

Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR
DE *Arundo donax*

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera
en Biotecnología

Sima Denise Schein Spiwak – 173797

Tutora: Inés Loaces

2016

Declaración de autoría

Yo, Sima Schein, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Proyecto de Grado de la Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Sima Denise Schein Spiwak - 3 de marzo, 2016

Agradecimientos

En esta ocasión me gustaría agradecer a todas las personas e instituciones que colaboraron con este proyecto y me ayudaron en su realización.

Al Laboratorio Bioquímica y Genómica Microbianas del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable donde se realizó la tesis. A todos los integrantes del laboratorio, especialmente a mi tutora Inés Loaces y a Francisco Noya.

A Guillermo Siri-Prieto, de la estación Experimental Mario Cassinoni, de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (UdelaR), por proporcionar la biomasa para el proyecto.

A Alfredo Martínez-Jiménez, del Instituto de Biotecnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

De la Facultad de Ingeniería, UdelaR, a Ma. Noel Cabrera y Melissa Bariani.

A Carlos Sanguinetti y todas aquellas personas de ORT que estuvieron presentes en mi formación a lo largo de la carrera.

A mis padres, Sandra y Nahum, a Rachel, Patricia, Abigail y a mis amigas por el apoyo.

Resumen

La demanda de etanol carburante está en aumento debido al rápido crecimiento de la población y el aumento en la industrialización. Los cultivos convencionales, como la caña de azúcar o el maíz, no son capaces de satisfacer la demanda mundial de producción de biocombustibles, debido a su uso primario como alimentos y las limitaciones de estos cultivos. Surge entonces, la biomasa lignocelulósica como alternativa renovable, accesible y abundante a dichas materias primas. Algunos ejemplos son los residuos agrícolas o forestales, el papel o el cartón y los cultivos energéticos. *Arundo donax*, o caña común, es un cultivo energético con una gran distribución en el Uruguay, el cual tiene potencial para ser utilizado como materia prima para la producción de bioetanol. El proceso de producción de etanol de segunda generación consta de cuatro etapas clave: el pretratamiento fisicoquímico, donde se elimina principalmente la lignina y se solubiliza parte de la hemicelulosa: la hidrólisis enzimática, en donde varias enzimas liberan azúcares simples a partir de las fibras de celulosa y hemicelulosa; la fermentación microbiana, donde uno o varios microorganismos se encargan de la conversión de las hexosas y pentosas en etanol; y finalmente la destilación del alcohol.

El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar varios modelos para la conversión de *Arundo donax* en etanol. En primer lugar, se probaron distintos pretratamientos utilizando hidrólisis ácida a 121°C con ácido sulfúrico o ácido fosfórico a concentraciones entre 0.5 y 2% (p/v) durante 10 a 30 minutos; evaluando la liberación de azúcares y la generación de inhibidores del crecimiento bacteriano. A continuación, se optimizó la sacarificación de las fracciones sólidas obtenidas utilizando el cóctel enzimático Cellic CTec2 de Novozymes. Por último, se evaluó la producción de etanol en dos configuraciones: sacarificación y fermentación por separado (SHF), o sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF), utilizando las cepas de *Escherichia coli* etanologénicas MS04 wt o MS04 (pTrc99A-EndoG).

Se determinó que la combinación del pretratamiento a 121°C con ácido sulfúrico 2% durante 20 minutos, seguida de la sacarