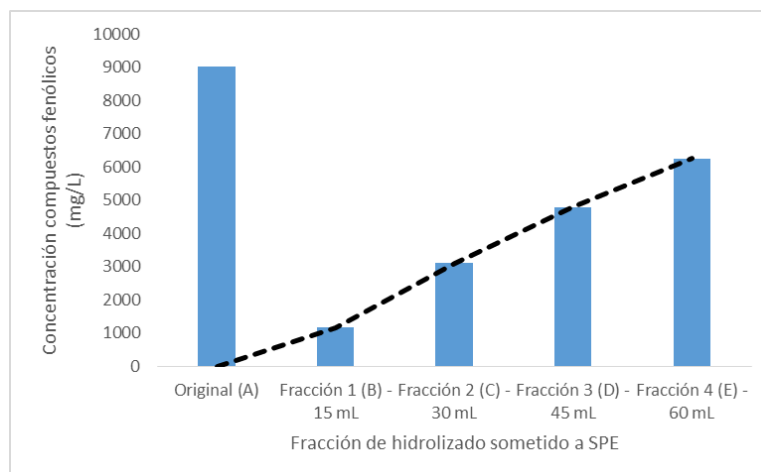


Figura 113. Concentración de compuestos fenólicos en las fracciones de hidrolizado luego de SPE con Sep-PAK C18 (5 g). Las letras entre paréntesis se corresponden con la Figura 97. La línea punteada indica la concentración estimada de compuestos fenólicos según el volumen sometido a SPE en la misma columna.

Composición de los hidrolizados

Como se esperaba, la extracción en fase sólida disminuyó significativamente la concentración de compuestos fenólicos totales para ambos hidrolizados sin importar que paso se realizó primero. Cuando la extracción en fase sólida fue el segundo paso (después de la pos-hidrólisis, configuración D), la columna C18 retuvo 38 % de los compuestos fenólicos en el hidrolizado de eucalipto (1,61 g/L menos que el hidrolizado original). Para el hidrolizado de switchgrass, la columna retuvo el 77 % de los compuestos fenólicos (4,53 g/L menos que el hidrolizado original). Someter los hidrolizados a extracción en fase sólida como primer paso (configuración II) redujo la concentración de compuestos fenólicos 86 % en el hidrolizado de eucalipto (6,64 g/L menos), y 92 % en el hidrolizado de switchgrass (8,35 g/L menos). Considerando que el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico son los principales compuestos fenólicos ligados a la lignina del switchgrass (Paniagua-García y otros, 2018), en contraste con la lignina de eucalipto (mayoritariamente derivada de siringilo), se podría inferir que estos diferentes compuestos fenólicos principales podrían ser la explicación de este fenómeno. Cambiando el pH del hidrolizado después de la pos-hidrólisis (aumentándolo a 5 en lugar de 2,5) no mostró ninguna diferencia en la retención de compuestos fenólicos por la columna. Vale la pena señalar que cuando la pos-hidrólisis se realizó después de la extracción en fase sólida, la concentración de compuestos fenólicos permaneció casi constante, lo que implica que los compuestos fenólicos que podrían precipitar fueron retenidos casi por completo por la columna C18.

Después de la extracción en fase sólida como segundo paso, la concentración de xilosa fue $48,0 \pm 0,9$ g/L para el hidrolizado de eucalipto (4 % menos que el hidrolizado luego de la pos-hidrólisis) y $28,1 \pm 3,1$ g/L para el hidrolizado de switchgrass (17 % menos que el hidrolizado luego de la pos-hidrólisis). La retención de xilosa para el hidrolizado de switchgrass fue mayor, y puede explicarse por interferencia de los otros compuestos presentes en el hidrolizado. Sin embargo, este efecto de retención de azúcares es significativamente mayor cuando se aplicó la extracción en fase sólida como primer paso, como puede ser visto en las cifras de la configuración II. Por ejemplo, la concentración de celobiosa antes de la extracción en fase sólida era de 11,9 g/L en el hidrolizado de eucalipto y luego de la extracción en fase sólida fue de 1,7 g/L, con un comportamiento similar en el hidrolizado de switchgrass. La retención de celobiosa y xilo-oligómeros - como se puede ver con el bajo aumento de concentración de xilosa después de la pos-hidrólisis- fue perjudicial para el objetivo de aumentar la concentración de monómeros. La concentración de xilosa también disminuyó 44 % para ambos hidrolizados debido a la retención de la columna C18, aspecto que además de bajar la concentración del compuesto objetivo (xilosa), también perjudica el otro objetivo propuesto de recuperar los compuestos fenólicos, ya que luego de la elución con etanol estos se encontrarían contaminados con azúcares.

El ácido acético y el ácido fórmico casi no se retuvieron cuando se realizó la pos-hidrólisis primero, pero de manera similar al comportamiento discutido anteriormente para los azúcares, cuando se hizo la extracción en fase sólida primero se observó alta retención de los ácidos.

La concentración de los aldehídos 5-HMF y furfural descendieron levemente en el hidrolizado de eucalipto, de 1.3 g/L a 0,9 g/L en el caso de 5-HMF 7.0 g/L a 5,0 g/L. Sin embargo, en el caso del hidrolizado de switchgrass la retención de estos compuestos fue mucho mayor, al igual que la retención de compuestos fenólicos.

5.3.2.3 Extracción líquido-líquido

El pH de la extracción se ajustó a 2.5, siguiendo el estudio de (Park, Moon y Um, 2013) y la relación hidrolizado a disolvente 1 a 4 (configuraciones I y II), con base en el estudio de (Cebreiros, Guigou y Cabrera, 2017). Para mejorar la extracción de ácido acético también fue probada una proporción de 1 a 8 (configuración III) de volumen de hidrolizado a solvente, y una extracción adicional con una proporción de solvente a

hidrolizado de 1 a 4 (configuración IV). Considerando los cambios de volumen (discutidos en la sección de balances de masa), la eficiencia de extracción con acetato de etilo de los ácidos orgánicos para cada hidrolizado y configuración se muestra en la Figura 114.

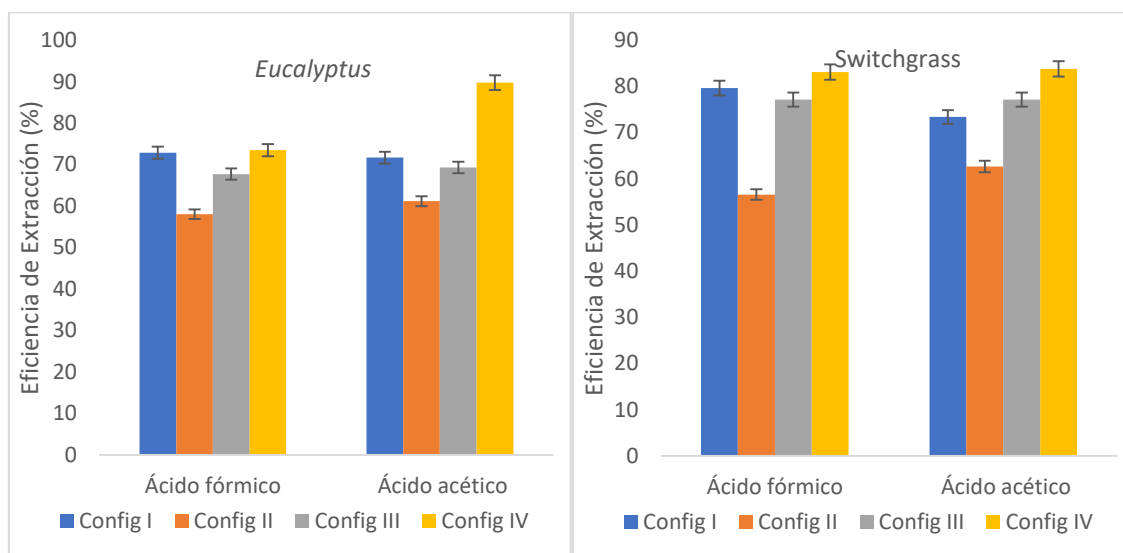


Figura 114. Eficiencia de extracción de los ácidos orgánicos usando acetato de etilo en las diferentes configuraciones.

En la ruta Pos-hidrólisis-Extracción en fase sólida-Extracción líquido-líquido 1:4 (configuración I), la concentración de xilosa en el hidrolizado de eucalipto cayó un 5,6 % en el último paso, siendo la concentración final después de los pasos de detoxificación de 45,3 g/L. Para el switchgrass, la concentración de xilosa permaneció casi constante en el paso final, considerando la desviación estándar. La concentración final de xilosa en el hidrolizado de switchgrass fue de 31,1 g/L. Cuando se aplicó la misma configuración Extracción en fase sólida-Pos-hidrólisis-Extracción líquido-líquido (configuración II) la concentración de xilosa permaneció prácticamente constante, pero debido a la retención de azúcares y oligómeros en la extracción de SPE las concentraciones finales para ambos hidrolizados fue menor, 29,5 g/L de hidrolizado de eucalipto y 19,0 g/L de hidrolizado de switchgrass.

En la misma configuración I, la concentración de ácido acético después de la extracción líquido-líquido tuvo una disminución del 69 %, de 29,7 g/L a una concentración final de 9,3 g/L. Aunque fue una reducción significativa de la concentración de ácido acético, aún era una cantidad elevada y no apta para fermentaciones. Comportamiento similar tuvo el

hidrolizado de switchgrass con una reducción del 71 % en la concentración de ácido acético, aunque la cantidad inicial era menor (15,6 g/L después de la extracción en fase sólida). La concentración final de 4,4 g/L todavía era demasiado alta para las fermentaciones, ya que también debe considerarse el efecto sinérgico con otros compuestos, como los compuestos fenólicos o el ácido fórmico. Este último compuesto también se redujo durante la extracción líquido-líquido, 78 % y 70 % menos de ácido fórmico en el hidrolizado de eucalipto y el hidrolizado de switchgrass. En la configuración II, la concentración final de ácido acético fue de 6,4 g/L y 3,4 g/L. La diferencia fue nuevamente el efecto de la extracción en fase sólida como primer paso, que hizo que la concentración de ácido acético en los hidrolizados fuera significativamente menor debido a la retención de oligómeros de xilosa ramificada con los grupos acetilo que luego de la hidrólisis se encuentran como ácido acético libre.

En la configuración III, la extracción líquido-líquido se probó usando una proporción de 1 parte de hidrolizado y 8 de acetato de etilo para lograr una reducción adicional de la concentración final de ácido acético. Aunque la concentración de ácido acético después de esta extracción fue menor que la concentración obtenida luego de la extracción usando la anterior proporción de acetato de etilo de 1 a 4 (3,8 g/L para el eucalipto y 2,4 g/L para el hidrolizado de switchgrass), todavía era demasiado alta para las fermentaciones. Sin embargo, en el hidrolizado de eucalipto la concentración final de compuestos fenólicos (0,8 g/L), furfural (0 g/L) y 5-HMF (0,04 g/L) fue adecuada. Similares valores se obtuvieron en el hidrolizado de switchgrass (0,03 g/L para furfural, 0,02 g/L de 5-HMF y 0,7 g/L de compuestos fenólicos). La concentración de azúcares después de esta extracción 1:8 fue mayor para ambos hidrolizados, lo que podría explicarse por la disminución del volumen de la fase acuosa, como se discutirá en la siguiente sección.

En la configuración IV, la extracción líquido-líquido se ensayó en dos extracciones secuenciales con una proporción de hidrolizado:acetato de etilo de 1 a 4. La concentración final de ácido acético (2,0 g/L para hidrolizado de eucalipto y 1,7 g/L para hidrolizado de switchgrass) hizo que esta extracción con dos etapas fuera la más eficiente, con una concentración final de ácido acético considerada aceptable para la fermentación con levaduras evolucionadas (Liu, Feist y otros, 2020; Beopoulos, Nicaud y Gaillardin, 2011; Xue y otros, 2018).

5.3.3 Comparativo entre dos columnas para Extracción en Fase Sólida

Con base en estos estudios previos, se definió que la configuración Pos-hidrólisis-Extracción en fase sólida-2 etapas de extracción líquido-líquido (1:4) era la mejor para lograr alta concentración de azúcares con baja cantidad de inhibidores (es decir, poca retención de azúcares, y la mejor extracción de compuestos inhibidores). Se realizó una comparación entre una columna más grande de C18 Sep-PAK (35 mL/10 g de absorbente) y una columna de resina PS-DVB. Los resultados se muestran en la Tabla 33, donde se muestran los porcentajes de recuperación de los distintos compuestos luego de ser sometidos a la extracción en fase sólida donde son retenidos. Cabe señalar que por la técnica empleada no tuvo lugar pérdida apreciable de volumen de hidrolizado en ninguna de las columnas.

La columna C18 mostró valores aceptables de retención de compuestos fenólicos, pero como también tuvo lugar una importante retención de azúcares C6 (glucosa y xilosa). La columna C18 retuvo del 31 al 35 % de la xilosa presente en el hidrolizado (recuperándose por lo tanto del 69 al 65%), mientras que la columna PS-DVB retuvo del 7 al 12 % de la xilosa, mostrando así la conveniencia de la columna PS-DVB para evitar una alta pérdida de azúcares en el hidrolizado. En términos de retención de compuestos fenólicos, la columna C18 tuvo mejor eficiencia, adsorbiendo del 79 al 82 % de ellos.

Por su parte, analizando los valores de extracción de la columna de poliestireno-divinilbenceno se pueden destacar algunos aspectos importantes. Como era de esperar, debido a las partículas poliméricas hidrofóbicas de la resina PS-DVB que absorbe solutos a través de interacciones π - π' y Van der Waals (Huang y otros, 2020), el furfural, el 5-HMF y los compuestos fenólicos fueron altamente retenidos por el columna. La extracción de los compuestos fenólicos fue de 44 % a 51 % en hidrolizados de eucalipto y switchgrass, respectivamente. Ambas columnas tuvieron alta extracción de furfural para los hidrolizados, 100 % en la columna C18 y 97 % a 100 % de extracción en la columna PS-DVB. La concentración de 5-HMF también se redujo a cero la concentración después de la extracción para ambos hidrolizados, pero la concentración inicial fue menor (1,0 g/L en el hidrolizado de eucalipto y 1,5 g/L en el hidrolizado de switchgrass).

La columna de resina PS-DVB también presentó cierta retención de azúcares. En el hidrolizado de eucalipto la concentración de xilosa pasó de 43,9 g/L antes de la extracción

en fase sólida con la columna PS-DVB a 38,5 g/L después de la extracción en fase sólida, mientras que en el switchgrass la concentración pasó de 29,9 g/L a 27,9 g/L.

En el caso de los ácidos orgánicos, el 30 % del ácido fórmico en el hidrolizado de eucalipto se absorbió en la columna de PS-DVB, mientras que el 10 % del ácido fórmico presente en el hidrolizado de switchgrass fue retenido. La columna retuvo el 25 % y el 16 % del ácido acético en los hidrolizados de eucalipto y switchgrass, respectivamente.

Tabla 33. Composición y porcentaje recuperado (% Rec) según las distintas columnas utilizadas.

Compuesto	Columna C18				Columna PS-DVB			
	Hidrolizado de eucalipto		Hidrolizado de switchgrass		Hidrolizado de eucalipto		Hidrolizado de switchgrass	
	Concentración (g/L)	% Rec	Concentración (g/L)	% Rec	Concentración (g/L)	% Rec	Concentración (g/L)	% Rec
Glucosa	6,42 ± 0,07	64	6,77 ± 0,15	60	9,16 ± 0,05	87	10,41 ± 0,06	91
Xilosa	31,8 ± 0,02	69	21,14 ± 0,23	65	38,50 ± 0,54	88	27,88 ± 0,07	93
Arabinosa	0,94 ± 0,07	49	0,91 ± 0,04	40	1,90 ± 0,13	81	2,24 ± 0,18	81
Ácido fórmico	4,41 ± 0,20	61	5,96 ± 0,07	56	5,43 ± 0,37	70	9,18 ± 0,75	91
Ácido acético	15,8 ± 0,35	50	10,74 ± 0,21	50	20,06 ± 0,77	75	13,72 ± 0,52	84
5-HMF	0	0	0	0	0,03	3	0,03	2
Furfural	0	0	0	0	0,03	0	0,02	0
Comp. fenólicos	0,61 ± 0,01	21	0,68 ± 0,20	18	2,36 ± 0,22	56	2,86 ± 0,02	49

5.3.4 Composición final de los hidrolizados y balance de masa

Aunque los valores de concentración de los carbohidratos era el parámetro fundamental a ser controlado debido a que era el hidrolizado final el que iba a ser sometido a un procesamiento posterior (fermentaciones para producir xilitol y carotenoides), el balance de masa fue un parámetro importante a analizar. Considerando los volúmenes obtenidos y las concentraciones de los compuestos antes y después de las distintas operaciones, es posible evaluar las masas retenidas y recuperadas, realizando un balance de masas. Tras

la pos-hidrólisis se produjo una pérdida de volumen de hidrolizado, principalmente debido al agua retenida por las huminas y los compuestos fenólicos precipitados, y al ajuste del pH con carbonato cálcico que generó un “barro” donde el agua era retenida. En el caso del hidrolizado de eucalipto hubo un 21 % de pérdida de volumen, mientras que el hidrolizado de switchgrass sufrió una pérdida de 19 % de volumen. Por esta razón, se procedió a ajustar el pH con hidróxido de sodio, lo que permitió reducir la pérdida de volumen significativamente, siendo la disminución del volumen del 10 % en el caso del hidrolizado de eucalipto y del 8 % en el hidrolizado de switchgrass. Sin embargo, el uso de un dispositivo de presión para recuperar el agua embebida en el precipitado reduciría más la pérdida de volumen después del pos-hidrolizado aumentando la eficiencia de recuperación de los azúcares.

En el caso de las extracciones en fase sólida, todo el líquido de hidrolizado que fue ingresado para someterse a extracción fue expulsado y recuperado, sin pérdida observable de volumen, independientemente de la columna que se utilizó.

En el caso de la extracción con acetato de etilo, hubo una pérdida de volumen de hidrolizado. Utilizando la columna C18, el volumen de hidrolizado recuperado después de la primera extracción con acetato de etilo fue del 88 % al 91 % del volumen original para ambos hidrolizados, mientras que el volumen recuperado después de la segunda extracción fue del 84 % para ambos hidrolizados, lo que hizo una recuperación de volumen total de 76 % del hidrolizado original. Cuando la columna utilizada fue la PS-DVB, en la primera extracción se recuperó del 88 % a 90 % del volumen de hidrolizado, y en la segunda extracción se recuperó el 87 % del volumen previo (hidrolizado de switchgrass) a 92 % (hidrolizado de eucalipto), recuperando en total 77 % a 82 % del volumen pre-extracción líquido-líquido. Este efecto puede explicar el aumento de la concentración de algunos compuestos después de la extracción, por la diferencia del coeficiente de partición de esos compuestos (es decir, permaneciendo en la fase acuosa sin pasar a la fase orgánica). No obstante, la explicación de la disminución del volumen de hidrolizado después de LLE puede encontrarse en la solubilidad mutua del agua y el acetato de etilo (3,3 % de agua en acetato de etilo y 8,7 % de acetato de etilo en agua). El mayor volumen de acetato de etilo utilizado para hacer la extracción da como resultado más solubilización de agua en acetato de etilo que acetato de etilo en agua. Además, se debe considerar la presencia de ácido acético haciendo de este un sistema trifásico, lo que

también puede explicar las diferencias de volúmenes recuperados entre los dos hidrolizados.

La concentración final de azúcares en los hidrolizados comparando las columnas se presentan en la Tabla 34, junto con los porcentajes de recuperación considerando el volumen. En la Figura 115 se representa gráficamente el comportamiento comparativo de las dos columnas para la glucosa, xilosa y arabinosa, tanto para switchgrass como para eucalipto. Como se puede observar usando la columna PS-DVB se obtuvieron mejores porcentajes de recuperación de glucosa y xilosa. En el caso de la arabinosa, el porcentaje de recuperación arrojó resultados diferentes y no se pueden extraer conclusiones. Sin embargo, cabe señalar que la concentración original de arabinosa ya era baja y, considerando la incertidumbre de las determinaciones, las diferencias no fueron significativas.

Tabla 34. Composición del hidrolizado y Eficiencia de Recuperación (ER) de los azúcares luego de todo el proceso. Los valores son referidos a la composición del pos-hidrolizado. PH: Pos-hidrolizado. SPE: Extracción en fase sólida. LLE: Extracción líquido-líquido

Compuesto	PH – SPE con columna C18 – LLE (1:4 x 2)				PH – SPE con columna PS-DVB – LLE (1:4 x 2)			
	Switchgrass		Eucalipto		Switchgrass		Eucalipto	
	g/L	ER (%)	g/L	ER (%)	g/L	ER (%)	g/L	ER (%)
Glucosa	8,50 ± 0,35	57	7,93 ± 0,47	62	11,70 ± 0,05	78	9,89 ± 0,02	77
Xilosa	25,86 ± 0,50	60	37,65 ± 0,72	64	32,44 ± 0,15	83	42,75 ± 0,15	80
Arabinosa	1,44 ± 0,24	47	2,23 ± 0,56	93	2,38 ± 0,21	66	2,05 ± 0,31	72

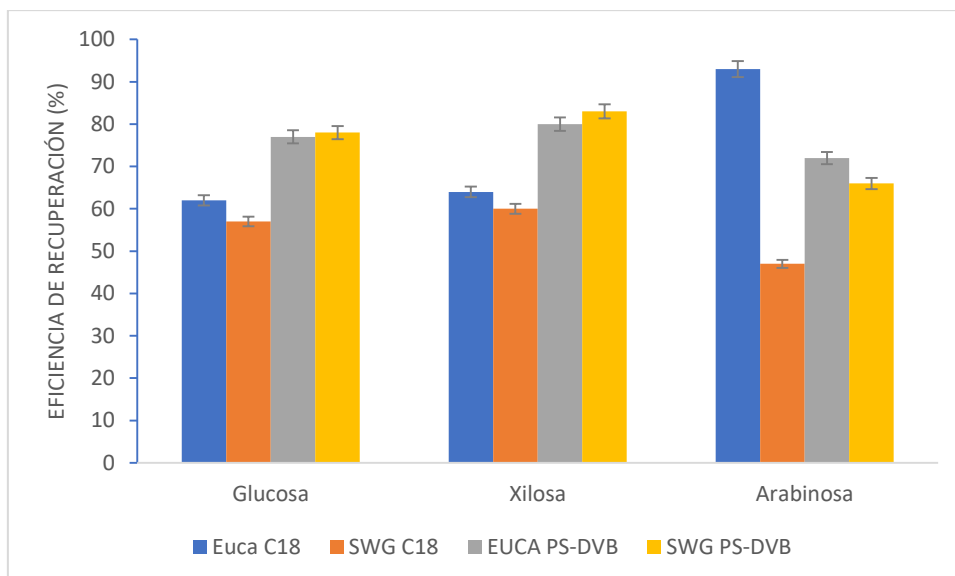


Figura 115. Eficiencia de recuperación de azúcares, luego de todo el proceso para los hidrolizados de switchgrass (SWG) y eucalipto (EUCA), usando las columnas C18 y PS-DVB.

En lo que refiere a la detoxificación propiamente dicha, en la Tabla 35 se presenta la concentración final en el hidrolizado de los compuestos tóxicos, junto con la eficiencia de extracción (considerando el volumen) para las dos columnas y los dos hidrolizados. Como se puede observar en la representación gráfica de las eficiencias de extracción (Figura 116), para el caso de los compuestos fenólicos, la columna C18 tuvo una mejor eficiencia de extracción. En los otros compuestos, los valores son similares para ambas columnas.

Tabla 35. Composición de hidrolizado y Eficiencia de Extracción (EE) de inhibidores luego de todo el proceso. Los valores son referidos a la composición del hidrolizado luego de la pos-hidrólisis, excepto en el caso de los fenólicos que son referidos al hidrolizado original.

Compuesto	PH – SPE con columna C18 – LLE (1:4 x 2)				PH – SPE con columna PS-DVB – LLE (1:4 x 2)			
	Switchgrass		Eucalipto		Switchgrass		Eucalipto	
	g/L	EE (%)	g/L	EE (%)	g/L	EE (%)	g/L	EE (%)
Ácido fórmico	1,55 ± 0,64	89	1,53 ± 0,61	83	2,00 ± 0,26	85	2,15 ± 0,21	69
Ácido acético	2,54 ± 0,63	91	2,67 ± 0,82	93	1,48 ± 0,63	93	3,94 ± 0,81	88
5-HMF	nd	100	nd	100	nd	100	nd	100
Furfural	nd	100	nd	100	nd	100	nd	100
Fenólicos	0,76 ± 0,13	95	0,53 ± 0,02	96	2,28 ± 0,07	82	1,21 ± 0,06	88

nd: no detectado

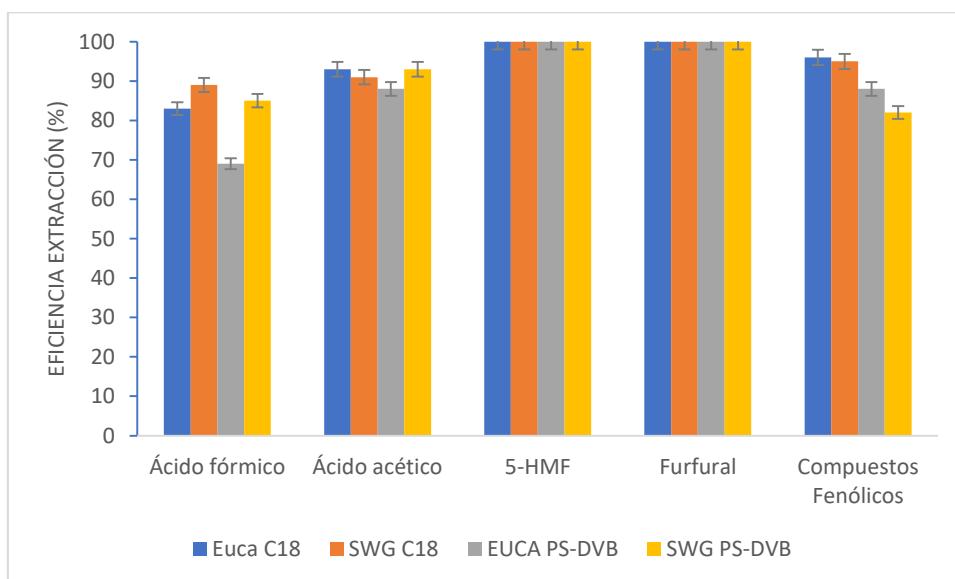


Figura 116. Eficiencia de extracción de compuestos inhibidores, luego de todo el proceso para los hidrolizados de switchgrass (SWG) y eucalipto (EUCA), usando las columnas C18 y PS-DVB.

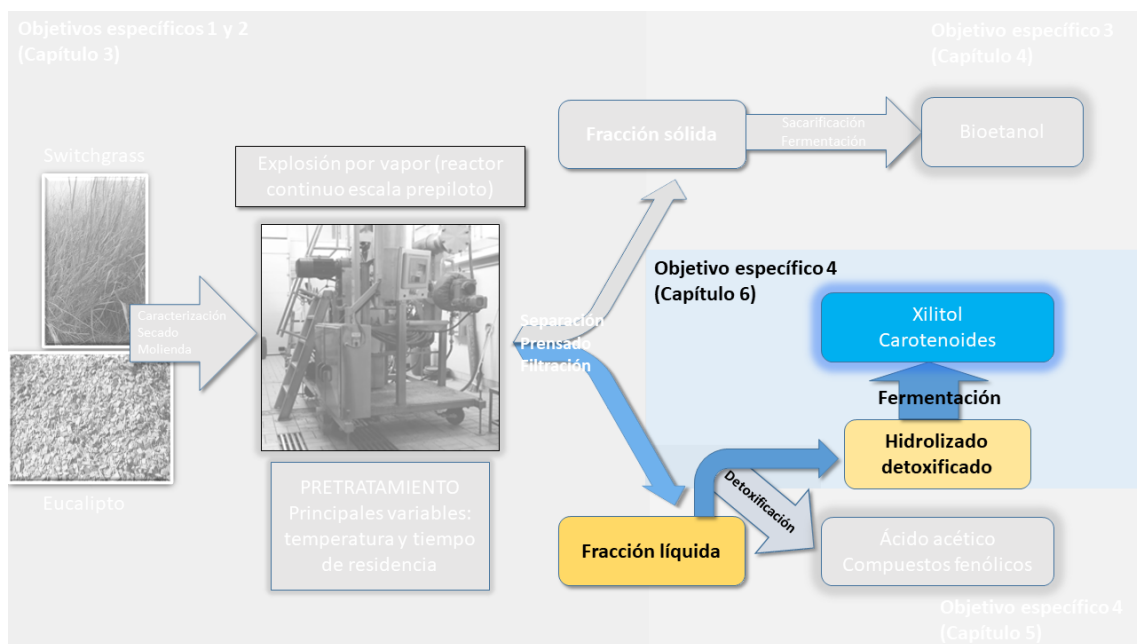
5.4 Conclusiones

La detoxificación de los hidrolizados fue más eficiente siguiendo el orden de pos-hidrólisis, extracción en fase sólida, finalizando con dos extracciones secuenciales con acetato de etilo. Las dos columnas usadas para detoxificar los hidrolizados presentaron buenas eficiencias en la remoción de los compuestos tóxicos; sin embargo, la columna C18 retuvo más azúcares que la columna de PS-DVB, lo que es perjudicial para el objetivo posterior de fermentar estos azúcares.

Del 82 al 88 % de los compuestos fenólicos y del 88 al 93 % del ácido acético pudieron ser extraídos de las fracciones líquidas estudiadas, recuperando del 80 al 83 % de la xilosa.

Esta estrategia de detoxificación permitió recuperar selectivamente compuestos fenólicos y ácidos acético/fórmico, y al mismo tiempo puede considerarse una forma relevante de obtener más valor del hidrolizado al tiempo que contribuye a mejorar su fermentabilidad. Esta estrategia de detoxificación puede ayudar a mejorar la viabilidad económica de las biorrefinerías de etanol, donde se puede producir un producto valioso mediante la fermentación de hidrolizados hemicelulósicos detoxificados, y el ácido acético y los compuestos fenólicos también se pueden recuperar de los hidrolizados como coproductos de valor agregado adicional. Este enfoque puede impactar positivamente en la sustentabilidad del proceso en general, contribuyendo no solo económicamente, sino también al medio ambiente y a la sociedad al minimizar la generación de desechos y al producir químicos a través de rutas que evitan el uso de recursos fósiles.

CAPÍTULO 6. PRODUCCIÓN DE XILITOL Y CAROTENOIDES DE LOS HIDROLIZADOS DE SWITCHGRASS Y EUCALIPTO



6.1 Introducción

Como fue presentado en el capítulo anterior, la fracción líquida obtenida luego de la explosión de vapor estaba compuesta por varios compuestos químicos, encontrándose en mayor cantidad la xilosa. Enfocándose en este monómero, es posible obtener otros compuestos de interés, siendo el xilitol uno de los más importantes, como fue presentado en la introducción. El xilitol es posible producirlo mediante fermentación de la xilosa, pero los ácidos orgánicos, los compuestos fenólicos y los productos de la degradación de los azúcares pueden resultar perjudiciales para las levaduras. Por otra parte, otros compuestos de interés como los carotenoides pueden ser producidos utilizando levaduras oleaginosas que son capaces de metabolizar las hexosas y pentosas. En este capítulo se presenta la investigación (representada esquemáticamente en la Figura 117) realizada para producir estos compuestos a partir de la fracción líquida como fue obtenida luego de la explosión por vapor, así como luego de realizados los pasos de pos-hidrólisis y detoxificación presentados previamente.

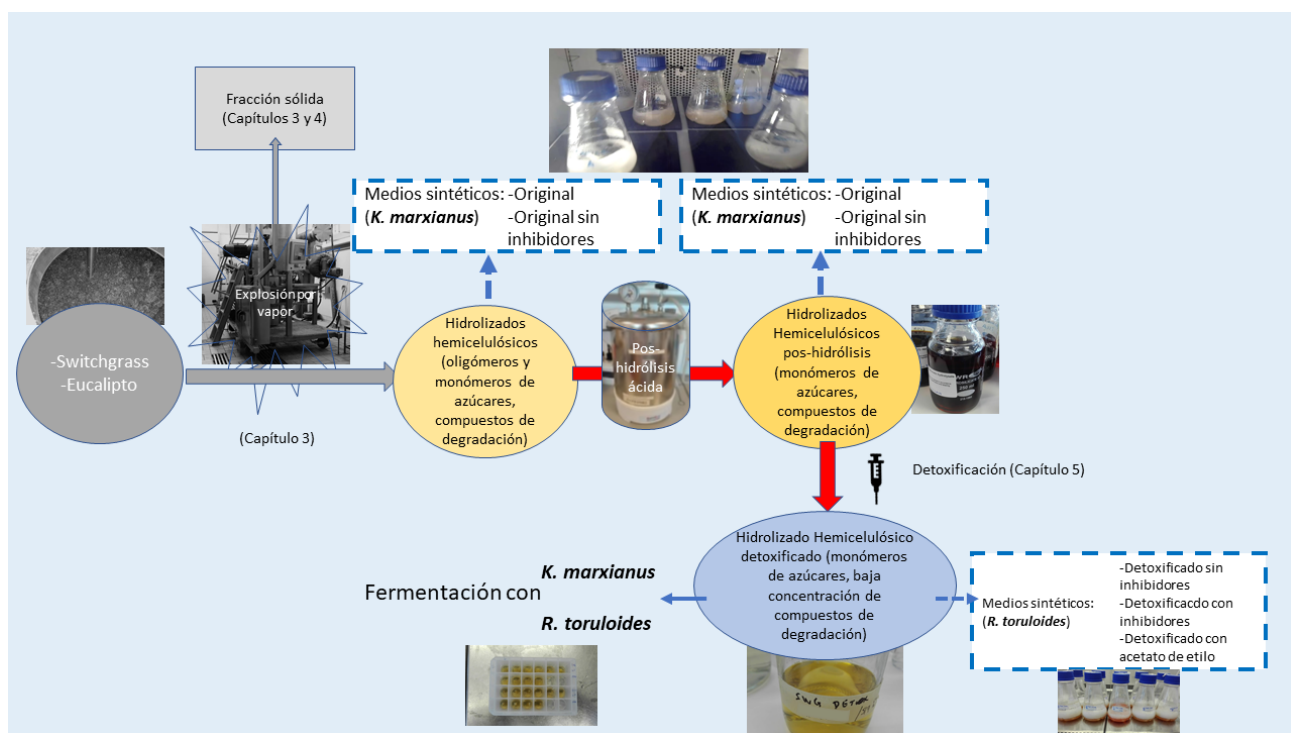


Figura 117. Esquema gráfico de la producción de xilitol y carotenoides a partir del hidrolizado hemicelulósico.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Microorganismos e inóculo

En los experimentos de fermentación se utilizaron dos levaduras evolucionadas del grupo de investigación “Biomass Conversion and Bioprocess Technology” (Universidad Técnica de Dinamarca), con tolerancia mejorada frente a compuestos tóxicos presentes en hidrolizados de biomasa. Las cepas evolucionadas se obtuvieron mediante la evolución adaptativa en laboratorio de las cepas de tipo salvaje de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6373 y *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-1091 (Liu, Radi y otros, 2021). El inóculo de ambas cepas evolucionadas se preparó transfiriendo 1 mL de cultivos madre congelados conservados a -80 °C con glicerol al 30 %, al medio compuesto por (en g/L): extracto de levadura, 3,0; extracto de malta, 3,0; peptona, 5,0; y xilosa, 20,0. El inóculo de *K. marxianus* se incubó en un matraz de 250 mL con deflectores usando 50 mL de medio, a 40 °C, 250 rpm durante 24 h. *R. toruloides* se incubó de la misma manera, pero a 30 °C. Posteriormente, las células se recuperaron por centrifugación y se lavaron dos veces con una solución de NaCl al 0,9 %.

6.2.2 Fermentación usando medios simulados

Se realizaron experimentos de fermentación utilizando medios complejos que simulaban la composición de los hidrolizados con el objetivo de comparar la capacidad de las cepas para crecer en presencia y ausencia de inhibidores. Los medios simulados estaban compuestos por celobiosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ácido fórmico, ácido acético, 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF), furfural, vainillina, ácido vanílico, ácido cumárico, siringaldehído, 4-hidroxibenzaldehído y ácido sirínico, en concentraciones similares a las encontradas en los hidrolizados hemicelulósicos.

Para los experimentos con *K. marxianus*, los medios se suplementaron con (g/L): extracto de levadura, 3,0; extracto de malta, 1,5; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 5,0; KH_2PO_4 , 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; y oligoelementos (mg/L): EDTA, 15; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,5; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,3; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,84; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4; H_3BO_3 , 1,0; y KI, 0,1. Se formularon cuatro medios complejos diferentes para simular la composición del hidrolizado original 1) sin inhibidores y 2) con inhibidores; y del hidrolizado pos-hidrólisis 3) sin inhibidores y 4) con inhibidores. Las fermentaciones se

realizaron en matraces con deflectores de 250 mL utilizando 100 mL de medio a 40 °C, 250 rpm, concentración celular inicial de 1 g/L. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Para los experimentos con *R. toruloides*, los medios se formularon con una relación C/N de 100 teniendo en cuenta glucosa, xilosa y arabinosa como fuentes de carbono. NH₄Cl (0,7-0,8 g/L) fue la fuente de nitrógeno utilizada. Además, el extracto de levadura sin nitrógeno y sulfato de amonio se utilizó en un 10 % de la concentración total de azúcares monoméricos. Se formularon tres medios complejos diferentes para simular la composición de 1) hidrolizado detoxificados sin inhibidores; 2) hidrolizado detoxificado con ácidos fórmico y acético (2.00 g/L y 1.48 g/L, respectivamente, para hidrolizado de switchgrass simulado; 2.15 g/L y 3.94 g/L, respectivamente, para hidrolizado de eucalipto simulado), y 3) hidrolizado detoxificado con acetato de etilo (2,0 g/L). Las fermentaciones se realizaron en matraces con deflectores de 250 mL usando 100 mL de medio a 30 °C, 250 rpm, concentración celular inicial de 1 g/L. Los ensayos se realizaron por duplicado.

6.2.3 Fermentación de los hidrolizados detoxificados

Para ser utilizados como medio de fermentación, el pH de los hidrolizados se ajustó a 5.5 y 4.6 con carbonato de calcio para *K. marxianus* y *R. toruloides*, respectivamente.

Fermentación en mini-reactor

Se realizó una prueba de fermentación en un minibioreactor (Figura 118) compuesto por 4 tubos de 20 mL insertados en un frasco con recirculación de agua, conectado a un baño de agua a 40 ° C. La agitación fue proporcionada por una plataforma magnética. Las fermentaciones se inocularon con aproximadamente 1 g/L de inóculo durante 48 h. Se realizaron dos pruebas en este minibioreactor. En la primera prueba, el sistema se configuró sin introducción forzada de aire, utilizando solo la aireación de la superficie. En la segunda prueba, se utilizó un sistema de burbujeo de aire para proporcionar más oxígeno.

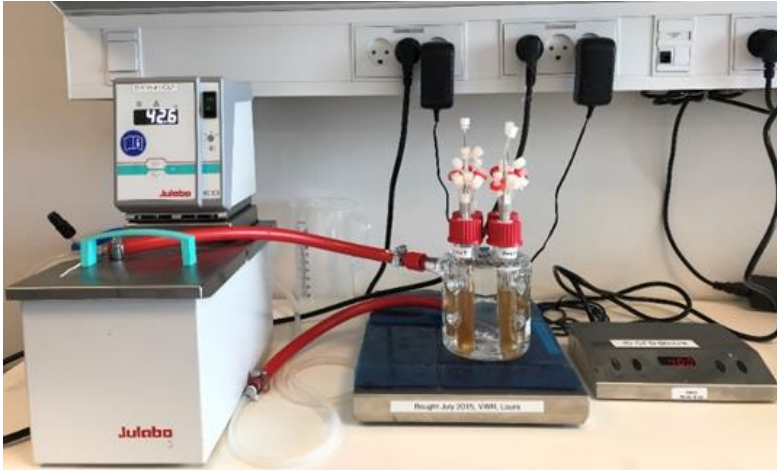


Figura 118. Configuración experimental del mini-reactor.

Fermentación en micro-reactores

Los ensayos se realizaron con y sin suplementación de los hidrolizados con nutrientes (sales y extractos). En los medios suplementados, los nutrientes se añadieron a los hidrolizados en la misma cantidad que se utilizó para la preparación de medios complejos simulados.

Los experimentos de fermentación se realizaron en placas de microtitulación de 24 pocillos (Enzyscreen, Países Bajos) utilizando 3 ml de hidrolizado por pocillo (Figura 119). Las placas se mantuvieron en una incubadora de agitación orbital con 50 mm de amplitud, a 300 rpm (New Brunswick, EE. UU.). El muestreo se realizó eliminando completamente el volumen del pozo seguido de estimación de la evaporación del agua. Los experimentos de control para estimar la evaporación del agua durante la fermentación se realizaron con medio no inoculado. Se estimó la evaporación del agua y se utilizó el valor para ajustar el volumen de los pozos de fermentación utilizando agua desionizada estéril (no se consideró la formación de dióxido de carbono). Las fermentaciones se realizaron a 40 °C y 30 °C para *K. marxianus* y *R. toruloides*, respectivamente. Los ensayos se realizaron por duplicado.

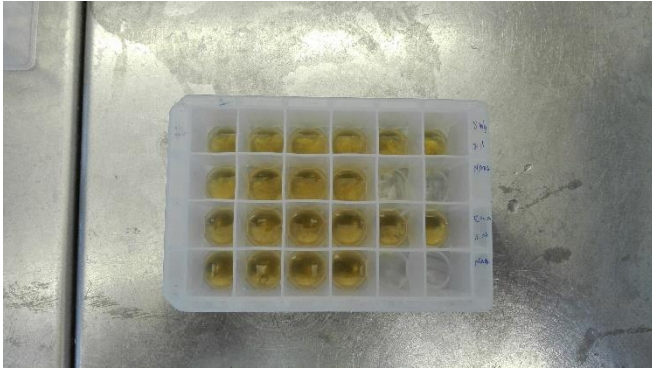


Figura 119. Fermentación en micro-reactores.

6.2.4 Métodos analíticos

La concentración de carbohidratos, ácidos orgánicos, furfural, 5-HMF y compuestos fenólicos en los hidrolizados se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se cuantificaron celobiosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético, ácido fórmico, furfural y 5-HMF utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución Dionex Ultimate 3000 UHPLC + Focused (Dionex Softron GmbH, Alemania) con una columna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) a 60 °C, y H₂SO₄ 5,0 mM como fase móvil a un caudal de 0,6 mL/min. Los azúcares y ácidos se detectaron usando un detector de índice de refracción Shodex RI-101, mientras que el 5-HMF y el furfural se detectaron usando medición UV a 254 nm. Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron por método colorimétrico utilizando ácido gálico como estándar (Ballesteros, Teixeira y Mussatto, 2014). El nitrógeno en los hidrolizados detoxificados se cuantificó como nitrógeno amino primario usando el kit de ensayo PANOPA (Megazyme).

Para la cuantificación de carotenoides, se centrifugó 1 mL de muestra con células (10000 rpm, 5 min, 4-5 °C), se lavó dos veces con agua destilada, se resuspendió en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se incubó en un Thermomixer a 30 °C durante 15 minutos. Luego, se centrifugó la muestra (10000 rpm, 5 min, 4-5 °C) y se recuperó el extracto. Este procedimiento se repitió hasta que las células se volvieron blancas y se combinaron todos los extractos. La concentración de carotenoides se midió mediante absorbancia a 450 nm frente a DMSO, utilizando como estándar β -caroteno disuelto en DMSO (Liu, Feist y otros, 2020).

Durante el curso de fermentación, los azúcares totales se estimaron midiendo los sólidos solubles totales expresados por °Brix usando un refractómetro óptico (Atago, Japón) y

agua como blanco. Las muestras de fermentación para el análisis por HPLC se centrifugaron (9600 g, 5 min, 5 °C) usando una centrífuga Micro star 17 R (VWR, Dinamarca). Los sobrenadantes se mantuvieron en un congelador a -20 °C hasta el análisis. La concentración celular se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm usando un espectrofotómetro V-1200 (VWR, Dinamarca), que se correlacionó con la concentración usando una curva de calibración preparada para cada levadura. Las curvas de calibración se validaron para un rango de DO de 0,1 a 0,8 ($R^2 = 1,0$). La tasa máxima de crecimiento específico (μ_{\max} , h^{-1}) se determinó como la pendiente de la región lineal en un gráfico $\ln(X/X_0)$ versus tiempo, donde X (g/L) era la concentración celular en un momento específico, y X_0 (g/L) fue la concentración celular en el tiempo inicial (0 h).

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Fermentación de medios sintéticos por *K. marxianus*

El rendimiento de fermentación de *K. marxianus* en términos de velocidad máxima de crecimiento específico (μ_{\max}) y consumo de azúcares (estimado por la diferencia entre los valores iniciales y finales de °Brix (Δ °Brix)) se presenta en la Tabla 36.

Tabla 36. Rendimiento de fermentación de *Kluyveromyces marxianus* en medios complejos que simulan la composición del hidrolizado

Condición simulada del hidrolizado	Switchgrass simulado		Eucalipto simulado	
	μ_{\max} (h^{-1})	Δ °Brix	μ_{\max} (h^{-1})	Δ °Brix
Hidrolizado original sin inhibidores	0,184 ± 0.002	2,85 ± 0.07	0,201 ± 0.001	3,00 ± 0,00
Hidrolizado original con inhibidores	-	-	-	-
Pos-hidrolizado sin inhibidores	0,184 ± 0.004	2,75 ± 0.07	0,192 ± 0.003	2,65 ± 0,07
Pos-hidrolizado con inhibidores	-	-	-	-

Como puede verse, *K. marxianus* tuvo un comportamiento similar en ambos medios complejos simulando los hidrolizados sin inhibidores, con μ_{\max} de 0.184 - 0.201 h^{-1} y un Δ °Brix de 2.65-3.00. La diferencia entre los medios originales y pos-hidrolizados sin inhibidores fue el contenido de azúcares. Los hidrolizados pos-hidrolizados presentaron mayor cantidad de azúcares, como fue mostrado en las Tabla 31 y Tabla 32 (Capítulo 5).

Estos rendimientos de fermentación revelaron que el aumento de concentración de azúcares no afectó el desempeño de la levadura, que fue capaz de crecer y consumir azúcares de manera similar en ambas condiciones. Sin embargo, en presencia de inhibidores, es decir en condiciones más similares a las de los hidrolizados reales, la levadura no pudo crecer ni consumir azúcar. Estos resultados permitieron concluir que la cantidad de inhibidores presentes en los hidrolizados es perjudicial para *K. marxianus* y era necesario el proceso de detoxificación -presentado en el capítulo anterior- para superar esta barrera.

6.3.2 Fermentación de hidrolizados detoxificados por *K. marxianus*

Los hidrolizados detoxificados obtenidos luego de detoxificar (Capítulo 5) fueron probados como medio de fermentación para la producción de xilitol por *K. marxianus*.

Fermentación en mini-reactor

Las fermentaciones se realizaron en el sistema que se muestra en la Figura 118. Aunque este sistema presentaba algunas ventajas para probar los medios detoxificados (en particular el uso de un volumen intermedio de hidrolizados detoxificados), la levadura no creció en las pruebas realizadas. En la primera prueba, la aireación solo estaba dada por la agitación usada (pastillas magnéticas en el fondo del tubo), lo que probablemente fue insuficiente. Observando que la fermentación no se producía y sospechando que la falta de aire era la responsable de este problema, se realizó una segunda prueba suministrando oxígeno al sistema. Sin embargo, esto tampoco funcionó, por lo que debería estudiarse más el sistema evaluando más exhaustivamente los parámetros del sistema (como la agitación) que influyen en la fermentación.

Fermentación en micro-reactores

Los ensayos se llevaron a cabo con y sin suplementación de nutrientes a los hidrolizados. Como se puede observar en la Figura 120 para el caso del hidrolizado de switchgrass, la remoción de compuestos tóxicos y la adición de nutrientes beneficiaron la velocidad de consumo de azúcares, que se agotaron en 48 horas, pero esto favoreció el crecimiento celular en lugar de la producción de xilitol.

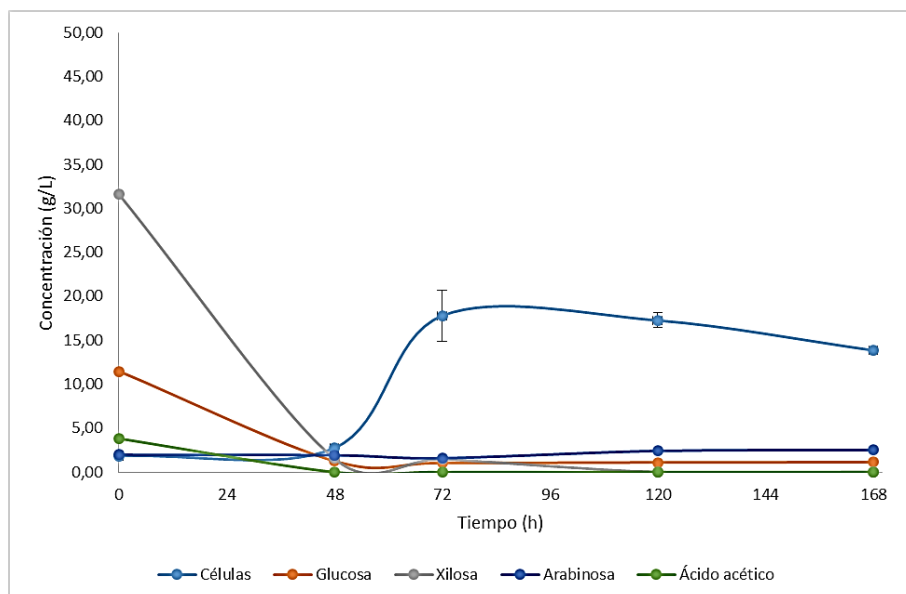


Figura 120. Fermentación del hidrolizado detoxificado de switchgrass con agregado de nutrientes.

Por su parte, la fermentación del hidrolizado de eucalipto con agregado de nutrientes (Figura 121) tuvo un comportamiento similar al del hidrolizado de switchgrass, con crecimiento celular pero sin observarse producción de xilitol. Dado que en los dos hidrolizados la segunda muestra se tomó a las 48 horas de cultivo y se observó un rápido consumo de azúcar durante este período, no es posible afirmar que no hubo formación de xilitol en estos experimentos. Sin embargo, cuando se compara con la fermentación de medios no suplementados, está claro que la suplementación nutricional desvió el metabolismo de la levadura hacia una mayor formación de células en lugar de la producción de xilitol.

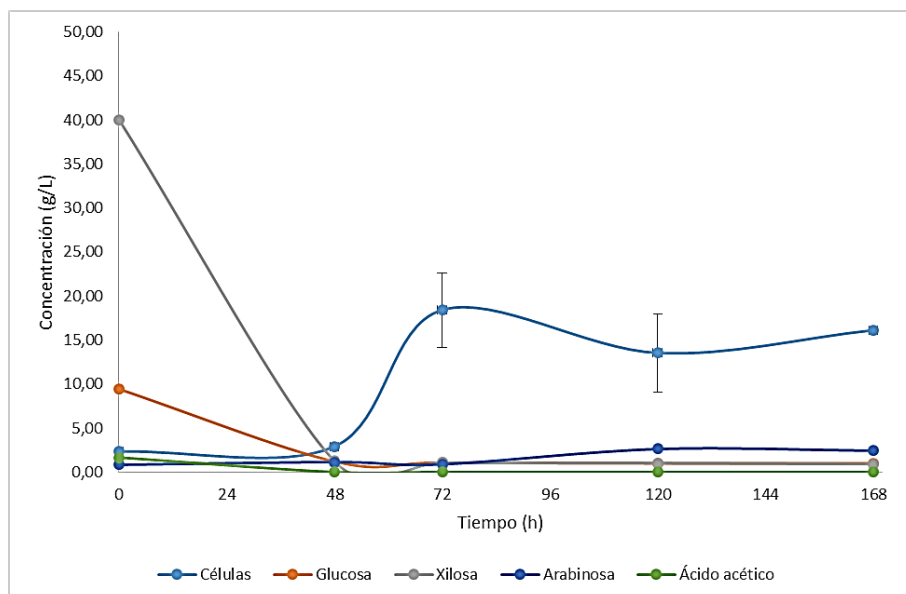


Figura 121. Fermentación del hidrolizado detoxificado de eucalipto con agregado de nutrientes.

La fermentación de hidrolizados detoxificados sin la adición de nutrientes resultó en un tiempo de fermentación más largo, pero también en una mayor producción de xilitol y un menor crecimiento celular, como se puede observar en la Figura 122 para el caso del hidrolizado de switchgrass. La concentración máxima de xilitol obtenida en este hidrolizado fue $13,71 \pm 0,19$ g/L que correspondió a $0,48 \pm 0,04$ g xilitol/g xilosa.

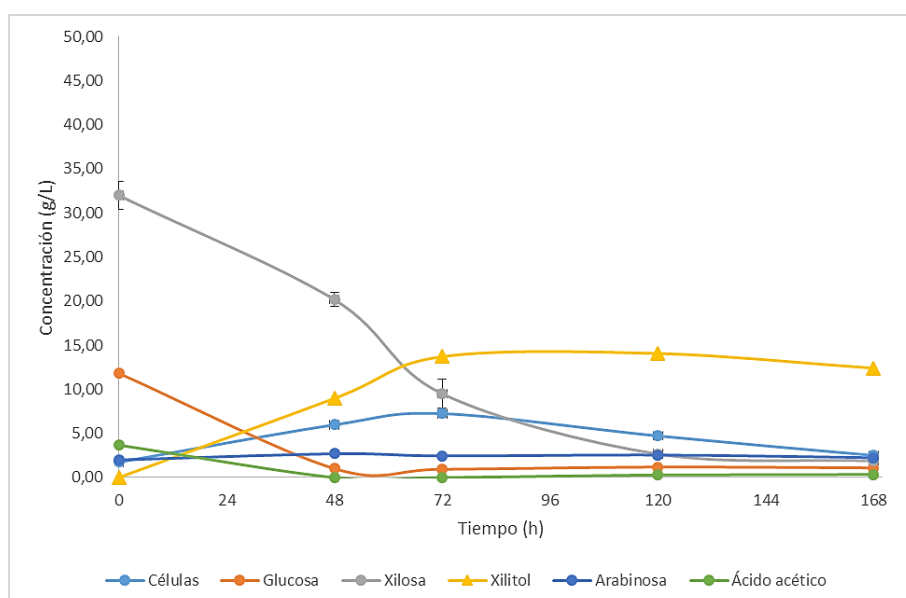


Figura 122. Fermentación del hidrolizado detoxificado de switchgrass sin agregado de nutrientes.

En la fermentación del hidrolizado de eucalipto sin agregado de nutrientes (Figura 123) la concentración de xilitol alcanzó $28,07 \pm 1,70$ g/L y correspondió a $0,68 \pm 0,10$ g de

xilitol/g de xilosa. Estos resultados sugieren que la mayor cantidad de azúcares y posiblemente el menor contenido de compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado de eucalipto detoxificado (Tabla 34 y Tabla 35, utilizando columna PS-DVB) influyó en el metabolismo de la levadura, lo que resultó en una mayor producción de xilitol. La alta concentración de azúcares reduce el nivel de oxígeno disuelto libre en la interfaz de la membrana de la levadura. La formación de xilitol se ve favorecida en condiciones de estrés fisiológico, en particular en condiciones anaeróbicas o de oxígeno limitado, que provocan la acumulación de NADH y luego la inhibición de la xilitol deshidrogenasa ligada a NAD (Goli, Panda y Linga, 2012).

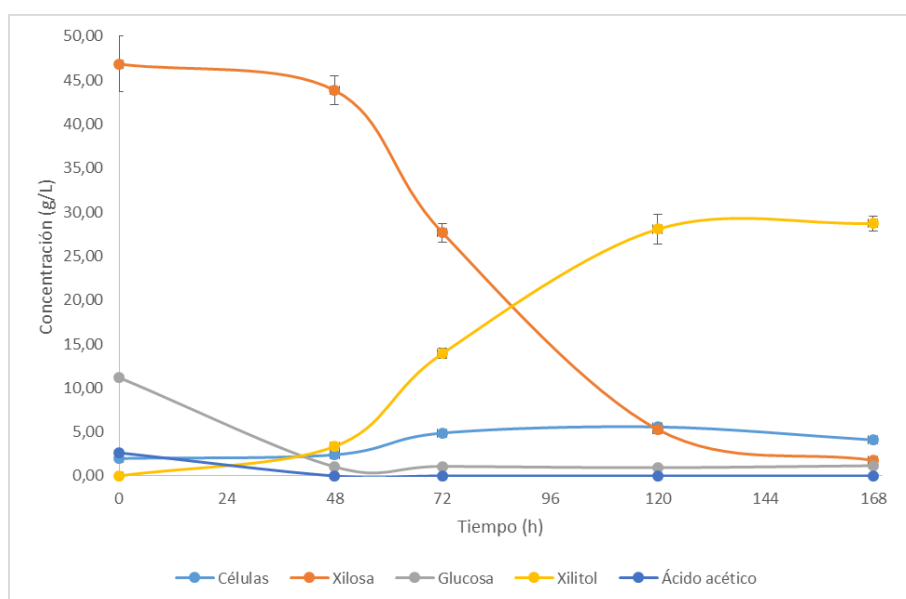


Figura 123. Fermentación del hidrolizado detoxificado de eucalipto sin agregado de nutrientes.

Además del mayor contenido de azúcar, el mayor contenido de nitrógeno en el hidrolizado de eucalipto también puede haber influido positivamente en el rendimiento de la levadura para producir xilitol. El nitrógeno, medido como nitrógeno amino primario, correspondió a 18 ± 4 mg/L en hidrolizado de switchgrass y 46 ± 5 mg/L en hidrolizado de eucalipto. Sin embargo, los resultados de la fermentación sugieren una posible falta de elementos esenciales en los hidrolizados debido al largo tiempo observado de fermentación. Los elementos esenciales son importantes para la formación de enzimas en la vía metabólica. Por ejemplo, el extracto de levadura contiene biotina, una vitamina esencial para el metabolismo de la levadura hacia la fermentación (Lee y otros, 1988; Parrondo, García y Díaz, 2009), así como potasio, magnesio y otros metales que juegan un papel importante en la actividad enzimática, homeostasis y división celular entre otros

(Udeh y Kgatla, 2013). Un correcto equilibrio de nutrientes es muy importante para favorecer el metabolismo de las levaduras para la síntesis del producto de interés.

Aunque se logró una producción significativa de xilitol a partir de hidrolizados detoxificados y no suplementados ($0,48 \pm 0,04$ g de xilitol/g de xilosa del hidrolizado de switchgrass y $0,68 \pm 0,10$ g de xilitol/g de xilosa del hidrolizado de eucalipto), hay margen para mejorar el rendimiento de xilitol ya que el valor teórico máximo de producción de xilitol a partir de xilosa corresponde a $0,917$ g/g (Barbosa y otros, 1988). Sin embargo, estos resultados se comparan bien con los estudios realizados en experimentos a mayor escala. (Zhang y otros, 2021), por ejemplo, produjeron xilitol con un rendimiento de $0,32$ g/g a partir de un medio que contenía 300 g/L de xilosa utilizando un biorreactor de 5 L, mientras que (Prabhu y otros, 2020) obtuvieron un rendimiento de xilitol de $0,67$ g/g de xilosa pura y $0,54$ g/g de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar utilizando un biorreactor de $2,5$ L. Vale la pena señalar que los cultivos a pequeña escala, en el rango de microlitros y mililitros, han ganado una importancia creciente en los últimos años en el desarrollo de procesos biotecnológicos modernos, desempeñando un papel esencial en experimentos de detección de alto rendimiento, así como para la producción de compuestos específicos, pruebas fenotípicas, estudios mecanicistas, entre otros (Lattermann y Büchs, 2015; de Mello y otros, 2019; Schäpper y otros, 2009). También se ha informado de escalabilidad y correlación con biorreactores de tanque agitado a escala de laboratorio (Garrigós-Martínez y otros, 2021; Hemmerich y otros, 2021); sin embargo, la aireación es un parámetro crítico. En el caso del presente estudio, establecer las condiciones óptimas de oxígeno disuelto y un adecuado equilibrio de nutrientes esenciales que se agregarán al hidrolizado, por ejemplo, podría ayudar a alcanzar mayores rendimientos de producción. De todos modos, los resultados demuestran que los hidrolizados hemicelulósicos producidos por la explosión de vapor de switchgrass y eucalipto presentan una buena fermentabilidad y pueden usarse para producir xilitol después de la detoxificación.

6.3.3 Fermentación de medios sintéticos por *R. toruloides*

Para el cultivo de *R. toruloides* se formularon medios complejos que simulaban la composición de hidrolizados de switchgrass y eucalipto detoxificados (Tabla 34, utilizando columna PS-DVB). Como se observa en la Figura 124, en el caso de switchgrass la cepa exhibió una tasa de crecimiento lenta cuando se cultivó en dicho

medio (identificado como “sin inhibidores”), lo que podría atribuirse al mayor contenido de xilosa que de glucosa en el medio. En esta vía metabólica es necesaria la inducción de un sistema de entrada de xilosa, que es reprimido por la presencia de glucosa (Ounine y otros, 1985). Este crecimiento lento en medio sin inhibidores también tuvo lugar en el caso del hidrolizado de eucalipto, como se puede observar en la Figura 125. Este crecimiento de levadura y total de azúcares consumido independientemente del hidrolizado utilizado, sugiere que el contenido de azúcares y la diferencia en las proporciones de xilosa a glucosa entre los hidrolizados (aproximadamente 2,7 en hidrolizado de switchgrass y 4,3 en hidrolizado de eucalipto) no afectaron el rendimiento de la cepa para crecer. Luego de 144 h, se observó una producción de carotenoides de $7,96 \pm 0,64$ mg/L en medio complejo simulando hidrolizado de eucalipto sin inhibidores y $8,29 \pm 0,50$ mg/L en medio complejo simulando hidrolizado de switchgrass sin inhibidores. Dichos valores están en estrecha concordancia con un estudio previo sobre la producción de carotenoides por esta misma cepa de levadura (Liu, Feist y otros, 2020).

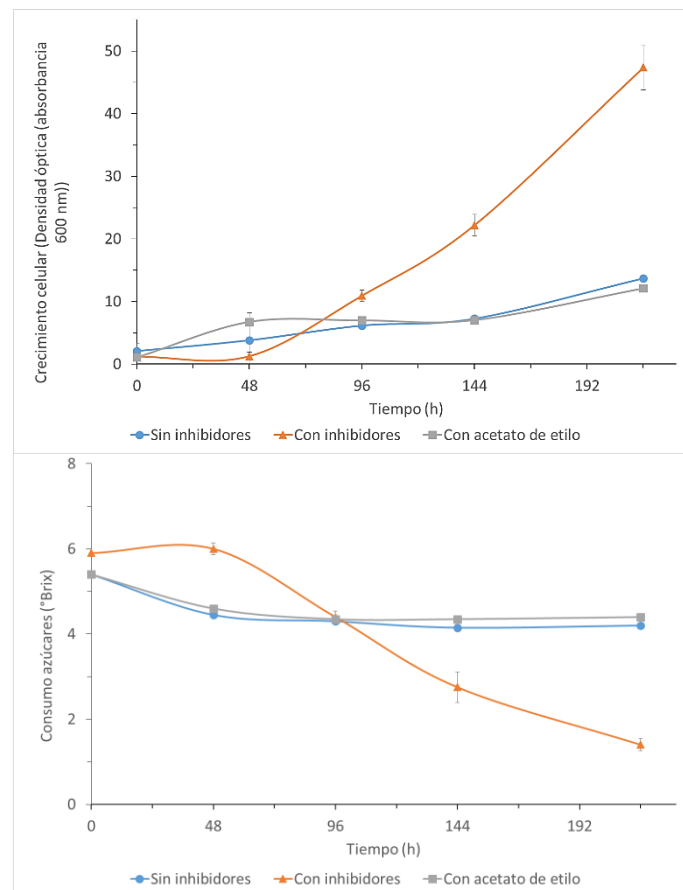


Figura 124. Crecimiento celular (gráfica superior) y consumo estimado de azúcares (gráfica inferior) durante la fermentación de medios sintéticos simulando la composición de hidrolizado de switchgrass por *R. toruloides*.

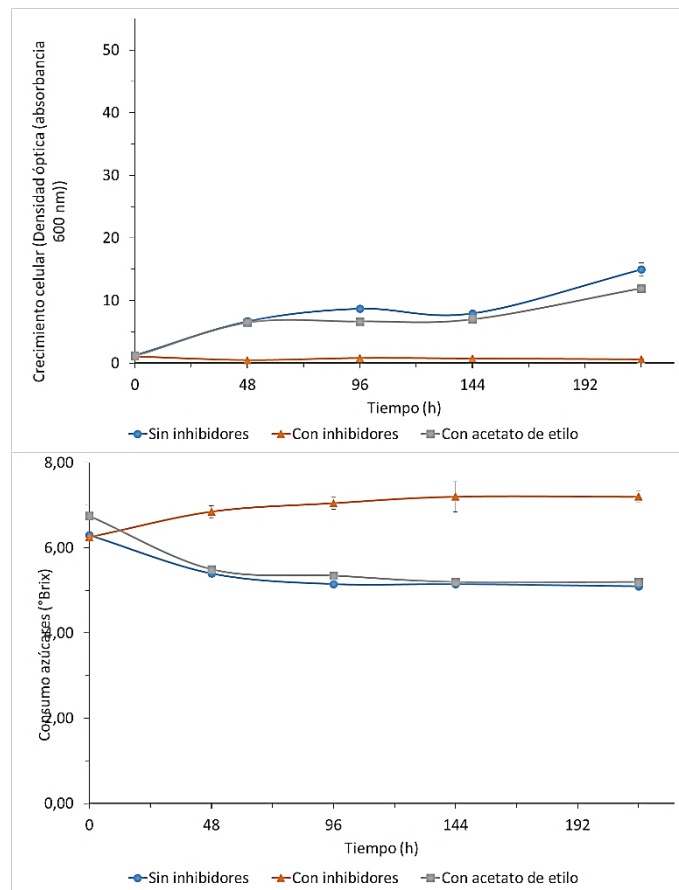


Figura 125. Crecimiento celular (gráfica superior) y consumo estimado de azúcares (gráfica inferior) durante la fermentación de medios sintéticos simulando la composición de hidrolizado de switchgrass por *R. toruloides*.

Por otro lado, se observaron resultados interesantes en medios simulados que contenían inhibidores. En medio que simulaba hidrolizado de switchgrass que contenía inhibidores (2,0 g/L de ácido fórmico y 1,48 g/L de ácido acético) (Figura 124), se favoreció el crecimiento de la levadura; mientras que en medio simulando hidrolizado de eucalipto con inhibidores (2,93 g/L de ácido fórmico y 3,94 g/L de ácido acético), el crecimiento de la levadura se inhibió completamente (Figura 125). De hecho, la cepa de *R. toruloides* utilizada en este estudio fue desarrollada previamente por evolución adaptativa de laboratorio para tolerar mejor los inhibidores presentes en los hidrolizados de paja de trigo (que contenían 1,5 g/L de ácido acético y 1,5 g/L de compuestos fenólicos totales) (Liu, Radi y otros, 2021). El metabolismo de las levaduras oleaginosas requiere un suministro constante de acetil-CoA y malonil CoA. Por lo tanto, una baja cantidad de acetato contribuye al ciclo de TCA estimulando la síntesis de carotenoides y ácidos grasos (Beopoulos, Nicaud y Gaillardin, 2011; Xue y otros, 2018). Sin embargo, gran cantidad de acetato puede afectar fuertemente el rendimiento de la levadura. Esto explicaría la

inhibición del crecimiento de levadura observada en hidrolizado de eucalipto simulado. Cabe destacar que el ácido acético tiene un efecto inhibitor por encima de ciertas concentraciones (dependiendo de la levadura y evolución), pero también puede ser utilizado como fuente de carbono por las levaduras cuando está presente en baja concentración (Chen y otros, 2009; Liu, Feist y otros, 2020).

Como el último paso de la detoxificación implicó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo, se realizaron experimentos de fermentación con agregado de acetato de etilo en los medios sintéticos sin inhibidores. En estos experimentos, la presencia de 2,0 g/L de acetato de etilo en el medio afectó ligeramente el crecimiento de la levadura en ambos hidrolizados simulados. Cuando se cultivó en medio simulando switchgrass con acetato de etilo, la levadura produjo $7,81 \pm 0,60$ mg/L de carotenoides a las 144 h, valor muy similar al obtenido en el medio simulado sin inhibidores. Estos resultados revelan que la etapa de detoxificación utilizada en el presente estudio empleando acetato de etilo como disolvente de extracción, no sería un problema para el posterior cultivo de *R. toruloides* en el hidrolizado, ya que después de la detoxificación, una pequeña cantidad de acetato de etilo se diluye en el hidrolizado.

R. toruloides es una levadura oleaginosa con capacidad para producir lípidos y carotenoides (Liu, Radi y otros, 2021). Esta levadura es un productor natural de β -caroteno, γ -caroteno, toruleno y torularodina, que son compuestos valiosos para las industrias química, farmacéutica, de piensos y cosmética (Qi y otros, 2020; Lin y otros, 2017). En este estudio, las células de levadura adquirieron un color rojo anaranjado incluso en los experimentos en los que no se observó crecimiento celular. Sin embargo, las células cultivadas en hidrolizado simulado sin inhibidores presentaron un color naranja claro (Figura 126, izquierda), mientras que se observó un color rojo anaranjado más fuerte en el hidrolizado simulado con inhibidores (Figura 126, derecha). De acuerdo con los probables carotenoides presentes en el hidrolizado fermentado y la observación del color, se podría sugerir que hubo una prevalencia de γ -caroteno (Liu, Radi y otros, 2021; Buzzini y otros, 2007). Sin embargo, una producción asociada de lípidos en el medio simulado sin inhibidores podría explicar el color más claro en comparación con el medio con inhibidores, ya que los carotenoides se forman en mayor cantidad en condiciones de estrés (Elfeky y otros, 2019; Liu, Radi y otros, 2021).

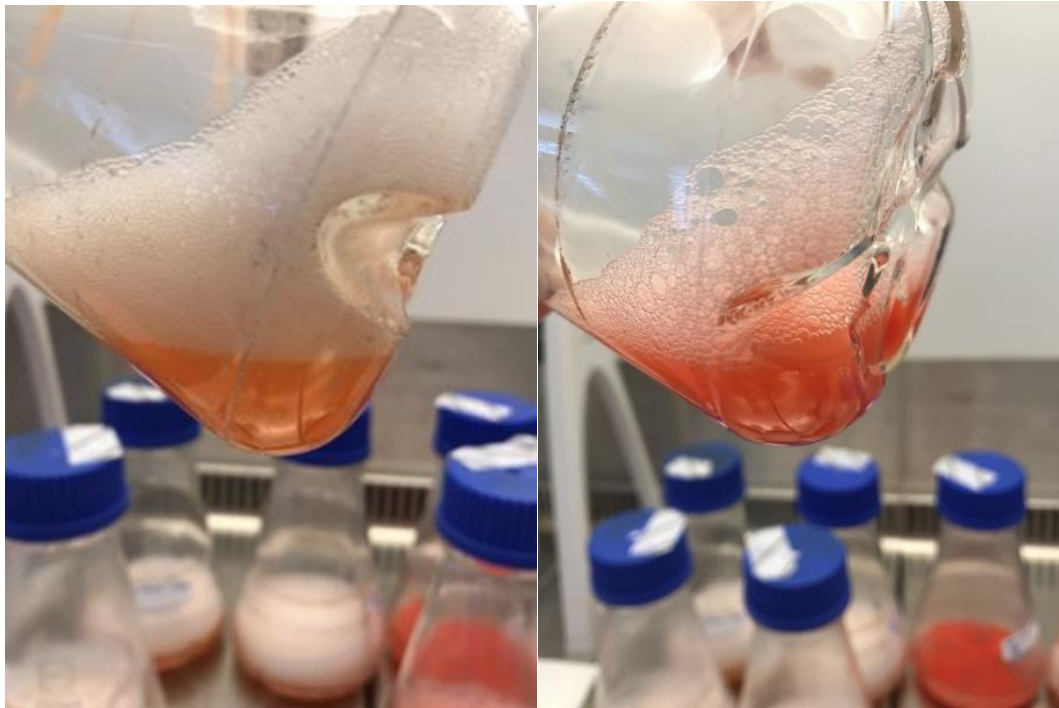


Figura 126. Células de *Rhodospiridium toruloides* en medio sintético simulando el hidrolizado de eucalipto sin inhibidores (izquierda) y con inhibidores (derecha).

6.3.4 Fermentación de hidrolizados detoxificados por *R. toruloides*

Finalmente, se realizaron experimentos de fermentación utilizando los hidrolizados detoxificados reales producidos a partir de switchgrass y eucalipto, pero la levadura no pudo crecer en estos medios. Estos resultados revelaron que, aunque la etapa de detoxificación eliminó una gran cantidad de compuestos inhibidores, la cantidad restante presente en los hidrolizados todavía era muy tóxica para *R. toruloides*. Los compuestos fenólicos en el hidrolizado pueden penetrar la membrana dañando la membrana celular, creando una mutación del ADN o aumentando el nivel de especies reactivas de oxígeno que resultan en daño del citoesqueleto y muerte celular (Wang, Sun y Yuan, 2018; Chandel, da Silva y Singh, 2013). Aunque el ácido acético también puede actuar como inhibidor de *R. toruloides*, puede que no haya sido el problema principal en el caso del presente estudio, como se discutió anteriormente. En este sentido, se deben realizar más estrategias de detoxificación o adaptación/ingeniería de cepas para mejorar el rendimiento de la levadura para crecer y producir carotenoides a partir de medios tan complejos. En la línea de esta última estrategia, considerando el papel protector de los carotenoides frente a diferentes condiciones de estrés como la exposición a la luz, una mutagénesis mediante radiación UV podría mejorar la resistencia de la levadura y su producción de

carotenoides (Avalos y Carmen Limón, 2014; Sridhar, Sree y Rao, 2002; Liu, Radi y otros, 2021).

6.4 Conclusiones

La explosión por vapor permitió la producción de hidrolizados con alta concentración de azúcares, adecuados para su uso como medio de fermentación. Además, al producir hidrolizados con alto contenido de azúcares durante el pretratamiento, se puede eliminar o al menos minimizar la etapa posterior de concentración, que normalmente se realiza para tener suficiente concentración de azúcares para su fermentación.

Los hidrolizados hemicelulósicos obtenidos por explosión de vapor de switchgrass y eucalipto se usaron eficientemente como medio de fermentación después de la detoxificación, especialmente para la producción de xilitol por *K. marxianus*. En el caso de los carotenoides, se obtuvieron resultados prometedores a partir de medios complejos que simulaban los hidrolizados, lo que sugiere que la producción de carotenoides a partir de estos hidrolizados puede ser un proceso factible. Sin embargo, se requieren más estudios para minimizar la toxicidad de los compuestos inhibidores restantes para *R. toruloides*. Seleccionando cepas microbianas apropiadas, los hidrolizados pueden usarse como una fuente rica en azúcares y nutrientes para producir compuestos de valor agregado por fermentación.

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

¿Caminos? A donde vamos no necesitamos caminos

Dr. Emmet Brown, Volver al Futuro - 1985

7.1 Discusión general de los resultados

Esta tesis abordó diferentes aspectos del proceso de obtención de bioetanol y otros productos de valor, como xilitol, carotenoides, compuestos fenólicos y ácido acético, a partir de biomasa lignocelulósica utilizando la explosión por vapor en forma continua como pretratamiento. Los experimentos se realizaron sobre dos biomásas, una angiosperma o madera dura como fuente de biomasa forestal ya establecida en Uruguay (eucalipto, *Eucalyptus globulus*), y una planta herbácea reconocida como cultivo energético (switchgrass, *Panicum virgatum*). El análisis de la composición y estructura de los componentes principales permitió establecer semejanzas y diferencias y relacionarlos con los productos que se pueden obtener de ellos, además de permitir establecer los rendimientos de los distintos procesos. El pretratamiento de las biomásas lignocelulósicas mediante explosión por vapor permitió evaluar los resultados teniendo como objetivo la producción de bioetanol. A partir de estos resultados se establecieron las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de residencia que permitían los mejores rendimientos de sacarificación y fermentación minimizando la degradación de la celulosa. Se demostró que tanto para switchgrass como para eucalipto el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas con alta carga de sólidos y baja carga de enzimas de la biomasa pretratada presenta claras ventajas en términos de eficiencia y concentración de etanol obtenido. El pretratamiento permitió también recuperar una fracción líquida rica en azúcares. Se desarrolló una estrategia efectiva de aumento de la concentración de azúcares y detoxificación de la fracción líquida. A partir de esta fracción líquida detoxificada se produjo exitosamente xilitol utilizando una levadura evolucionada (*Kluyveromyces marxianus*), y se sentaron las bases para la producción de carotenoides con otra levadura evolucionada (*Rhodospordium toruloides*).

En esta sección se discuten los resultados obtenidos considerándolos en conjunto, evaluando la factibilidad de las estrategias propuestas para la producción de bioetanol y otros productos de valor a partir de switchgrass y eucalipto.

En la ruta propuesta en esta tesis, se realiza el pretratamiento sobre las biomásas lignocelulósicas mediante explosión por vapor de forma continua sin agregado de ácidos. Al ser un proceso continuo se tiene mayor flexibilidad en el ajuste de parámetros de entrada y salida, minimizando la dependencia en las materias primas y su variabilidad natural, además de ser más eficiente en términos de energía y tiempos de proceso que si

fuera explosión por vapor *batch*. Este pretratamiento genera dos fracciones que son separadas mediante filtración. Por un lado, se genera una fracción sólida rica en celulosa y lignina que es procesada mediante sacarificación y fermentación simultáneas con alta carga de sólidos para generar bioetanol (Capítulo 4). El bioetanol luego es purificado y pronto para ser usado como biocombustible, aunque también puede ser usado directamente en la industria química. De este proceso queda un residuo sólido rico en lignina con celulosa residual y una fracción mínima de hemicelulosa, que si bien es posible utilizar como generador de energía mediante combustión, también es factible de ser usado con otros fines, como fue presentado en la sección 1.6.5 (Productos a partir de la lignina). Derivado de este trabajo, este residuo está siendo investigado como material para inmovilizar enzimas.

La fracción líquida generada luego del pretratamiento con explosión por vapor es pos-hidrolizada con ácido sulfúrico para aumentar la concentración de los monómeros de azúcar. Los compuestos que son tóxicos para las levaduras son extraídos y recuperados (Capítulo 5). Por un lado, se recuperan compuestos fenólicos que pueden ser usados como biocidas genéricamente, o purificados y procesados buscando productos específicos como vainillina. Por otro lado, se recupera ácido acético que puede ser comercializado o usado en la misma instalación industrial para otros usos. Como fue demostrado, al trabajar con cepas de levaduras evolucionadas con tolerancia a los inhibidores, no es necesario remover completamente estos compuestos tóxicos, por lo que la fracción líquida puede continuar siendo procesada, produciéndose xilitol o carotenoides (Capítulo 6).

En cuanto a las cantidades de los distintos productos que se pueden obtener según la biomasa es posible hacer algunas estimaciones, basándose en estudios previos del grupo (datos no publicados, (Cebreiros, Risso y otros, 2021)). En virtud de las composiciones determinadas, las degradaciones que ocurren y la recuperación y producción de distintos compuestos se pueden considerar las cantidades a obtener por tonelada de biomasa lignocelulósica (Tabla 37).

Tabla 37. Masa estimada (en kg) de productos de valor obtenibles por tonelada de biomasa seca

	Etanol	Xilitol	Ácido acético	Compuestos fenólicos	Lignina
Switchgrass	147	88	127	26	279
Eucalipto	196	97	81	23	234

Considerando que la explosión por vapor inevitablemente degrada algo de celulosa, se puede estimar que se conserva un 90 % de la celulosa presente en la biomasa. A partir de los rendimientos de producción de bioetanol obtenidos (aproximadamente 80 % para eucalipto y 90 % para switchgrass) se puede estimar que se pueden obtener aproximadamente 196 kg de etanol a partir de eucalipto, y 147 kg de etanol a partir de switchgrass. En cuanto a la hemicelulosa, también se puede estimar que -considerando lo que permanece en la fracción sólida y lo que se degrada por el pretratamiento- se recupera en la fracción líquida aproximadamente un 90 % de la hemicelulosa presente en cada biomasa. Según los resultados obtenidos (0,68 y 0,48 g xilitol/g xilosa para eucalipto y switchgrass respectivamente) se podrían obtener aproximadamente 88 kg de xilitol por tonelada de eucalipto y 97 kg de xilitol por tonelada de switchgrass. En cuanto al ácido acético, según la concentración de ácido acético que se obtuvo en cada fracción líquida, es posible estimar que se obtendrían en la fracción líquida 92 kg de ácido acético por tonelada de eucalipto, los cuales podrían recuperarse por la eficiencia de extracción aproximadamente 81 kg. Para el switchgrass se podrían recuperar aproximadamente 127 kg de ácido acético por tonelada. Por otra parte, si se considera que 10 % de la lignina pasa a la fracción líquida como compuestos fenólicos, se podrían recuperar 23 kg de estos compuestos por tonelada de eucalipto, y 26 kg por tonelada de switchgrass. Por otra parte, una recirculación de las aguas de lavado podría incrementar la recuperación de algunos de estos compuestos. Finalmente, el residuo de lignina luego de la sacarificación y fermentación simultánea correspondería al menos a 234 kg por tonelada de eucalipto y 279 kg por tonelada de switchgrass.

Aunque para tomar una decisión fundada sobre los beneficios económicos que se pueden obtener según las distintas biomásas es necesario realizar un análisis tecno-económico, es posible hacer una estimación simplificada. En Uruguay, ANCAP compra bioetanol a ALUR (Alcoholes del Uruguay) para mezclarlo con la gasolina en el porcentaje

correspondiente, a un precio aproximado de 855 dólares el metro cúbico (783 kg), es decir aproximadamente 1090 dólares por tonelada (la diaria, 2021). Por su parte el xilitol tiene un precio en el entorno de los 3900-4200 dólares por tonelada (Delgado Arcaño y otros, 2020; Taylor y otros, 2015). El ácido acético en tanto, se puede estimar su precio en 617 dólares por tonelada (Dieste y otros, 2019). En cuanto a los compuestos fenólicos y la lignina, como fue dicho (Capítulo 1, 1.6.5) su rango de precios es bastante amplio, dependiendo de su uso o del producto que se obtenga. Se puede considerar la lignina usada como combustible (180 dólares por tonelada) o se puede estimar un precio bastante mayor por tonelada para compuestos más elaborados (desde 1080 dólares por tonelada llegando a 15000 dólares por tonelada para la vainillina). Considerando estos precios medios (tomando la lignina obtenida como combustible, y los compuestos fenólicos conservadoramente como compuestos de 2000 dólares por tonelada), se podrían obtener aproximadamente 700 dólares por tonelada de switchgrass, mientras que se obtendrían 745 dólares por tonelada de eucalipto. Desglosando estos resultados, en el caso de switchgrass 356 dólares corresponden al xilitol, 160 dólares a bioetanol, 78 dólares al ácido acético, 52 a los compuestos fenólicos y 50 dólares a la lignina. En el caso del eucalipto, 393 dólares corresponden a xilitol, 213 dólares al bioetanol, 46 dólares a los compuestos fenólicos y 42 dólares a la lignina usada como combustible. Sin considerar otras variables que puedan ser distintas entre las biomásas (agronómicas o de transporte, por ejemplo), se podría razonar que a partir del eucalipto se obtendrían mejores resultados económicos por tonelada de biomasa. Sin embargo, debe considerarse que una mejora en el rendimiento de obtención de xilitol para el switchgrass, así como una transformación química de la lignina en productos de mayor valor, haría que fuera más beneficioso procesar el switchgrass. También debe tenerse en cuenta que una estrategia de producción de coproductos debería contribuir a hacer más competitivo el precio del bioetanol.

El aprovechamiento intensivo de todas las fracciones permite reducir el impacto ambiental, así como mejorar la ecuación económica ampliando el espectro de posibles productos de valor. La utilización de distintas biomásas lignocelulósicas reduce el riesgo ambiental de tener un solo cultivo que predomine sobre los otros, lo que haría que se reduzca la diversidad. Por otra parte, a nivel social esto permitiría aprovechar distintas tierras con crecimientos más favorables para determinadas especies, fomentando el desarrollo local.

Los resultados presentados en este trabajo sustentan la utilización de switchgrass en Uruguay como fuente de biomasa para la producción de bioetanol y otros compuestos de valor, aprovechando las ventajas agronómicas que ha demostrado tener este cultivo. En el caso del eucalipto, estos resultados permitirían la diversificación de la matriz de productos que se pueden obtener a partir de esta especie, aprovechando su abundancia en el Uruguay.

Considerando estos aspectos se sugiere realizar los siguientes trabajos futuros de investigación de forma de profundizar los conocimientos en la producción sostenible de bioetanol y otros productos de valor a partir de biomasa lignocelulósica:

- En el Capítulo 4 se obtuvieron valores altos de rendimiento con alta carga de sólidos y baja carga enzimática. La utilización de mayor carga de sólidos y menor carga enzimática podría mejorar valores de rendimiento, además de mejorar la ecuación económica.
- Luego de la sacarificación y fermentación simultáneas (Capítulo 4) se obtuvo un residuo compuesto principalmente por lignina. Se deberían evaluar estrategias de valorización de esta fracción, como es usarla como polímero en distintas aplicaciones, o evaluar su deconstrucción en monómeros.
- Los compuestos fenólicos recuperados en el Capítulo 5 pueden ser valorizables directamente como son recuperados. Sin embargo, la identificación precisa de la mezcla heterogénea de compuestos fenólicos aumentaría el beneficio que se puede obtener, tanto en forma económica como por la presencia de compuestos particularmente importantes por su aplicación.
- En el Capítulo 6 se obtuvieron valores promisorios de producción en medios sintéticos de carotenoides con *R. toruloides*. Seguir evolucionando esta levadura para que sea tolerante a las concentraciones de inhibidores (de forma similar a *K. marxianus*) otorgaría una importante opción para producir coproductos de alto valor agregado. También sería una buena estrategia estudiar la producción de otros compuestos de valor a partir de la fracción hemicelulósica, de forma de ampliar el espectro de posibilidades.

En forma genérica, pensando en términos de una biorrefinería, sería atractivo contar con flexibilidad en las biomásas utilizadas, así como en los productos que se obtienen. Un ajuste relativamente continuo de lo que la biorrefinería consume y produce, llevando el

concepto “bio” aún más cercano al concepto “vivo” (en cierta forma reaccionando frente al entorno), le otorgaría mayor robustez frente a cuestiones circunstanciales, además de ser más amigable ambientalmente.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

El fin de la eternidad... y el comienzo del infinito

Isaac Asimov – El fin de la eternidad, 1955

Conclusiones

La presente tesis contribuye con conocimiento sobre dos biomásas lignocelulósicas y su procesamiento para producir bioetanol, y aporta estrategias para la generación de otros productos de valor. Estos aportes permiten profundizar en el desarrollo sostenible de biorrefinerías en general, y en Uruguay en particular. Durante la ejecución del presente trabajo se abordaron diversos aspectos importantes en el establecimiento de una biorrefinería, como ser la composición de las biomásas, su pretratamiento mediante explosión por vapor continuo, la hidrólisis enzimática y fermentación de la fracción celulósica, así como la detoxificación y la obtención de productos de valor en la fracción hemicelulósica. Las principales conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- El switchgrass presentó menor contenido de celulosa ($31,8 \pm 0,8$ % m/m) que el eucalipto ($47,9 \pm 1,0$ % m/m). En cuanto a las hemicelulosas, el switchgrass estudiado tuvo un contenido de $25,0 \pm 1,2$ % m/m y el eucalipto $16,0 \pm 0,8$ % m/m. La lignina del eucalipto estaba compuesta principalmente por monolignoles siringil y en menor medida por guaiacil, mientras que en el switchgrass se evidenció alta proporción de unidades *p*-hidroxifenil y guaiacil, y en menor proporción siringil.
- La explosión por vapor de forma continua de las dos biomásas a distintas condiciones de temperatura y tiempo de residencia demostró ser una buena estrategia para la deconstrucción de la biomasa reduciendo la recalcitrancia sin agregado de otros químicos, como ácidos. En las dos biomásas la explosión por vapor a 200 °C y 10 minutos de tiempo de residencia fue la que presentó los mejores resultados, con menor pérdida de celulosa y mayor rendimiento de hidrólisis enzimática.
- La sacarificación y fermentación simultánea (de las fracciones sólidas obtenidas luego de las explosiones por vapor seleccionadas) con 10 % de carga de sólidos y 25 FPU/g biomasa resultó en alta producción de bioetanol con rendimientos del $79,2 \pm 5,6$ % para el eucalipto y $89,7 \pm 0,8$ % para el switchgrass.
- Se desarrolló una estrategia efectiva para la extracción y recuperación de ácido acético y compuestos fenólicos de las fracciones líquidas, lo que permite aportar más valor al procesamiento de la biomasa lignocelulósica, además de reducir el impacto ambiental.

- A partir de la xilosa presente en la fracción líquida se produjo xilitol utilizando una cepa evolucionada de *K. marxianus* (tolerante a inhibidores) en cantidades de $0,48 \pm 0,04$ g xilitol/g xilosa para la fracción líquida de switchgrass y $0,68 \pm 0,10$ g de xilitol/g de xilosa para la fracción líquida de eucalipto.
- Se avanzó en la producción de carotenoides a partir de pruebas en medios sintéticos utilizando una cepa evolucionada de *R. toruloides*.

Los hallazgos de esta tesis contribuyen al desarrollo de biorrefinerías en Uruguay, brindando opciones de valorización de la biomasa lignocelulósica, tanto por la utilización de distintas materias primas como por la generación de distintas opciones de productos de valor. La realización de pruebas tendientes a aumentar la capacidad productiva de bioetanol mediante el uso de mayor carga de sólidos, así como mejoras en la eficiencia en la producción de xilitol y carotenoides, junto con el aprovechamiento de la lignina residual, pueden contribuir a impactar positivamente en la economía del proceso, además de abrir posibilidades de nuevos materiales y aplicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Abatzoglou, Nicolas, Esteban Chornet, Khaled Belkacemi, y Ralph P. Overend. 1992. «Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation.» *Chemical Engineering Science* 47 (5): 1109-1122. doi:[https://doi.org/10.1016/0009-2509\(92\)80235-5](https://doi.org/10.1016/0009-2509(92)80235-5).
- Abdel-Rahman, Mohamed Ali, Yukihiro Tashiro, y Kenji Sonomoto. 2011. «Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits.» *Journal of Biotechnology* 156 (4): 286-301. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.017>.
- Agrawal, Ruchi, Alok Satlewal, Manali Kapoor, Sujit Mondal, y Biswajit Basu. 2017. «Investigating the enzyme-lignin binding with surfactants for improved saccharification of pilot scale pretreated wheat straw.» *Bioresource Technology* 224: 411-418. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.026>.
- Agrawal, Ruchi, Amit Verma, Reeta Rani Singhanian, Sunita Varjani, Cheng Di Dong, y Anil Kumar Patel. 2021. «Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis.» *Bioresource Technology* 332: 125042. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125042>.
- Ahmad, Waqar, Susanna Kuitunen, Marc Borrega, y Ville Alopaeus. 2016. «Physicochemical Modeling for Hot Water Extraction of Birch Wood.» *Industrial & Engineering Chemistry Research* 55 (42): 11062-11073. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b02987>.
- Ahuja, Vishal, Markéta Macho, Daniela Ewe, Manoj Singh, Subhasish Saha, y Kumar Saurav. 2020. «Biological and Pharmacological Potential of Xylitol: A Molecular Insight of Unique Metabolism.» *Foods* 9 (11): 1592. doi:<https://www.mdpi.com/2304-8158/9/11/1592>.
- Ajala, E.O., Y.O. Olonade, M.A. Ajala, y G.S. Akinpelu. 2020. «Lactic Acid Production from Lignocellulose – A Review of Major Challenges and Selected Solutions.» *ChemBioEng Reviews* 7 (2): 38-49. doi:<https://doi.org/10.1002/cben.201900018>.
- Akram, Fatima, Ikram ul Haq, Wafa Imran, y Hamid Mukhtar. 2018. «Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review.» *Renewable Energy* 122: 225-238. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.01.095>.
- Albergaria, H., y N. Arneborg. 2016. «Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions.» *Applied Microbiology & Biotechnology* 2035–2046. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-015-7255-0>.
- Alexopoulou, Efthymia, Andrea Monti, H. Wolter Elbersen, Walter Zegada-Lizarazu, Dimitra Million, Danilo Scordia, Federica Zanetti, Eleni G. Papazoglou, y Myrsini Christou. 2018. «3 - Switchgrass: From Production to End Use.» En *Perennial Grasses for Bioenergy and Bioproducts*, editado por Efthymia Alexopoulou, 61-105. Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812900-5.00003-5>.
- Allen, Sandra A., William Clark, J. Michael McCaffery, Zhen Cai, Alison Lanctot, Patricia J. Slininger, Z. Lewis Liu, y Steven W. Gorsich. 2010. «Furfural induces reactive oxygen

- species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*.» *Biotechnology for Biofuels* 3 (1). doi:<https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-2>.
- Almeida, J.R., T. Modig, A. Petersson, B. Hähn-Hägerdal, G. Lidén, y M.F. Gorwa-Grauslund. 2007. «Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*.» *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82: 340-349. doi:<https://doi.org/10.1002/jctb.1676>.
- Alonso, D.M., S.G. Wettstein, y J.A. Dumesic. 2012. «Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals.» *Chemical Society Reviews* 41 (24): 8075-8098. doi:<https://doi.org/10.1039/C2CS35188A>.
- Altaner, C.M., y M.C. Jarvis. 2008. «Modelling polymer interactions of the 'molecular Velcro' type in wood under mechanical stress.» *Journal of Theoretical Biology* 253: 434– 445. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.03.010>.
- Althuri, A., A.D. Chintagunta, K.C. Sherpa, y R. Banerjee. 2018. «Simultaneous Saccharification and Fermentation of Lignocellulosic Biomass.» En *Biorefining of Biomass to Biofuels. Biofuel and Biorefinery Technologies, vol 4*, editado por Kumar S. y Sani R., 265-285. Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-67678-4_12.
- Althuri, Avanthi, Lohit Kumar Srinivas Gujjala, y Rintu Banerjee. 2017. «Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production.» *Bioresource Technology* 245 part A: 530-539. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.140>.
- Althuri, Avanthi, y Rintu Banerjee. 2019. «Separate and simultaneous saccharification and fermentation of a pretreated mixture of lignocellulosic biomass for ethanol production.» *Biofuels* 61-72. doi:<https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1409059>.
- Alves, Catarina M., Misha Valk, Sierk de Jong, Antonio Bonomi, Luuk A.M. van der Wielen, y Solange I. Mussatto. 2017. «Techno-economic assessment of biorefinery technologies for aviation biofuels supply chains in Brazil.» *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 11 (1): 67-91. doi:<https://doi.org/10.1002/bbb.1711>.
- Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, y M.J. Negro. 2010. «Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.» *Bioresource Technology* 4851-4861.
- Andary, J, Maalouly, J., R. Ouaini, H. Chebib, M. Beyrouthy, D. N. Rutledge, y N. Ouaini. 2013. «Phenolic compounds from diluted acid hydrolysates of olive stones: effect of overliming.» *Advances in crop science and Technology* 103. doi:10.4172/2329-8863.1000103.
- Ansanay-Galeote, Virginie, Bruno Blondin, Sylvie Dequin, y Jean-Marie Sablayrolles. 2001. «Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*.» *Biotechnology Letters* 23 (9): 677-681. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1010396232420>.
- Ansarinasab, Hojat, Mehdi Mehrpooya, y Milad Sadeghzadeh. 2021. «Life-cycle assessment (LCA) and techno-economic analysis of a biomass-based biorefinery.» *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 145 (3): 1053-1073. doi:<https://doi.org/10.1007/s10973-020-10324-7>.

- Antunes, Felipe Antonio Fernandes, Kalavathy Rajan, Angele Djiroleu, Thiago Moura Rocha, Larissa Pereira Brumano, Yasmin Cristhine de Souza Melo, Júlio César dos Santos, Carlos A. Rosa, Danielle Julie Carrier, y Silvio Silvério da Silva. 2021. «Sustainable Second-Generation Ethanol Production from Switchgrass Biomass via Co-fermentation of Pentoses and Hexoses Using Novel Wild Yeasts.» *BioEnergy Research*. doi:<https://doi.org/10.1007/s12155-021-10302-3>.
- Arantes, Valdeir, Jody Jellison, y Barry Goodell. 2012. «Peculiarities of Brown-Rot Fungi and Biochemical Fenton Reaction with Regard to Their Potential as a Model for Bioprocessing Biomass.» *Applied Microbiology & Biotechnology* 94: 323-338. doi:[10.1007/s00253-012-3954-y](https://doi.org/10.1007/s00253-012-3954-y).
- Aristizábal-Marulanda, V., y C.A. Cardona Alzate. 2019. «Methods for designing and assessing biorefineries: Review.» *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 13 : 789-808. doi:<https://doi.org/10.1002/bbb.1961>.
- Armenta, Silvia, Silvia Moreno-Mendieta, Zaira Sánchez-Cuapio, Sergio Sánchez, y Romina Rodríguez-Sanoja. 2017. «Advances in molecular engineering of carbohydrate-binding modules.» *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 85 (9): 1602-1617. doi:<https://doi.org/10.1002/prot.25327>.
- Arroyo-López, F.N., Z. Salvadó, J. Tronchoni, J.M. Guillamón, E. Barrio, y A. Querol. 2010. «Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments.» *Yeast* 27: 1005-1015. doi:<https://doi.org/10.1002/yea.1809>.
- ASTM. 2013. *D1102-84 Standard Test Method for Ash in Wood*. West Conshohocken, PA: ASTM International. www.astm.org.
- Auxenfans, T, D Crônier, B Chabbert, y G Paës. 2017. «Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment.» *Biotechnology for Biofuels* 10: 1-16. doi:[10.1186/s13068-017-0718-z](https://doi.org/10.1186/s13068-017-0718-z).
- Avalos, J., y M. Carmen Limón. 2014. «Biological roles of fungal carotenoids.» *Current Genetics* 61: 309-324. doi:[10.1007/s00294-014-0454-x](https://doi.org/10.1007/s00294-014-0454-x).
- Bajpai, Pratima. 2021. «Production of Bioethanol.» En *Developments in Bioethanol*, de Pratima Bajpai, 41-110. Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-981-15-8779-5_5.
- Bajwa, D.S., G. Pourhashem, A.H. Ullah, y S.G. Bajwa. 2019. «A concise review of current lignin production, applications, products and their environmental impact.» *Industrial Crops and Products* 111526. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111526>.
- Balan, Venkatesh, Sandeep Kumar, Bryan Bals, Shishir Chundawat, Mingjie Jin, y Bruce Dale. 2012. «Chapter 7 - Biochemical and Thermochemical Conversion of Switchgrass to Biofuels.» En *Switchgrass - A valuable Biomass Crop for Energy*, editado por Andrea Monti. Springer.
- Ballesteros, L.F., J.A. Teixeira, y S.I. Mussatto. 2014. «Selection of the Solvent and Extraction Conditions for Maximum Recovery of Antioxidant Phenolic Compounds from Coffee Silverskin.» *Food Bioprocess Technol* 7: 1322-1332. doi:<https://doi.org/10.1007/s11947-013-1115-7>.

- Banerjee, G., y P. Chattopadhyay. 2019. «Vanillin biotechnology: the perspectives and future.» *J. Sci. Food Agric.* 99: 499-506. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.9303>.
- Banu, J. Rajesh, S. Kavitha Preethi, Vinay Kumar Tyagi, M. Gunasekaran, Obulisamy Parthiba Karthikeyan, y Gopalakrishnan Kumar. 2021. «Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy.» *Fuel* 302: 121086. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121086>.
- Barakat, Abdellatif, Hugo de Vries, y Xavier Rouau. 2013. «Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review.» *Bioresource Technology* 134: 362-373. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.169>.
- Barbosa, Maria F.S., Maria B. de Medeiros, Ismael M. de Mancilha, Henry Schneider, y Hung Lee. 1988. «Screening of yeasts for production of xylitol from D-Xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*.» *Journal of Industrial Microbiology* 3: 241-251. doi:<https://doi.org/10.1007/BF01569582>.
- Barnette, Anna L., Christopher Lee, Laura C. Bradley, Edward P. Schreiner, Yong Bum Park, Heenae Shin, Daniel J. Cosgrove, Sunkyu Park, y Seong H. Kim. 2012. «Quantification of crystalline cellulose in lignocellulosic biomass using sum frequency generation (SFG) vibration spectroscopy and comparison with other analytical methods.» *Carbohydrate Polymers* 89 (3): 802-809. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.014>.
- Barreiro, Carlos, y José-Luis Barredo. 2018. «Carotenoids Production: A Healthy and Profitable Industry.» En *Microbial Carotenoids: Methods and Protocols*, editado por Carlos Barreiro y José-Luis Barredo, 45-55. New York: Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_2.
- Baruah, Julie, Bikash Kar Nath, Ritika Sharma, Sachin Kumar, Ramesh Chandra Deka, Deben Chandra Baruah, y Eeshan Kalita. 2018. «Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products.» *Frontiers in Energy Research* 6: 141. doi:10.3389/fenrg.2018.00141.
- Beig, Bilal, Muhammad Riaz, Salman Raza Naqvi, Muhammad Hassan, Zhifeng Zheng, Keikhosro Karimi, Arivalagan Pugazhendhi, A.E. Atabani, y Nguyen Thuy Lan Chi. 2021. «Current challenges and innovative developments in pretreatment of lignocellulosic residues for biofuel production: A review.» *Fuel* 287: 119670. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119670>.
- Bengtsson, Andreas, Jenny Bengtsson, Maria Sedin, y Elisabeth Sjöholm. 2019. «Carbon Fibers from Lignin-Cellulose Precursors: Effect of Stabilization Conditions.» *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 7 (9): 8440-8448. doi:<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00108>.
- Beopoulos, Athanasios, Jean-Marc Nicaud, y Claude Gaillardin. 2011. «An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes.» *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 1193-1206. doi: 10.1007/s00253-011-3212-8.
- Bhatia, Rakesh, Ana Winters, David N. Bryant, Maurice Bosch, John Clifton-Brown, David Leak, y Joe Gallagher. 2020. «Pilot-scale production of xylo-oligosaccharides and fermentable sugars from *Miscanthus* using steam explosion pretreatment.»

- Bioresource Technology* 296: 122285.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122285>.
- Bhatia, Yukti, Saroj Mishra, y V.S. Bisaria. 2002. «Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications.» *Critical Reviews in Biotechnology* 22 (4): 375-407.
doi:<https://doi.org/10.1080/07388550290789568>.
- Biorefinery Euroview. 2009. Último acceso: 2021.
https://cordis.europa.eu/docs/results/44/44275/123655621-6_en.pdf.
- Bissaro, Bastien, Anikó Várnai, Åsmund K. Røhr, y Vincent G. H Eijsink. 2021. «Oxidoreductases and Reactive Oxygen Species in Conversion of Lignocellulosic Biomass.» *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 82 (4): e00029-18.
doi:<https://doi.org/10.1128/MMBR.00029-18>.
- Björklund Jansson, Marianne, y Nils-Olof Nilvebrant. 2009. «7- Wood Extractives.» En *Pulp and Paper Chemistry and Technology Volume 1 Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, editado por Monica Ek, Göran Gellerstedt y Gunnar Henriksson, 147-171. de Gruyter.
- Black, K. J., A. Boslett, E. Hill, L. Ma, y S McCoy. 2020. «A Review of the Economic, Environmental, and Health Impacts of the Fracking Boom.» *Environmental, and Health Impacts of the Fracking Boom Annual Review of Resource Economics*, Forthcoming.
doi:<https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3780721>.
- Boraston, Alisdair B, David N Bolam, Harry J Gilbert, y Gideon J Davies. 2004. «Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition.» *The Biochemical Journal* 382 (Pt 3): 769-781. doi:<https://doi.org/10.1042/BJ20040892>.
- Borisova, Anna S., Elena V. Eneyskaya, Suvamay Jana, Silke F. Badino, Jeppe Kari, Antonella Amore, Magnus Karlsson y otros,. 2018. «Correlation of structure, function and protein dynamics in GH7 cellobiohydrolases from *Trichoderma atroviride*, *T. reesei* and *T. harzianum*.» *Biotechnology for Biofuels* 11 (1). doi:<https://doi.org/10.1186/s13068-017-1006-7>.
- Botto, Emiliana. 2018. *Búsqueda de nuevos biocatalizadores para la valorización de residuos lignocelulósicos*. Montevideo: RIQUIM - Repositorio Institucional de la Facultad de Química - UdelaR. Último acceso: 2021 de Setiembre .
doi:<http://riquim.fq.edu.uy/items/show/5758>.
- Boudet, A.-M., Deborah Goffner, Christiane Marque, Chantal Teulières, y Jacqueline Grima-Pettenatti. 1998. «Genetic manipulation of lignin profiles: a realistic challenge towards the qualitative improvement of plant biomass.» *Ag Biotech* 295N-304N.
- Brandt, B.A., T. Jansen, J.F. Görgens, y W.H. van Zyl. 2019. «Overcoming lignocellulose-derived microbial inhibitors: advancing the *Saccharomyces cerevisiae* resistance toolbox.» *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 13: 1520-1536. doi:<https://doi.org/10.1002/bbb.2042>.
- Bridgwater, Tony. 2018. «Challenges and Opportunities in Fast Pyrolysis of Biomass: Part I.» *Johnson Matthey Technology Review* 62 (1): 118-130.
doi:<https://doi.org/10.1595/205651318X696693>.
- Budiman, Anatta Wahyu, Ji Su Nam, Jae Hyun Park, Ryan Indra Mukti, Tae Sun Chang, Jong Wook Bae, y Myoung Jae Choi. 2016. «Review of Acetic Acid Synthesis from Various

- Feedstocks Through Different Catalytic Processes.» *Catalysis Surveys from Asia* 20 (3): 173-196. doi:<https://doi.org/10.1007/s10563-016-9215-9>.
- Bustamante, M., G. Siri-Prieto, y L Carrasco-Letelier. 2020. «Huella de carbono de rotaciones agrícolas con fines bioenergéticos: evaluación de cultivos anuales y perennes.» *Cangüé* 43: 25-29.
http://www.eemac.edu.uy/cangué/images/revistas/revista_43/Cangué%2043_6NT4.pdf.
- Buzzini, P, M Innocenti, B Turchetti, D Libkind, M van Broock, y N Mulinacci. 2007. «Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*.» *Canadian journal of microbiology* 53 (8): 1024-1031. doi:<https://doi.org/10.1139/W07-068>.
- Byun, J., Y.-L. Cha, S.-M. Park, K.-S. Kim, J.-E. Lee, y Y.-G. Kang. 2020. «Lignocellulose Pretreatment Combining Continuous Alkaline Single-Screw Extrusion and Ultrasonication to Enhance Biosugar Production.» *Energies* 13 (21): 5636. doi:<https://doi.org/10.3390/en13215636>.
- Cabral, Maria Marina Serrao, Karina Cence, Jamile Zeni, Sui Mui Tsai, Ademir Durrer, Lillian Liva Foltran, Geciane Toniazzo, Eunice Valduga, y Helen Treichel. 2011. «Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation.» *Eur Food Res Technol* 233: 159-166.
- Caldarelli, C. E., M. A. F. D. D. Moraes, y P. A. T Paschoalino. 2017. «Sugarcane ethanol industry effects on the GDP per capita in the Center-South region of Brazil.» *Revista De Economia E Agronegócio* 15 (2): 183-200. doi:<https://doi.org/10.25070/rea.v15i2.481>.
- Capolupo, L., y V. Faraco. 2016. «Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development.» *Applied Microbiology & Biotechnology* 9451–9467. doi:[10.1007/s00253-016-7884-y](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7884-y).
- Carrillo, Isabel, Regis Teixeira Mendonça, Mariko Ago, y Orlando J. Rojas. 2018. «Comparative study of cellulosic components isolated from different *Eucalyptus* species.» *Cellulose* 25 (2): 1011-1029. doi:<https://doi.org/10.1007/s10570-018-1653-2>.
- Carvalho, F., L.C. Duarte, F. Gírio, y P. Moniz. 2016. «Chapter 14 - Hydrothermal/Liquid Hot Water Pretreatment (Autohydrolysis): A Multipurpose Process for Biomass Upgrading.» En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, editado por Solange I. Mussatto, 315-347. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00014-1>.
- Casey, Elizabeth, Miroslav Sedlak, Nancy W.Y. Ho, y Nathan S. Mosier. 2010. «Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*.» *FEMS Yeast Search* 10 (4): 385-393. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00623.x>.
- Castro, Jean F., Carolina Parra, Mauricio Yáñez-S, Jonathan Rojas, Regis Teixeira Mendonça, Jaime Baeza, y Juanita Freer. 2013. «Optimal Pretreatment of *Eucalyptus globulus* by Hydrothermolysis and Alkaline Extraction for Microbial Production of Ethanol and Xylitol.» *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52 (16): 5713-5720. doi:<https://doi.org/10.1021/ie301859x>.

- Cebreiros, Florencia, Florencia Risso, Matias Cagno, Maria Noel Cabrera, Eloísa Rochón, Guillermo Jauregui, Elzeario Boix, Silvia Böthig, Mario Daniel Ferrari, y Claudia Lareo. 2021. «Enhanced production of butanol and xylosaccharides from Eucalyptus grandis wood using steam explosion in a semi-continuous pre-pilot reactor.» *Fuel* 290: 119818. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119818>.
- Cebreiros, Florencia, Mairan D. Guigou, y María N. Cabrera. 2017. «Integrated forest biorefineries: Recovery of acetic acid as a by-product from eucalyptus wood hemicellulosic hydrolysates by solvent extraction.» *Industrial Crops and Products* 109 (15): 101-108. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.012>.
- Chandel, Anuj K., Silvio Silvério da Silva, y Om V. Singh. 2013. «Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology.» *BioEnergy Research* 6: 388-401. doi:<https://doi.org/10.1007/s12155-012-9241-z>.
- Chandel, Anuj Kumar, Vijay Kumar Garlapati, Akhilesh Kumar Singh, Felipe Antonio Fernandes Antunes, y Silvio Silvério da Silva. 2018. «The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization.» *Bioresource Technology* 264: 370-381. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.004>.
- Chandi, G., y B. Gill. 2011. «Production and Characterization of Microbial Carotenoids as an Alternative to Synthetic Colors: a Review.» *International Journal of Food Properties* 14 (3): 503–513. doi:<https://doi.org/10.1080/10942910903256956>.
- Chattopadhyay, Pritam, Goutam Banerjee, y Sukanta K. Sen. 2018. «Cleaner production of vanillin through biotransformation of ferulic acid esters from agroresidue by *Streptomyces sannanensis*.» *Journal of Cleaner Production* 182: 272-279. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.043>.
- Chen, H. 2014. «Chemical composition and structure of natural lignocellulose.» En *Biotechnology of Lignocellulose*, editado por H. Chen, 25-71. Dordrecht: Springer. doi:10.1007/978-94-007-6898-7.
- Chen, Xi, Zihui Li, Xiaoxi Zhang, Fengxian Hu, Dewey D. Y. Ryu, y Jie Bao. 2009. «Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds.» *Appl Biochem Biotechnol* (159): 591-604.
- Cherubini, F., G. Jungmeier, M. Wellisch, T. Willke, I. Skiadas, R. Van Ree, y E. de Jong. 2009. «Toward a common classification approach for biorefinery systems.» *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 3: 534-546. doi:<https://doi.org/10.1002/bbb.172>.
- Choi, Hang Seok, y Dietrich Meier. 2013. «Fast pyrolysis of Kraft lignin—Vapor cracking over various fixed-bed catalysts.» *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 100: 207-212. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2012.12.025>.
- Chong, Ting Yen, Siang Aun Cheah, Chin Tye Ong, Lee Yi Wong, Chern Rui Goh, Inn Shi Tan, Henry Chee Yew Foo, Man Kee Lam, y Steven Lim. 2020. «Techno-economic evaluation of third-generation bioethanol production utilizing the macroalgae waste: A case study in Malaysia.» *Energy* 210: 118491. doi:<https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.118491>.
- Christ-Ribeiro, A., C.S. Graça, L. Kupski, E. Badiale-Furlong, y L.A. de Souza-Soares. 2019. «Cytotoxicity, antifungal and anti mycotoxins effects of phenolic compounds from

- fermented rice bran and *Spirulina* sp.» *Process Biochemistry* 80: 190-196.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.007>.
- Chryssikou, Loukia P., Stella Bezergianni, y Costas Kiparissides. 2018. «Environmental analysis of a lignocellulosic-based biorefinery producing bioethanol and high-added value chemicals.» *Sustainable Energy Technologies and Assessments* 28: 103-109.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.seta.2018.06.010>.
- Chum, Helena L., David K. Johnson, Stuart K. Black, y Ralph P. Overend. 1990. «Pretreatment-Catalyst effects and the combined severity parameter.» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24 (1). doi:<https://doi.org/10.1007/BF02920229>.
- Chundawat, Shishir P. S., Bryon S. Donohoe, da Costa Sousa, Thomas Leonardo and Elder, Umesh P. Agarwal, Fachuang Lu, John Ralph, Michael E. Himmel, Venkatesh Balan, y Bruce E. Dale. 2011. «Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment.» *Energy Environ. Sci.* 4 (3): 973-984. doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C0EE00574F>.
- Chundawat, Shishir P.S., Gregg T. Beckham, Michael E. Himmel, y Bruce E. Dale. 2011. «Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals.» *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 2 (1): 121-145. doi:[10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205](https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205).
- Chundawat, SP, R Vismeh, Sharma. LN, JF Humpula, L da Costa Sousa, CK Chambliss, AD Jones, V Balan, y BE Dale. 2010. «Multifaceted characterization of cell wall decomposition products formed during ammonia fiber expansion (AFEX) and dilute acid based pretreatments.» *Bioresour Technol.* 21: 8429-8438.
doi:[10.1016/j.biortech.2010.06.027](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.027).
- Ciesielski, Peter N., Michael F. Crowley, Mark R. Nimlos, Aric W. Sanders, Gavin M. Wiggins, Dave Robichaud, Bryon S. Donohoe, y Thomas D. Foust. 2015. «Biomass Particle Models with Realistic Morphology and Resolved Microstructure for Simulations of Intraparticle Transport Phenomena.» *Energy & Fuels* 29 (1): 242-254.
doi:<https://doi.org/10.1021/ef502204v>.
- Clugston, R.D. 2020. «Carotenoids and fatty liver disease: Current knowledge and research gaps.» *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1865 (11): 158597. doi:[10.1016/j.bbailip.2019.158597](https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2019.158597).
- Coca, M., G. González-Benito, y M.T. García-Cubero. 2016. «Chapter 18 - Chemical Oxidation With Ozone as an Efficient Pretreatment of Lignocellulosic Materials.» En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, editado por Solange I. Mussatto, 409-429. Elsevier. doi:[Solange I. Mussatto](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.010).
- Coca, Mónica, Beatriz Jiménez, Susana Lucas, Aleta Duque, Paloma Manzanares, y M^a Teresa García-Cubero. 2016. «Sequential Extrusion-Ozone Pretreatment for the Production of Bioethanol by *Pichia stipitis* from Wheat Straw.» *New Biotechnology* 33: S92–S93.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.1042>.
- Costa, V.L.D., T.P. Gomes, y M.S. Simões. 2016. «Effect of Acid Sulphite Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis of Eucalypt, Broom, and Pine.» *Journal of Wood Chemistry and Technology* 36 (1): 63-75. doi:[10.1080/02773813.2015.1066393](https://doi.org/10.1080/02773813.2015.1066393).

- Coz, Alberto, Tamara Llano, Eva Cifrián, Javier Viguri, Edmond Maican, y Herbert Sixta. 2016. «Physico-Chemical Alternatives in Lignocellulosic Materials in Relation to the Kind of Component for Fermenting Purposes.» *Materials* 9 (7): 1996-1944. doi:10.3390/ma9070574.
- Cubas-Cano, Enrique, Cristina González-Fernández, Ignacio Ballesteros, y Elia Tomás-Pejó. 2020. «Efficient utilization of hydrolysates from steam-exploded gardening residues for lactic acid production by optimization of enzyme addition and pH control.» *Waste Management* 107: 235-243. doi:https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.04.003.
- Cubbage, Frederick, Sadharga Koesbandana, Patricio Mac Donagh, Rafael Rubilar, Gustavo Balmelli, Virginia Morales Olmos, Rafael De La Torre y otros,. 2010. «Global timber investments, wood costs, regulation, and risk.» *Biomass and Bioenergy* 34 (12): 1667-1678. doi:https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.05.008.
- Cunha, Joana T., Aloia Romaní, Carlos E. Costa, Isabel Sá-Correia, y Lucília Domingues. 2019. «Molecular and physiological basis of *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to adverse lignocellulose-based process conditions.» *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (1): 159-175. doi:https://doi.org/10.1007/s00253-018-9478-3.
- Cunha, Manuel, Aloia Romaní, Margarida Carvalho, y Lucília Domingues. 2018. «Boosting bioethanol production from Eucalyptus wood by whey incorporation.» *Bioresource Technology* 250: 256-264. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.023.
- Dagle, Robert A., Austin D. Winkelman, Karthikeyan K. Ramasamy, Vanessa Lebarbier Dagle, y Robert S. Weber. 2020. «Ethanol as a Renewable Building Block for Fuels and Chemicals.» *Industrial & Engineering Chemistry Research* 59 (11): 4843-4853. doi:https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b05729.
- Dahmen, Nicolaus, Iris Lewandowski, Susanne Zibek, y Annette Weidtmann. 2019. «Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives.» *GCB Bioenergy* 11: 107-117. doi:10.1111/gcbb.12586.
- Daniel, Geoffrey. 2009. «3 Wood and Fibre Morphology.» En *Pulp and Paper Chemistry and Technology Volume 1 Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, editado por Monica Ek , Göran Gellerstedt y Gunnar Henriksson, 45-70.
- Danti, Serena, Luisa Trombi, Alessandra Fusco, Bahareh Azimi, Andrea Lazzeri, Pierfrancesco Morganti, Maria-Beatrice Coltelli, y Giovanna Donnarumma. 2019. «Chitin Nanofibrils and Nanolignin as Functional Agents in Skin Regeneration.» *International Journal of Molecular Sciences* 20 (11). doi:https://doi.org/10.3390/ijms20112669.
- Davies, Gideon, y Bernard Henrissat. 1995. «Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases.» *Structure* 3 (9): 853-859. doi:https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9.
- Davison, Brian H., Sadie R. Drescher, Gerald A. Tuskan, Mark F. Davis, y Nhuan P. Nghiem. 2006. «Variation of S/G Ratio and Lignin Content in a Populus Family Influences the Release of Xylose by Dilute Acid Hydrolysis.» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129-132: 427-435. doi:https://doi.org/10.1385/ABAB:130:1:427.
- de Mello, Fellipe da Silveira Bezerra, Alessandro Luis Venega Coradini, Pedro Augusto Galvão Tizei, Marcelo Falsarella Carazzolle, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, y Gleidson

- Silva Teixeira. 2019. «Static microplate fermentation and automated growth analysis approaches identified a highly-aldehyde resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain.» *Biomass and Bioenergy* 120: 49-58. doi:10.1016/j.biombioe.2018.10.019.
- De Stefani, E., P. Boffetta, P. Brennan, H. Deneo-Pellegrini, J. C. Carzoglio, A. Ronco, y M. Mendilaharsu. 2000. «Dietary carotenoids and risk of gastric cancer: a case-control study in Uruguay.» *European Journal of Cancer Prevention : The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation* 9 (5): 329-334. doi:10.1097/00008469-200010000-00007.
- dela Seña, C., K. M. Riedl, S. Narayanasamy, J. R. W. Curley, S. J. Schwartz, y E. H. Harrison. 2014. «The Human Enzyme That Converts Dietary Provitamin A Carotenoids to Vitamin A Is a Dioxygenase.» *Journal of Biological Chemistry* 289 (19): 13661-13666. doi:10.1074/jbc.M114.557710.
- Delgado Arcaño, Yaimé, Oscar Daniel Valmaña García, Dalmo Mandelli, Wagner Alves Carvalho, y Luiz Antonio Magalhaes Pontes. 2020. «Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route.» *Catalysis Today* (344): 2-14. doi:https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.07.060.
- Deng, Fang, Dae-Yeol Cheong, y Giovanna M. Aita. 2018. «Optimization of activated carbon detoxification of dilute ammonia pretreated energy cane bagasse enzymatic hydrolysate by response surface methodology.» *Industrial Crops and Products* 115: 166-173. doi:https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.030.
- Dias, Ricardo, Helder Oliveira, Iva Fernandes, Jesus Simal-Gandara, y Rosa Perez-Gregorio. 2020. «Recent advances in extracting phenolic compounds from food and their use in disease prevention and as cosmetics.» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61 (7): 1130-1151. doi:10.1080/10408398.2020.1754162.
- Diehl, Brett G., Nicole R. Brown, Curtis W. Frantz, Matthew R. Lumadue, y Fred Cannon. 2013. «Effects of pyrolysis temperature on the chemical composition of refined softwood and hardwood lignins.» *Carbon* 60: 531-537. doi:https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.04.087.
- Dien, Bruce S. 2010. «Mass Balances and Analytical Methods for Biomass Pretreatment Experiments.» En *Biomass to biofuels: strategies for global industries*, editado por A. A. Vertes, N. Qureshi, H. P. Blaschek y H. Yukawa, 213-231. Wiley and Sons.
- Dieste, A, M Cabrera, L Clavijo, y N Cassella. 2019. *La bioeconomía forestal en Uruguay desde una perspectiva tecnológica*. Montevideo: Udelar, Facultad de Ingeniería. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/22747/1/DCCC19.pdf>.
- Djalal, Trache, Tarchoun Ahmed Fouzi, Derradji Mehdi, Hamidon Tuan Sherwyn, Masruchin Nanang, Brosse Nicolas, y Hussin M. Hazwan. 2020. «Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Applications.» *Frontiers in Chemistry* 8: 392. doi:10.3389/fchem.2020.00392.
- Doherty, William O.S., Payam Mousavioun, y Christopher M. Fellows. 2011. «Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers.» *Industrial Crops and Products* 33 (2): 259-276. doi:https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.022.

- Donohoe, Bryon S., Stephen R. Decker, Melvin P. Tucker, Michael E. Himmel, y Todd B. Vinzant. 2008. «Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment.» *Biotechnology and Bioengineering* 101 (5): 913-925. doi:<https://doi.org/10.1002/bit.21959>.
- Doran-Peterson, J., D. M. Cook, y S. K. Brandon. 2008. «Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol.» *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 54 (4): 582-592. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03480.x>.
- Duong, Le Dai, Gi-Yong Nam, Joon-Suk Oh, In-Kyung Park, Nguyen Dang Luong, Ho-Kyu Yoon, Seong-Hoon Lee y otros,. 2014. «High molecular-weight thermoplastic polymerization of kraft lignin macromers with diisocyanate.» *BioResources* 9 (2): 2359-2371. doi:<https://doi.org/10.15376/biores.9.2.2359-2371>.
- Duque, A., P. Manzanares, I. Ballesteros, y M. Ballesteros. 2016. «Steam Explosion as Lignocellulosic Biomass Pretreatment.» En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosi Feedstock Based Biorefinery*, editado por Solange I. Mussatto, 349-368. Elsevier. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00015-3>.
- Duque, Aleta, Paloma Manzanares, y Mercedes Ballesteros. 2017. «Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications.» *Renewable Energy* 114, part B: 1427-1441. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.050>.
- Duval, Antoine, y Martin Lawoko. 2014. «A review on lignin-based polymeric, micro- and nano-structured materials.» *Reactive and Functional Polymers* 85: 78-96. doi:<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.09.017>.
- Dzialo, Magdalena, Justyna Mierziak, Urszula Korzun, Marta Preisner, Jan Szopa, y Anna Kulma. 2016. «The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders.» *International Journal of Molecular Sciences* 17 (2): 41. doi:[10.3390/ijms17020160](https://doi.org/10.3390/ijms17020160).
- Efroymson, Rebecca A., Virginia H. Dale, Keith L. Kline, Allen C. McBride, Jeffrey M. Bielicki, Raymond L. Smith, Esther S. Parish, Peter E. Schweizer, y Denice M. Shaw. 2013. «Environmental Indicators of Biofuel Sustainability: What About Context?» *Environmental Management* 51 (2): 291-306. doi:<https://doi.org/10.1007/s00267-012-9907-5>.
- Eibinger, Manuel, Jürgen Sattelkow, Thomas Ganner, Harald Plank, y Bernd Nidetzky. 2017. «Single-molecule study of oxidative enzymatic deconstruction of cellulose.» *Nature Communications* 8 (1): 894. doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01028-y>.
- Eisenlauer, M, y U Teipel. 2020. «Comminution of Wood - Influence of Process Parameters.» *CHEMICAL ENGINEERING & TECHNOLOGY* 43 (5): 838-847. doi:[10.1002/ceat.201900488](https://doi.org/10.1002/ceat.201900488).
- Elbakush, Areej Elmheidi, y Didem Güven. 2021. «Evaluation of ethanol tolerance in relation to intracellular storage compounds of *Saccharomyces cerevisiae* using FT-IR spectroscopy.» *Process Biochemistry* 101: 266-273. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.11.028>.
- Elboughdiri, Nouredine. 2018. «Effect of Time, Solvent-Solid Ratio, Ethanol Concentration and Temperature on Extraction Yield of Phenolic Compounds From Olive Leaves.» *Engineering, Technology & Applied Science Research* 8 (2): 2805-2808.

- Efkey, Nora, Mostafa Elmahmoudy, Yue Zhang, JianLi Guo, y Yongming Bao. 2019. «Lipid and carotenoid production by *Rhodotourola glutinis* with a combined Cultivation mode od Nitrogen, Sulfur, and Aluminum stress.» *Applied Sciences* 9 (12): 2444. doi:<https://doi.org/10.3390/app9122444>.
- Elli, Elvis Felipe, Paulo Cesar Sentelhas, y Fabiani Denise Bender. 2020. «Impacts and uncertainties of climate change projections on Eucalyptus plantations productivity across Brazil.» *Forest Ecology and Management* 474: 118365. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118365>.
- Ellison, S.L. 2016. «Carotenoids: Physiology.» En *Encyclopedia of Food and Health*, 670-675. Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00120-3>.
- Elshout, PMF, R van Zelm, M van der Velde, Z Steinmann, y MAJ Huijbregts. 2019. «Global relative species loss due to first-generation biofuel production for the transport sector.» *Global change biology. Bioenergy* 763–772. doi:doi: 10.1111/gcbb.12597.
- Erfani Jazi, M., G. Narayanan, F. Aghabozorgi , Behzad Farajidizaji, Ali Aghaei, Mohammad Ali Kamyabi, Chanaka Navarathna, y Todd MIsna. 2019. «Structure, chemistry and physicochemistry of lignin for material functionalization.» *SN Appl. Sci.* 1 (1094). doi:<https://doi.org/10.1007/s42452-019-1126-8>.
- Espirito Santo, Melissa C., Douglas H. Fockink, Vanessa O.A. Pellegrini, Francisco E.G. Guimaraes, Eduardo R. deAzevedo, Luiz Pereira Ramos, y Igor Polikarpov. 2020. «Physical techniques shed light on the differences in sugarcane bagasse structure subjected to steam explosion pretreatments at equivalent combined severity factors.» *Industrial Crops and Products* 158: 113003. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113003>.
- Eyley, Samuel, y Wim Thielemans. 2014. «Surface modification of cellulose nanocrystals.» *Nanoscale* 6 (14): 7764-7779. doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C4NR01756K>.
- Fache, Maxence, Bernard Boutevin, y Sylvain Caillol. 2016. «Vanillin Production from Lignin and Its Use as a Renewable Chemical.» *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4 (1): 35-46. doi:<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01344>.
- Faix, O., D. Meier, y I. Fortmann. 1990a. «Thermal degradation products of wood.» *Holz als Roh- und Werkstoff* 48 (9): 351-354. doi:10.1007/BF02639897.
- Faix, O., D. Meier, y I. Fortmann. 1990b. «Thermal degradation products of wood. Gas chromatographic separation and mass spectrometric characterization of monomeric lignin derived products.» *Holz Als Roh- Und* 281-285.
- Faix, O., I. Fortmann, J. Bremer, y D. Meier. 1991b. «Thermal degradation products of wood.» *Holz Als Roh- Und Werkst* 299-304. doi:10.1007/BF02663795.
- Faix, O., I. Fortmann, J. Bremer, y D. Meier. 1991a. «Thermal degradation products of wood Gas chromatographic separation and mass spectrometric characterization.» *Holz Als Roh- Und Werkst* 49: 213–219.
- Fang, Wei, Sheng Yang, Xi-Luan Wang, Tong-Qi Yuan, y Run-Cang Sun. 2017. «Manufacture and application of lignin-based carbon fibers (LCFs) and lignin-based carbon nanofibers (LCNFs).» *Green Chem.* 19 (8): 1794-1827. doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C6GC03206K>.

- FAO. 2006. «Food and Agriculture Organization of the United Nations.» Último acceso: Octubre de 2021. <https://www.fao.org/3/a0469e/a0469e.pdf>.
- Fava, Fabio, Grazia Totaro, Ludo Diels, Maria Reis, Jose Duarte, Osvaldo Beserra Carioca, Héctor M. Poggi-Varaldo, y Bruno Sommer Ferreira. 2015. «Biowaste biorefinery in Europe: opportunities and research & development needs.» *New Biotechnology* 32 (1): 100-108. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.11.003>.
- Fawzy, Samer, Ahmed I. Osman, John Doran, y David W. Rooney. 2020. «Strategies for mitigation of climate change: a review.» *Environmental Chemistry Letters* 18 (6): 2069-2094. doi:<https://doi.org/10.1007/s10311-020-01059-w>.
- Feng, Junfeng, Chung-yun Hse, Kui Wang, Zhongzhi Yang, Jianchun Jiang, y Junming Xu. 2017. «Directional liquefaction of biomass for phenolic compounds and in situ hydrodeoxygenation upgrading phenolic using bifunctional catalysts.» *Energy* 135: 1-13. doi:<https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.06.032>.
- Feng, Yan-Hong, Hui-Ting Zhong, Yong Liang, Bo Lei, Hong Chen, Xiao-Chun Yin, y Xing-Xing Yu. 2018. «Structure and Compositional Changes of Eucalyptus Fiber after Various Cycles of Continuous Screw Extrusion Steam Explosion.» *BioResources* 13 (2): 2204–2217. doi:<https://doi.org/10.15376/biores.13.2.2204-2217>.
- Fernandes, Maria C., Miguel D. Ferro, Ana F.C. Paulino, Joana A.S. Mendes, Janis Gravitis, Dmitry V. Evtuguin, y Ana M.R.B. Xavier. 2015. «Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion.» *Bioresource Technology* 309-315. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.037>.
- Ferreira, A.F. 2017. «Biorefinery Concept.» En *Biorefineries. Lecture Notes in Energy*, vol 57, editado por Rabaçal M., Ferreira A., Silva C. y Costa M., 1-20. Springer, Cham. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-48288-0_1.
- Ferreira-Santos, Pedro, Elisa Zanuso, Zlatina Genisheva, Cristina M.R. Rocha, y José A. Teixeira. 2020. «Green and Sustainable Valorization of Bioactive Phenolic Compounds from Pinus By-Products.» *Molecules* 25 (12): 2931. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules25122931>.
- Filiciotto, Layla, Alina M. Balu, Antonio A. Romero, Carlo Angelici, Jan C. van der Waal, y Rafael Luque. 2019. «Reconstruction of humins formation mechanism from decomposition products: A GC-MS study based on catalytic continuous flow depolymerizations.» *Molecular Catalysis* 479: 110564. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110564>.
- Fior Markets. 2019. *Global Carotenoids Market is Expected to Reach USD 3.59 Billion by 2025 : Fior Markets*. GlobeNewsWire. Último acceso: Setiembre de 2021. doi:<https://www.globenewswire.com/news-release/2019/10/15/1929461/0/en/Global-Carotenoids-Market-is-expected-to-reach-USD-3-59-billion-by-2025-Fior-Markets.html>.
- Fiore, M., V. Magi, y A. Viggiano. 2020. «Internal combustion engines powered by syngas: A review.» *Applied Energy* 276: 115415. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.115415>.

- FitzPatrick, Michael, Pascale Champagne, Michael F. Cunningham, y Ralph A. Whitney. 2010. «A biorefinery processing perspective: Treatment o lignocellulosic materials for the production of value-added products.» *Bioresource Technology* 8915-8922.
- Fockink, Douglas Henrique, Jorge Hernán Sánchez, y Luiz Pereira Ramos. 2018. «Comprehensive analysis of sugarcane bagasse steam explosion using autocatalysis and dilute acid hydrolysis (H₃PO₄ and H₂SO₄) at equivalent combined severity factors.» *Industrial Crops and Products* 123: 563-572.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.017>.
- Folch, PL, MMM Bisschops, y RA Weusthuis. 2021. «Metabolic energy conservation for fermentative product formation.» *Microb Biotechnol.* 14 (3): 829-858.
doi:10.1111/1751-7915.13746.
- Fonseca, G.C., C.B.B. Costa, y A.J.G. Cruz. 2020. «Economic analysis of a second-generation ethanol and electricity biorefinery using superstructural optimization.» *Energy* 204: 117988. doi:<https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117988>.
- Frengova, G. I., y D. M Beshkova. 2009. «Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance.» *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 163-180.
doi:10.1007/s10295-008-0492-9.
- Fusco, Francesca Anna, Gabriella Fiorentino, Emilia Pedone, Patrizia Contursi, Simonetta Bartolucci, y Danila Limauro. 2018. «Biochemical characterization of a novel thermostable β -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum*.» *International Journal of Biological Macromolecules* 113: 783-791.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.018>.
- Galanakis, C.M., V. Goulas, V. Tsakona, G.A. Manganaris, y V. Gekas. 2013. «A Knowledge base for the Recovery of natural phenols with different solvents.» *International Journal of Food Properties* 16: 382-396. doi:10.1080/10942912.2010.522750.
- Gallo, Jean Marcel R, y Marilia A. Trapp. 2017. «The Chemical Conversion of Biomass-Derived Saccharides: an Overview.» *Journal of the Brazilian Chemical Society* 28 (9): 1586-1607.
doi:<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170009>.
- Gao, Chao, Cuiqing Ma, y Ping Xu. 2011. «Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass.» *Biotechnology Advances* 29 (6): 930-939.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.022>.
- García-Aparicio, M.P., J.M. Oliva, P. Manzanares, M. Ballesteros, I. Ballesteros, A. González, y M.J. Negro. 2011. «Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875.» *Fuel* 1624-1630.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.10.052>.
- García-Velásquez, Carlos A., y Carlos A. Cardona. 2019. «Comparison of the biochemical and thermochemical routes for bioenergy production: A techno-economic (TEA), energetic and environmental assessment.» *Energy* 172: 232-242.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.01.073>.
- Garrett, R.H., y C.M. Grisham. 2010. *Biochemistry. 4th Edition*. Brooks/Cole, Cengage Learning.

- Garrigós-Martínez, Javier, Astrid Weninger, José Luis Montesinos-Seguí, Christian Schmid, Francisco Valero, Claudia Rinnofner, Anton Glieder, y Xavier García-Ortega. 2021. «Scalable production and application of *Pichia pastoris* whole cell catalysts expressing human cytochrome P450 2C9.» *Microbial Cell Factories* 20 (90): 1-13. doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01577-4>.
- Garrote, G., H. Domínguez, y J.C. Parajó. 2001. «Study on the deacetylation of hemicelluloses during the hydrothermal processing of Eucalyptus wood.» *Holz als Roh- und Werkstoff* 59: 53-59.
- Gasmi Benahmed, Asma, Amin Gasmi, Maria Arshad, Mariia Shanaida, Roman Lysiuk, Massimiliano Peana, Irena Pshyk-Titko, Stepan Adamiv, Yurii Shanaida, y Geir Bjørklund. 2020. «Health benefits of xylitol.» *Applied Microbiology and Biotechnology* 104 (17): 7225-7237. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10708-7>.
- Gasmi, Najla, Pierre-Etienne Jacques, Natalia Klimova, Xiao Guo, Alessandra Ricciardi, François Robert, y Bernard Turcotte. 2014. «The switch from fermentation to respiration in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the Ert1 transcriptional activator/repressor.» *PubMed* 547-560. doi:10.1534/genetics.114.168609.
- Georgelis, N., NH. Yennawar, y DJ. Cosgrove. 2012. «Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin.» *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (37): 14830-5. doi:10.1073/pnas.1213200109.
- Gérardy, Romaric, Damien P. Debecker, Julien Estager, Patricia Luis, y Jean-Christophe M. Monbaliu. 2020. «Continuous Flow Upgrading of Selected C2–C6 Platform Chemicals Derived from Biomass.» *Chemical Reviews* 120 (15): 7219-7347. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00846>.
- Giannattasio, Sergio, Nicoletta Guaragnella, Maša Ždraljević, y Ersilia Marra. 2013. «Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid.» *Frontiers in Microbiology* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00033.
- Gírio, F.M., C. Fonseca, F. Carvalheiro, L.C. Duarte, S. Marques, y R. Bogel-Lukasik. 2010. «Hemicelluloses for fuel ethanol: A review.» *Bioresource Technology* 101 (13): 4775-4800. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>.
- Giummarella. 2018. *Fundamental Aspects of Lignin Carbohydrate Complexes (LCC) : Mechanisms, Recalcitrance and Material concepts*. <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1205464/FULLTEXT01.pdf>.
- Giurca, Alexandru, y Philipp Späth. 2017. «A forest-based bioeconomy for Germany? Strengths, weaknesses and policy options for lignocellulosic biorefineries.» *Journal of Cleaner Production* 153: 51-62. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.156>.
- Go, Camille Celeste, Krunal Pandav, Marcos A Sanchez-Gonzalez, y Gustavo Ferrer. 2020. «Potential Role of Xylitol Plus Grapefruit Seed Extract Nasal Spray Solution in COVID-19: Case Series.» *Cureus* 12 (11): e11315. doi:10.7759/cureus.11315.
- Gobert, Antoine, Raphaëlle Tourdot-Maréchal, Christophe Morge, Céline Sparrow, Youzhong Liu, Beatriz Quintanilla-Casas, Stefania Vichi, y Hervé Alexandre. 2017. «Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential

- Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile.» *Frontiers in microbiology* 8: 2175. doi:10.3389/fmicb.2017.02175.
- Goli, Jyosthna Khanna, Smita Hasini Panda, y Venkaster Rao Linga. 2012. «Molecular Mechanism of D-xylitol Production in yeasts: Focus on Molecular Transportation, Catabolic Sensing and Stress Response.» En *D-Xylitol*, editado por S.S. da Silva y A.K. Chandel, 85-107. Berlin: Springer-Verlag.
- Gominho, J., A. Lourenço, A. V. Marques, y H Pereira. 2020. «An extensive study on the chemical diversity of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* wood.» *Phytochemistry* 180: 112520. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112520>.
- Gonçalves, F. A., E. J. Sanjinez-Argandona, y G. G Fonseca. 2013. «Cellulosic ethanol and its co-products from different substrates, pretreatments, microorganisms and bioprocesses: a review.» *Natural Science* 5: 624-630. doi:10.4236/ns.2013.55077.
- Gonçalves, F., E. Sanjinez-Argandona, y G. Fonseca. 2013. «Cellulosic ethanol and its co-products from different substrates, pretreatments, microorganisms and bioprocesses: A review.» *Natural Science* 5 (5): 624-630. doi:<http://dx.doi.org/10.4236/ns.2013.55077>.
- Goncalves, Sandra, y Anabela Romano. 2017. «Inhibitory properties of phenolic compounds against enzymes linked with human diseases.» *Phenolic compounds-biological activity* 40 (5): 100-120. doi:10.5772/66844.
- Goodell, Barry, Jerrold E. Winandy, y Jeffrey J. Morrell. 2020. «Fungal Degradation of Wood: Emerging Data, New Insights and Changing Perceptions.» *Coatings* 10 (12): 1210. doi:<https://doi.org/10.3390/coatings10121210>.
- Grand View Research. 2021. «Lactic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report By Raw Material (Sugarcane, Corn, Cassava), By Application (PLA, Food & Beverages), By Region, And Segment Forecasts, 2021 - 2028.» Último acceso: Setiembre de 2021. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market>.
- Grand View Research. 2017. «Vanillin Market Size Worth \$724.5 Million By 2025 | CAGR: 7.0%.» Último acceso: Setiembre de 2021. <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-vanillin-market>.
- Granström, TB, K Izumori, y M Leisola. 2007. «A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol.» *Appl Microbiol Biotechnol.* 74 (2): 277-281. doi:10.1007/s00253-006-0761-3.
- Guigou, Mairan, María Noel Cabrera, Mauricio Vique, Melissa Bariani, Juan Guarino, y Mario Daniel Ferrari. 2018. «Combined pretreatments of *Eucalyptus* sawdust for ethanol production.» *Biomass Conversion and Biorefinery* 9: 293-304.
- Gunjan, Singh, Jawed Arshad, Paul Debarati, Bandyopadhyay Kalyan K., Kumari Abha, y Haque Shafiul. 2016. «Concomitant Production of Lipids and Carotenoids in *Rhodospiridium toruloides* under Osmotic Stress Using Response Surface Methodology.» *Frontiers in Microbiology* 7: 1686. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01686>.

- Gupta, Rishi, Garima Yadav, Gaurav Kumar, Anju Yadav, Jitendra Kumar Saini, y Ramesh Chander Kuhad. 2019. «Second Generation Bioethanol Production: The State of Art.» En *Sustainable Approaches for Biofuels Production Technologies: From Current Status to Practical Implementation*, 121-146. Springer International Publishing.
doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-94797-6_8.
- Haldar, Dibyajyoti, y Mihir Kumar Purkait. 2021. «A review on the environment-friendly emerging techniques for pretreatment of lignocellulosic biomass: Mechanistic insight and advancements.» *Chemosphere* 264, part 2: 128523.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128523>.
- Heltzel, Jacob, Sushil K.R. Patil, y Carl R.F. Lund. 2016. «Humin Formation Pathways.» En *Reaction Pathways and Mechanisms in Thermocatalytic Biomass Conversion II*, editado por Marcel Schlaf y Z. Conrad Zhang, 105-118. Springer.
- Hemmerich, J, N Adelantado, JM Barrigón, X Ponte, A Hörmann, P Ferrer, F Kensity, y F Valero. 2021. «Comprehensive clone screening and evaluation of fed-batch strategies in a microbio reactor and lab scale stirred tank bioreactor system: application on *Pichia pastoris* producing *Rhizopus oryzae* lipase.» *Microbial Cell Factories* 13 (1): 1-31.
doi:10.1186/1475-2859-13-36.
- Henderson, M., E. Block, y V. Müller. 2014. «Examining the Role of Membrane Lipid Composition in Determining the Ethanol Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*.» *Applied and Environmental Microbiology* 80 (10): 2966-2972.
doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.04151-13>.
- Hendriks, A.T.W.M., y G. Zeeman. 2009. «Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.» *Bioresource Technology* 100: 10-18.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>.
- Henn, A., y ML Mattinen. 2019. «Chemo-enzymatically prepared lignin nanoparticles for value-added applications.» *World J Microbiol Biotechnol* 35 (125).
doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2697-7>.
- Henriksson, Gunnar. 2009. «6 - Lignin.» En *Pulp and Paper Chemistry and Technology Volume 1 Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, editado por Monica Ek, Göran Gellerstedt y Gunnar Henriksson. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.
- Henriksson, Gunnar, y Helena Lennholm . 2009. «4 - Cellulose and Carbohydrate Chemistry.» En *Pulp and Paper Chemistry and Technology Volume 1 Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, editado por Monica Ek, Göran Gellerstedt y Gunnar Henriksson, 72-99. de Gruyter.
- Hernández-Pérez, Andrés Felipe, Priscila Vaz de Arruda, Luciane Sene, Silvio Silvério da Silva, Anuj Kumar Chandel, y Maria das Graças de Almeida Felipe. 2019. «Xylitol bioproduction: state-of-the-art, industrial paradigm shift, and opportunities for integrated biorefineries.» *Critical Reviews in Biotechnology* 39 (7): 924-943.
doi:<https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1640658>.
- Herrera, Israel, Cristina de la Rúa, y Yolanda Lechón. 2015. «<https://www.gub.uy/ministerio-industria-energia-mineria>.» 22 de 09. <https://www.gub.uy/ministerio-industria-energia-mineria/sites/ministerio-industria-energia->

mineria/files/documentos/publicaciones/1.1%20-%20Ciclo%20de%20Vida%20Bioetanol%20Planta%20Bella%20Uni%C3%B3n.pdf.

- Hoang, Anh Tuan, Sandro Nizetic, Hwai Chyuan Ong, Cheng Tung Chong, A.E. Atabani, y Van Viet Pham. 2021. «Acid-based lignocellulosic biomass biorefinery for bioenergy production: Advantages, application constraints, and perspectives.» *Journal of Environmental Management* 296: 113194.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113194>.
- Hoang, Anh Tuan, Sandro Nižetić, Hwai Chyuan Ong, M. Mofijur, S.F. Ahmed, B. Ashok, Van The Vinh Bui, y Minh Quang Chau. 2021. «Insight into the recent advances of microwave pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass into sustainable biofuel.» *Chemosphere* 281: 130878.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130878>.
- Hodásová, Ľudmila, Michal Jablonský, Andrea Škulcová, y Aleš Ház. 2015. «Lignin, potential products and their market value.» *Wood Research* 60 (6): 973-986.
<http://www.centrumdp.sk/wr/201506/13.pdf>.
- Hofstetter, Karin, Barbara Hinterstoisser, y Lennart Salmén. 2006. «Moisture uptake in native cellulose – the roles of different hydrogen bonds: a dynamic FT-IR study using Deuterium exchange.» *Cellulose* 13: 131-145.
- Hou, Jinju, Zhen Qiu, Hui Han, y Qiuzhuo Zhang. 2018. «Toxicity evaluation of lignocellulose-derived phenolic inhibitors on *Saccharomyces cerevisiae* growth by using the QSTR method.» *Chemosphere* 201: 286-293.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.008>.
- Hsu, Chiung-Wen, Cheng-Mei Tung, y Chiu-Yue Lin. 2017. «Industrialization roadmap model for fermentative hydrogen production from biomass in Taiwan.» *International Journal of Hydrogen Energy* 42: 27460-27470.
- Hu, Zhoujian, Robert Sykes, Mark F. Davis, E. Charles Brummer, y Arthur J. Ragauskas. 2010. «Chemical profiles of switchgrass.» *Bioresource Technology* 101 (9): 3253-3257.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.033>.
- Huang, Caoxing, Yayue Zheng, Wenqian Lin, Yuxuan Shi, Guohong Huang, y Qiang Yong. 2020. «Removal of fermentation inhibitors from pre-hydrolysis liquor using polystyrene divinylbenzene resin.» *Biotechnology for Biofuels* 13 (188).
doi:<https://doi.org/10.1186/s13068-020-01828-3>.
- Huang, Chao, Yue Feng, Gopal Patel, Xiao-qian Xu, Jun Qian, Qun Liu, y Guo-yin Kai. 2021. «Production, immobilization and characterization of beta-glucosidase for application in cellulose degradation from a novel *Aspergillus versicolor*.» *International Journal of Biological Macromolecules* 177: 437-446.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.154>.
- Huang, Yu-Fong, Pei-Te Chiueh, Wen-Hui Kuan, y Shang-Lien Lo. 2016. «Microwave pyrolysis of lignocellulosic biomass: Heating performance and reaction kinetics.» *Energy* 100: 137-144. doi:<https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.01.088>.
- IEA Bioenergy Task 42. 2009. <https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2013/10/Task-42-Booklet.pdf>.

- IMPO. 2007. Último acceso: 11 de Octubre de 2021.
<https://www.impo.com.uy/bases/leyes/18195-2007>.
- International Energy Agency. 2021. «International Energy Agency.» 16 de Junio.
<https://iea.blob.core.windows.net/assets/d0031107-401d-4a2f-a48b-9eed19457335/GlobalEnergyReview2021.pdf>.
- Jalak, Jürgen, Mihhail Kurašin, Hele Teugjas, y Priit Väljamäe. 2012. «Endo-exo Synergism in Cellulose Hydrolysis Revisited.» *Journal of Biological Chemistry* 287 (34): 28802-28815.
 doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381624>.
- Jarvis, M.C. 2011. «Plant cell walls: Supramolecular assemblies.» *Food Hydrocolloids* 25 (2): 257-262. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.09.010>.
- Jedvert, Krestin, Anna Saltberg, Mikael E. Lindström, y Hans Theliander. 2012. «Mild Steam Explosion and chemical pre-treatment of Norway Spruce.» *Bioresources* (7 (2)): 2051-2074.
- Jiang, Bo, Jiayao Yu, Xufeng Luo, Yangsu Zhu, y Yongcan Jin. 2018. «A strategy to improve enzymatic saccharification of wheat straw by adding water-soluble lignin prepared from alkali pretreatment spent liquor.» *Process Biochemistry* 71: 147-151.
 doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.05.007>.
- Jiang, F., T. Li, Y. Li, Y. Zhang, A. Gong, J. Dai, E. Hitz, W. Luo, y L. Hu. 2018. «Wood-Based Nanotechnologies toward Sustainability.» *Advanced Materials* 30 (1): 1703453.
 doi:<https://doi.org/10.1002/adma.201703453>.
- Johansen, Katja Salomon. 2016. «Lytic Polysaccharide Monooxygenases: The Microbial Power Tool for Lignocellulose Degradation.» *Trends in Plant Science* 21 (11): 926-936.
 doi:<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.012>.
- Jonas De Roos, Luc De Vuyst. 2018. «Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages.» *Current Opinion in Biotechnology* 49: 115-119.
 doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.007>.
- Jönsson, Leif J., y Carlos Martín. 2016. «Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects.» *Bioresource Technology* (199): 103-112.
- Jugwanth, Yanchal, Y. Sewsynker-Sukai, y E.B. Gueguim Kana. 2020. «Valorization of sugarcane bagasse for bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation: Optimization and kinetic studies.» *Fuel* 262: 116552.
 doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116552>.
- Kaenchan, Piyanon, Nattapong Puttanapong, Thongchart Bowonthumrongchai, Kitti Limskul, y Shabbir H. Gheewala. 2019. «Macroeconomic modeling for assessing sustainability of bioethanol production in Thailand.» *Energy Policy* 127: 361-373.
 doi:<https://doi.org/10.1016/j.enpol.2018.12.026>.
- Kainthola, Jyoti, Aditi Podder, Marcus Fechner, y Ramesh Goel. 2021. «An overview of fungal pretreatment processes for anaerobic digestion: Applications, bottlenecks and future needs.» *Bioresource Technology* 321: 124397.
 doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124397>.

- Kang, Kang, Shaowen Wang, Guohong Lai, Gang Liu, y Miao Xing. 2013. «Characterization of a novel swollenin from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose.» *BMC Biotechnology* 13 (1): 1–9. doi:<https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-42>.
- Karunanithy, C., K. Muthukumarappan, y W.R. Gibbons. 2014. «Sequential extrusion-microwave pretreatment of switchgrass and big bluestem.» *Bioresource Technology* 393-398. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.032>.
- Karunanithy, C., y K. Muthukumarappan. 2010. «Effect of Extruder Parameters and Moisture Content of Switchgrass, Prairie Cord Grass on Sugar Recovery from Enzymatic Hydrolysis.» *Appl Biochem Biotechnol* 162: 1785–1803. doi:<https://doi.org/10.1007/s12010-010-8959-3>.
- Kataria, Rashmi, Annerel Mol, Els Schulten, Anton Happel, y Solange I. Mussato. 2017. «Bench scale steam explosion pretreatment of acid impregnated elephant grass biomass and its impacts on biomass composition, structure and hydrolysis.» *Industrial Crops and Products* 106: 48-58. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.050>.
- Kaur, A, y R Monga. 2021. «Eucalyptus Trees Plantation: A Review on Suitability and their Beneficial Role.» *International Journal of Bio-Resource & Stress Management* 12 (1): 16-25. doi:<https://doi.org/10.23910/1.2021.2174>.
- Kautto, J., K. Henricson, H. Sixta, M. Trogen, y R. Alen. 2010. «Effects of integrating a bioethanol production process to a kraft pulp mill.» *Nordic Pulp and Paper Research Journal* 25 (2): 233-242.
- Keller, Malene Billeskov, Silke Flindt Badino, Nanna Røjel, Trine Holst Sørensen, Jeppe Kari, Brett McBrayer, Kim Borch, Benedikt M. Blossom, y Peter Westh. 2021. «A comparative biochemical investigation of the impeding effect of C1-oxidizing LPMOs on cellobiohydrolases.» *Journal of Biological Chemistry* 296: 100504. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100504>.
- Kemppainen, Katariina, Jenni Inkinen, Jaana Uusitalo, Tiina Nakari-Setälä, y Matti Siika-aho. 2012. «Hot water extraction and steam explosion as pretreatments for ethanol production from spruce bark.» *Bioresource Technology* (117): 131-139.
- Khalil Diop, Chérif Ibrahima, Jean-Michel Lavoie, y Michel A. Huneault. 2015. «Structural changes of *Salix miyabeana* cellulose fibres during dilute-acid steam explosion: Impact of reaction temperature and retention time .» *Carbohydrate Polymers* (119): 8-17.
- Khodayari, Ali, Wim Thielemans, Ulrich Hirn, Aart W. Van Vuure, y David Seveno. 2021. «Cellulose-hemicellulose interactions - A nanoscale view.» *Carbohydrate Polymers* 270: 118364. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118364>.
- Khoo, Hsien H. 2015. «Review of bio-conversion pathways lignocellulose-to-ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (46): 100-119.
- Kim, In Jung, Hee Jin Lee, In-Geol Choi, y Kyoung Heon Kim. 2014. «Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase.» *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (20): 8469-8480. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6001-3>.

- Kim, Youngmi, Eduardo Ximenes, Nathan S. Mosier, y Michael R. Ladisch. 2011. «Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass.» *Enzyme and Microbial Technology* 48 (4-5): 408-415.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.01.007>.
- Klemm, D., B. Philipp, T. Heinze, y W. Wagenknecht. 1998. *Comprehensive Cellulose Chemistry*. Vol. I: Fundamentals and Analytical Methods. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Ko, J, Y Um, Y-C Park, J-H Seo, y K Kim. 2015. «Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose.» *Applied Microbiology & Biotechnology* 99 (10): 4201–4212. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6595-0>.
- Kong, Fanhua, Shimo Kang, Jinlong Tian, Mohan L, Xiaona Liang, Mei Yang, Yan Zheng y otros,. 2020. «Interaction of xylitol with whey proteins: Multi-spectroscopic techniques and docking studies.» *Food Chemistry* 326: 126804.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126804>.
- Kong, In lok, Timothy Lee Turner, Heejin Kim, Soo Rin Kim, y Yong-Su Jin. 2018. «Phenotypic evaluation and characterization of 21 industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains.» *FEMS Yeast Research* 18 (1). doi:<https://doi.org/10.1093/femsyr/foy001>.
- Kont, Riin, Bastien Bissaro, Vincent G. H. Eijsink, y Priit Väljamäe. 2020. «Kinetic insights into the peroxygenase activity of cellulose-active lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs).» *Nature Communications* 11 (1): 5786. doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-020-19561-8>.
- Kookana, R.S., A.K. Sarmah, L. Van Zwieten, E. Krull, y B. Singh. 2011. «Chapter three - Biochar Application to Soil: Agronomic and Environmental Benefits and Unintended Consequences.» *Advances in Agronomy* 112: 103-143.
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385538-1.00003-2>.
- Kumar, Ritesh, N. Chandrashekar, N. R. R. Prasad, y Ritesh Tailor. 2020. «Effect of Extractive Content on Fuelwood Characteristics of Certain Woody and Non-Woody Biomass.» *Current Science* 118 (6): 966-969. doi:10.18520/cs/v118/i6/966-969.
- Kuppuraj, Sree Preethy, Baskar Venkidasamy, Dhivya Selvaraj, y Sathishkumar Ramalingam. 2021. «Comprehensive in silico and gene expression profiles of MnP family genes in *Phanerochaete chrysosporium* towards lignin biodegradation.» *International Biodeterioration & Biodegradation* 157: 105143.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105143>.
- la diaria. 2021. «Biocombustibles: Ancap presentó nuevo “modelo de pago” a productores de Bella Unión y defiende mejora en otras plantas de ALUR.» *la diaria*, 5 de marzo. Último acceso: Noviembre de 2021.
<https://ladiaria.com.uy/politica/articulo/2021/3/biocombustibles-ancap-presento-nuevo-modelo-de-pago-a-productores-de-bella-union-y-defiende-mejora-en-otras-plantas-de-alur/>.
- Lamsal, B., J. Yoo, y K. Brijwani S. Alavi. 2010. «Extrusion as a thermo-mechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol.» *Biomass and Bioenergy* 34 (12): 1703-1710.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.06.009>.

- Larnaudie, Valeria, Mario Daniel Ferrari, y Claudia Lareo. 2021. «Life cycle assessment of ethanol produced in a biorefinery from liquid hot water pretreated switchgrass.» *Renewable Energy* 176: 606-616. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.05.094>.
- Lattermann, Clemens, y Jochen Büchs. 2015. «Microscale and miniscale fermentation and screening.» *Current Opinion in Biotechnology* 35: 1-6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.005>.
- Laurichesse, Stéphanie, y Luc Avérous. 2014. «Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers.» *Progress in Polymer Science* 39 (7): 1266-1290. doi:<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.11.004>.
- Leal, L.E., V. Juárez, y M. Terán. 2011. «Composición química de la madera de Eucalyptus grandis Hill ex Maiden procedente de Finca Las Maravillas, Departamento de Orán, Salta.» *Quebracho* 19: 75-83.
- Lee, Hung, Audrey L. Atkin, Maria F.S. Barbosa, Delbert R. Dorscheid, y Henry Schneider. 1988. «Effect of biotin limitation on the conversion of xylose to ethanol and xylitol by *Pachysolen tannophilus* and *Candida guilliermondii*.» *Enzyme and Microbial Technology* 10 (2): 81-84. doi:10.1016/0141-0229(88)90002-6.
- Lenihan, P., A. Orozco, E. O'Neill, M.N.M. Ahmad, D.W. Rooney, y G.M. Walker. 2010. «Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass.» *Chemical Engineering Journal* 156 (2): 395-403. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.10.061>.
- Leong, H. Y., P. L. Show, M. H. Lim, C. W. Ooi, y T. C. Ling. 2018. «Natural red pigments from plants and their health benefits: A review.» *Food Reviews International* 34 (5): 463-482. doi:10.1080/87559129.2017.1326935.
- Lewis Liu, Z. 2011. «Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates.» *Applied Microbiology & Biotechnology* 90 (3): 809-825. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3167-9>.
- Li, Bo, Cai-Yun Xie, Bai-Xue Yang, Min Gou, Zi-Yuan Xia, Zhao-Yong Sun, y Yue-Qin Tang. 2020. «The response mechanisms of industrial *Saccharomyces cerevisiae* to acetic acid and formic acid during mixed glucose and xylose fermentation.» *Process Biochemistry* 91: 319-329. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.01.002>.
- Li, Jing, Jianjun Dai, Guangqing Liu, Hedong Zhang, Zuopeng Gao, Jie Fu, Yanfeng He, y Yan Huang. 2016. «Biochar from microwave pyrolysis of biomass: A review.» *Biomass and Bioenergy* 94: 228-244. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.09.010>.
- Li, Sha, Pan Li, Feng Feng, y Li-Xin Luo. 2015. «Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process.» *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (12): 4997-5024. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6659-1>.
- Li, Yalin, Sarang S. Bhagwat, Yoel R. Cortés-Peña, Dongwon Ki, Christopher V. Rao, Yong-Su Jin, y Jeremy S. Guest. 2021. «Sustainable Lactic Acid Production from Lignocellulosic Biomass.» *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 9 (3): 1341-1351. doi:10.1021/acssuschemeng.0c08055.
- Lin, X, N Gao, S Liu, S Zhang, S Song, C Ji, X Dong, Y Su, ZK Zhao, y B Zhu. 2017. «Characterization the carotenoid productions and profiles of three *Rhodospiridium*

- toruloides mutants from *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation.» *Yeast* 34 (8): 335-342. doi:<https://doi.org/10.1002/yea.3236>.
- Lin, Zengxiang, L. Liu, R. Li, y J. Shi. 2012. «Screw Extrusion Pretreatments to Enhance the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass.» *Journal of Microbial & Biochemical Technology* S12:002: 1-5. doi:[10.4172/1948-5948.S12-002](https://doi.org/10.4172/1948-5948.S12-002).
- Lindsey, Kline, Amy Johnson, Kim Pyoungchung, Samuel Jackson, y Nicole Labbé. 2013. «Monitoring switchgrass composition to optimize harvesting periods for bioenergy and value-added products.» *Biomass and Bioenergy* 56: 29-37. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.04.023>.
- Liu, Enshi, Lalitendu Das, Bingyu Zhao, Mark Crocker, y Jian: Shi. 2017. «Impact of Dilute Sulfuric Acid, Ammonium Hydroxide, and Ionic Liquid Pretreatments on the Fractionation and Characterization of Engineered Switchgrass.» *BioEnergy Research* 10 (4): 1079-1093. doi:<https://doi.org/10.1007/s12155-017-9868-x>.
- Liu, Jiawen, Jinshui Yang, Ruonan Wang, Liang Liu, Yu Zhang, Huifang Bao, Jin Myong Jang, Entao Wang, y Hongli Yuan. 2020. «Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation.» *International Journal of Biological Macromolecules* 152: 288-294. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.256>.
- Liu, Li-Yang, Jin-Cheng Qin, Kai Li, Muhammad Aamer Mehmood, y Chen-Guang Liu. 2017. «Impact of Moisture Content on Instant Catapult Steam Explosion Pretreatment of Sweet Potato Vine.» *Bioresources and Bioprocessing* 4 (1): 1-11. doi:[10.1186/s40643-017-0179-z](https://doi.org/10.1186/s40643-017-0179-z).
- Liu, Lu, Zhicai Zhang, Jia Wang, Yajuan Fan, Wenjing Shi, Xiaocui Liu, y Quanshan Shun. 2019. «Simultaneous saccharification and co-fermentation of corn stover pretreated by H₂O₂ oxidative degradation for ethanol production.» *Energy* 168: 946-952. doi:<https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.11.132>.
- Liu, Shan, Shuhao Qin, Min He, Dengfeng Zhou, Qingdong Qin, y Hao Wang. 2020. «Current applications of poly(lactic acid) composites in tissue engineering and drug delivery.» *Composites Part B: Engineering* 199: 108238. doi:<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2020.108238>.
- Liu, Simin, I-Min Lee, Umed Ajani, Stephen R. Cole, Julie E Buring, y JoAnn Manson. 2001. «Intake of vegetables rich in carotenoids and risk of coronary heart disease in men: The Physicians' Health Study.» *International Journal of Epidemiology* 30 (1): 130-135. doi:<https://doi.org/10.1093/ije/30.1.130>.
- Liu, Ya-Jun, Bin Li, Yingang Feng, y Qiu Cui. 2020. «Consolidated bio-saccharification: Leading lignocellulose bioconversion into the real world.» *Biotechnology Advances* 40: 107535. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107535>.
- Liu, Yuzhong, Pablo Cruz-Morales, Amin Zargar, Michael S. Belcher, Bo Pang, Elias Englund, Qingyun Dan, Kevin Yin, y Jay D. Keasling. 2021. «Biofuels for a sustainable future.» *Cell* 184 (6): 1636-1647. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.052>.

- Liu, Z., C van den Berg, Weusthuis, R.A., G Dragone, y Mussatto, S.I. 2021. «Strategies for an improved extraction and separation of lipids and carotenoids from oleaginous yeast.» *Sep. Purif. Technol.* 257: 117946. doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.11>.
- Liu, Z.L. 2021. «Reasons for 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: current state of knowledge and perspectives for further improvements.» *Appl Microbiol Biotechnol* 105: 2991–3007. doi:<https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1007/s00253-021-11256-4>.
- Liu, Zhi-Hua, Lei Qin, Feng Pang, Ming-Jie Jin, Bing-Zhi Li, Yong Kang, Bruce E. Dale, y Ying-Jin Yuan. 2013. «Effects of Biomass Particle Size on Steam Explosion Pretreatment Performance for Improving the Enzyme Digestibility of Corn Stover.» *Industrial Crops & Products* 44: 176-184. doi:[10.1016/j.indcrop.2012.11.009](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.009).
- Liu, Zhijia, Adam M. Feist, Giuliano Dragone, y Solange I. Mussatto. 2020. «Lipid and carotenoid production from wheat straw hydrolysates by different oleaginous yeasts.» *Journal of Cleaner Production* 249 (119308).
- Liu, Zhijia, Adam M. Feist, Giuliano Dragone, y Solange I. Mussatto. 2020. «Lipid and carotenoid production from wheat straw hydrolysates by different oleaginous yeasts.» *Journal of Cleaner Production* 249 (119308). doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119308>.
- Liu, Zhijia, Mohammad Radi, Elsayed T.T. Mohamed, Adam M. Feist, Giuliano Dragone, y Solange I. Mussatto. 2021. «Adaptive laboratory evolution of *Rhodospiridium toruloides* to inhibitors derived from lignocellulosic biomass and genetic variations behind evolution.» *Bioresource Technology* 333: 125171. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125171>.
- Liu, ZongLin Lewis. 2018. «Understanding the tolerance of the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* against a major class of toxic aldehyde compounds.» *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (13): 5639-5390. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8993-6>.
- López, Pau Cabaneros, Chuantao Peng, Nils Arneborg, Helena Junicke, y Krist V. Gernaey. 2021. «Analysis of the response of the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae* during the detoxification of common lignocellulosic inhibitors.» *Scientific Reports* 11 (1): 6853. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-021-86135-z>.
- Lourenço, Ana, Jorge Gominho, António Velez Marques, y Helena Pereira. 2013. «Variation of Lignin Monomeric Composition During Kraft Pulping of *Eucalyptus globulus* Heartwood and Sapwood.» *Journal of Wood Chemistry and Technology* 33: 1-18. doi:<https://doi.org/10.1080/02773813.2012.703284>.
- Lu, Fachuang, y John Ralph. 2010. «Chapter 6 - Lignin.» En *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, 169-207. Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53234-3.00006-7>.
- Luo, Hao, y Mahdi M. Abu-Omar. 2017. «Chemicals From Lignin.» *Encyclopedia of Sustainable Technologies* 573-585. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10235-0>.

- Luo, Jia, Zhen Fang, y Richard L. Smith. 2014. «Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels.» *Progress in Energy and Combustion Science* 41: 56-93.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.pecs.2013.11.001>.
- Luo, Lin, Ester van der Voet, y Gjalt Huppes. 2009. «Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (13): 1613-1619.
- Luo, Yiping, Zheng Li, Xiaoling Li, Xiaofeng Liu, Jiajun Fan, James H. Clark, y Changwei Hu. 2019. «The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass: A review.» *Catalysis Today* (319): 14-24.
- Luthria, Devanand. 2008. «Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor.» *Food Chemistry* 107 (2): 745-752.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.074>.
- Ma, X., J. Chen, J. Zhu, y N. Yan. 2021. «Lignin-Based Polyurethane: Recent Advances and Future Perspectives.» *Macromol. Rapid Commun* 42: 2000492.
doi:<https://doi.org/10.1002/marc.202000492>.
- Macfarlane, A.L., R. Prestidge, M.M. Farid, y J.J.J. Chen. 2009. «Dissolved air flotation: A novel approach to recovery of organosolv lignin.» *Chemical Engineering Journal* 148: 15-19.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.07.036>.
- Machado, G., S. Leon, F. Santos, R. Lourega, J. Dullius, M. Mollmann, y P. Eichler. 2016. «Literature Review on Furfural Production from Lignocellulosic Biomass.» *Natural Resources* 7: 115-129. doi:10.4236/nr.2016.73012.
- Machmudah, S., Wahyudiono, y H., Goto, M. Kanda. 2017. «Chapter 3 - Hydrolysis of Biopolymers in Near-Critical and Subcritical Water.» En *Water Extraction of Bioactive Compounds*, editado por Herminia Dominguez González y María Jesús González Muñoz, 69-107. Elsevier.
- Mäkinen, K. 2011. «Sugar Alcohol Sweeteners as Alternatives to Sugar with Special Consideration of Xylitol.» *Med Princ Pract* 20: 303-320. doi:10.1159/000324534.
- Mäkinen, KK. 1978. *Biochemical principles of the use of xylitol in medicine and nutrition with special consideration of dental aspects*. Experientia Suppl. doi:10.1007/978-3-0348-5757-4.
- Malgas, Samkelo, Mpho S. Mafa, Lithalethu Mkabayi, y Brett I. Pletschke. 2019. «A mini review of xylanolytic enzymes with regards to their synergistic interactions during hetero-xylan degradation.» *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35 (12).
doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-019-2765-z>.
- Maniet, Guillaume, Quentin Schmetz, Nicolas Jacquet, Michaël Temmerman, Sébastien Goflot, y Aurore Richel. 2017. «Effect of steam explosion treatment on chemical composition and characteristic of organosolv fescue lignin.» *Industrial Crops and Products* 99: 79-85.
- Mann, David G. J., Nicole Labbé, Robert W. Sykes, Kristen Gracom, Lindsey Kline, Isabella M. Swamidoss, Jason N. Burris, Mark Davis, y C. Neal Stewart. 2009. «Rapid Assessment of

- Lignin Content and Structure in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) Grown Under Different Environmental Conditions.» *BioEnergy Research* 246-256.
doi:<https://doi.org/10.1007/s12155-009-9054-x>.
- Martău, Gheorghe Adrian, Lavinia-Florina Călinoiu, y Dan Cristian Vodnar. 2021. «Bio-vanillin: Towards a sustainable industrial production.» *Trends in Food Science & Technology* 109: 579-592. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.059>.
- Martins, Silvia, Solange I. Mussatto, Guillermo Martínez-Avila, y Julio Montañez-Saenz. 2011. «Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review.» *Biotechnology Advances* 29: 365-373.
- Mat Aron, Nurul Syahirah, Kuan Shiong Khoo, Kit Wayne Chew, Pau Loke Show, Wei-Hsin Chen, y The Hong Phong Nguyen. 2020. «Sustainability of the four generations of biofuels – A review.» *International Journal of Energy Research* 44 (12): 9266-9282.
doi:<https://doi.org/10.1002/er.5557>.
- Matsushika, A., y S. Sawayama. 2012. «Characterization of a Recombinant Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* Strain That Co-Ferments Glucose and Xylose: II. Influence of pH and Acetic Acid on Ethanol Production.» *Appl Biochem Biotechnol* 168: 2094–2104.
doi:<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9920-4>.
- Matsushika, Akinori, Toshihiro Suzuki, Tetsuya Goshima, y Tamotsu Hoshino. 2017. «Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 with respect to its involvement in tolerance to low pH and salt stress.» *Journal of Bioscience and Bioengineering* 124 (2): 164-1.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.004>.
- Mauricio, J., C. Millán, y J. Ortega. 1998. «Influence of oxygen on the biosynthesis of cellular fatty acids, sterols and phospholipids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*.» *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14: 405–410. doi:<https://doi.org/10.1023/A:1008873430077>.
- Mazzoli, R. 2020. «Metabolic engineering strategies for consolidated production of lactic acid from lignocellulosic biomass.» *Biotechnology and Applied Biochemistry* 67: 61-72.
doi:<https://doi.org/10.1002/bab.1869>.
- McIntosh, Shane, Janice Palmer, Zhanying Zhang, William O.S. Doherty, Syed S. Yazdani, Rajeev K. Sukumaran, y Tony Vancov. 2017. «Simultaneous Saccharification and Fermentation of Pretreated *Eucalyptus grandis* Under High Solids Loading.» *Industrial Biotechnology* 13 (3): 131-140. doi:<https://doi.org/10.1089/ind.2016.0018>.
- Mehmood, Muhammad Aamer, Ayesha Shahid, Sana Malik, Ning Wang, Muhammad Rizwan Javed, Muhammad Nabeel Haider, Pradeep Verma, y Muhammad Umer Faroo. 2021. «Advances in developing metabolically engineered microbial platforms to produce fourth-generation biofuels and high-value biochemicals.» *Bioresource Technology* 337: 125510. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125510>.
- Meleiro, Luana Parras, José Carlos Santos Salgado, Raquel Fonseca Maldonado, Sibeli Carli, Luiz Alberto Beraldo Moraes, Richard John Ward, João Atílio Jorge, y Rosa Prazeres Melo Furrie. 2017. «Engineering the GH1 β -glucosidase from *Humicola insolens*: insights on the stimulation of activity by glucose and xylose.» *PloS one* e0188254.
doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188254>.

- Meneses, Nuno G.T., Silvia Martins, José A. Teixeira, y Solange I. Mussatto. 2013. «Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains.» *Separation and Purification Technology* (108): 152-158.
- Meng, Xianzhi, Qining Sun, Matyas Kosa, Fang Huang, Yunqiao Pu, y Arthur J. Ragauskas. 2016. «Physicochemical Structural Changes of Poplar and Switchgrass during Biomass Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis.» *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4 (9): 4563-4572. doi:<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00603>.
- Meng, Xiaohui, Lei Ma, Tuo Li, Han Zhu, Kai Guo, Dongyang Liu, Wei Ran, y Qirong Shen. 2020. «The functioning of a novel protein, Swollenin, in promoting the lignocellulose degradation capacity of *Trichoderma guizhouense* NJAU4742 from a proteomic perspective.» *Bioresource Technology* 317: 123992. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123992>.
- Mergner, Rita, Rainer Janssen, Dominik Rutz, Isabella de Bari, y Fabio Sissot. 2013. *Lignocellulosic Ethanol Process and Demonstration - A Handbook - Part I*. Munich: WIP Renewable Energies.
- Merklein, K., S.S. Fong, y Y. Deng. 2016. «Chapter 11 - Biomass Utilization.» En *Biotechnology for Biofuel Production and Optimization*, editado por Carrie A. Eckert y Cong T. Trinh, 291-324. Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63475-7.00011-X>.
- Merrettig-Bruns, U., y B. Sayder. 2016. «Chapter 20 - Pretreatment With Ammonia.» En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, editado por Solange I. Mussatto, 461-481. Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00020-7>.
- Mesa, L., Y. Albornas, M. Morales, G. Corsano, y E. González. 2016. «Chapter 11 - Integration of Organosolv Process for Biomass Pretreatment in a Biorefinery.» En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, editado por Solange I. Mussatto, 229-254. Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00011-6>.
- Mills, Tirzah Y., Nicholas R. Sandoval, y Ryan T. Gill. 2009. «Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*.» *Biotechnology for Biofuels* 2 (1): 26. doi:<https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-26>.
- Miyashiro, Daisuke, Ryo Hamano, y Kazuo Umemura. 2020. «A Review of Applications Using Mixed Materials of Cellulose, Nanocellulose and Carbon Nanotubes.» *Nanomaterials* 10 (2): 2079-4991. doi:10.3390/nano10020186.
- Mohanty, Sujit K., y Manas R. Swain. 2019. «Chapter 3 - Bioethanol Production From Corn and Wheat: Food, Fuel, and Future.» En *Bioethanol Production from Food Crops*, 45-59. Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813766-6.00003-5>.
- Monrad, Rune Nygaard, Jens Eklöf, Kristian B. R. M. Krogh, y Peter Biely. 2018. «Glucuronoyl esterases: diversity, properties and biotechnological potential. A review.» *Critical Reviews in Biotechnology* 38 (7): 1121-1136. doi:<https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1468316>.
- Monschein, Mareike, y Bernd Nidetzky. 2016. «Effect of pretreatment severity in continuous steam explosion on enzymatic conversion of wheat straw: Evidence from kinetic

- analysis of hydrolysis time courses.» *Bioresource Technology* 200: 287-296.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.020>.
- Montipó, S., I. Ballesteros, A. F. Martins, M. Ballesteros, y M. Camassola. 2020. «Optimisation of Uncatalysed Steam Explosion of Lignocellulosic Biomasses to Obtain Both C6- and C5-Sugars.» *Waste & Biomass Valorization* 11 (1): 231-244. doi:10.1007/s12649-018-0396-5.
- Moon, Robert J., Ashlie Martini, John Nairn, John Simonsen, y Jeff Youngblood. 2011. «Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites.» *Chemical Society Reviews* 40 (7): 3941-3994.
doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C0CS00108B>.
- Mosbech, Caroline, Jesper Holck, Anne Meyer, y Jane Wittrup Agger. 2019. «Enzyme kinetics of fungal glucuronoyl esterases on natural lignin-carbohydrate complexes.» *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (10): 4065-4075.
doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09797-w>.
- Murali, N., K. Srinivas, y B.K Ahring. 2017. «Biochemical Production and Separation of Carboxylic Acids for Biorefinery Applications.» *Fermentation* 3 (22).
doi:<https://doi.org/10.3390/fermentation3020022>.
- Mussagy, Cassamo Ussemane, Ana Alice Carizia Guimaraes, Lara Vicente Ferreira Rocha, James Winterbum, Valeria de Carvalho Santos Ebinuma, y Jorge Fernando Brandao Pereira. 2020. «Improvement of carotenoids production from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186.» *Biochemical Engineering Journal* 165 (107827).
- Mussatto, S.I., y G.M. Dragone. 2016. «Biomass Pretreatment, Biorefineries, and Potential Products for a Bioeconomy Development.» En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, editado por S.I. Mussatto, 1-22. Elsevier Inc.
- Mussatto, S.I., y N. Bikaki. 2016. «Chapter 25 - Technoeconomic Considerations for Biomass Fractionation in a Biorefinery Context.» En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, editado por Solange I. Mussatto, 587-610. Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00025-6>.
- Mussatto, Solange I. 2012. «Application of xylitol in food formulations and benefits for health.» En *D-Xylitol Fermentative production, Application and Commercialization*, editado por Silvio Silveiro da Silva y Anuj Kumar Chandel, 309-323. Berlin: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_14.
- . 2016. *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery*. Editado por Solange I. Mussatto. Elsevier.
- Mussatto, Solange I. 2016. «Biomass pretreatment with acids.» En *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery*, editado por Solange I. Mussatto, 169-186. Elsevier.
- Mussatto, Solange I., Giuliano Dragone, Pedro M.R. Guimarães, João Paulo A. Silva, Lívia M. Carneiro, Inés C. Roberto, António Vicente, Lucília Domingues, y José A. Teixeira. 2010. «Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production.» *Biotechnology Advances* (28): 817-830.

- Mussatto, Solange I., Marcela Fernandes, Adriane M.F. Milagres, y Inês C. Roberto. 2008. «Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain.» *Enzyme and Microbial Technology* 43 (2): 124-129. doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.006>.
- Mussatto, Solange I., y Inés Conceição Roberto. 2004. «Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review.» *Bioresource Technology* (93): 1-10.
- Muthukumarappan, K., y C. Karunanithy. 2016. «Chapter 3 - Extrusion Processing: Opportunities and Challenges Toward Biofuel.» En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, 57-79. Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00003-7>.
- Naidu, Darrel Sarvesh, Shanganyane Percy Hlangothi, y Maya Jacob John. 2018. «Bio-based products from xylan: A review.» *Carbohydrate Polymers* 179: 28-41. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.064>.
- Nakamura, Akihiko, Daiki Ishiwata, Akasit Visootsat, Taku Uchiyama, Kenji Mizutani, Satoshi Kaneko, Takeshi Murata, Kiyohiko Igarashi, y Ryota Iino. 2020. «Domain architecture divergence leads to functional divergence in binding and catalytic domains of bacterial and fungal cellobiohydrolases.» *Journal of Biological Chemistry* 295 (43): 14606-14617. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014792>.
- Nanda, Sonil, Ramin Azargohar, Ajay K. Dalai, y Janusz A. Kozinski. 2015. «An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50: 925-941. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.058>.
- Nasrullah, A., A.H. Bhat, A. Sada Khan, y H. Ajab. 2017. «Comprehensive approach on the structure, production, processing, and application of lignin.» En *Composites Science and Engineering, Lignocellulosic Fibre and Biomass-Based Composite Materials*, editado por Mohammad Jawaid, Paridah Md Tahir y Naheed Saba, 165-178. Woodhead Publishing Series. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100959-8.00009-3>.
- Navarro-Tapia, Elisabet, Amparo Querol, y Roberto Pérez-Torrado. 2018. «Membrane fluidification by ethanol stress activates unfolded protein response in yeasts.» *Microbial Biotechnology* 11 (3): 465-475. doi:<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13032>.
- Nazir, M. S., B. A. Wahjoedi, A. W. Yussof, y M. A. Abdullah. 2013. «Eco-friendly extraction and characterization of cellulose from oil palm empty fruit bunches.» *BioResources* 8 (2): 2161-2172. <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/eco-friendly-extraction-and-characterization-of-cellulose-from-oil-palm-empty-fruit-bunches/>.
- Nelson, David L, y Michael M Cox. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry (4th Ed.)*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Nguyen, N., C. Fargues, W. Guiga, y M.-L. Lameloise. 2015. «Assessing nanofiltration and reverse osmosis for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates.» *Journal of Membrane Science* 487: 40-50. doi:<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.03.072>.

- Nishimura, Hiroshi, Akihiro Kamiya, Takashi Nagata, Masato Katahira, y Takashi Watanabe. 2018. «Direct evidence for α ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls.» *Scientific Reports* 6538. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-018-24328-9>.
- Nogueira, Guilherme Pessoa, Marcelle C. McManus, David J. Leak, Telma Teixeira Franco, Marina Oliveira de Souza Dias, y Carla Kazue Nakao Cavaliero. 2021. «Are eucalyptus harvest residues a truly burden-free biomass source for bioenergy? A deeper look into biorefinery process design and Life Cycle Assessment.» *Journal of Cleaner Production* 299: 126956. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126956>.
- Norris, F.W., y L.A. Preece. 1930. «Studies on hemicelluloses: the hemicelluloses of wheat bran.» *Biochemical Journal* 24 (1): 59-66.
- Nunes, Cleiton A., Cláudio F. Lima, Luiz C.A. Barbosa, Jorge L. Colodette, A.F.G. Gouveia, y Flaviano O. Silvério. 2010. «Determination of Eucalyptus spp lignin S/G ratio: A comparison between methods.» *Bioresource Technology* 101 (11): 4056-4061. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.012>.
- Oded, Shoseyov, Shani Ziv, y Levy Ilan. 2006. «Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications.» *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (2): 283-295. doi:<https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-05>.
- Oh, Sang Youn, Dong Il Yoo, Younsok Shin, Hwan Chul Kim, Hak Yong Kim, Yong Sik Chung, Won Ho Park, y Ji Ho Youk. 2005. «Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon.» *Carbohydrate research* 340 (15): 2376-91. doi:[10.1016/j.carres.2005.08.007](https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.08.007).
- Öhgren, Karin, Renata Bura, Gary Lesnicki, Jack Saddler, y Guido Zacchi. 2007. «A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover.» *Process Biochemistry* 834-839. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.003>.
- Ohra-aho, T., F.J.B. Gomes, J.L. Colodette, y T. Tamminen. 2013. «S/G ratio and lignin structure among Eucalyptus hybrids determined by Py-GC/MS and nitrobenzene oxidation.» *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 101: 166-171. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.01.015>.
- Okolie, JA, S Nanda, AK Dalai, y JA Kozinski. 2021. «Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass.» *Waste & Biomass Valorization* 12 (5): 2145–2169. doi:<https://doi.org/10.1007/s12649-020-01123-0>.
- Omoriyekomwan, J. E., A. Tahmasebi, J. Dou, R., Wang, y J Yu. 2021. «A review on the recent advances in the production of carbon nanotubes and carbon nanofibers via microwave-assisted pyrolysis of biomass.» *Fuel Processing Technology* 214. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2020.106686>.
- Ong, Victor Zhenquan, y Ta Yeong Wu. 2020. «An application of ultrasonication in lignocellulosic biomass valorisation into bio-energy and bio-based products.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 132: 109924. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109924>.
- Osman, Ahmed I., Umair Qasim, Farrukh Jamil, Ala'a H. Al-Muhtaseb, Ahmad Abu Jrai, Mohammed Al-Riyami, Suhaib Al-Maawali y otros,. 2021. «Bioethanol and biodiesel:

- Bibliometric mapping, policies and future needs.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 152: 111677. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111677>.
- Østby, Heidi, Line Degn Hansen, Svein J Horn, Vincent G H Eijsink, y Anikó Várnai. 2020. «Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives.» *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 47 (9-10): 623-657. doi:<https://doi.org/10.1007/s10295-020-02301-8>.
- Ounine, K., H. Petitdemange, G. Raval, y R. Gay. 1985. «Regulation and Butanol inhibition of D-Xylose and D-Glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*.» *Applied and environmental Microbiology* 49 (4): 874-878.
- Overend, R. P., y E. Chornet. 1987. «Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments.» *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* 321: 523–536. doi:<https://doi.org/10.1098/rsta.1987.0029>.
- Overend, R.P., y E. Chornet. 1987. «Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments.» *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* 321 321 (1561): 523-536. doi:<https://doi.org/10.1098/rsta.1987.0029>.
- Owonubi, Shesan J., Stephen C. Agwuncha, Nyemaga M. Malima, Ginena B. Shombe, Elizabeth M. Makhatha, y Neerish Revaprasadu. 2021. «Non-woody Biomass as Sources of Nanocellulose Particles: A Review of Extraction Procedures.» *Frontiers in Energy Research* 9: 132. doi:[10.3389/fenrg.2021.608825](https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.608825).
- Pacek, Andrzej W., Ping Ding, Mark Garrett, Gary Sheldrake, y Alvin W. Nienow. 2013. «Catalytic Conversion of Sodium Lignosulfonate to Vanillin: Engineering Aspects. Part 1. Effects of Processing Conditions on Vanillin Yield and Selectivity.» *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52 (25): 8361-8372. doi:<https://doi.org/10.1021/ie4007744>.
- Palmqvist, Eva, y Bärbel Hahn-Hägerdal. 2000. «Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition.» *Bioresource Technology* 74 (1): 25-33. doi:[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3).
- Pang, Yean Ling, Ahmad Zuhairi Abdullah, y Subhash Bhatia. 2011. «Review on sonochemical methods in the presence of catalysts and chemical additives for treatment of organic pollutants in wastewater.» *Desalination* 277 (1-3): 1-14. doi:<https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.04.049>.
- Paniagua-García, Ana I, María Hijosa-Valsero, Rebeca Díez-Antolínez, Marta E. Sánchez, y Mónica Coca. 2018. «Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation: The case of *Panicum virgatum*.» *Biomass and Bioenergy* 116: 131-139. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.06.006>.
- Parada, Mar Palmeros, Patricia Osseweijer, y John A. Posada Duque. 2017. «Sustainable biorefineries, an analysis of practices for incorporating sustainability in biorefinery design.» *Industrial Crops and Products* 106: 105-123. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.052>.

- Parajó, Juan Carlos, Herminia Domínguez, Andrés Moure, Beatriz Díaz-Reinoso, Enma Conde, M. Luisa Soto, M. Jesús Conde, y Noelia González-López. 2008. «Recovery of Phenolic Antioxidants Released during hydrolytic treatments of agricultural and forest residues.» *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 7 (8): 3243-3249.
- Park, Seong-Jik, Joon-Kwan Moon, y Byung-Hwan Um. 2013. «Evaluation of the Efficiency of Solvent Systems to Remove Acetic Acid Derived from Pre-pulping Extraction.» *J. Korean Wood Sci & Tech* 41 (5): 447-455. doi:<https://doi.org/10.5658/WOOD.2013.41.5.447>.
- Parrish, D.J., M.D. Casler, y Andrea Monti . 2012. «The Evolution of Switchgrass as an Energy Crop.» En *Switchgrass - A valuable Biomass Crop for Energy*, editado por Andrea Monti, 1-28. Springer.
- Parrondo, J., L.A. García , y M. Díaz. 2009. «Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey.» *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 26 (03): 445-456. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322009000300001>.
- Paschalidou, Annoula, Michael Tsatiris, Kyriaki Kitikidou, y Christina Papadopoulou. 2018. «Using Energy Crops for Biofuels or Food: The Choice.» En *Using Energy Crops for Biofuels or Food: The Choice*, de Annoula Paschalidou, Michael Tsatiris, Kyriaki Kitikidou y Christina Papadopoulou, 35-38. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-63943-7_5.
- Pascual-Maté, Ana, Sandra M. Osés , Miguel A. Fernández-Muiño, y M. Teresa Sancho. 2018. «Analysis of Polyphenols in Honey: Extraction, Separation and Quantification Procedures.» *Separation & Purification Reviews* 142-158. doi:<https://doi.org/10.1080/15422119.2017.1354025>.
- Patel, Amisha, y Amita R. Shah. 2021. «Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products.» *Journal of Bioresources and Bioproducts* 6 (2): 108-128. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.02.001>.
- Peleteiro, Susana, Andre M. da Costa Lopes, Gil Garrote, y Juan Carlos Parajó. 2015. «Simple and Efficient Furfural Production from Xylose in Media Containing 1-Butyl-3-Methylimidazolium Hydrogen Sulfate.» *Industrial & Engineering Chemistry Research* 54 (33): 8368-8373. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b01771>.
- Pereira, Rogério S., Solange I. Mussatto, y Inês C. Roberto . 2011. «Inhibitory action of toxic compounds present in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*.» *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 71-78. doi:DOI 10.1007/s10295-010-0830-6.
- Pérez, S., C.J. Renedo, A. Ortiz, M. Mañana, y D. Silió. 2006. «Energy evaluation of the *Eucalyptus globulus* and the *Eucalyptus nitens* in the north of Spain (Cantabria).» *Thermochimica Acta* 451 (1-2): 57-64. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tca.2006.08.009>.

- Perrone, Lorena, Simone Sampaolo, y Mariarosa A.B. Melone. 2020. «Bioactive Phenolic Compounds in the Modulation of Central and Peripheral Nervous System Cancers: Facts and Misdeeds.» *Cancers* 12 (2). doi:<https://doi.org/10.3390/cancers12020454>.
- Pessani, Naveen K., Hasan K. Atiyeh, Mark R. Wilkins, Danielle D. Bellmer, y Ibrahim M. Banat. 2011. «Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: The effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings.» *Bioresource Technology* 102 (22): 10618-10624. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.011>.
- Pettersson, A., M. Zevenhoven, B Steenari, y L. Amand. 2008. «Application of chemical fractionation methods for characterisation of biofuels, waste derived fuels and CFB co-combustion fly ashes.» *Fuel* 87: 3183-3193. doi:10.1016/j.fuel.2008.05.030.
- Pfeiffer, Thomas, y Annabel Morley. 2014. «An evolutionary perspective on the Crabtree effect.» *Frontiers in Molecular Biosciences* 1. doi:10.3389/fmolb.2014.00017.
- Pidtasang, Boonsiri, Parncheewa Udomsap, Sittha Sukkasi, Nuwong Chollacoop, y Adisak Pattiya. 2013. «Influence of alcohol addition on properties of bio-oil produced from fast pyrolysis of eucalyptus bark in a free-fall reactor.» *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* (19): 1851-1857.
- Pielhop, Thomas, Janick Amgarten, Philipp Rudolf von Rohr, y Michael H. Studer. 2016. «Steam explosion pretreatment of softwood: the effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility.» *Biotechnology for Biofuels* 9: 152. doi:<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0567-1>.
- Polotskaya, Galina, Alexandra Pulyalina, Vasily Lebedev, Gyula Török, Daria Rudakova, y Ludmila Vinogradova. 2020. «Novel view at hybrid membranes containing star macromolecules using neutron scattering and pervaporation dehydration of acetic acid.» *Materials & Design* 186: 108352. doi:<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108352>.
- Pönni, Raili, Eero Kontturi, y Tapani Vuorinen. 2013. «Accessibility of cellulose: Structural changes and their reversibility in aqueous media.» *Carbohydrate Polymers* 93: 424-429.
- Ponnusamy, Vinoth Kumar, Dinh Duc Nguyen, Jeyaprakash Dharmaraja, Sutha Shobana, J. Rajesh Banu, Rijuta Ganesh Saratale, Soon Woong Chang, y Gopalakrishnan Kumar. 2019. «A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential.» *Bioresource Technology* 271: 462-472. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.070>.
- Posada, J.A., y P. Osseweijer. 2016. «Chapter 26 - Socioeconomic and Environmental Considerations for Sustainable Supply and Fractionation of Lignocellulosic Biomass in a Biorefinery Context.» En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, 611-631. Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00026-8>.
- Prabhu, AA, E Bosakornranut, Y Amraoui, D Agrawal, F Coulon, V Vivekanand, VK Thakur, y V Kumar. 2020. «Enhanced xylitol production using non-detoxified xylose rich pre-hydrolysate from sugarcane bagasse by newly isolated *Pichia fermentans*.» *Biotechnology for Biofuels* 13 (1): 1-15. doi:10.1186/s13068-020-01845-2.

- Qi, F, P Shen, R Hu, T Xue, X Jiang, L Qin, Y Chen, y J Huang. 2020. «Carotenoids and lipid production from *Rhodospiridium toruloides* cultured in tea waste hydrolysate.» *Biotechnology for Biofuels* 13 (1): 1-12. doi:10.1186/s13068-020-01712-0.
- Qian, Y, Y Deng, X Qiu, H Li, y D Yang. 2014. «Formation of uniform colloidal spheres from lignin, a renewable resource recovered from pulping spent liquor.» *Green Chemistry* 16: 2156-2163. doi:https://doi.org/10.1039/C3GC42131G.
- Qin, Lei, Xiong Zhao, Wen-Chao Li, Jia-Qing Zhu, Li Liu, Bing-Zhi Li, y Ying-Jin Yuan. 2018. «Process analysis and optimization of simultaneous saccharification and co-fermentation of ethylenediamine-pretreated corn stover for ethanol production.» *Biotechnology for Biofuels* 11 (1): 118. doi:https://doi.org/10.1186/s13068-018-1118-8.
- Qiu, Jingwen, Dong Tian, Fei Shen, Jinguang Hu, Yongmei Zeng, Gang Yang, Yanzong Zhang, Shihuai Deng, y Jing Zhang. 2018. «Bioethanol production from wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) pretreatment via simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at high solid loadings.» *Bioresource Technology* 268: 355-362. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.009.
- Rahikainen, Jenni L., Raquel Martin-Sampedro, Harri Heikkinen, Stella Rovio, Kaisa Marjamaa, Tarja Tamminen, Orlando J. Rojas, y Kristiina Kruus. 2013. «Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption.» *Bioresource Technology* 133: 270-278. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.075.
- Ram, Shristi, Madhusree Mitra, Freny Shah, Sushma Rani Tirkey, y Sandhya Mishra. 2020. «Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges.» *Journal of Functional Foods* 67: 103867. doi:https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103867.
- Ramadevi, Payyavula, Deepak V. Hegde, Mohan Varghese, Rathinam Kamalakannan, Suraj P. Ganapathy, y Demlapura S. Gurusurthy. 2016. «Evaluation of Lignin Syringyl/Guaiacyl Ratio in *Eucalyptus Camaldulensis* across Three Diverse Sites Based on near Infrared Spectroscopic Calibration Modelling with Five *Eucalyptus* Species and its Impact on Kraft Pulp Yield.» *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 529-536. doi:10.1255/jnirs.1251.
- Ramos, LP. 2003. «The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials.» *Química Nova* 26 (6): 863–871. doi:10.1590/S0100-40422003000600015.
- Reese, Elwyn T., Ralph G. H. Siu, y Hillel S. Levinson. 1950. «The Biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis.» *Journal of Bacteriology* 59 (4): 485-497. doi:https://doi.org/10.1128/jb.59.4.485-497.1950.
- Reis, Raquel S., Lucas G.P. Tienne, Diego de H.S. Souza, Maria de Fátima V. Marques, y Sergio N. Monteiro. 2020. «Characterization of coffee parchment and innovative steam explosion treatment to obtain microfibrillated cellulose as potential composite reinforcement.» *Journal of Materials Research and Technology* 9 (4): 9412-9421. doi:https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.05.099.

- Ren, Jun-Li, y Run-Cang Sun. 2010. En *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, editado por Run-Cang Sun, 73-130. Elsevier.
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53234-3.00004-3>.
- Rencoret, Jorge. 2008. *Estudio de lignina y lípidos en madera de eucalipto: Caracterización química en distintas especies y su evolución durante la fabricación y blanqueo químico y enzimático de pasta de papel*. <http://hdl.handle.net/10261/86361>.
- Renewable Fuels Association. 2021. «Essential Energy - 2021 Ethanol Industry Outlook.» *Ethanol RFA*. Último acceso: 7 de Octubre de 2021.
https://ethanolrfa.org/file/274/RFA_Outlook_2021_fin_low.pdf.
- Resch, M.G., J.O. Baker, y S.R. Decker. 2015. *Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulose Biomass*. NREL. <https://www.nrel.gov/docs/fy15osti/63351.pdf>.
- Research and Markets. 2019. «Global Vanilla and Vanillin Market Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast Report 2019-2024.» Último acceso: Setiembre de 2021.
<https://www.globenewswire.com/news-release/2019/02/26/1742696/0/en/Global-Vanilla-and-Vanillin-Market-Trends-Share-Size-Growth-Opportunity-and-Forecast-Report-2019-2024.html>.
- Rice-Evans, Catherine A., Nicholas J. Miller, y George Paganga. 1997. «Antioxidant properties of phenolic compounds.» *Trends in Plant Science* 2 (4): 152-159.
- Rice-Evans, Catherine, Nicholas Miller, y George Paganga. 1997. «Antioxidant properties of phenolic compounds.» *Trends in Plant Science* 2 (4): 152-159.
doi:[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2).
- Río, Pablo G. del, Elena Domínguez, Viana D. Domínguez, Aloia Romaní, Lucília Domingues, y Gil Garrote. 2019. «Third generation bioethanol from invasive macroalgae *Sargassum muticum* using autohydrolysis pretreatment as first step of a biorefinery.» *Renewable Energy* 141: 728-735. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.083>.
- Rodrigues, Patrícia de Oliveira, Leandro Vinícius Alves Gurgel, Daniel Pasquini, Fernanda Badotti, Aristóteles Góes-Neto, y Milla Alves Baffi. 2020. «Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes.» *Renewable Energy* 145: 2683-2693.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041>.
- Rodríguez, Hector. 2021. «Ionic liquids in the pretreatment of lignocellulosic biomass.» *Acta Innovations* 38: 23-36. doi:<https://doi.org/10.32933/ActaInnovations.38.3>.
- Rodríguez, I., N. Caldés, C. de la Rúa, y Y Lechón. 2017. «Análisis de los impactos socio-económicos de la producción de bioetanol en Uruguay.»
doi:<https://www.gub.uy/ministerio-industria-energia-mineria/sites/ministerio-industria-energia-mineria/files/documentos/publicaciones/3.2%20-%20Impactos%20Etanol%20Planta%20Paysand%C3%BA.pdf>.
- Rodríguez-Montaña, A., M. H. Brijaldo, L. Y. Rache, L. P. C. Silva, y L. M. Esteves. 2020. «Reacciones comunes de Furfural en procesos escalables de Biomasa Residual.» *Ciencia En Desarrollo* 11 (1): 63-80.
doi:<https://doi.org/10.19053/01217488.v11.n1.2020.10973>.

- Rollin, Joseph A., Zhiguang Zhu, Noppadon Sathitsuksanoh, y Y.-H. Percival Zhang. 2011. «Increasing Cellulose Accessibility Is More Important Than Removing Lignin: A Comparison of Cellulose Solvent-Based Lignocellulose Fractionation and Soaking in Aqueous Ammonia.» *Biotechnology and Bioengineering* 108 (1): 22-30.
- Romaní, Aloia, Gil Garrote, Ignacio Ballesteros, y Mercedes Ballesteros. 2013. «Second generation bioethanol from steam exploded Eucalyptus globulus wood.» *Fuel* 66-74. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.076>.
- Romaní, Aloia, Gil Garrote, y Juan Carlos Parajó. 2012. «Bioethanol production from autohydrolyzed Eucalyptus globulus by Simultaneous Saccharification and Fermentation operating at high solids loading.» *Bioethanol production from autohydrolyzed Eucalyptus globulus by Simultaneous Saccharification and Fermentation operating at high solids loading*, 94: 305-312. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.12.013>.
- Rowell, Roger M., Roger Pettersen, y Mandla A. Tshabalala. 2012. «Cell Wall Chemistry.» En *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*, editado por Roger M. Rowell, 33-72. CRC Press. <https://www.routledgehandbooks.com/doi/10.1201/b12487-5>.
- Rustemeyer, Paul. 2004. «History of CA and Evolution of the Markets.» *Macromol. Symp.* (208): 1-6. doi:<https://doi.org/10.1002/masy.200450401>.
- Saihua Huang, Deyin Huang, Qitang Wu, Meifang Hou, Xiaoyan Tang, Jian Zhou. 2020. «Effect of environmental C/N ratio on activities of lignin-degrading enzymes produced by Phanerochaete chrysosporium.» *Pedosphere* 30 (2): 285-292. doi:[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60391-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60391-6).
- Saito, Tomonori, Joshua H. Perkins, Daniel C. Jackson, Neil E. Trammel, Marcus A. Hunt, y Amit K. Naskar. 2013. «Development of lignin-based polyurethane thermoplastics.» *RSC Advances* 3 (44): 21832-21840. doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C3RA44794D>.
- Salmon, Jean-Michel. 2006. «Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: Practical implications.» *LWT - Food Science and Technology* 39 (9): 959-965. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.11.005>.
- Samuel, Reichel, Marcus Foston, Nan Jiang, Lenong Allison, y Arthur J. Ragauskas. 2011. «Structural changes in switchgrass lignin and hemicelluloses during pretreatments by NMR analysis.» *Polymer Degradation and Stability* 96 (11): 2002-2009. doi:<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.08.015>.
- Samuel, Reichel, Marcus Foston, Nan Jiang, Lenong Allison, y Arthur J. Ragauskas. 2011. «Structural changes in switchgrass lignin and hemicelluloses during pretreatments by NMR analysis.» *Polymer Degradation and Stability* (96): 2002-2009.
- Sánchez, Ó.J., y S. Montoya. 2020. «Assessment of Polysaccharide and Biomass Production from Three White-Rot Fungi by Solid-State Fermentation Using Wood and Agro-Industrial Residues: A Kinetic Approach.» *Forests* 11 (10): 1055. doi:<https://doi.org/10.3390/f11101055>.
- Sánchez, Óscar J., y Carlos A. Cardona. 2008. «Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks.» *Bioresource Technology* (99): 5270-5295.

- Sandberg, Anders, Stuart Armstrong, Rebecca Gorman, y Rei England. 2021. «Sigmoids behaving badly: why they usually cannot predict the future as well as they seem to promise.» *DecisionSciRN EM Feeds*. doi:<https://doi.org/10.2139/ssrn.3926169>.
- Sangregorio, Anna, Nathanael Guigo, Jan C. van der Waal, y Nicolas Sbirrazzuoli. 2019. «All 'green' composites comprising flax fibres and humins' resins.» *Composites Science and Technology* 171: 70-77. doi:<https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2018.12.008>.
- Santos, Clelton A., Jaire A. Ferreira-Filho, Anthonia O'Donovan, Vijai K. Gupta, Maria G. Tuohy, y Anete P. Souza. 2017. «Production of a recombinant swollenin from *Trichoderma harzianum* in *Escherichia coli* and its potential synergistic role in biomass degradation.» *Microbial Cell Factories* 16 (1): 83. doi:<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0697-6>.
- Santos, Sonia A.O., Carla Vilela, Carmen S. R. Freire, Carlos Pascoal Neto, y Armando J.D. Silvestre. 2013. «Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from *Eucalyptus* wood.» *Journal of Chromatography B* 938 (1): 65-74. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.034>.
- Sarabana, S. S., A. I. Ramadan, y A. M. Eldin. 2018. «Consolidated bioprocess for ethanol production from rice straw and corn cobs by using fungi.» *Middle East Journal of Applied Sciences* 8: 635-646.
- Saritha, M., Anju Arora, y Lata. 2012. «Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility.» *Indian Journal of Microbiology* 52 (2): 122-130. doi:<https://doi.org/10.1007/s12088-011-0199-x>.
- Sasaki, Mitsuru, Zhen Fang, Yoshiko Fukushima, Tadafumi Adschiri, y Kunio Arai. 2000. «Dissolution and Hydrolysis of Cellulose in Subcritical and Supercritical Water.» *Industrial & Engineering Chemistry Research* 39 (8): 2883-2890. doi:<https://doi.org/10.1021/ie990690j>.
- Sassner, Per, Carl-Gustav Martensson, Mats Galbe, y Guido Zacchi. 2008. «Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated *Salix* for the production of bioethanol.» *Bioresource Technology* (99): 137-145.
- Sato, Kazuki, Daisuke Chiba, Sayaka Yoshida, Mayu Takahashi, Kazuhide Totani, Yosuke Shida, Wataru Ogasawara, y Yuko S. Nakagawa. 2020. «Functional analysis of a novel lytic polysaccharide monooxygenase from *Streptomyces griseus* on cellulose and chitin.» *International Journal of Biological Macromolecules* 164: 2085-2091. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.015>.
- Satolo, Luiz, y Mirian Bacchi. 2013. «Impacts of the Recent Expansion of the Sugarcane Sector on Municipal per Capita Income in São Paulo State.» *ISRN Economics* 828169. doi:<https://doi.org/10.1155/2013/828169>.
- Schäpper, Daniel, Muhd N. H. Z. Alam, Nicolas Szita, Anna Eliasson Lantz, y Krist V. Gernaey. 2009. «Application of microbioreactors in fermentation process development: A review.» *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 679-695. doi:[10.1007/s00216-009-2955-x](https://doi.org/10.1007/s00216-009-2955-x).

- Sharma, Hem Kanta, Chunbao Xu, y Wensheng Qin. 2019. «Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview.» *Waste and Biomass Valorization* 10 (2): 235-251. doi:<https://doi.org/10.1007/s12649-017-0059-y>.
- Shinde, Suhas H., Amol Hengne, y Chandrashekhar V. Rode. 2020. «Chapter 1 - Lignocellulose-derived platform molecules: An introduction.» En *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, editado por Shunmugavel Saravanamurugan, Ashok Pandey, Hu Li y Anders Riisager, 1-31. Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64307-0.00001-9>.
- Si, Mengying, Jin Zhang, Yuyang He, Ziqi Yang, Xu Yan, Mingren Liu, Shengnan Zhuo y otros,. 2018. «Synchronous and rapid preparation of lignin nanoparticles and carbon quantum dots from natural lignocellulose.» *Green Chemistry* 20 (15): 3414-3419. doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C8GC00744F>.
- Silva, Thiago Alves Lopes, Hernán Dário Zamora Zamora, Leandro Henrique Ribeiro Varão, Natália Soares Prado, Milla Alves Baffi, y Daniel Pasquini. 2018. «Effect of Steam Explosion Pretreatment Catalysed by Organic Acid and Alkali on Chemical and Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse.» *Waste and Biomass Valorization* 9 (11): 2191-2201. doi:<https://doi.org/10.1007/s12649-017-9989-7>.
- Simpson, K. 1983. «Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A.» *Proceedings of the Nutrition Society* 42 (1): 7-17. doi:10.1079/PNS19830003.
- Sims, Ralph, Michael Taylor, Jack Saddler, y Warren Mabee. 2008. «From 1st- to 2nd-generation biofuel technologies. An overview of current industry and RD&D activities.» www.iea.org. Editado por OECD/IEA. International Energy Agency. Noviembre. Último acceso: 04 de Febrero de 2016. https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/2nd_Biofuel_Gen.pdf.
- Singh, Sandip K. 2019. «Solubility of lignin and chitin in ionic liquids and their biomedical applications.» *International Journal of Biological Macromolecules* 132: 265-277. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.182>.
- Singhania, Reeta Rani, Anil Kumar Patel, Rajeev K. Sukumaran, Christian Larroche, y Ashok Pandey. 2013. «Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production.» *Bioresource Technology* 127: 500-507. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>.
- Sipponen, Mika Henrikki, Heiko Lange, Claudia Crestini, Alexander Henn, y Monika Österberg. 2019. «Lignin for Nano- and Microscaled Carrier Systems: Applications, Trends, and Challenges.» *ChemSusChem* 12 (10): 2039-2054. doi:<https://doi.org/10.1002/cssc.201900480>.
- Siri-Prieto, Guillermo. 2012. «Switchgrass como alternativa energética en el Uruguay.» *Cangüé* (32): 31-39.
- Sixta, H. 2006. *Handbook of Pulp*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Sjulander, Nikki, y Timo Kikas. 2020. «Origin, Impact and Control of Lignocellulosic Inhibitors in Bioethanol Production - A review.» *Energies* 13 (18): 4751. doi:<https://doi.org/10.3390/en13184751>.

- Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, y D. Crocker. 2012. *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency & Renewable Energy, Golden, Colorado: NREL.
- Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, y D. Templeton. 2008. *Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples*. Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory.
- Sluiter, A., R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, y D. J. L. A. P. Templeton. 2005. «Determination of extractives in biomass.» *Laboratory analytical procedure (LAP)* 1617: 1-9.
- Solarte-Toro, Juan Camilo, Cesar Augusto Rueda-Duran, Mariana Ortiz-Sanchez, y Carlos Ariel Cardona Alzate. 2021. «A comprehensive review on the economic assessment of biorefineries: The first step towards sustainable biomass conversion.» *Bioresource Technology Reports* 15: 100776. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100776>.
- Sridhar, M., N.K. Sree, y L.V. Rao. 2002. «Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains.» *Bioresour. Technol.* 83 (3): 199-202. doi:[10.1016/S0960-8524\(01\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00221-8).
- Srivastava, Neha, Rishabh Rathour, Sonam Jha, Karan Pandey, Manish Srivastava, Vijay Kumar Thakur, Rakesh Singh Sengar y otros,. 2019. «Microbial Beta Glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversion for Biofuels Application.» *Biomolecules* 9 (6). doi:<https://doi.org/10.3390/biom9060220>.
- Steinmann, H.W. 1998. «11: Cellulose Acetate and Triacetate Fibers.» En *Handbook of fiber chemistry*, editado por Lewin Menachin y Eli M. Pierce. New York: Marcel Dekker.
- Stewart, Derek. 2008. «Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics.» *Industrial Crops and Products* 27 (2): 202-207. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.07.008>.
- Stewart, G.G. 2014. «SACCHAROMYCES | *Saccharomyces cerevisiae*.» En *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, editado por Carl A. Batt y Mary Lou Tortorello, 309-315. Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5>.
- Suetsugu, M., M. Kotera, y T. Nishino. 2009. «Cellulosic Nanocomposite prepared by acetylation of bacterial cellulose using supercritical carbon dioxide .» *17th International Conference of Composite Materials*. Edinburgh.
- Sui, W, y H Chen. 2015. «Water transfer in steam explosion process of corn stalk.» *Ind Crops Prod* 76: 977–986. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.001>.
- Sui, Wenjie, y Hongzhang Chen. 2016. «Effects of water states on steam explosion of lignocellulosic biomass.» *Bioresource Technology* 199: 155-163. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.001>.
- Sun, Run-Cang. 2020. «Lignin Source and Structural Characterization.» *ChemSusChem* 13 (17): 4385-4393. doi:<https://doi.org/10.1002/cssc.202001324>.
- Sun, Y-G, Y-L Ma, L-Q Wang, F-Z Wang, Q-Q Wu, y G-Y Pan. 2015. «Physicochemical properties of corn stalk after treatment using steam explosion coupled with acid or alkali.»

- Carbohydrate polymers* 117: 486–493.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.066>.
- Susmozas, Ana, Raquel Martín-Sampedro, David Ibarra, María E. Eugenio, Raquel Iglesias, Paloma Manzanares, y Antonio D. Moreno. 2020. «Process Strategies for the Transition of 1G to Advanced Bioethanol Production.» *Processes* 8 (10): 1310.
doi:<https://doi.org/10.3390/pr8101310>.
- Sykes, R.W., E.L. Gjersing, K Foutz, W.H. Rottman, S.A. Kuhn, C. E. Foster, A. Ziebell y otros,. 2015. «Down-regulation of p-coumaroyl quinate/shikimate 3'-hydroxylase (C3'H) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) genes in the lignin biosynthetic pathway of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* leads to improved sugar release.» *Biotechnol Biofuels* 8 (128).
doi:<https://doi.org/10.1186/s13068-015-0316-x>.
- Tanaka, T., M. Shnimizu, y H Moriwaki. 2012. «Cancer chemoprevention by carotenoids.» *Molecules* 17: 3202-3242. doi:10.3390/molecules17033202 .
- Tareen, Afrasiab Khan, Imrana Niaz Sultan, Kiattipong Songprom, Nikhom Laemsak, Sarote Sirisansaneeyakul, Wirat Vanichsiratana, y Pramuk Parakulsuksatid. 2021. «Two-step pretreatment of oil palm trunk for ethanol production by thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* SC90.» *Bioresource Technology* 320, part A: 124298.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124298>.
- Taylor, R., L. Nattrass, G. Alberts, P. Robson, C. Chudziak, A. Bauen, I. M. Libelli y otros,. 2015. *From the Sugar Platform to biofuels and biochemicals : Final report for the European Commission Directorate-General Energy*. E4tech/Re-CORD/Wageningen.
<https://ec.europa.eu/energy/sites/ener/files/documents/EC%20Sugar%20Platform%20Ofinal%20report.pdf>.
- Teeri, T.T. 1997. «Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases.» *Trends in Biotechnology* 15 (5): 160-167.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01032-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01032-9).
- Teixeira Mancini, Luana, Fernanda Maria Guedes Ramalho, Paulo Fernando Trugilho, y Paulo Ricardo Gherardi Hein. 2021. «Estimation of Total Extractive Content of Wood from Planted and Native Forests by near Infrared Spectroscopy.» *IForest - Biogeosciences & Forestry* 14 (1): 18-28. doi:10.3832/ifor3472-013.
- Teleman, Anita. 2009. «5- Hemicellulose and Pectins.» En *Pulp and Paper Chemistry and Technology - Volume 1 - Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, editado por Monica Ek, Göran Gellerstedt y Gunnar Henriksson, 101-120. Berlin, New York: De Gruyter.
- Torija, Ma.Jesús, Nicolas Rozès, Montse Poblet, José Manuel Guillamón, y Albert Mas. 2003. «Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*.» *International Journal of Food Microbiology* 80 (1): 47-53.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00144-7).
- Traoré, Mohamed, Joeri Kaal, y Antonio Martínez Cortizas. 2018. «Differentiation between pine woods according to species and growing location using FTIR-ATR.» *Wood Science and Technology* (2): 487-504. doi:<https://doi.org/10.1007/s00226-017-0967-9>.

- Troncoso-Ortega, E, Castillo, R. del P., P. Reyes-Contreras, P. Castaño-Rivera, R. Teixeira Mendonça, N. Schiappacasse, y C. Parra. 2021. «Effects on Lignin Redistribution in Eucalyptus globulus Fibres Pre-Treated by Steam Explosion: A Microscale Study to Cellulose Accessibility.» *Biomolecules* 11 (4): 2218-273X. doi:<https://doi.org/10.3390/biom11040507>.
- Tuazon, D., G. D. Corder, y B. C. McLellan. 2013. «Sustainable development: a review of theoretical contributions.» *International Journal Sustainable Future for Human Security* 1 (1): 40-48. [http://www.j-sustain.com/files/pub/file/Vol1\(1\)2013/J-Sustain_Vol1_No1_40-48.pdf](http://www.j-sustain.com/files/pub/file/Vol1(1)2013/J-Sustain_Vol1_No1_40-48.pdf).
- Ubando, Aristotle T., Charles B. Felix, y Wei-Hsin Chen. 2020. «Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review.» *Bioresource Technology* 299: 122585. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122585>.
- Udeh, Henry Okwudili, y Tsietsie Ephraim Kgatla. 2013. «Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation .» *Journal of Brewing and Distilling* 4 (2): 19-45.
- US Department of Energy; Alternative fuels data center. 2021. «Global Ethanol Production by Country or Region.» Último acceso: 11 de Octubre de 2021. <https://afdc.energy.gov/data/10331>.
- US Energy Information Administration. 2020. *Biofuels explained. Ethanol and biomass-based diesel*. Último acceso: Octubre de 2021. <https://www.eia.gov/energyexplained/biofuels/>.
- Väljamäe, P., Sild, V., Nutt, A., Pettersson, G., & Johansson, G. 1999. «Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I.» *European Journal of Biochemistry* 266 (2): 327–334. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00853.x>.
- Vallejos-Barra, Ó., A. Ibáñez, G. Morás, G. Daniluk-Mosquera, y M. Ponce-Donoso. 2020. «BIOMASS OF Eucalyptus Globulus IN YOUNG PLANTATIONS IN URUGUAY.» *Floresta* 50 (4): 1798–1807. doi:[10.5380/rf.v50i4.65781](https://doi.org/10.5380/rf.v50i4.65781).
- Valles, Alejo, F. Javier Álvarez-Hornos, Vicente Martínez-Soria, Paula Marzal, y Carmen Gabaldón. 2020. «Comparison of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation processes for butanol production from rice straw.» *Fuel* 118831. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118831>.
- Valuates Reports. 2021. «Carotenoids Market Size is Projected to Reach USD 1168.7 Million by 2026 at CAGR 0.6% | Valuates Reports.» Último acceso: Setiembre de 2021. <https://www.prnewswire.com/in/news-releases/carotenoids-market-size-is-projected-to-reach-usd-1168-7-million-by-2026-at-cagr-0-6-valuates-reports-810425072.html>.
- van Zandvoort, Ilona, Yuehu Wang, Carolus B. Rasrendra, Ernst R. H. van Eck, Pieter C. A. Bruijninx, Hero J. Heeres, y Bert M. Weckhuysen. 2013. «Formation, Molecular Structure, and Morphology of Humins in Biomass Conversion: Influence of Feedstock and Processing Conditions.» *ChemSusChem* 6 (9): 1745-1758. doi:<https://doi.org/10.1002/cssc.201300332>.

- Vanholme, Ruben, Brecht Demedts, Kris Morreel, John Ralph, y Wout Boerjan. 2010. «Lignin Biosynthesis and Structure.» *Plant Physiology* 153 (3): 895-905. doi:<https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>.
- Varanasi, Patanjali, Priyanka Singh, Manfred Auer, Paul D Adams, Blake A Simmons, y Seema Singh. 2013. «Survey of renewable chemicals produced from lignocellulosic biomass during ionic liquid pretreatment.» *Biotechnology for Biofuels* 6 (14). doi:<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-14>.
- Vasilescu, R., A. Ionescu, A. Mihai, S. Carniciu, y C. Ionescu-Tîrgoviște. 2011. «Sweeteners and metabolic diseases: xylitol as a new player.» *Proc Rom Acad Series B* 2: 125–128. <https://academiaromana.ro/sectii2002/proceedingsChemistry/doc2011-2/art04Vasilescu.pdf>.
- Vassilev, Stanislav V., David Baxter, Lars K. Andersen, Christina G. Vassileva, y Trevor J. Morgan. 2012. «An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass.» *Fuel* 94: 1-33. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.09.030>.
- Vazquez, A., M. Laura Foresti, Juan I. Moran, y Viviana P. Cyras. 2015. «Extraction and Production of Cellulose Nanofibers.» En *Handbook of Polymer Nanocomposites. Processing, Performance and Application*, editado por Jitendra K. Pandey, Hitoshi Takagi, Antonio Norio Nakagaito y Hyun-Joong Kim, 81-118. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-642-45232-1_57.
- Vázquez, H., y O. Dacosta. 2007. «Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas / Alcoholic fermentation: An option for renewable energy production from agricultural residues.» *Ingeniería, investigación y tecnología* 8 (4): 249–259.
- Vermaas, Josh V., Michael F. Crowley, Gregg T. Beckham, y Christina M. Payne. 2015. «Effects of Lytic Polysaccharide Monooxygenase Oxidation on Cellulose Structure and Binding of Oxidized Cellulose Oligomers to Cellulases.» *Journal of Physical Chemistry* 119 (20): 6129–6143. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00778>.
- Viana, H., A. Rodrigues, D. M. M. Lopes, R. Godina, L. J. R. Nunes, y J. C. O. Matias. 2018. «Pinus Pinaster and Eucalyptus Globulus Energetic Properties and Ash Characterization.» *2018 IEEE International Conference on Environment and Electrical Engineering and 2018 IEEE Industrial and Commercial Power Systems Europe (EEEIC / I&CPS Europe)* 1-4. doi:10.1109/EEEIC.2018.8494618.
- Vidra, A., y Áron Németh. 2018. «Bio-produced Acetic Acid: A Review.» *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 62 (3): 245–256. doi:<https://doi.org/10.3311/PPch.11004>.
- Vijay Kumar Garlapati, Anuj K. Chandel, S.P. Jeevan Kumar, Swati Sharma, Surajbhan Sevda, Avinash P. Ingle, y Deepak Pant. 2020. «Circular economy aspects of lignin: Towards a lignocellulose biorefinery.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 130: 109977. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.109977>.
- Vishtal, A., y A. Kraslawski. 2011. «Challenges in industrial applications of technical lignins.» *BioRes.* 3547-3568.
- Volynets, Bohdan, Farhad Ein-Mozaffari, y Yaser Dahman. 2017. «Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing.»

- Green Processing and Synthesis* 6 (1): 1-22. doi:<https://doi.org/10.1515/gps-2016-0017>.
- Vu, Hang P., Luong N. Nguyen, Minh T. Vu, Md Abu Hasan Johir, Robert McLaughlan, y Long D. Nghiem. 2020. «A comprehensive review on the framework to valorise lignocellulosic biomass as biorefinery feedstocks.» *Science of The Total Environment* 743: 140630. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140630>.
- Wang, Changbo, Arunima Malik, Yafei Wang, Yuan Chang, Manfred Lenzen, Dequn Zhou, Mingyue Pang, y Qingxu Huang. 2020. «The social, economic, and environmental implications of biomass ethanol production in China: A multi-regional input-output-based hybrid LCA model.» *Journal of Cleaner Production* 249: 119326. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119326>.
- Wang, Danli, Lufeng Yan, Xiaobin Ma, Wenjun Wang, Mingming Zou, Jianjun Zhong, Tian Ding, Xingqian Ye, y Donghong Liu. 2018. «Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems.» *International Journal of Biological Macromolecules* 119: 453-461. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.133>.
- Wang, Jing, Junying Bai, Mingcong Fan, Tingting Li, Yan Li, Haifeng Qian, Li Wang, Hui Zhang, Xiguang Qi, y Zhiming Rao. 2020. «Cereal-derived arabinoxylans: Structural features and structure–activity correlations.» *Trends in Food Science & Technology* 96: 157-165. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.016>.
- Wang, Shizeng, Xinxiao Sun, y Qipeng Yuan. 2018. «Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: A review.» *Bioresource Technology* 258: 302-309. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.064>.
- Wang, Yuanyuan, Shaoni Sun, Fengfeng Li, Xuefei Cao, y Runcang Sun. 2018. «Production of vanillin from lignin: The relationship between β -O-4 linkages and vanillin yield.» *Industrial Crops and Products* 116: 116-121. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.043>.
- Wang, Z., P. Osseweijer, y J. P. Duque. 2017. «Assessing social sustainability for biofuel supply chains: The case of aviation biofuel in Brazil.» *IEEE Conference on Technologies for Sustainability (SusTech)* 1-5. doi:[10.1109/SusTech.2017.8333474](https://doi.org/10.1109/SusTech.2017.8333474).
- Wenger, J., V. Haas, y T Stern. 2020. «Why Can We Make Anything from Lignin Except Money? Towards a Broader Economic Perspective in Lignin Research.» *Curr Forestry Rep* 6: 294–308. doi:<https://doi.org/10.1007/s40725-020-00126-3>.
- Westman, Johan O., Ruifei Wang, Vera Novy, y Carl Johan Franzén. 2017. «Sustaining fermentation in high-gravity ethanol production by feeding yeast to a temperature-profiled multifeed simultaneous saccharification and co-fermentation of wheat straw.» *Biotechnology for Biofuels* 10 (1). doi:<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0893-y>.
- Wietschel, L, L., Thorenz, A Messmann, y A. Tuma. 2021. «Environmental benefits of large-scale second-generation bioethanol production in the EU: An integrated supply chain network optimization and life cycle assessment approach.» *Journal of Industrial Ecology* 25 (3): 677-692. doi:<https://doi.org/10.1111/jiec.13083>.

- Wongtanyawat, Nattanan, Possawat Lusanandana, Nawaporn Khwanjaisakun, Pichayapan Kongpanna, Janewit Phromprasit, Lida Simasatitkul, Suksun Amornraksa, y Suttichai Assabumrungrat. 2018. «Comparison of different kraft lignin-based vanillin production processes.» *Computers & Chemical Engineering* 117: 159-170. doi:https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2018.05.020.
- Woodward, JR, VP Cirillo, y LN Edmunds. 1978. «Light effects in yeast: inhibition by visible light of growth and transport in *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperatures.» *Journal of Bacteriology* 133 (2): 692-698. doi:https://doi.org/10.1128/jb.133.2.692-698.1978.
- Wu, Bo, Yan-Wei Wang, Yong-Hua Dai, Chao Song, Qi-Li Zhu, Han Qin, Fu-Rong Tan y otros,. 2021. «Current status and future prospective of bio-ethanol industry in China.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 145: 111079. doi:https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111079.
- Wu, Jie, Kwang Ho Kim, Keunhong Jeong, Dongwoo Kim, Chang Soo Kim, Jeong-Myeong Ha, Richard P. Chandra, y Jack N. Saddler. 2021. «The production of lactic acid from chemi-thermomechanical pulps using a chemo-catalytic approach.» *Bioresource Technology* 324: 124664. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124664.
- Wu, Wei, Vanessa Rondon, Kalvin Weeks, Pratap Pullammanappallil, Lonnie O. Ingram, y K.T. Shanmugam. 2018. «Phosphoric acid based pretreatment of switchgrass and fermentation of entire slurry to ethanol using a simplified process.» *Bioresource Technology* 251: 171-180. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.041.
- Xavier, Lucía, y María Noel Cabrera. 2021. «Aqueous two-phase systems applied to the extraction of syringaldehyde and vanillin from eucalyptus wood residues.» *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 43 (1): 153-159.
- Xiu, Shuangning, y Abolghasem Shahbazi. 2012. «Bio-oil production and upgrading research: A review.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (7): 4406-4414. doi:https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.04.028.
- Xu, Chunbao, y Fatemeh Ferdosian. 2017. «Lignin-Based Phenol–Formaldehyde (LPF) Resins/Adhesives.» En *Conversion of Lignin into Bio-Based Chemicals and Materials*, de Chunbao Xu y Fatemeh Ferdosian, 91-109. Berlin: Springer Berlin Heidelberg. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-662-54959-9_6.
- Xu, Feng. 2010. «Structure, ultrastructure, and chemical composition.» En *Cereal Straw as a Resource*. Oxford: Elsevier Science. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53234-3.00002-X.
- Xu, Feng, Jianming Yu, Tesfaye Tesso, Floyd Dowell, y Donghai Wang. 2013. «Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review.» *Applied Energy* 104: 801-809. doi:https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.12.019.
- Xu, J.-K., y R.-C. Sun. 2016. «Chapter 19 - Recent Advances in Alkaline Pretreatment of Lignocellulosic Biomass.» En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, editado por Solange I. Mussatto, 431-459. Elsevier. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00019-0.

- Xu, Q., Y. Luo, S.-Y. Ding, M.E. Himmel, L. Bu, R. Lamed, y E.A. Bayer. 2011. «3.03 - Multifunctional Enzyme Systems for Plant Cell Wall Degradation.» En *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, editado por Murray Moo-Young, 15-25. Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00167-7>.
- Xu, Shuguang, Yi Wu, Jianmei Li, Ting He, Yuan Xiao, Cuiqing Zhou, y Changwei Hu. 2020. «Directing the Simultaneous Conversion of Hemicellulose and Cellulose in Raw Biomass to Lactic Acid.» *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 8 (10): 4244-4255. doi:<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b07552>.
- Xue, Si-Jia, Zhe Chi, Yu Zhang, Yan-Feng Li, Guang-Lei Liu, Hong Jiang, Zhong Hu, y Zhen-Ming Chi. 2018. «Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications.» *Critical Reviews in Biotechnology* 7: 1049-1060. doi:<https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1428167>.
- Yan, F., S. Tian, K. Du, y X. Wang. 2021. «Effects of steam explosion pretreatment on the extraction of xylooligosaccharide from rice husk.» *BioResources* 6910-6920. <https://www.proquest.com/docview/2565818091?pq-origsite=gscholar&fromopenview=true>.
- Yan, Jinhua, Zhoujian Hu, Yunqiao Pu, E. Charles Brummer, y Arthur J Ragauskas. 2010. «Chemical compositions of four switchgrass populations.» *Biomass and Bioenergy* (34): 48-53.
- Yan, Kai, Guosheng Wu, Todd Lafleur, y Cody Jarvis. 2014. «Production, properties and catalytic hydrogenation of furfural to fuel additives and value-added chemicals.» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 38: 663-676. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.003>.
- Yang, Jian, Fukiko Kubota, Yuzo Baba, Noriho Kamiya, y Masahiro Goto. 2014. «Application of cellulose acetate to the selective adsorption and recovery of Au (III).» *Carbohydrate Polymers* 111: 768-774.
- Yang, Xinchao, Ke Wang, Jianhua Zhang, Lei Tang, y Zhonggui Mao. 2016. «Effect of acetic acid in recycling water on ethanol production for cassava in an integrated ethanol–methane fermentation process.» *Water Sci Technol* 74 (10): 2392–2398. doi:<https://doi.org/10.2166/wst.2016.228>.
- Yao, K., Q. Wu, R. An, W. Meng, M. Ding, B. Li, y Y. Yuan. 2018. «Hydrothermal pretreatment for deconstruction of plant cell wall: Part I. Effect on lignin-carbohydrate complex.» *AIChE Journal* 64 (6): 1938-1953. doi:<https://doi.org/10.1002/aic.16114>.
- Ylittervo, Päivi, Carl J. Franzén, y Mohammad J. Taherzadeh. 2013. «Impact of Furfural on Rapid Ethanol Production Using a Membrane Bioreactor.» *Energies* 6 (3): 1604-1617. doi:<https://doi.org/10.3390/en6031604>.
- Yoneda, Noriyuki, Satoru Kusano, Makoto Yasui, Peter Pujado, y Steve Wilcher. 2001. «Recent advances in processes and catalysts for the production of acetic acid.» *Applied Catalysis A: General* 221 (1-2): 253-265. doi:[https://doi.org/10.1016/S0926-860X\(01\)00800-6](https://doi.org/10.1016/S0926-860X(01)00800-6).
- Yoo, C.G., X. Meng, Yunqiao Pu, y Arthur J. Ragauskas. 2020. «The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A

- comprehensive review.» *Bioresource Technology* 301 (122784).
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122784>.
- Yoo, Chang Geun, Yongil Yang, Yunqiao Pu, Xianzhi Meng, Wellington Muchero, Kelsey L. Yee, O. Thompson y otros,. 2017. «Insights of biomass recalcitrance in natural *Populus trichocarpa* variants for biomass conversion.» *Green Chemistry* 19 (22): 5467-5478.
doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C7GC02219K>.
- Yoo, Juhyun, Sajid Alavi, Praveen Vadlani, y Vincent Amanor-Boadu. 2011. «Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars.» *Bioresource Technology* 102 (16): 7583-7590.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.092>.
- Yousuf, Abu, Domenico Pirozzi, y Filomena Sannino. 2020. «Chapter 1 - Fundamentals of lignocellulosic biomass.» En *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*, editado por Abu Yousuf, Domenico Pirozzi y Filomena Sannino, 1-15. Academic Press.
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815936-1.00001-0>.
- Yu Selikhova, N, D A Kurgachev, V S Sidelnikov, D V Novikov, V V Botvin, y O K Poleshchuk. 2019. «Optimization of the conditions of guaiacol and glyoxylic acid condensation to vanillylmandelic acid as an intermediate product in vanillin synthesis.» *Journal of Physics: Conference Series* 1145: 012047. doi:<http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/1145/1/012047>.
- Yu, Yun, Yu Long, y Hongwei Wu. 2016. «Near-Complete Recovery of Sugar Monomers from Cellulose and Lignocellulosic Biomass via a Two-Step Process Combining Mechanochemical Hydrolysis and Dilute Acid Hydrolysis.» *Energy & Fuels* 30 (3): 1571-1578. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b02196>.
- Yu, Zhengdao, Fuqiang Yu Bailiang Zhang, Guizhuan Xu, y Andong Song. 2012. «A real explosion: The requirement of steam explosion pretreatment.» *Bioresource Technology* 121: 335-341. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.055>.
- Yuan, Xueming, y Gang Cheng. 2015. «From cellulose fibrils to single chains: understanding cellulose dissolution in ionic liquids.» *Physical Chemistry Chemical Physics* 17 (47): 31592-31607. doi:<http://dx.doi.org/10.1039/C5CP05744B>.
- Zabner, Joseph, Michael P. Seiler, Janice L. Launspach, Philip H. Karp, William R. Kearney, Dwight C. Look, Jeffrey J. Smith, y Michael J. Welsh. 2000. «The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (21): 11614-11619.
doi:[10.1073/pnas.97.21.11614](https://doi.org/10.1073/pnas.97.21.11614).
- Zada, Numan Saleh, Ali Osman Belduz, Halil Ibrahim Güler, Anum Khan, Miray Sahinkaya, Arife Kaçiran, Hilal Ay, Malik Badshah, Aamer Ali Shah, y Samiullah Khan. 2021. «Cloning, expression, biochemical characterization, and molecular docking studies of a novel glucose tolerant β -glucosidase from *Saccharomonospora* sp. NB11.» *Enzyme and Microbial Technology* 148: 109799.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109799>.

- Zamora, Fernando. 2009. «Biochemistry of Alcoholic Fermentation.» En *Wine Chemistry and Biochemistry*, 3-26. New York, NY: Springer New York.
doi:https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_1.
- Zang, Guiyan, Ajay Shah, y Caixia Wan. 2020. «Techno-economic analysis of an integrated biorefinery strategy based on one-pot biomass fractionation and furfural production.» *Journal of Cleaner Production* 260 (120837): 1-10.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120837>.
- Zevallos Torres, L.A., A. Lorenci Woiciechowski, V.O. de Andrade Tanobe, S.G. Karp, L.C. Guimaraes Lorenci, C. Faulds, y C.R Soccol. 2020. «Lignin as a potential source of high-added value compounds: A review.» *Journal of Cleaner Production* 263: 121499.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121499>.
- Zhai, Jihua, Ian T. Burke, William M. Mayes, y Douglas I. Stewart. 2021. «New insights into biomass combustion ash categorisation: A phylogenetic analysis.» *Fuel* 287 (119469).
doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119469>.
- Zhang, Ji, Junling Yang, Huaifu Zhang, Zhentao Zhang, y Yu Zhang. 2021. «Research Status and Future Development of Biomass Liquid Fuels.» *BioResources* 16 (2): 4523-4543.
- Zhang, Jiwei, y Jonathan S. Schilling. 2017. «Role of carbon source in the shift from oxidative to hydrolytic wood decomposition by *Postia placenta*.» *Fungal Genetics and Biology* 106: 1-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.06.003>.
- Zhang, L, Z Chen, J Wang, W Shen, Q Li, y X Chen. 2021. «Stepwise metabolic engineering of *Candida tropicalis* for efficient xylitol production from xylose mother liquor.» *Microbial Cell Factories* 20 (1): 1-12. doi:[10.1186/s12934-021-01596-1](https://doi.org/10.1186/s12934-021-01596-1).
- Zhang, Libing, Lishi Yan, Zheming Wang, Dhrubojyoti D. Laskar, Marie S. Swita, John R. Cort, y Bin Yang. 2015. «Characterization of lignin derived from water-only and dilute acid flowthrough pretreatment of poplar wood at elevated temperatures.» *Biotechnology for Biofuels* 8: 203. doi:<https://doi.org/10.1186/s13068-015-0377-x>.
- Zhang, Peiqian, Rongxin Su, Yuhao Duan, Mei Cui, Renliang Huang, Wei Qi, Zhimin He, y Wim Thielemans. 2021. «Synergy between endo/exo-glucanases and expansin enhances enzyme adsorption and cellulose conversion.» *Carbohydrate Polymers* 253: 117287. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117287>.
- Zhang, Weiwei, Xiankun Zhang, Fuhou Lei, y Jianxin Jiang. 2020. «Co-production bioethanol and xylooligosaccharides from sugarcane bagasse via autohydrolysis pretreatment.» *Renewable Energy* 162: 2297-2305. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.034>.
- Zhang, X., M. Tu, y M.G. Paice. 2011. «Routes to Potential Bioproducts from Lignocellulosic Biomass Lignin and Hemicelluloses.» *Bioenerg. Res.* 4: 246–257. doi:<https://doi-org.proxy.timbo.org.uy/10.1007/s12155-011-9147-1>.
- Zhang, X.-Z., y Y.-H.P. Zhang. 2013. «Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications.» En *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, editado por S.-T Yang, Hesham, A.E.-E. y T. Nuttha, 131–146. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons.
doi:<https://doi.org/10.1002/9781118642047.ch8>.

- Zhang, Y., L. G. Oates, J. Serate, D. Xie, E. Pohlmann, Y. V. Bukhman, S. D. Karlen y otros,. 2018. «Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits.» *GCB Bioenergy* 10: 825-840. doi:10.1111/gcbb.12533.
- Zhang, Yu, Xiaoyan Wang, Peipei Wang, Junlong Song, Yongcan Jin, y Orlando J. Rojas. 2020. «Interactions between type A carbohydrate binding modules and cellulose studied with a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring.» *Cellulose* 27 (7): 3661-3675. doi:https://doi.org/10.1007/s10570-020-03070-4.
- Zhao, Bao-Cheng, Ji-Dong Xu, Bo-Yang Chen, Xue-Fei Cao, Tong-Qi Yuan, Shuang-Fei Wang, Adam Charlton, y Run-Cang Sun. 2018. «Selective precipitation and characterization of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) from Eucalyptus.» *Planta* 1077-1087. doi:https://doi.org/10.1007/s00425-018-2842-9.
- Zhao, Yong, Usama Shakeel, Muhammad Saif Ur Rehman, Hongqiang Li, Xia Xu, y Jian Xu. 2020. «Lignin-carbohydrate complexes (LCCs) and its role in biorefinery.» *Journal of Cleaner Production* 253: 120076. doi:https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120076.
- Zhao, Zhezhen, Jiaming Zhang, Yiming Li, Fei Li, y Ping Liu. 2021. «Effects and Mechanisms of Alkali Recycling and Ozone Recycling on Enzymatic Conversion in Alkali Combined with Ozone Pretreatment of Corn.» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 193 (1): 281-295. doi:https://doi.org/10.1007/s12010-020-03425-4.
- Zheng, Jun, y Lars Rehmann. 2014. «Extrusion Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review.» *International Journal of Molecular Sciences* 15 (10): 18967-18984. doi:https://doi.org/10.3390/ijms151018967.
- Zhou, Fanglei, Cunwen Wang, y Jiang Wei. 2013. «Simultaneous acetic acid separation and monosaccharide concentration by reverse osmosis.» *Bioresource Technology* 131: 349-356. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.145.
- Zhu, Mingjun, Ping Li, Xinfang Gong, y Jufang Wang. 2012. «A Comparison of the Production of Ethanol between Simultaneous Saccharification and Fermentation and Separate Hydrolysis and Fermentation Using Unpretreated Cassava Pulp and Enzyme Cocktail.» *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 671-678. doi:https://doi.org/10.1271/bbb.110750.
- Zhu, Yuan, Nayomi Plaza, Yuka Kojima, Makoto Yoshida, Jiwei Zhang, Jody Jellison, Sai Venkatesh Pingali, Hugh O'Neill, y Barry Goodell. 2020. «Nanostructural Analysis of Enzymatic and Non-enzymatic Brown Rot Fungal Deconstruction of the Lignocellulose Cell Wall.» *Frontiers in Microbiology* 11: 1389. doi:10.3389/fmicb.2020.01389.
- Zhuang, Xinshu, Wen Wang, Qiang Yu, Wei Qi, Qiong Wang, Xuesong Tan, Guixiong Zhou, y Zhenhong Yuan. 2016. «Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products.» *Bioresource Technology* 68-75.
- Zinovyev, Grigory, Irina Sulaeva, Stepan Podzimek, Dierk Rössner, Ilkka Kilpeläinen, Ivan Sumerskii, Thomas Rosenau, y Antje Potthast. 2018. «Getting Closer to Absolute Molar Masses of Technical Lignins.» *ChemSusChem* 11 (18): 3259-3268. doi:https://doi.org/10.1002/cssc.201801177.

Zucaro, Amalia, Annachiara Forte, y Angelo Fierro. 2018. «Life cycle assessment of wheat straw lignocellulosic bio-ethanol fuel in a local biorefinery prospective.» *Journal of Cleaner Production* 194: 138-149. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.130>.

LISTA DE PUBLICACIONES

Publicaciones

1. Bonfiglio, F.; Cagno, M.; Rey, F.; Torres, M.; Böthig, S.; Menéndez, P.; Mussatto, S.I. (2019). "Pretreatment of switchgrass by steam explosion in a semi-continuous pre-pilot reactor." *Biomass and Bioenergy* 121: 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.013>.
2. Bonfiglio, F.; Cagno, M.; Yamakawa, C.K.; Mussatto, S.I. (2021). "Production of xylitol and carotenoids from switchgrass and Eucalyptus globulus hydrolysates obtained by intensified steam explosion pretreatment." *Industrial Crops and Products* 170: 113800. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113800>.

Presentaciones en Congresos

1. "Pretreatment of Switchgrass by Steam Explosion in a Semi Continuous pre-pilot plant". Brazilian Bioenergy Science and Technology Conference, 2017, Campos do Jordao, Brasil. Bonfiglio, F.; Cagno, M.; Rey, F.; Torres, M.; Böthig, S.; Menéndez, P.; Mussatto, S.I.. Resumen y presentación póster.
2. "Estudio de la variación de la composición de la lignina de Switchgrass pretratada por explosión por vapor". 5to Encuentro Nacional de Química (ENAGUI), 2017, Montevideo, Uruguay. Bonfiglio, F.; Reina, L.; Cagno, M.; Mussatto, S.I.; Menéndez, P. Resumen y presentación póster.
3. "Study of the production of bioethanol from Switchgrass pretreated by steam explosion". International Council of Academies of Engineering and Technological Sciences, 2018. Montevideo, Uruguay. Bonfiglio, F.; Rey, F.; Cagno, M.; Böthig, S.; Menéndez, P.; Mussatto, S.I. Resumen y presentación póster.
4. "Composition and fermentation capacity of Switchgrass and Eucalyptus globulus hydrolysates obtained by steam explosion pretreatment". 2nd International Workshop on Biorefinery and Lignocellulosic Materials, 2019. Córdoba, España. Bonfiglio, F.; Yamakawa, C.K.; Cagno, M.; Menéndez, P.; Mussatto, S.I. Resumen y presentación póster.
5. "Utilización de biomasa lignocelulósica pretratada con explosión por vapor para producción de etanol y coproductos de alto valor agregado". 6to Encuentro Nacional de Química (ENAGUI), 2019. Montevideo, Uruguay. Bonfiglio, F.; Mussatto, S.I.; Menéndez, P. Resumen y presentación oral.
6. "Production of xylitol from switchgrass and Eucalyptus globulus hydrolysates obtained by steam explosion pretreatment" BBEST 2020-21/BIOFUTURE SUMMIT II, 2020. Congreso Virtual. Bonfiglio, F.; Yamakawa, C.K.; Mussatto, S.I. Resumen y presentación en video.



Research paper

Pretreatment of switchgrass by steam explosion in a semi-continuous pre-pilot reactor

Fernando Bonfiglio^a, Matías Cagno^a, Fabiana Rey^a, Marina Torres^b, Silvia Böthig^a, Pilar Menéndez^c, Solange I. Mussatto^{d,*}

^a Centro de Investigaciones en Biocombustibles 2G, Latitud – Fundación LATU, Avenida Italia 6201, Edificio Los Abetos, 11500, Montevideo, Uruguay

^b Departamento de Desarrollo de Métodos Analíticos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Avenida Italia 6201, 11500, Montevideo, Uruguay

^c Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Avenida General Flores 2124, 11800, Montevideo, Uruguay

^d Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, Technical University of Denmark, Kemitorvet, Building 220, 2800, Kongens Lyngby, Denmark



ARTICLE INFO

Keywords:

Switchgrass
Steam explosion pretreatment
Pre-pilot reactor
Optimization
Saccharification

ABSTRACT

Switchgrass (*Panicum virgatum*) is a perennial grass highly valued as an energy crop resource for the production of bioethanol due to its high carbohydrate content, fast growth, and ability to grow in lands that cannot support crop or food production. In the present study, this biomass was submitted to steam explosion pretreatment in a semi-continuous pre-pilot reactor with the aim of obtaining a pretreated solid with high digestibility for enzymatic hydrolysis. Different conditions of temperature (170–200 °C) and residence time (5–15 min), leading to different severity factors (2.76–4.12) were used for steam explosion pretreatment, which were combined through a 2² central composite design. The results revealed that both variables had great influence in the process, affecting both the biomass structure and the saccharification yield, as a consequence. However, in the range of values evaluated in this study, the effect of the temperature was more prominent than the effect of the residence time. The best saccharification yield (88.3%) was obtained when using the biomass pretreated at 200 °C for 10 min. Similar result was obtained using a commercial cellulose pulp as feedstock for enzymatic hydrolysis, confirming that the best conditions for switchgrass pretreatment in the pre-pilot scale were successfully established.

1. Introduction

In the context of high demand of energy and reduction of CO₂ emissions, there is a global interest in the development of fuel production processes from renewable biomass. In fact, lignocellulosic biomass is an attractive resource for use in these processes, since it can provide environmental, economic and social benefits when compared to the production of fuels from fossil resources [1]. However, the production of cellulosic ethanol, for example, presents some important challenges to overcome. Due to the biomass recalcitrance, the introduction of an extra step, i.e., a pretreatment of the raw material, is required to make cellulose fibers more accessible to the action of enzymes during the enzymatic saccharification. Among the several alternatives of pretreatment reported in the literature, steam explosion has been one of the most commonly used, even on commercial scale, due to its efficiency to remove hemicellulose and lignin from biomass structure. In this process, the biomass is submitted to high-pressure

saturated steam during a short period of time (minutes). Then, the pressure is suddenly released, causing a disruption in the cell wall structure and solubilizing mainly the hemicellulose and lignin fractions, making the cellulose fibers more available for the following step of enzymatic hydrolysis as a consequence [2–4].

Steam explosion pretreatment has already been tested for different lignocellulosic materials, including elephant grass [5], tall fescue [6], spruce bark [7], corn stalk [8], among others. In general, this process has been demonstrated to be an efficient technology for biomass pretreatment. However, the efficiency and the selectivity of this pretreatment is highly dependent on the feedstock and conditions applied, the temperature and residence time being the two main parameters affecting the results. For this reason, it is of great importance to optimize the process conditions to each lignocellulosic feedstock in order to obtain a material with improved digestibility for enzymatic hydrolysis [3,5].

In the last years, Uruguay has demonstrated a strong commitment to

* Corresponding author.

E-mail addresses: smussatto@biosustain.dtu.dk, solangemussatto@hotmail.com (S.I. Mussatto).

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.013>

Received 16 April 2018; Received in revised form 26 November 2018; Accepted 7 December 2018
0961-9534/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the development of technologies for the production of second-generation biofuels and, according to a recent study, by increasing the use of biofuels in the sector of transport, Uruguay has already achieved an annual reduction of 7% in greenhouse gas emissions. Among the raw materials available in the country, suitable for use on the production of second-generation biofuels, switchgrass (*Panicum virgatum*) is one of the most relevant for use on the production of cellulosic ethanol since it is an abundant perennial grass with a high carbohydrate content. In addition, switchgrass is also an attractive feedstock for use on bioethanol production since it has a fast growth, high volume of production per area, low cost of production, and ability to grow in lands that cannot support crop or food production [9,10]. Therefore, the present study is focused on the development of a process technology for ethanol production using switchgrass as a feedstock. More specifically, this study evaluated the pretreatment of switchgrass by steam explosion in a semi-continuous pre-pilot reactor able to generate between 3 and 7 kg of pretreated solid material. The effects of temperature and residence time used for pretreatment were evaluated and the conditions able to result in a solid with improved digestibility for enzymatic hydrolysis were selected.

2. Material and methods

2.1. Raw material

The switchgrass (*Panicum virgatum*) used in this study was provided by ANCAP (Uruguay). The feedstock was harvested in the Agricultural Experimental Station Mario Cassinoni, department of Paysandú, in September 2016. The biomass was dried at 40 °C and milled to an average particle size of 1 cm.

2.2. Steam explosion pretreatment

Steam explosion pretreatment was carried out in a semi-continuous pre-pilot equipment (being the *semi* due to the release of pressure every 5 s) installed at the Pilot Plant of the Technological Laboratory of Uruguay (Montevideo). The equipment (Advance Bio Systems LLC, model S1401-D2011) has an approximate capacity of 10 kg/h (depending on pretreatment conditions), a maximum working pressure of 15 bar, and a screw of variable speed to regulate residence time. Maximum working temperature was 200 °C, which was regulated according to the working pressure (as the equipment works with saturated vapor) and controlled by means of a PLC that also regulated and set

Table 1

Chemical composition of the switchgrass used in the present study.

Component	Composition (%wt)
Cellulose	31.8
Hemicellulose	25.0
Lignin	31.2
<i>Klason lignin</i>	26.9
<i>Soluble lignin</i>	4.3
Ash	3.2
Protein	1.8
Extractives	7.4
<i>Water extractives</i>	5.0
<i>Ethanol extractives</i>	2.4

different screw speeds (hopper screw, feeding screw and reactor screw) (Fig. 1).

Twenty-four hours prior to the steam explosion reaction, the biomass was hydrated to 30% (w/w) with tap water at room temperature. This point was similar to the fiber-saturated point, which was considered the ideal since no extra nor incomplete hydration had taken place [11]. The hydrated biomass was then added to the pretreatment reactor and submitted to high-pressure steam under different conditions of temperature and residence time. Once the desired time lapsed, a sudden reduction of the pressure was promoted.

After steam explosion pretreatment, the biomass was filtrated using a fabric (65% polyester and 35% cotton, 180 g/m², 405 warp yarns in 10 cm and 194 weft yarns in 10 cm) and a press in order to separate the remaining solid from the liquid fraction. The liquid fraction was then frozen for further analysis. The solid fraction was washed three times with tap water at 60 °C in a ratio 5:1 (water:dry biomass in kg), using a portable concrete mixer during 5 min, and re-pressed. The pH of the third washing water was 5–6. Then, the solid fraction was dried at 40 °C and stored at room temperature in bags for further analyses and enzymatic saccharification.

2.3. Experimental design and severity factor calculation

Three levels of temperature (170, 185, and 200 °C), and three levels of residence time (5, 10, and 15 min), were evaluated for steam explosion pretreatment of switchgrass. Such values were combined through a 2² central composite design, leading to a total of 11 assays. The design included three assays in the center point to estimate the

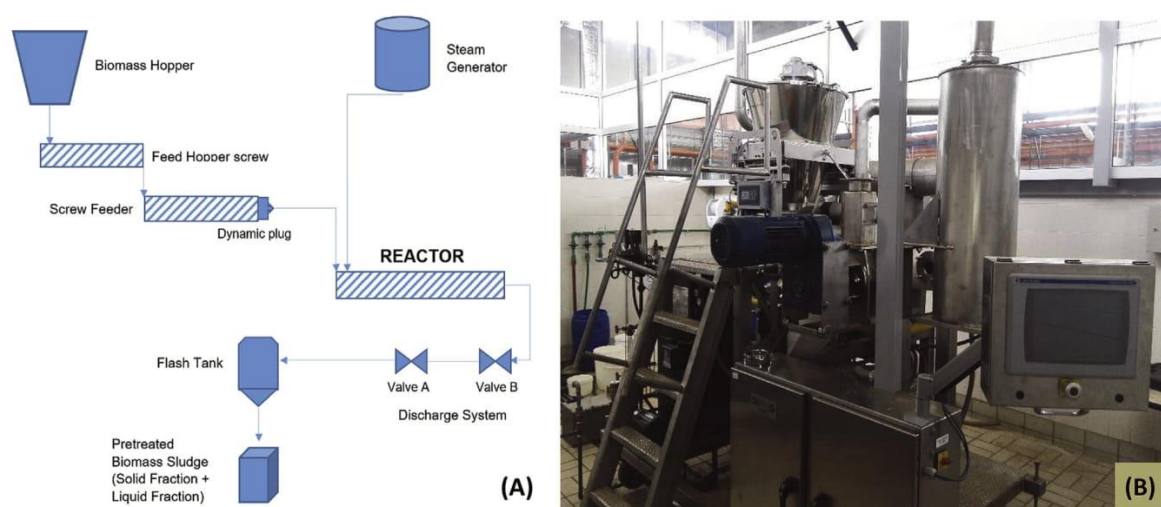


Fig. 1. Schematic representation (A) and original image (B) of the steam explosion equipment used for pretreatment of switchgrass in the present study.

Table 2

Composition of the remaining solid material obtained after steam explosion pretreatment of switchgrass under different conditions of temperature and residence time.

Run	Pretreatment variables (original and (coded) values)		Severity factor	Composition of the pretreated solid (%wt)		
	Temperature (°C)	Residence time (min)		Cellulose	Hemicellulose	Lignin
1	170 (-1)	5 (-1)	2.76	33.8	25.5	34.8
2	170 (-1)	10 (0)	3.06	35.4	25.4	35.0
3	185 (0)	5 (-1)	3.20	36.2	22.3	36.8
4	170 (-1)	15 (+1)	3.24	34.9	27.9	36.6
5	185 (0)	10 (0)	3.50	42.1	15.5	34.7
6	185 (0)	10 (0)	3.50	44.3	15.8	38.8
7	185 (0)	10 (0)	3.50	41.2	21.0	34.4
8	200 (+1)	5 (-1)	3.64	44.4	14.0	42.2
9	185 (0)	15 (+1)	3.68	44.4	13.9	40.8
10	200 (+1)	10 (0)	3.94	49.1	5.1	45.3
11	200 (+1)	15 (+1)	4.12	50.9	2.5	50.6

Table 3

Composition of the liquid fraction obtained after steam explosion pretreatment of switchgrass under different conditions of temperature and residence time.

Run	Pretreatment variables (original and (coded) values)		Severity factor	Composition of the liquid fraction (g/L)					
	Temperature (°C)	Residence time (min)		Glucose	Xylose	Formic Acid	Acetic Acid	HMF ^a	Furfural
1	170 (-1)	5 (-1)	2.76	0.47	0.6	1.4	1.3	nd	nd
2	170 (-1)	10 (0)	3.06	0.31	1.1	1.4	2.3	0.03	0.0
3	185 (0)	5 (-1)	3.20	0.38	1.8	2.1	2.5	0.04	0.1
4	170 (-1)	15 (+1)	3.24	0.16	0.6	0.9	1.5	0.04	0.0
5	185 (0)	10 (0)	3.50	0.27	3.3	2.9	2.9	0.05	0.2
6	185 (0)	10 (0)	3.50	0.51	4.8	3.8	4.1	0.07	0.3
7	185 (0)	10 (0)	3.50	0.12	1.2	1.2	1.3	0.03	0.1
8	200 (+1)	5 (-1)	3.64	0.18	2.9	2.1	1.7	0.07	0.2
9	185 (0)	15 (+1)	3.68	0.14	3.4	2.0	2.7	0.05	0.2
10	200 (+1)	10 (0)	3.94	0.69	15.7	4.2	6.1	0.39	1.3
11	200 (+1)	15 (+1)	4.12	2.60	20.3	7.7	10.6	0.54	2.3

^a HMF: hydroxymethylfurfural; nd: non detected.

experimental error needed for analysis of the variance, and to verify the presence of curvature in the response surfaces. The cellulose content in the remaining solid after pretreatment and the saccharification yield were considered as responses for the experimental design. The software Statistica version 12 was used for analysis of the data.

The severity factor (R_o) was calculated to each combination of temperature and residence time used for steam explosion. R_o was calculated according to Eq. (1), where t is the residence time in minutes, T is the reaction temperature in °C, and 14.75 is a fitted value [12].

$$R_o = t \times e^{\frac{T-100}{14.75}} \quad (1)$$

2.4. Enzymatic saccharification

Enzymatic saccharification was performed for all the solids obtained after steam explosion pretreatment. For comparison, assays were also performed using the untreated biomass and a sample of commercial Kraft cellulose pulp. For the reactions, the biomass (2% w/v) was mixed with 0.05 M sodium citrate buffer (pH 4.8) in Erlenmeyer flasks. Then, 50 FPU of enzyme (Cellic CTec2, Sigma Aldrich code SAE0020) were added to the flasks in order to initiate the reactions. The experiments were maintained in an incubator at 50 °C and 200 rpm, for 96 h. At the end of the saccharification, the samples were centrifuged (15000 rpm, 10 min) and the sugar content was determined using the dinitrosalicylic acid (DNS) method [13]. All the experiments were performed in duplicate.

2.5. Analytical methods

Cellulose, hemicellulose and lignin contents in the samples were determined according to the technical report from the National

Renewable Energy Laboratory of the United States NREL/TP-510-42618 [14], being the concentration of sugars, byproducts and degradation products in the liquid samples determined as described in the technical report NREL/TP-510-42623 [15]. Ash content was determined according to the standard test method ASTM D1102-84 [16]. Protein was estimated by multiplying the nitrogen content by 6.25. Nitrogen content was determined using a CHN Analyzer Flash 2000 Organic Elemental Analyzer (ThermoScientific). Extractives were determined according to the technical report NREL/TP-510-42619 [17].

Three biomass samples were observed by scanning electron microscopy (SEM): two samples pretreated under different process conditions (the less severe and the most severe) and an untreated sample. Images were obtained by using a JEOL electron microscope model JSM-5900LV. For analysis, the dried samples were covered with a gold film and then submitted to an acceleration voltage of 20 kV. Images were obtained at 75 and 370-fold magnifications.

3. Results and discussion

3.1. Biomass composition

Chemical composition of the switchgrass used in the present study is shown in Table 1. As can be seen, the original raw material had an elevated amount of carbohydrates in the composition (approx. 57% w/w), present in the form of cellulose and hemicellulose. Cellulose was the most abundant fraction, being the amount found in this study similar to that reported by other authors [18]. Hemicellulose content was within the range of values reported to switchgrass and other grasses [5,10]; while lignin was present in higher amount, which could be explained by the natural variability of the specie, the harvesting season and storage conditions, as reported by Lindsey et al. [10]. Ash, protein and

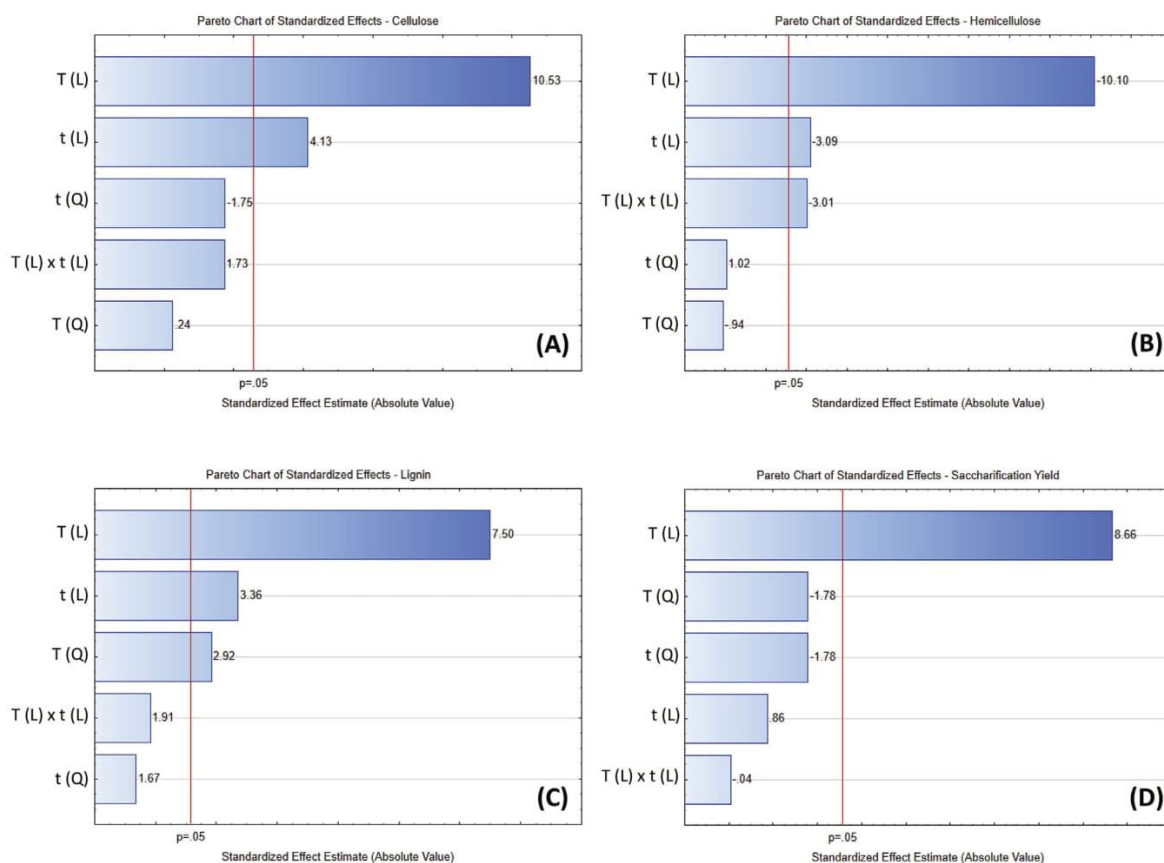


Fig. 2. Pareto chart for the effects of temperature (T) and residence time (t) and their interactions on the contents of cellulose (A), hemicellulose (B) and lignin (C) in the remaining solid material after steam explosion pretreatment, and on the saccharification yield (D) obtained using the pretreated solid materials.

Table 4
Saccharification yield obtained from the different pretreated samples of switchgrass, an untreated sample of switchgrass, and a commercial cellulose pulp sample.

Run	Pretreatment variables (original and coded) values		Severity factor	Saccharification yield (%)
	Temperature (°C)	Residence time (min)		
1	170 (-1)	5 (-1)	2.76	19.8
2	170 (-1)	10 (0)	3.06	26.3
3	185 (0)	5 (-1)	3.20	50.6
4	170 (-1)	15 (+1)	3.24	21.6
5	185 (0)	10 (0)	3.50	73.0
6	185 (0)	10 (0)	3.50	53.1
7	185 (0)	10 (0)	3.50	64.9
8	200 (+1)	5 (-1)	3.64	71.3
9	185 (0)	15 (+1)	3.68	64.0
10	200 (+1)	10 (0)	3.94	88.3
11	200 (+1)	15 (+1)	4.12	72.5
Untreated switchgrass				0.0
Commercial cellulose pulp				84.7

extractives contents in switchgrass were comparable to contents reported to other types of grasses and lignocellulosic biomass. Ash in switchgrass consists of inorganic elements and silica, while water and ethanol extractives are composed of a multitude of compounds, including waxes, oils, fats, resins, nonstructural sugars, chlorophyll, among others [10].

3.2. Steam explosion pretreatment

In this work, the equipment used for the steam explosion was a semi-continuous pre-pilot reactor (Fig. 1). Some advantages of this type of reactor when compared to lab-scale batch reactors include a higher production of pretreated biomass per time with less operative manipulation. However, although highly automatized, the operation of this equipment presents some challenges, among of which, the uniform biomass feeding, which in turn affects the dynamic plug to keep the pressure inside the reactor. In addition, the release of pressure at small intervals could affect the homogenous production of pretreated biomass. Nevertheless, such system and conditions are more similar to what is expected to happen in an industrial large-scale production.

Table 2 summarizes the composition of the remaining solid material obtained under the different steam explosion conditions. As expected, hemicellulose was the main fraction affected during pretreatment, the composition in the pretreated solid varying between 2.5 and 27.9% (w/w) according to the condition employed for reaction. The amount of this fraction in the pretreated solid decreased along with the increase in the reaction severity, thus increasing the relative amounts of cellulose and lignin, as a consequence. Due to the hemicellulose solubilization, higher concentration of xylose was also obtained in the liquid fraction along with the increase in the severity factor (Table 3), and a higher concentration of organic acids, mainly acetic acid, was also observed since this acid is also present in the hemicellulosic structure. On the other hand, the low concentrations of glucose and hydroxymethylfurfural (HMF) in the final liquors confirm that the reaction conditions attacked more selectively the hemicellulose than the

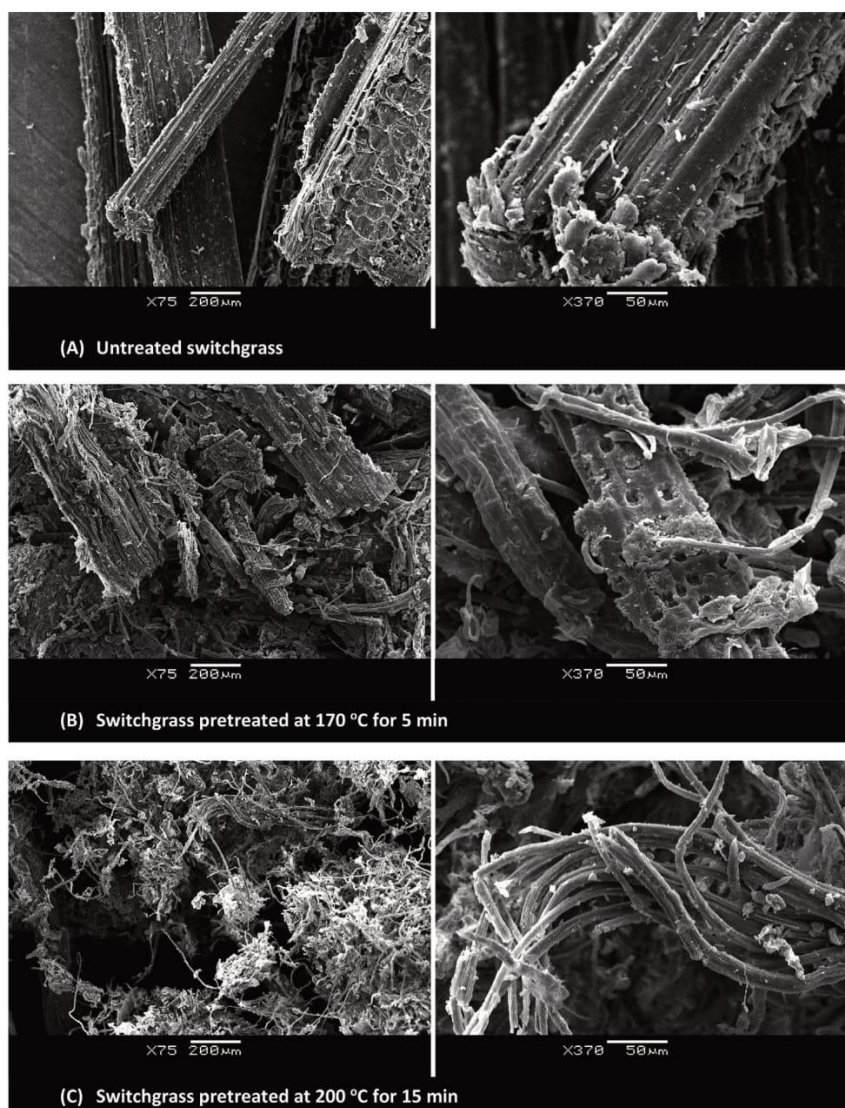


Fig. 3. SEM images obtained for switchgrass samples in the untreated form (A), pretreated by steam explosion under the less severe (B) and under the most severe (C) process conditions. Images taken at 75 and 370-fold magnifications.

cellulose present in switchgrass.

Statistical analysis of the data revealed that temperature was the most important variable affecting the results (Fig. 2). The effect of this variable was positive for cellulose and lignin responses (Fig. 2A and C) and negative for hemicellulose (Fig. 2B), revealing that more cellulose and lignin, and less hemicellulose were obtained in the solid when the temperature used for pretreatment was increased. The reaction time promoted also similar effects to the composition of the final solid but in much less intensity when compared to the temperature.

3.3. Enzymatic hydrolysis

In this step of the study, the solid fraction obtained for all the pretreatment conditions was submitted to enzymatic hydrolysis in order to release glucose for further use in fermentation process. Table 4 shows the saccharification yield obtained to each sample. Such value strongly varied according to the used sample (from 19.6 to 88.3%), confirming that the conditions used for pretreatment had great influence on the

subsequent step of cellulose enzymatic hydrolysis to obtain glucose. In general, the results were better when solids pretreated under the highest values of severity were used. Statistical analysis of these data revealed that the temperature used during pretreatment had the most significant effect in this response too (Fig. 2D), confirming that the solids obtained by steam explosion under the highest temperature conditions contained more cellulose in the composition and such fibers were more available to the action of enzymes during the hydrolysis. This conclusion is supported by the results of saccharification obtained for the untreated sample of switchgrass (Table 4) and also by the images obtained by scanning electron microscopy (Fig. 3). In Fig. 3, the image obtained at 75-fold magnification (left) allows to observe the effect of the explosion on the general deconstruction of the material, meanwhile the image obtained at 370-fold magnification (right) shows a more detailed effect of the pretreatment in a fiber-level. As can be seen, under the most severe pretreatment conditions, it is evident that a better deconstruction of the biomass structure occurred, making the cellulose fibers more accessible to the enzymes (Fig. 3C). On the other

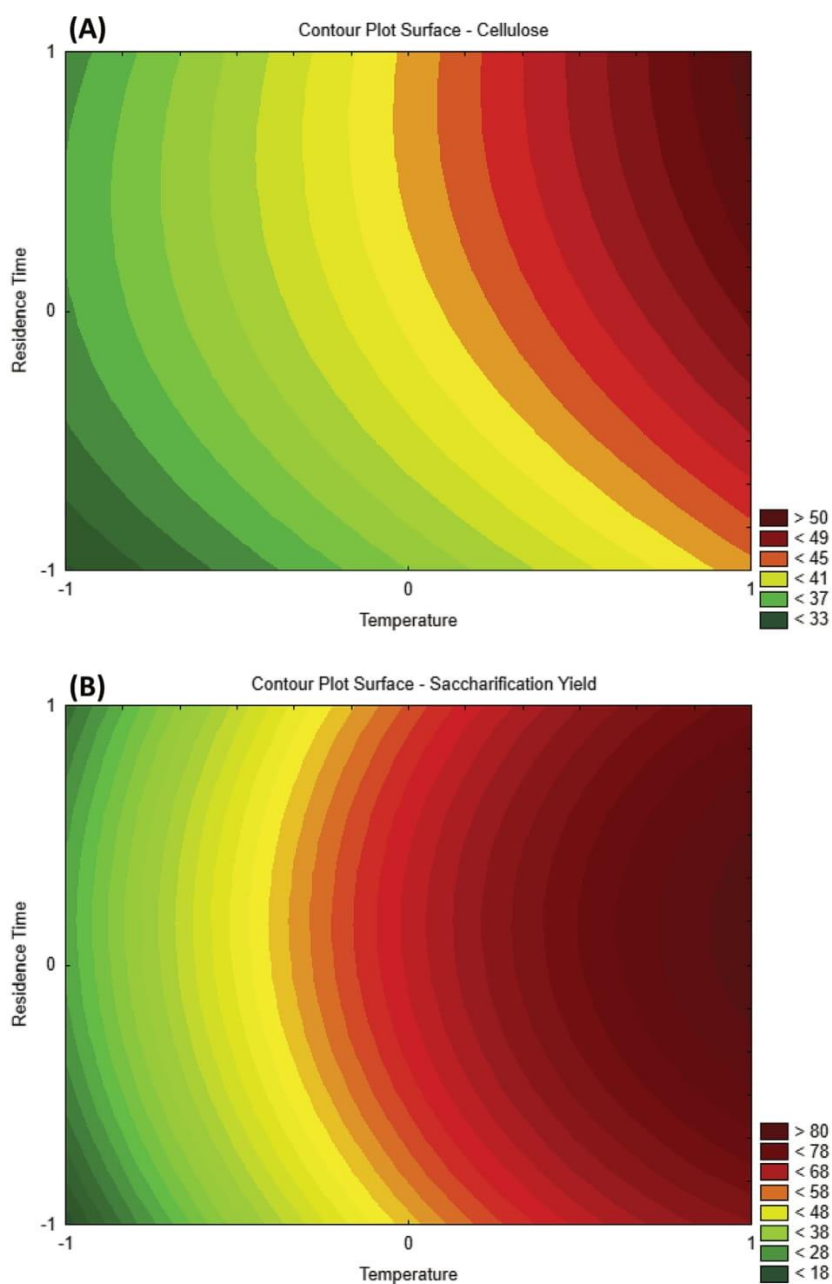


Fig. 4. Contour plots representing the variations of cellulose content in the pretreated solid material (A) and saccharification yield (B) using the solid pretreated by steam explosion under different conditions of temperature and residence time (coded values).

hand, pretreatment under the less severe conditions promoted little effects in the biomass structure, which was almost similar to the original biomass (Fig. 3A), justifying the low saccharification yield obtained for this sample.

It is important to highlight that it was not the aim of the present study to optimize the conditions used for enzymatic hydrolysis. However, in order to better understand the efficiency of the results obtained during this step, assays were also performed by submitting a commercial cellulose sample to the same conditions of enzymatic hydrolysis used for the pretreated switchgrass samples. As can be seen in Table 4, in the case of the sample pretreated with severity factor 3.94

(run number 10) it was possible to obtain a saccharification yield similar to that achieved when using a pure sample of cellulose. These results are highly relevant and demonstrate that it was possible to obtain a pretreated solid with good characteristics (high digestibility) for use in the saccharification process. In addition, when taking into account the composition of the solid obtained under these pretreatment conditions (Table 2, run 10) it is possible to conclude that it is not necessary to remove all the hemicellulose and lignin from the biomass structure to achieve efficient results of saccharification in the next step. As can be seen, the best saccharification results were obtained from a solid containing low amount of hemicellulose and high amount of lignin

in the composition (45% w/w), revealing that the presence of lignin was not detrimental to the saccharification yield, but probably the lignocellulosic complexity along with the hemicellulose and lignin together was a more important factor affecting the saccharification [19,20]. Similar findings were reported by Kataria et al. [5] when studying the enzymatic saccharification of steam explosion pretreated elephant grass biomass. This is also a very important finding from an economic point of view since the use of more severe pretreatment conditions (higher temperature and/or addition of chemicals, or even an extra pretreatment step) to remove the lignin fraction from biomass can be avoided.

3.4. Optimization of pretreatment conditions

The cellulose content in the pretreated solid and the saccharification yield were considered as the main responses of the experimental design and were used in this step of the study to optimize the pretreatment conditions. As can be seen in the contour plots showed in Fig. 4, both responses had a similar profile, with the best results being achieved under the highest conditions of temperature (200 °C). By performing an analysis of variance of the experimental data and eliminating the variables with the lowest significance on the responses, the following model equations were obtained for cellulose (Eq. (2)) and saccharification yield (Eq. (3)), respectively:

$$\text{Cellulose (\%wt)} = 42.42 + 13.43 T + 5.27t - 3.31t^2 + 2.70T \times t \quad (R^2 = 0.96) \quad (2)$$

$$\text{Saccharification yield (\%)} = 64.41 + 54.80T - 17.33T^2 - 17.33t^2 \quad (R^2 = 0.94) \quad (3)$$

The model equations (2) and (3) are able to predict the values of cellulose in the pretreated solid and saccharification yield, when using the temperature (T) and residence time (t) in the range of values studied in the present study. The high values of the coefficient R^2 demonstrates a high agreement between the experimental values and those obtained by the model equations.

Finally, the statistical analysis predicted that the highest result of saccharification yield (86.3%) can be obtained by using a solid pretreated at 209 °C for 11 min. However, this value is not statistically different from that obtained experimentally in the present study when using the solid pretreated at 200 °C for 10 min (saccharification yield of 88.3%, Table 4), revealing that the experimental result obtained under this condition is close similar to the maximum expected to be achieved through the statistical optimization. Therefore, steam explosion at 200 °C for 10 min was selected as the best condition to pretreat switchgrass by steam explosion in the semi-continuous pre-pilot reactor.

4. Conclusions

Pretreatment of switchgrass in a semi-continuous steam explosion pre-pilot reactor under selected conditions of temperature and residence time was a successful strategy to obtain a solid with high digestibility during enzymatic hydrolysis. Temperature and residence time revealed to be two important variables affecting this pretreatment and, selecting the optimal conditions (200 °C for 10 min) was very important to maximize the glucose release during enzymatic hydrolysis

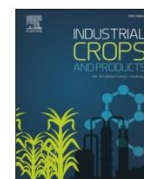
(saccharification yield of 88.3%). These results are very promising and contribute to the development of a technology for the production of second-generation ethanol production using switchgrass as a feedstock.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge ANCAP (Uruguay) and the Novo Nordisk Foundation (Denmark), Novo Nordisk Foundation Grant number: NNF10CC1016517.

References

- [1] S.I. Mussatto, G. Dragone, Biomass pretreatment, biorefineries, and potential products for a bioeconomy development, Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery. Mussatto SI, Elsevier Inc., Waltham, MA, 2016, pp. 1–22.
- [2] P. Alvira, E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, M. Negro, Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 4851–4861.
- [3] A. Duque, P. Manzanares, I. Ballesteros, M. Ballesteros, Steam explosion as lignocellulosic biomass pretreatment, Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery. Mussatto SI, Elsevier Inc., Waltham, MA, 2016, pp. 349–368.
- [4] S.I. Mussatto, G. Dragone, P.M. Guimarães, J.P.A. Silva, L.M. Carneiro, I.C. Roberto, A. Vicente, L. Domingues, J.A. Teixeira, Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 817–830.
- [5] R. Kataria, A. Mol, E. Schulten, A. Happel, S.I. Mussatto, Bench scale steam explosion pretreatment of acid impregnated elephant grass biomass and its impacts on biomass composition, structure and hydrolysis, *Ind. Crop. Prod.* 106 (2017) 48–58.
- [6] G. Maniet, O. Schmetz, N. Jacquet, M. Temmerman, S. Gofflot, A. Richel, Effect of steam explosion treatment on chemical composition and characteristic of organosolv fescue lignin, *Ind. Crop. Prod.* 99 (2017) 79–85.
- [7] K. Kemppainen, J. Inkinen, J. Uusitalo, T. Nakari-Setälä, M. Siika-aho, Hot water extraction and steam explosion as pretreatments for ethanol production from spruce bark, *Bioresour. Technol.* 117 (2012) 131–139.
- [8] Y.G. Sun, Y.L. Ma, L.Q. Wang, F.Z. Wang, Q.Q. Wu, G.Y. Pan, Physicochemical properties of corn stalk after treatment using steam explosion coupled with acid or alkali, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 486–493.
- [9] G. Siri-Prieto, Switchgrass como alternativa energética en el Uruguay, *Cangué* 32 (2012) 31–39.
- [10] K. Lindsey, A. Johnson, K. Pyoungchung, S. Jackson, N. Labbé, Monitoring switchgrass composition to optimize harvesting periods for bioenergy and value-added products, *Biomass Bioenergy* 56 (2013) 29–37.
- [11] W. Sui, H. Chen, Effects of water states on steam explosion of lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* 199 (2016) 155–163.
- [12] R. Overend, E. Chornet, Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A* 321 (1987) 523–536.
- [13] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428.
- [14] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, NREL, Golden, Colorado, Revised August 2012.
- [15] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, 2008.
- [16] ASTM, D1102-84 Standard Test Method for Ash in Wood, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2013.
- [17] A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, Determination of Extractives in Biomass, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, 2008.
- [18] Z. Hu, R. Sykes, M.F. Davis, E.C. Brummer, A.J. Ragauskas, Chemical profiles of switchgrass, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3253–3257.
- [19] S.I. Mussatto, M. Fernandes, A.M.F. Milagres, I.C. Roberto, Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain, *Enzym. Microb. Technol.* 43 (2008) 124–129.
- [20] J.A. Rollin, Z. Zhu, N. Sathitsuksanoh, Y.-H. Percival Zhang, Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 22–30.



Production of xylitol and carotenoids from switchgrass and *Eucalyptus globulus* hydrolysates obtained by intensified steam explosion pretreatment

Fernando Bonfiglio^a, Matías Cagno^a, Celina K. Yamakawa^b, Solange I. Mussatto^{b,*}

^a Centro de Investigaciones en Biocombustibles 2G, Latitud – Fundación LATU, Avenida Italia 6201, Edificio Los Abetos, 11500, Montevideo, Uruguay

^b Department of Biotechnology and Biomedicine, Technical University of Denmark, Søtofts Plads, Building 223, 2800, Kongens Lyngby, Denmark

ARTICLE INFO

Keywords:

Intensified pretreatment
Steam explosion
Hemicellulosic hydrolysate
Detoxification
Xylitol
Carotenoids

ABSTRACT

This study investigated the fermentability of hemicellulosic hydrolysates obtained by intensified steam explosion pretreatment of switchgrass (*Panicum virgatum*) and *Eucalyptus globulus*. Xylitol and carotenoids were the high-value molecules produced by fermentation. The intensified pretreatment allowed to process a large amount of biomass per unit of time and resulted in hydrolysates containing high amount of sugars, among of which, a significant fraction was in the form of oligomers (eucalyptus hydrolysate: 25.0 g/L of oligomers and 50.6 g/L of monomeric sugars; switchgrass hydrolysate: 18.9 g/L of oligomers and 39.6 g/L of monomeric sugars). To be used as fermentation media, a post-hydrolysis step was applied to increase the content of monomeric sugars in the hydrolysates. Then, a detoxification process was carried out to reduce the concentration of inhibitors present. Two evolved yeasts were used for fermentation: *Kluyveromyces marxianus* for xylitol production, and *Rhodospiridium toruloides* for carotenoids production. Results revealed that the hydrolysates produced by intensified steam explosion of switchgrass and eucalyptus present good fermentability and can be used to produce valuable compounds such as xylitol, after detoxification. *K. marxianus* presented better tolerance to inhibitory compounds still present in the detoxified hydrolysates (acetic acid up to 3.94 g/L and phenolic compounds up to 2.28 g/L) than *R. toruloides*, which favored the production of xylitol. Finally, the intensified pretreatment was found to be a potential strategy to obtain hydrolysates with high concentration of sugars, reducing the need of concentration in a subsequent step. Moreover, the detoxification strategy applied in this study allowed to recover valuable compounds from the hydrolysates, offering extra value to a biorefinery. Altogether, the findings of this study contribute to the advancement of a technology for valorization of hemicellulosic hydrolysates.

1. Introduction

Lignocellulosic biomass is an attractive feedstock for use on the production of valuable compounds, providing environmental, economic, and social benefits (Dragone et al., 2020). With an estimated production of 181,5 billion tons per year, lignocellulose is the most abundant biomass on Earth and, of them, 8.2 billion tons are used (Dahmen et al., 2019). Using lignocellulosic biomass as a feedstock to produce second generation biofuels, for instance, avoids utilization of petroleum, thereby reducing greenhouse gas emissions (Zhao et al., 2021; Mussatto and Dragone, 2016). In addition, an efficient utilization of lignocellulosic biomass for the production of different products in a biorefinery perspective increases the profitability and opens new opportunities for the biobased industry (Dragone et al., 2020).

Cellulose, hemicellulose, and lignin are the main components of

lignocellulosic biomass structure. Deconstruction of this structure is necessary to obtain monomeric sugars, which can later be converted into fuels and chemicals by fermentation process. Several pretreatment processes have been proposed for biomass deconstruction, among of which, steam explosion has been the most used in industrial-scale to produce cellulosic ethanol as it is very efficient to disrupt the material structure exposing the cellulose fibers to enzymatic hydrolysis in the subsequent step (Duque et al., 2016; Mussatto and Dragone, 2016).

During the biomass pretreatment, a hemicellulosic hydrolysate is also generated. Hemicellulosic hydrolysates contain a mixture of pentose and hexose sugars and can be used to produce valuable compounds such as food ingredients, chemicals, and materials contributing to an effective use of all biomass fractions, adding value to biorefineries (Mussatto and Dragone, 2016). From the different compounds that can be produced from pentose sugars, xylitol and carotenoids are high-value

* Corresponding author.

E-mail addresses: smussatto@dtu.dk, solangemussatto@hotmail.com (S.I. Mussatto).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113800>

Received 4 April 2021; Received in revised form 17 June 2021; Accepted 2 July 2021

Available online 12 July 2021

0926-6690/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

molecules with relevant properties and numerous industrial applications (Yamakawa et al., 2020; Liu et al., 2021a). So, the production of these compounds open good opportunities for valorization of hemicellulosic hydrolysates. Xylitol is a food sweetener with similar sweetening power than sucrose but with around 40 % less caloric value. In addition, xylitol can be consumed by diabetic people and can also be used to prevent dental caries, otitis, osteoporosis, and respiratory infections (Mussatto, 2012). Commercially, xylitol is produced by chemical synthesis through catalytic hydrogenation of xylose, a process that requires high energy demand (Delgado Arcaño et al., 2020). The bioconversion of xylose into xylitol by yeasts is seen as an attractive alternative to the chemical synthesis and has gained increased interest in the last years due to the potential advantages in both energetic and environmental aspects (Cortez et al., 2016; Dasgupta et al., 2017; Mussatto, 2012). Carotenoids are lipid-soluble natural pigments responsible for the yellow, red, orange, and purple colors (Leong et al., 2018). Besides acting as high-quality food color additives, they are also vitamin A precursors (de la Seña et al., 2014). Furthermore, carotenoids are largely used in the pharmaceutical industry as anticarcinogenic compounds (Frengova and Beshkova, 2009) and to reduce the risk of diseases such as coronary heart, fatty liver, neurodegenerative as Alzheimer and diabetes associated with obesity and hypertension (Clugston, 2020; Bhatt and Patel, 2020). Carotenoids can be produced by oleaginous yeasts, which are able to metabolize hexose and pentose sugars (Cabral et al., 2011; Liu et al., 2020; Mussatto et al., 2021).

Eucalyptus globulus and switchgrass are interesting feedstocks for utilization in biorefineries due to their composition and large availability. *Eucalyptus* spp. is the most planted hardwood tree of the world thanks to its fast growth and high quality wood (Elli et al., 2020). It is a hardwood rich in cellulose (Cebreiros et al., 2017; Guigou et al., 2019) and is one of the main feedstocks used in the pulp and paper industries, particularly in South America (Uruguay, Brazil and Chile) being, therefore, largely available. Cellulose content in eucalyptus range from 46 % to 55 % in a dry weight basis, hemicellulose 12%–23%, and lignin 22%–31%, these values being dependent of a series of factors such as age, geographical localization, growth and soil conditions (Mussatto and Dragone, 2016; Costa et al., 2016). The hemicellulose fraction of eucalyptus is a xylan backbone highly branched with acetyl groups (Sixta, 2006), while the lignin has extra linear linkages due to the presence of additional methoxy groups on aromatic rings (Erfani Jazi et al., 2019). Switchgrass (*Panicum virgatum*) is a perennial grass that also has interesting characteristics such as fast growth, high volume of production per area, longevity, low cost of production, and ability to grow in lands unsuitable for food or crops production (Lindsey et al., 2013). Additionally, it also has a high content of hemicellulose (xylan structure) in the composition, which may constitute up to 30 % in a dry weight basis (Yan et al., 2010), while the lignin content usually vary between 19 % and 29 % (Larnaudie et al., 2021).

Based on the above, the present work evaluated the fermentability of hemicellulosic hydrolysates obtained by intensified steam explosion pretreatment of switchgrass (*Panicum virgatum*) and *Eucalyptus globulus*, in order to find a potential opportunity for valorization of such aqueous stream generated after pretreatment of the biomass during the process for the production of cellulosic ethanol. More specifically, efforts were done to produce hemicellulosic hydrolysates containing high concentration of sugars through the intensification of the steam explosion pretreatment. This is an innovative approach tested in the present study, which was applied with the aim of obtaining hydrolysates rich in sugars, avoiding the need to perform a subsequent step of concentration to increase the sugars content before fermentation. Two evolved yeasts with ability to consume pentose and hexose sugars were used to evaluate the potential of the hydrolysates to be used as fermentation medium. Xylitol and carotenoids were the high-value compounds produced by fermentation, as their production could represent two possible high-value applications for the hemicellulosic hydrolysates. The need of submitting the hydrolysates to post-hydrolysis and detoxification steps before use as

fermentation medium was also evaluated. Finally, the potential impacts and perspectives related to the used of the eucalyptus and switchgrass hydrolysates for the production of valuable compounds were discussed.

2. Materials and methods

The overall methodology used in this study is summarized in Fig. 1. Briefly, hemicellulosic hydrolysates were produced by intensified steam explosion of two different raw materials: Switchgrass and *Eucalyptus globulus*. The composition of the hydrolysates was analyzed and a step of post-hydrolysis (acid hydrolysis) was performed to increase the concentration of sugar monomers in the hydrolysates. The presence of compounds that inhibit the yeasts' metabolism was detected in the hydrolysates and then, a detoxification process was applied to reduce the concentration of such inhibitory compounds in the hydrolysates. Fermentation experiments were performed using two evolved yeast strains with increased tolerance to biomass-derived inhibitors in order to evaluate the possibility to produce xylitol and carotenoids from the hydrolysates. Fermentation experiments were performed in hydrolysate-based media and also in complex media simulating the composition of the hydrolysates (with and without inhibitors) for comparison.

2.1. Feedstock

Switchgrass used in this study was provided by the Uruguayan state-owned company ANCAP. The material was harvested at the Agricultural Experimental Station Mario Cassinoni, department of Paysandú, in September 2016. *Eucalyptus globulus* chips were provided by the Uruguayan company Chipper. Both feedstocks were dried at 40 °C by forced convection oven until 10 % moisture, and then milled to an average particle size of 1 cm. Chemical composition of the raw materials was determined according to NREL's standard procedure (Sluiter et al., 2012).

2.2. Steam explosion pretreatment

Switchgrass and *Eucalyptus globulus* biomasses were pretreated in a semi-continuous pre-pilot reactor installed at the Technological Laboratory of Uruguay. The conditions of temperature (200 °C) and residence time (10 min) used for pretreatment were based on a previous optimization study (Bonfiglio et al., 2019). In this equipment, the biomass enters the reactor continuously by means of an "infinite screw". There are two forces applied to the biomass: the pressure of the "infinite screw" pressing the mass into the reactor constantly, and the opposite steam pressure trying to escape the reactor. Therefore, higher pressure inside the reactor increases the torque of the screw, which if it is too high, the equipment automatically shuts down. In this study, intensification of the steam explosion pretreatment was done by increasing the high torque limit of the equipment, which made possible to process around 15 % more biomass per unit of time (up to 11.5 kg/h) than the previous study. Additionally, this change promoted a slightly greater "extrusion" effect to the biomass before entering in the reactor vessel, which acted as an additional pretreatment, improving the biomass deconstruction during the steam explosion step.

After pretreatment, the resulting solid material, composed mainly by cellulose and lignin, was separated by filtration using a press filter. The liquid fraction (hemicellulosic hydrolysate) was filtered through a fabric filter to remove remaining solid particles, and analyzed to determine the contents of oligosaccharides, monomeric sugars, carboxylic acids, furans, and phenolic compounds. The hemicellulosic hydrolysate was submitted to a post-hydrolysis process to break the oligomers into monomers using 4% (w/w) sulfuric acid in autoclave at 121 °C for 60 min (Sluiter et al., 2008).

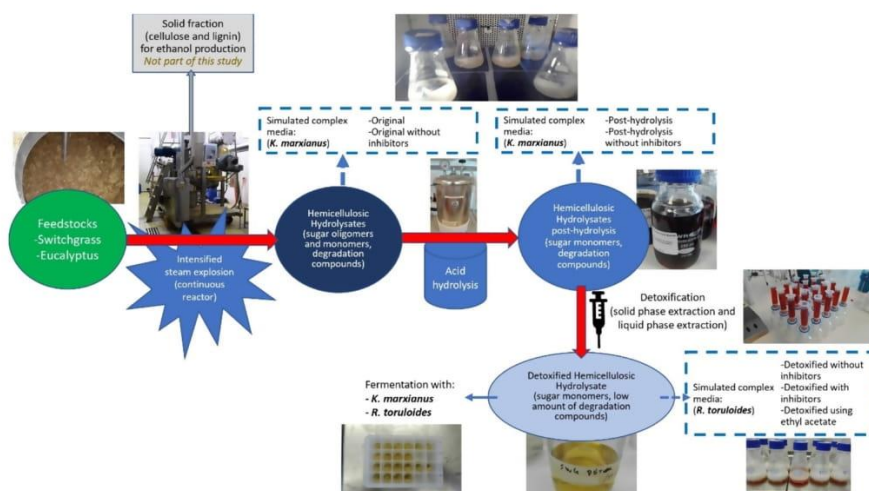


Fig. 1. Schematic representation of the overall methodology used in the present study.

2.3. Microorganisms and inoculum

Two evolved yeasts of the research group “Biomass Conversion and Bioprocess Technology” (Technical University of Denmark), with improved tolerance against toxic compounds present in biomass hydrolysates, were used in the fermentation experiments. The evolved strains were obtained by adaptive laboratory evolution of the wild-type strains of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6373 (unpublished data) and *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-1091 (Liu et al., 2021b). Inoculum of both evolved strains were prepared by transferring 1 mL of frozen stock cultures preserved at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 30 % glycerol, to the medium composed by (in g/L): yeast extract, 3.0; malt extract, 3.0; peptone, 5.0; and xylose, 20.0. *K. marxianus* inoculum was incubated in 250-mL baffled shaken flask using 50 mL of medium, at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 rpm for 24 h. *R. toruloides* was incubated at the same manner, but at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Afterwards, the cells were recovered by centrifugation and washed twice with 0.9 % NaCl solution.

2.4. Fermentation using simulated complex media

Fermentation experiments using complex media simulating the composition of the hydrolysates were performed with the aim of comparing the ability of the strains to grow in presence and absence of inhibitors. Simulated media were composed by cellobiose, glucose, xylose, arabinose, formic acid, acetic acid, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), furfural, vanillin, vanillic acid, coumaric acid, syringaldehyde, 4-hydroxybenzaldehyde, and syringic acid, in concentrations similar to those found in the hemicellulosic hydrolysates.

For the experiments with *K. marxianus*, the media were supplemented with (g/L): yeast extract, 3.0; malt extract, 1.5; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 5.0; KH_2PO_4 , 3.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; and trace elements (mg/L): EDTA, 15; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.5; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.3; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.84; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.0; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4; H_3BO_3 , 1.0; and KI, 0.1. Four different complex media were formulated to simulate the composition of the raw hydrolysate 1) without inhibitors, and 2) with inhibitors; and of the post-hydrolysis hydrolysate 3) without inhibitors, and 4) with inhibitors. Fermentations were performed in 250-mL baffled shaker flasks using 100 mL of medium at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 rpm, initial cell concentration of 1 g/L. Assays were performed in duplicate.

For the experiments with *R. toruloides*, the media were formulated with C/N ratio of 100 taking into account glucose, xylose, and arabinose as carbon sources. NH_4Cl (0.7–0.8 g/L) was the nitrogen source used. Additionally, yeast extract without nitrogen and ammonium sulfate was

used by 10 % of total monomeric sugars concentration. Three different complex media were formulated to simulate the composition of 1) Detoxified hydrolysate without inhibitors; 2) Detoxified hydrolysate with formic and acetic acids (2.00 g/L and 1.48 g/L, respectively, for simulated switchgrass hydrolysate; 2.15 g/L and 3.94 g/L, respectively, for simulated eucalyptus hydrolysate), and 3) Detoxified hydrolysate with ethyl acetate (2.0 g/L). Fermentations were performed in 250-mL baffled shaker flasks using 100 mL of medium at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 rpm, initial cell concentration of 1 g/L. Assays were performed in duplicate.

2.5. Hydrolysate detoxification

A detoxification process was designed and applied with the aim of promoting a sequential removal of phenolic compounds and organic acids from the hydrolysates. The detoxification process was composed of two sequential steps; the first step corresponded to a solid-phase extraction using polystyrene-divinylbenzene resin membrane to retain phenolic compounds, and the second step corresponded to a liquid-liquid extraction with ethyl acetate to remove organic acids.

For the process, the hydrolysate obtained after post-hydrolysis was centrifuged to remove the black precipitate particles (humin). Then, the pH of the hydrolysate was adjusted to 2.5 with NaOH pellets. A resin membrane column Chromabond® HR-X (Macherey-Nagel, Germany) of 15 mL and 500 mg of sorbent was first conditioned with 10 mL of methanol followed by 15 mL of deionized water. Then, 10 mL of hydrolysate were eluted through the column. Phenolic compounds retained in the column were recovered by using 10 mL of 5 % (v/v) ethanol followed by 20 mL of absolute ethanol. The partially detoxified hydrolysate had the pH adjusted again to 2.5 (using NaOH pellets) to be used for liquid-liquid extraction. In this step, 50 mL of hydrolysate and 200 mL of ethyl acetate were mixed in 250-mL baffled shaken flasks with closed lid for solvent, and incubated at $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 rpm for 40 min. After that, the mixture was transferred to a 500-mL funnel separator and left for 20 min for phase separation. The aqueous phase was collected and submitted again to the same liquid-liquid extraction process. The detoxified hydrolysate obtained at the end of the second extraction process was used for fermentation experiments.

2.6. Fermentation of detoxified hydrolysates

To be used as fermentation medium, the hydrolysates had the pH adjusted with calcium carbonate to 5.5 and 4.6, for *K. marxianus* and *R. toruloides*, respectively. Assays were carried out with and without

supplementation of the hydrolysates with nutrients (salts and extracts). In supplemented media, nutrients were added in the hydrolysates in the same amount used for simulated complex media preparation (item 2.4).

Fermentation experiments were performed in 24-wells microtiter plates (EnzyScreen, Netherlands) using 3 mL of hydrolysate per well. The plates were kept in an orbital shaking incubator with 50 mm amplitude, at 300 rpm (New Brunswick, USA). Sampling was done by completely removing the volume of the well followed by weighting to estimate the water evaporation. Control experiments to estimate the water evaporation during the fermentation were performed with non-inoculated medium. The water evaporation was estimated, and the value was used to adjust the volume of the fermentation wells using sterile deionized water (carbon dioxide formation was not considered). Fermentations were carried out at 40 °C and 30 °C for *K. marxianus* and *R. toruloides*, respectively. Assays were performed in duplicate.

2.7. Analytical methods

The concentration of carbohydrates, organic acids, furfural, 5-HMF, and phenolic compounds in the hydrolysates was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Cellobiose, glucose, xylose, arabinose, acetic acid, formic acid, furfural, and 5-HMF were quantified using a Dionex Ultimate 3000 high-performance liquid chromatography UHPLC + Focused system (Dionex Softron GmbH, Germany) with a Bio-Rad Aminex® column HPX-87H (300 mm × 7.8 mm) at 60 °C, and 5.0 mM H₂SO₄ as mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min. Sugars and acids were detected using a Shodex RI-101 refractive index detector, whereas 5-HMF and furfural were detected using UV measurement at 254 nm. Vanillin, vanillic acid, coumaric acid, 4-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde, and syringic acid were determined using a Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Dionex Softron GmbH, Germany) equipped with a Zorbax eclipse plus C18 column, eluted with a gradient method with mobile phase 0.05 % acetic acid in water and acetonitrile, column oven at 30 °C, 1 mL/min, UV detection. The content of oligomers in the hydrolysates was calculated as the difference between the concentration of monomeric sugars in the post-hydrolysate and in the original hydrolysate. Total phenolic compounds were quantified by colorimetric method using gallic acid as standard (Ballesteros et al., 2014). Nitrogen in the detoxified hydrolysates was quantified as primary amino nitrogen using the assay kit PANOPA (Megazyme).

For quantification of carotenoids, 1 mL of sample with cells was centrifuged (10,000 rpm, 5 min, 4–5 °C), washed twice with distilled water, resuspended in 1 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) and incubated in a Thermomixer at 30 °C for 15 min. Then, the sample was centrifuged (10,000 rpm, 5 min, 4–5 °C) and the extract recovered. This procedure was repeated until cells become white, and all the extracts were combined. The concentration of carotenoids was measured by absorbance at 450 nm against DMSO, using β-carotene dissolved in DMSO as standard (Liu et al., 2020).

During the fermentation course, total sugars were estimated by measurement of the total soluble solids expressed by °brix using an optical refractometer (Atago, Japan) and water as blank. Fermentation samples for HPLC analysis were centrifuged (9600 g, 5 min, 5 °C) using a Micro star 17 R (VWR, Denmark) centrifuge. Supernatants were kept in freezer at –20 °C until analysis. Cell concentration was determined by measurement of the optical density (OD) at 600 nm using a V-1200 spectrophotometer (VWR, Denmark), which was correlated with the concentration using a calibration curve prepared to each yeast. The calibration curves were validated for OD range of 0.1 to 0.8 ($R^2 = 1.0$). The maximum specific growth rate (μ_{max} , h⁻¹) was determined as the slope of linear region on an $\ln(X/X_0)$ versus time plot, where X (g/L) was the cell concentration at a specific time, and X₀ (g/L) was the cell concentration at the initial time (0 h).

3. Results and discussion

3.1. Feedstock composition and hydrolysate characterization

Table 1 presents the composition of switchgrass and *Eucalyptus globulus* biomasses used in the present study in terms of cellulose, hemicellulose, lignin, ash, protein, and extractives. Overall, the composition of eucalyptus wood was similar to values reported in the literature for cellulose, hemicellulose, and lignin; while for switchgrass the composition differed in terms of lignin content (literature reports 13.2–22.5 wt%), but was in the range that has been reported for cellulose and hemicellulose (Mussatto and Dragone, 2016).

Chemical composition of original hydrolysates produced from switchgrass and eucalyptus is shown in Table 2. Eucalyptus hydrolysate presented total monomeric sugars (50.61 ± 0.61 g/L) in higher concentration than switchgrass hydrolysate (39.57 ± 0.25 g/L), which is in agreement with the characterization of both feedstocks. Although most of the monomers corresponded to xylose, some glucose was also present in the hydrolysates. As reported in previous studies, the steam explosion pretreatment results in the disruption of the lignocellulosic matrix and cleavage of glycosidic bonds, therefore solubilizing monomers and oligomers mainly from hemicellulose, but also glucose and phenolic compounds from cellulose and lignin fractions respectively (Bonfiglio et al., 2019; Duque et al., 2016). The content of acetic acid in eucalyptus hydrolysate was also higher than in switchgrass hydrolysate, which can be explained by the fact that the eucalyptus xylan backbone is more branched with acetyl groups (Koch, 2008). The high amount of formic acid, 5-HMF, and furfural in the hydrolysates reveals that sugars degradation reactions occurred during pretreatment. The formation of these compounds could be minimized by optimizing the pretreatment conditions. However, this should be carefully evaluated since the use of a lower severity factor during the steam explosion pretreatment results in less formation of sugar degradation compounds, but also promotes less deconstruction of the lignocellulose structure, which will affect the subsequent access of the cellulose fibers to the cellulase enzymes during the subsequent step of enzymatic hydrolysis (Pielhop et al., 2016; Auxenfans et al., 2017). The content of phenolic compounds was also high in both hydrolysates, revealing that lignin depolymerization reactions also occurred during the biomass pretreatment. It is interesting to note the presence of different types of phenolic compounds in the hydrolysates according to the feedstock used (Table 2). For instance, coumaric acid and 4-hydroxybenzaldehyde (both derived from lignin precursor type p-hydroxyphenyl (H) units) were found in switchgrass hydrolysate, but not in eucalyptus hydrolysate. The main lignin precursor in *Eucalyptus* spp. is syringyl (S) unit, which explains the higher content of syringaldehyde in eucalyptus hydrolysate than in switchgrass hydrolysate. For vanillin and vanillic acid (both derived from the guaiacyl (G) unit), higher amounts were found in switchgrass hydrolysate, which was expected since it is a non-hardwood material.

Cellobiose was detected in both hydrolysates, which, together with the chromatogram profile of the samples, indicated the presence of oligomers in the media. A post-hydrolysis of the hydrolysates was then performed and confirmed the presence of oligomers in the original

Table 1
Composition of switchgrass (*Panicum virgatum*) and *Eucalyptus globulus* biomasses used in the present study.

Compound	Switchgrass (wt%)	Eucalyptus (wt%)
Cellulose	31.8 ± 0.8	47.9 ± 1.0
Hemicellulose	25.0 ± 1.2	16.0 ± 0.8
Lignin	31.2 ± 0.8	26.0 ± 0.8
Ash	3.2 ± 0.3	0.4 ± 0.1
Protein	1.8 ± 0.3	0.6 ± 0.3
Extractives	7.4 ± 1.1	3.1 ± 1.1
Water extractives	5.0 ± 0.4	2.6 ± 0.3
Ethanol extractives	2.4 ± 0.4	0.5 ± 0.2

Table 2
Chemical composition of switchgrass and *Eucalyptus globulus* hemicellulosic hydrolysates obtained by intensified steam explosion pretreatment.

Compound	Concentration in the hydrolysate (g/L)			
	Original hydrolysate		After post-hydrolysis	
	Switchgrass	Eucalyptus	Switchgrass	Eucalyptus
Cellobiose	3.59 ± 0.08	11.89 ± 0.03	nd	nd
Glucose	5.30 ± 0.09	7.82 ± 0.10	14.96 ± 0.03	14.02 ± 0.17
Xylose	26.46 ± 0.10	36.01 ± 0.33	39.99 ± 0.01	58.06 ± 0.48
Arabinose	7.81 ± 0.06	6.78 ± 0.13	3.47 ± 0.16	3.50 ± 0.02
Formic acid	8.82 ± 0.12	5.93 ± 0.07	9.87 ± 0.07	6.96 ± 0.07
Acetic acid	15.39 ± 0.16	20.13 ± 0.09	18.44 ± 0.01	29.03 ± 0.35
5-HMF	3.08 ± 0.12	2.74 ± 0.09	1.75 ± 0.06	1.28 ± 0.09
Furfural	3.11 ± 0.28	3.42 ± 0.06	3.23 ± 0.59	4.82 ± 0.23
Total phenolic	9.12 ± 0.91	7.74 ± 0.64	5.91 ± 0.38	4.29 ± 0.98
Vanillin	0.23	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.05
Vanillic acid	0.15	0.03	0.14	0.05
Coumaric acid	0.15	nd	0.04	nd
Syringaldehyde	0.10	0.21	0.03	0.14 ± 0.01
Syringic acid	0.09	0.09	0.09	0.10
4-Hydroxybenzaldehyde	0.12	0.01	0.08	0.02

nd: not detected.

media (Table 2). The content of oligomers in switchgrass and in eucalyptus hydrolysates corresponded to 18.9 g/L and 25.0 g/L, respectively. Chemical composition of the hydrolysates after post-hydrolysis reveals that oligomers were hydrolyzed into monomers, which is evidenced by the absence of cellobiose and increased amount of monomeric sugars, mainly xylose. The amount of acetic acid also increased after post-hydrolysis, more notably in the eucalyptus hydrolysate, which can be explained by the fact that the xylan backbone in hardwood is more branched with acetyl groups, as explained before. The total content of phenolic compounds in both hydrolysates decreased after post-hydrolysis, which could be related to the formation of a black precipitate called humin. Humins are formed as byproduct of glucose dehydration, and can also be derived from the conversion of 5-HMF (Hetzel et al., 2016); the later would explain the reduction of 5-HMF concentration observed in the hydrolysates after post-hydrolysis.

3.2. Fermentation of complex media simulating the hydrolysates by *K. marxianus*

Fermentation performance of *K. marxianus* in terms of maximum specific growth rate (μ_{max}) and sugars consumption (estimated by the difference between the initial and final values of °brix ($\Delta^\circ\text{brix}$)) is presented in Table 3. As can be seen, *K. marxianus* had similar behavior in both complex media simulating the hydrolysates without inhibitors, with μ_{max} of 0.184–0.201 h⁻¹ and a $\Delta^\circ\text{brix}$ of 2.65–3.00. The difference between the original and post-hydrolyzed media without inhibitors was the content of sugars; post-hydrolyzed hydrolysates presented higher amount of sugars, as shown in Table 2. These results reveal that the sugars concentration increase did not affect the yeast performance, which was able to grow and consume sugars similarly in both

Table 3
Fermentation performance of *Kluyveromyces marxianus* in complex media simulating the hydrolysate's composition.

Simulated hydrolysate condition	Simulated switchgrass		Simulated eucalyptus	
	μ_{max} (h ⁻¹)	$\Delta^\circ\text{brix}$	μ_{max} (h ⁻¹)	$\Delta^\circ\text{brix}$
Original hydrolysate without inhibitors	0.184 ± 0.002	2.85 ± 0.07	0.201 ± 0.001	3.00 ± 0.00
Original hydrolysate with inhibitors	–	–	–	–
Post-hydrolyzed without inhibitors	0.184 ± 0.004	2.75 ± 0.07	0.192 ± 0.003	2.65 ± 0.07
Post-hydrolyzed with inhibitors	–	–	–	–

Values after 48 h of fermentation.

conditions. However, in the presence of inhibitors, i.e., under conditions more similar to the real hydrolysates, the yeast was unable to grow or consume sugar. These results allowed to conclude that the amount of inhibitors present in the hydrolysates is harmful to *K. marxianus* and a detoxification process is necessary to overcome this barrier.

3.3. Detoxification process

Due to the high contents of acetic and formic acids and phenolic compounds in the hydrolysates after post-hydrolysis (Table 2), a detoxification process able to selectively recover these compounds from the hydrolysates was proposed with the ultimate goal of not only obtaining a suitable medium for fermentation, but also of getting additional value from the produced hydrolysates. Table 4 shows the composition of switchgrass and eucalyptus hydrolysates after each detoxification step: solid-phase extraction and liquid-liquid extraction. When compared to the original hydrolysates, the removal of organic acids corresponded to 73–91 %, and for total phenolic compounds corresponded to 81–88 %, with complete removal of 5-HMF and furfural. Additionally, phenolic compounds adsorbed into the resin membrane during solid-phase extraction were recovered by using 5 % (v/v) ethanol followed by absolute ethanol; while acetic acid and formic acids were recovered from the organic phase of liquid-liquid extraction by solvent evaporation. So, the detoxification strategy used in the present study was found as being an efficient method to selectively remove inhibitor compounds from hemicellulosic hydrolysates and could also contribute to improve the income of a biorefinery.

Table 4
Chemical composition of detoxified hydrolysates after sequential solid-phase extraction and liquid-liquid extraction.

Compound	Switchgrass hydrolysate (g/L)		Eucalyptus hydrolysate (g/L)	
	Solid-phase extraction	Liquid-liquid extraction	Solid-phase extraction	Liquid-liquid extraction
Cellobiose	nd	nd	nd	nd
Glucose	10.41 ± 0.09	11.70 ± 0.05	9.16 ± 0.0	9.89 ± 0.02
Xylose	27.88 ± 0.10	32.44 ± 0.05	38.50 ± 0.25	42.75 ± 0.15
Arabinose	2.24 ± 0.25	2.38 ± 0.21	1.90 ± 0.02	2.05 ± 0.31
Formic acid	9.18 ± 1.06	2.00 ± 0.26	5.43 ± 0.42	2.15 ± 0.0
Acetic acid	13.72 ± 0.73	1.48 ± 0.63	20.06 ± 0.89	3.94 ± 0.81
5-HMF	0.18 ± 0.0	nd	0.03 ± 0.0	nd
Furfural	0.03 ± 0.0	nd	0.03 ± 0.0	nd
Total phenolic	2.80 ± 0.03	2.28 ± 0.07	2.33 ± 0.02	1.29 ± 0.08

nd: not detected.

3.4. Fermentation of detoxified hydrolysates by *K. marxianus*

The detoxified hydrolysates obtained in the previous step were tested as fermentation medium for xylitol production by *K. marxianus*. Assays were carried out with and without nutrient supplementation to the hydrolysates. Fig. 2A and B show the results in hydrolysate supplemented with nutrients, and Fig. 2C and D show the results using non-supplemented hydrolysate. As can be seen, removal of toxic compounds and addition of nutrients benefited the sugars consumption rate, which were exhausted within 48 h, but favored the cell growth instead of the xylitol production. Since the second sample was taken after 48 h of cultivation and a fast sugar consumption rate was observed during this period, it is not possible to affirm that there was no xylitol formation in these experiments. However, when compared to the fermentation from non-supplemented media, it is clear that the nutritional supplementation deviated the yeast metabolism to higher cell formation instead of xylitol production.

Fermentation of detoxified hydrolysates without addition of nutrients resulted in longer fermentation time, but also in higher production of xylitol and lower cell growth. The maximum concentration of xylitol obtained from switchgrass hydrolysate was 13.71 ± 0.19 g/L that corresponded to 0.48 ± 0.04 g xylitol/g xylose; while the concentration of xylitol from eucalyptus hydrolysate achieved 28.07 ± 1.70 g/L and corresponded to 0.68 ± 0.10 g xylitol/g xylose. These results suggest that the higher amount of sugars and possibly the lower content of phenolic compounds present in detoxified eucalyptus hydrolysate (Table 4) influenced the yeast metabolism resulting in higher xylitol production. High concentration of sugars reduce the level of free dissolved oxygen in the yeast membrane interface. Xylitol formation is

favored under physiological stress conditions, in particular under anaerobic or oxygen-limited conditions, which cause NADH accumulation and then inhibition of NAD-linked xylitol dehydrogenase (Goli et al., 2012).

Besides the higher sugar content, the higher nitrogen content in eucalyptus hydrolysate may also have positively influenced the yeast performance to produce xylitol. Nitrogen, measured as primary amino nitrogen, corresponded to 18 ± 4 mg/L in switchgrass hydrolysate and 46 ± 5 mg/L in eucalyptus hydrolysate. However, the fermentation results suggest a possible lack of essential elements in the hydrolysates due to the long fermentation time observed. Essential elements are important for the formation of the enzymes in the metabolic pathway. For example, yeast extract contain biotin, a vitamin that is essential for yeast metabolism towards fermentation (Lee et al., 1988; Parrondo et al., 2009) as well as potassium, magnesium and other metals that play important role in the enzyme activity, homeostasis and cell division among others (Udeh, 2013). A correct balance of nutrients is very important to favor the yeast metabolism for the synthesis of the product of interest.

Although a significant production of xylitol was achieved from both detoxified and non-supplemented hydrolysates (0.48 ± 0.04 g xylitol/g xylose from switchgrass hydrolysate and 0.68 ± 0.10 g xylitol/g xylose from eucalyptus hydrolysate), there is a room for improvement of the xylitol yield since the maximum theoretical value of xylitol production from xylose corresponds to 0.917 g/g (Barbosa et al., 1988). However, these results compare well with studies performed in larger scale experiments. Zhang et al. (2021), for example, produced xylitol with an yield of 0.32 g/g from a medium containing 300 g/L of xylose using a 5-L bioreactor, while Prabhu et al. (2020) obtained a xylitol yield of 0.67

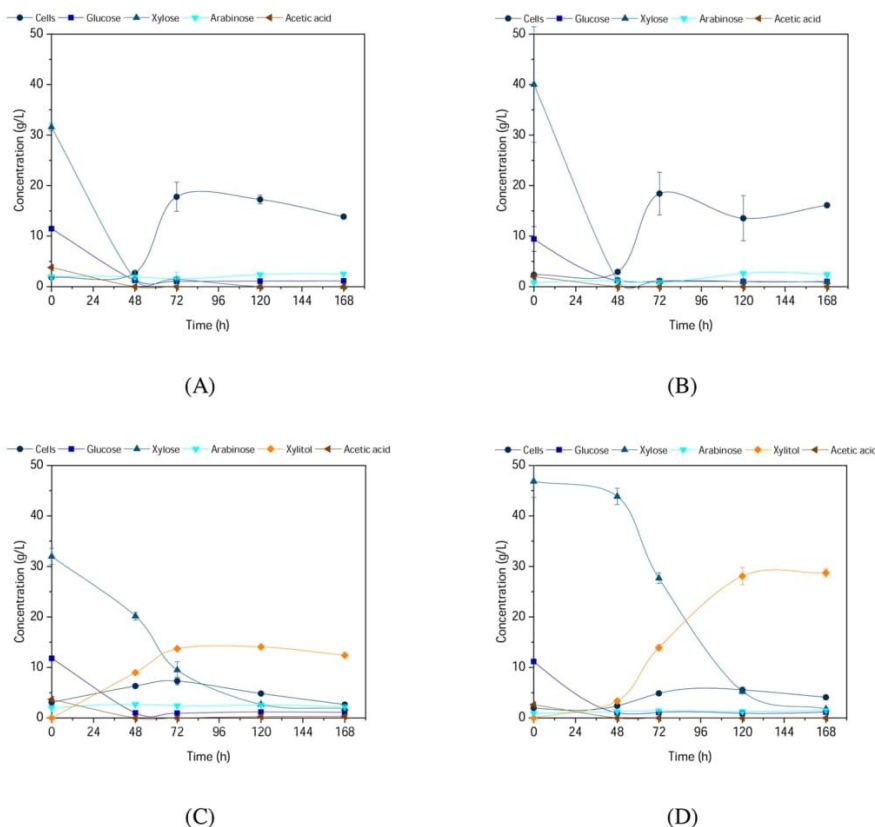


Fig. 2. Fermentation of detoxified hydrolysates with (A and B) and without (C and D) nutrient supplementation by *Kluyveromyces marxianus*. (A,C) Switchgrass hydrolysate; (B,D) *Eucalyptus globulus* hydrolysate.

g/g from pure xylose and 0.54 g/g from sugarcane bagasse hydrolysate using a 2.5 L bioreactor. It is worth noting that small-scale cultivations, in the microliter and milliliter range, have gained increased importance in recent years in modern biotechnological process development, playing an essential role in high-throughput screening experiments as well as for the production of specific compounds, phenotypic tests, mechanistic studies, among others (Lattermann and Büchs, 2015; de Mello et al., 2019). Scalability and correlation with lab scale stirred tank bioreactors has also been reported (Garrigós-Martínez et al., 2021; Hemmerich et al., 2021); however, aeration is a critical parameter. In the case of the present study, establishing the optimum conditions of dissolved oxygen and an appropriate balance of essential nutrients to be added to the hydrolysate, for example, could help to reach higher production yields. Anyway, the results demonstrate that the hemicellulosic hydrolysates produced by intensified steam explosion of switchgrass and eucalyptus present good fermentability and can be used to produce xylitol after detoxification.

3.5. Fermentation of simulated complex media by *R. toruloides*

Complex media simulating the composition of detoxified switchgrass and eucalyptus hydrolysates (Table 4) were formulated and used for cultivation of *R. toruloides*. Overall, the strain exhibited a slow growth rate when cultivated in such media, which could be attributed to the higher content of xylose than glucose in the media. In this metabolic pathway, the induction of a xylose entry system is necessary, which is repressed by the presence of glucose (Ounine et al., 1985). In media without inhibitors, the yeast growth (Fig. 3A and 3C) and total sugars

consumed (Fig. 3B and D) were similar independent of the hydrolysate used, which suggest that the content of sugars and the difference in the xylose-to-glucose ratios among the hydrolysates (about 2.7 in switchgrass hydrolysate, and 4.3 in eucalyptus hydrolysate), did not affect the strain performance to grow. After 144 h, a carotenoid production of 7.96 ± 0.64 mg/L was observed in complex medium simulating eucalyptus hydrolysate without inhibitors, and 8.29 ± 0.50 mg/L in complex medium simulating switchgrass hydrolysate without inhibitors. Such values are in close agreement with a previous study on the production of carotenoids by this same yeast strain (Liu et al., 2020).

On the other hand, interesting results were observed in simulated media containing inhibitors. In medium simulating switchgrass hydrolysate containing inhibitors (2.0 g/L of formic acid and 1.48 g/L of acetic acid), the yeast growth was favored; while in medium simulating eucalyptus hydrolysate with inhibitors (2.93 g/L of formic acid and 3.94 g/L of acetic acid), the yeast growth was completely inhibited (Fig. 3A and C). In fact, the strain of *R. toruloides* used in this study was previously evolved by adaptive laboratory evolution to better tolerate inhibitors present in wheat straw hydrolysates (which contained 1.5 g/L of acetic acid and 1.5 g/L of total phenolic compounds) (Liu et al., 2021b). The metabolism of oleaginous yeasts requires a constant supply of acetyl-CoA and malonyl CoA. Therefore, low amount of acetate contributes to the TCA cycle stimulating the carotenoid and fatty acids synthesis (Beopoulos et al., 2011; Xue et al., 2018). However, high amount of acetate may strongly affect the yeast performance. This would explain the inhibition of the yeast growth observed in simulated eucalyptus hydrolysate. It is worth highlighting that acetic acid has an inhibitory effect above certain concentrations (depending on yeast and

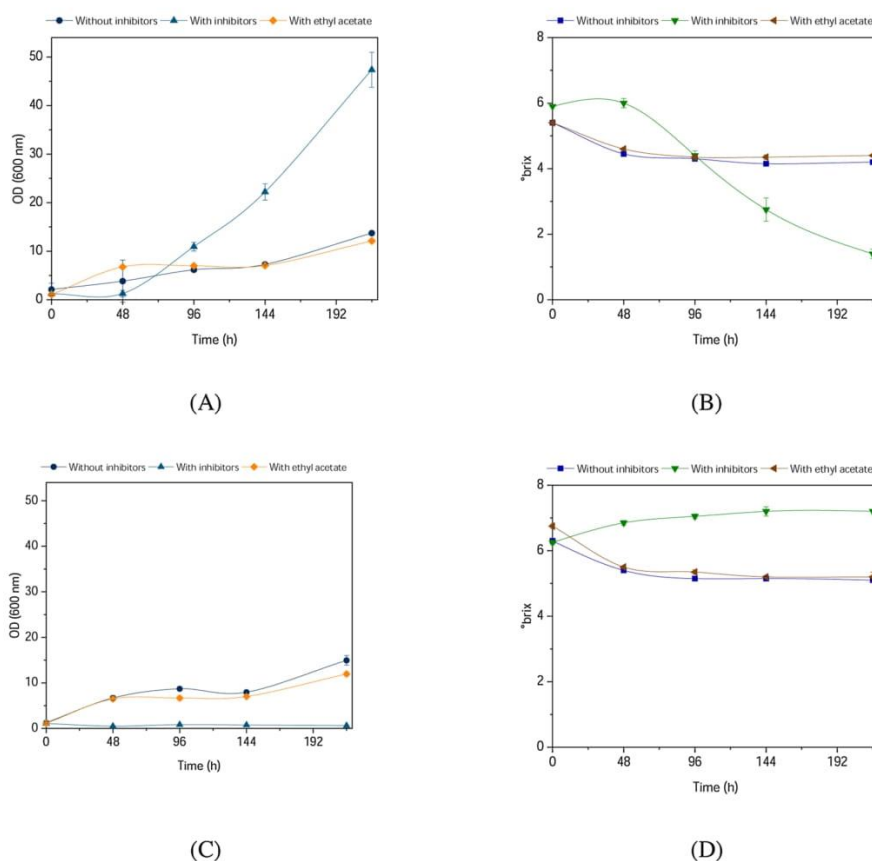


Fig. 3. Growth (A,C) and estimated sugars consumption (B,D) during the cultivation of *Rhodosporidium toruloides* in complex medium simulating switchgrass hydrolysate (A,B) and *Eucalyptus globulus* hydrolysate (C,D).

evolution), but it can also be used as carbon source by the yeasts when present in low concentration (Chen et al., 2009; Liu et al., 2020). Concerning the experiments with ethyl acetate, the presence of 2.0 g/L in the media slightly affected the yeast growth in both simulated hydrolysates. However, when cultivated in medium simulating switchgrass with ethyl acetate, the yeast produced 7.81 ± 0.60 mg/L of carotenoids after 144 h, which was very similar to the value obtained in the simulated media without inhibitors. These results reveal that the detoxification step used in the present study employing ethyl acetate as extraction solvent, would not be a problem for subsequent cultivation of *R. toruloides* in the hydrolysate, as after detoxification, a small amount of ethyl acetate dilutes in the hydrolysate.

R. toruloides is an oleaginous yeast with ability to produce lipids and carotenoids (Liu et al., 2021a). This yeast is a natural producer of β -carotene, γ -carotene, torulene, and torularhodin, which are valuable compounds for the chemical, pharmaceutical, feed, and cosmetic industries (Qi et al., 2020; Lin et al., 2017). In this study, the yeast cells became orange-red color even in the experiments where cell growth was not observed. However, cells cultivated in simulated hydrolysate without inhibitors presented a light orange color (Fig. 4A), while a stronger orange-red color was observed in simulated hydrolysate with inhibitors (Fig. 4B). According to the probable carotenoids present in the fermented hydrolysate and the observation of the color, it could be suggested that there was a prevalence of γ -carotene (Liu et al., 2021a; Buzzini et al., 2007). Nevertheless, an associated production of lipids in the simulated media without inhibitors could explain the lighter color compared to the media with inhibitors, as carotenoids are formed in higher amount under stress conditions (Elfeky et al., 2019; Liu et al., 2021b).

3.6. Fermentation of detoxified hydrolysates by *R. toruloides*

Finally, fermentation experiments were performed using the real detoxified hydrolysates produced from switchgrass and eucalyptus, but the yeast was unable to grow in these media. These results revealed that, although the detoxification step removed high amount of inhibitory compounds, the remaining amount present in the hydrolysates was still very toxic to *R. toruloides*. Phenolic compounds in the hydrolysate can penetrate the membrane damaging the cellular membrane, creating

DNA mutation or increasing the level of reactive oxygen species resulting in cytoskeleton damage and cell death (Wang et al., 2018; Chandel et al., 2013). Although acetic acid can also act as an inhibitor to *R. toruloides*, it may not have been the main problem in the case of the present study, as previously discussed. In this sense, further detoxication strategies or strain adaptation/engineering should be done to improve the yeast performance to grow and produce carotenoids from such complex media. In the line of the latter strategy, considering the protective role of carotenoids against different stress conditions such as exposure to light, a mutagenesis using UV radiation could be an alternative to improve the resistance of the yeast and its production of carotenoids, for example (Avalos and Carmen Limón, 2014; Sridhar et al., 2002; Liu et al., 2021b).

4. Conclusion and final remarks

Intensification of steam explosion pretreatment was demonstrated to be an interesting strategy to process more biomass per unit of time, producing hemicellulosic hydrolysates with high concentration of sugars, suitable for use as fermentation medium. In addition, by producing hydrolysates with high sugars content during pretreatment, the subsequent step of concentration, which is usually performed to have enough sugars for fermentation purposes, can be eliminated or at least minimized. This may lead to less energy expenses for the overall hydrolysate bioconversion process.

The intensification strategy used in the present study was tested with two different raw materials, switchgrass and *Eucalyptus globulus*, and, in both cases, resulted in hydrolysates containing high concentration of sugars and also high concentration of inhibitor compounds. The formation of toxic compounds can potentially be minimized by optimizing the pretreatment conditions. However, the detoxification strategy here applied, which allowed to selectively recover phenolic compounds and acetic/formic acids, can also be considered a relevant way to get more value from the hydrolysate while contributes to improve its fermentability. At the end, this strategy of detoxification can help to improve the economic feasibility of ethanol biorefineries, where a valuable product can be produced by fermentation of hemicellulosic hydrolysates, and acetic acid and phenolic compounds can also be recovered from the hydrolysates as extra value-added byproducts. This approach can

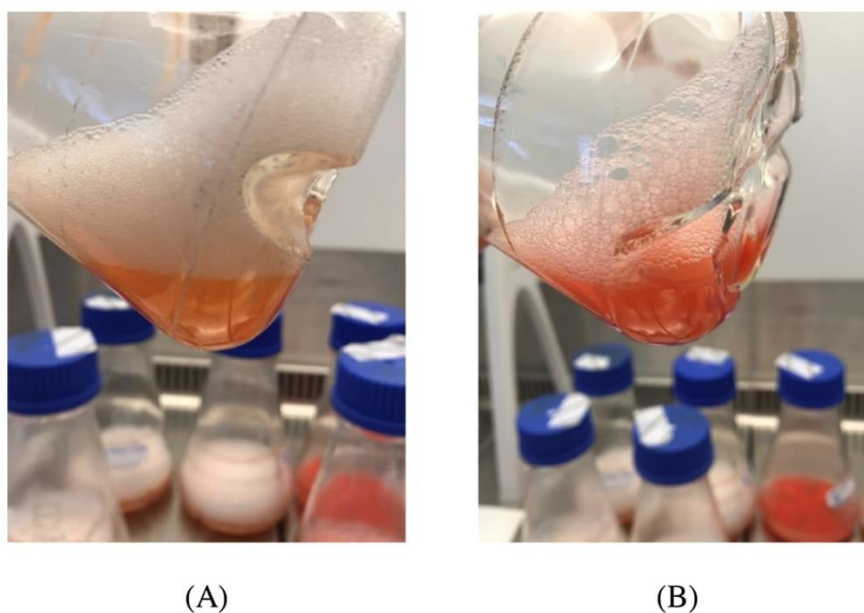


Fig. 4. Cells of *Rhodosporidium toruloides* cultivated in complex medium simulating *Eucalyptus globulus* hydrolysate without inhibitors (A) and with inhibitors (B).

positively impact the sustainability of the overall process, contributing not only economically, but also to the environment and to the society by minimizing the generation of wastes and by producing chemicals through routes that avoid the use of fossil resources.

Hemicellulosic hydrolysates obtained by intensified steam explosion of switchgrass and *Eucalyptus globulus* were efficiently used as fermentation medium after detoxification, especially for xylitol production by *K. marxianus*. In the case of carotenoids, promising results were obtained from complex media simulating the hydrolysates, which suggest that the production of carotenoids from these hydrolysates can be a feasible process. However, further studies are required to minimize the toxicity of the remaining inhibitory compounds to *R. toruloides*. In summary, it can be concluded that, by selecting appropriate microbial strains, the hydrolysates can be used as a rich source of sugars and nutrients to produce added-value compounds by fermentation.

CRediT authorship contribution statement

Fernando Bonfiglio: Methodology, Formal analysis, Funding acquisition, Writing - original draft. **Matías Cagno:** Methodology, Formal analysis. **Celina K. Yamakawa:** Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing - original draft. **Solange I. Mussatto:** Conceptualization, Supervision, Resources, Project administration, Funding acquisition, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the Novo Nordisk Foundation (NNF), Denmark (grant number NNF20SA0066233), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay (grant number MOV_CA_2018_1_149368) and PEDECIBA Química, Uruguay.

References

- Auxenfans, T., Cr nier, D., Chabbert, B., Pa s, G., 2017. Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0718-z>.
- Avalos, J., Carmen Limón, M., 2014. Biological roles of fungal carotenoids. *Curr. Genet.* 61, 309–324. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0454-x>.
- Ballesteros, L.F., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I., 2014. Selection of the solvent and extraction conditions for maximum recovery of antioxidant phenolic compounds from coffee silverskin. *Food Bioprocess Technol.* 7, 1322–1332. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1115-7>.
- Barbosa, M.F.S., de Medeiros, M.B., de Mancilha, I.M., Schneider, H., Lee, H., 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from d-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol.* 3, 241–251. <https://doi.org/10.1007/BF01569582>.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.M., Gaillardin, C., 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1193–1206. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3212-8>.
- Bhatt, T., Patel, K., 2020. Carotenoids: potent to prevent diseases review. *Nat. Prod. Bioprospect.* 10, 109–117. <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00244-2>.
- Bonfiglio, F., Cagno, M., Rey, F., Torres, M., Böthig, S., Menéndez, P., Mussatto, S.I., 2019. Pretreatment of switchgrass by steam explosion in a semi-continuous pre-pilot reactor. *Biomass Bioenergy* 121, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.013>.
- Buzzini, P., Innocenti, M., Turchetti, B., Libkind, D., van Broock, M., Mulinacci, N., 2007. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. *Can. J. Microbiol.* 53, 1024–1031. <https://doi.org/10.1139/W07-068>.
- Cabral, M.M.S., Cence, K., Zeni, J., Tsai, S.M., Durrer, A., Foltran, L.L., Toniazzo, G., Valduga, E., Treichel, H., 2011. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* 233. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1510-0>.
- Cebreiro, F., Guigou, M.D., Cabrera, M.N., 2017. Integrated forest biorefineries: recovery of acetic acid as a by-product from eucalyptus wood hemicellulosic hydrolysates by solvent extraction. *Ind. Crops Prod.* 109, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.012>.
- Chandel, A., da Silva, S., Singh, O., 2013. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. *Bioenergy Res.* 6, 388–401. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9241-z>.
- Chen, X., Li, Z., Zhang, X., Hu, F., Ryu, D.D.Y., Bao, J., 2009. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159, 591–604. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8491-x>.
- Clugston, R., 2020. Carotenoids and fatty liver disease: Current knowledge and research gaps. *Biochimica et Biophysica Acta Mol. Cell Biol. L.* 1865, 158597. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2019.158597>.
- Cortez, D.V., Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2016. Improvement on d-xylose to xylitol biotransformation by *Candida guilliermondii* using cells permeabilized with triton X-100 and selected process conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 180, 969–979. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2146-0>.
- Costa, V., Gomes, T., Simões, M., 2016. Effect of acid sulphite pretreatment on enzymatic hydrolysis of eucalypt, broom, and pine. *J. Wood Chem. Technol.* 36, 63–75. <https://doi.org/10.1080/02773813.2015.1066393>.
- Dahmen, N., Lewandowski, I., Zibek, S., Weidtmann, A., 2019. Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: status quo and perspectives. *GCB Bioenergy* 11, 107–117. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12586>.
- Dasgupta, D., Bandhu, S., Adhikari, D.K., Ghosh, D., 2017. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: a review. *Microbiol. Res.* 197, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.012>.
- de la Sena, C., Riedl, K.M., Narayanasamy, S., Curley, J.R., Schwartz, S.J., Harrison, E.H., 2014. The human enzyme that converts dietary provitamin A carotenoids to vitamin A is a dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 289, 13661–13666. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557710>.
- de Mello, F.D., Coradini, A.L., Tizei, P.A., Carazzolte, M.F., Pereira, G.A., Teixeira, G.S., 2019. Static microplate fermentation and automated growth analysis approaches identified a highly-aldehyde resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biomass Bioenergy* 120, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.10.019>.
- Delgado Arcaño, Y., Valma a García, O.D., Mandelli, D., Carvalho, W.A., Magalhães Pontes, L.A., 2020. Xylitol: a review on the progress and challenges of its production by chemical route. *Catal. Today* 344, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.07.060>.
- Dragone, G., Kersemakers, A.A.J., Driessen, J.L.S.P., Yamakawa, C.K., Brumano, L.P., Mussatto, S.I., 2020. Innovation and strategic orientations for the development of advanced biorefineries. *Bioresour. Technol.* 302, 122847. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122847>.
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Ballesteros, M., 2016. Steam Explosion as Lignocellulosic Biomass Pretreatment, Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00015-3>.
- Elfeky, N., Elmahmoudy, M., Zhang, Y., Guo, J.L., Bao, Y., 2019. Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* with a combined cultivation mode of nitrogen, sulfur, and aluminium stress. *Appl. Sci.* 9. <https://doi.org/10.3390/app9122444>.
- Elli, E., Sentelhas, P., Bender, F., 2020. Impacts and uncertainties of climate change projections on Eucalyptus plantations productivity across Brazil. *Forest Ecol. Manag.* 474, 118365. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118365>.
- Erfani Jazi, M., Narayanan, G., Aghabozorgi, F., Farajidizaji, B., Aghaei, A., Kamyabi, M., et al., 2019. Structure, chemistry and physicochemistry of lignin for material functionalization. *SN Appl. Sci.* 1 (1094). <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1126-8>.
- Frengova, G.I., Beshkova, D.M., 2009. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 163–180. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0492-9>.
- Garrigós-Martínez, J., Weninger, A., Montesinos-Segui, J., Schmid, C., Valero, F., Rinnofner, C., et al., 2021. Scalable production and application of *Pichia pastoris* whole cell catalysts expressing human cytochrome P450 2C9. *Microb. Cell Fact.* 20, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01577-4>.
- Goli, J.K., Panda, S.H., Linga, V.R., 2012. Molecular mechanism of d-xylitol production in yeasts: focus on molecular transportation, catabolic sensing and stress response. D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_4.
- Guigou, M., Cabrera, M.N., Vique, M., Bariani, M., Guarino, J., Ferrari, M.D., Lareo, C., 2019. Combined pretreatments of eucalyptus sawdust for ethanol production within a biorefinery approach. *Biomass Convers. Biorefinery* 9. <https://doi.org/10.1007/s13399-018-0353-3>.
- Hemmerich, J., Adelantado, N., Barrig n, J., Ponte, X., Hörmann, A., Ferrer, P., et al., 2021. Comprehensive clone screening and evaluation of fed-batch strategies in a microreactor and lab scale stirred tank bioreactor system: application on *Pichia pastoris* producing *Rhizopus oryzae* lipase. *Microb. Cell Fact.* 13, 1–31. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-36>.
- Hetzel, J., Patil, S.K.R., Lund, C.R.F., 2016. Chapter 5 humin formation pathways. In: Schlaf, M., Zhang, Z. (Eds.), *Reaction Pathways and Mechanisms in Thermocatalytic Biomass Conversion I*, pp. 171–202. <https://doi.org/10.1007/978-981-287-769-7>.
- Koch, G., 2008. Raw Material for Pulp. *Handbook of Pulp*. <https://doi.org/10.1002/9783527619887.ch2>.
- Larnaudie, V., Ferrari, M., Lareo, C., 2021. Life cycle assessment of ethanol produced in a biorefinery from liquid hot water pretreated switchgrass. *Renew. Energy* 176, 606–616. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.05.094>.
- Lattermann, C., B chs, J., 2015. Microscale and miniscale fermentation and screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* 35, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.005>.
- Lee, H., Atkin, A.L., Barbosa, M.F.S., Dorscheid, D.R., Schneider, H., 1988. Effect of biotin limitation on the conversion of xylose to ethanol and xylitol by *Pachysoletan tannophilus* and *Candida guilliermondii*. *Enzyme Microb. Technol.* 10. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90002-6).

- Leong, H.Y., Show, P.L., Lim, M.H., Ooi, C.W., Ling, T.C., 2018. Natural red pigments from plants and their health benefits: a review. *Food Rev. Int.* 34, 463–482. <https://doi.org/10.1080/87559129.2017.1326935>.
- Lin, X., Gao, N., Liu, S., Zhang, S., Song, S., Ji, C., et al., 2017. Characterization the carotenoid productions and profiles of three *Rhodospiridium toruloides* mutants from *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Yeast* 34, 335–342. <https://doi.org/10.1002/yea.3236>.
- Lindsey, K., Johnson, A., Kim, P., Jackson, S., Labbé, N., 2013. Monitoring switchgrass composition to optimize harvesting periods for bioenergy and value-added products. *Biomass Bioenergy* 56. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.04.023>.
- Liu, Z., Feist, A.M., Dragone, G., Mussatto, S.I., 2020. Lipid and carotenoid production from wheat straw hydrolysates by different oleaginous yeasts. *J. Clean. Prod.* 249, 119308 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119308>.
- Liu, Z., van den Berg, C., Weusthuis, R.A., Dragone, G., Mussatto, S.I., 2021a. Strategies for an improved extraction and separation of lipids and carotenoids from oleaginous yeast. *Sep. Purif. Technol.* 257, 117946 <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117946>.
- Liu, Z., Radi, M., Mohamed, E.T., Feist, A.M., Dragone, G., Mussatto, S.I., 2021b. Adaptive laboratory evolution of *Rhodospiridium toruloides* to inhibitors derived from lignocellulosic biomass and genetic variations behind evolution. *Bioresour. Technol.* 333, 125171 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125171>.
- Mussagy, C.U., Guimarães, A.A.C., Rocha, L.V.F., Winterburn, J., Santos-Ebinuma, Vde C., Pereira, J.F.B., 2021. Improvement of carotenoids production from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186. *Biochem. Eng. J.* 165 <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107827>.
- Mussatto, S.I., 2012. Application of xylitol in food formulations and benefits for health. *D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 309–323. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_14.
- Mussatto, S.I., Dragone, G.M., 2016. Biomass pretreatment, biorefineries, and potential products for a bioeconomy development. *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*. Elsevier Inc., pp. 1–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00001-3>.
- Ounine, K., Petitdemange, H., Raval, G., Gay, R., 1985. Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 <https://doi.org/10.1128/aem.49.4.874-878.1985>.
- Parrondo, J., García, L.A., Díaz, M., 2009. Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. *Brazilian J. Chem. Eng.* 26. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322009000300001>.
- Pielhop, T., Amgarten, J., von Rohr, P.R., Studer, M.H., 2016. Steam explosion pretreatment of softwood: the effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility. *Biotechnol. Biofuels* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0567-1>.
- Prabhu, A., Bosakornranut, E., Amraoui, Y., Agrawal, D., Coulon, F., Vivekanand, V., et al., 2020. Enhanced xylitol production using non-detoxified xylose rich pre-hydrolysate from sugarcane bagasse by newly isolated *Pichia fermentans*. *Biotechnol. Biofuels* 13, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01845-2>.
- Qi, F., Shen, P., Hu, R., Xue, T., Jiang, X., Qin, L., et al., 2020. Carotenoids and lipid production from *Rhodospiridium toruloides* cultured in tea waste hydrolysate. *Biotechnol. Biofuels* 13, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01712-0>.
- Sixta, H., 2006. *Handbook of Pulp*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., 2008. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction. *Laboratory Analytical Procedure* <https://doi.org/TP-510-42623>.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2012. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory* <https://doi.org/NREL/TP-510-42618>.
- Sridhar, M., Sree, N., Rao, L., 2002. Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. *Bioresour. Technol.* 83, 199–202. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00221-8).
- Udeh, O., 2013. Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation. *J. Brew. Distill.* 4. <https://doi.org/10.5897/jbd2013.0041>.
- Wang, S., Sun, X., Yuan, Q., 2018. Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: a review. *Bioresour. Technol.* 258, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.064>.
- Xue, S.J., Chi, Z., Zhang, Y., Li, Y.F., Liu, G.L., Jiang, H., Hu, Z., Chi, Z.M., 2018. Fatty acids from oleaginous yeasts and yeast-like fungi and their potential applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38, 1049–1060. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1428167>.
- Yamakawa, C.K., Kastell, L., Mahler, M.R., Martinez, J.L., Mussatto, S.I., 2020. Exploiting new biorefinery models using non-conventional yeasts and their implications for sustainability. *Bioresour. Technol.* 309, 123374 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123374>.
- Yan, J., Hu, Z., Pu, Y., Brummer, E., Ragauskas, A., 2010. Chemical compositions of four switchgrass populations. *Biomass Bioenergy* 34, 48–53.
- Zhang, L., Chen, Z., Wang, J., Shen, W., Li, Q., Chen, X., 2021. Stepwise metabolic engineering of *Candida tropicalis* for efficient xylitol production from xylose mother liquor. *Microb. Cell Fact.* 20, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01596-1>.
- Zhao, Y., Lu, K., Xu, H., Zhu, L., Wang, S., 2021. A critical review of recent advances in the production of furfural and 5-hydroxymethylfurfural from lignocellulosic biomass through homogeneous catalytic hydrothermal conversion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 139, 110706 <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110706>.

Ah, y en caso de que no los vea: ¡Buenos días, buenas tardes y buenas noches!

Truman Burbank, The Truman Show - 1998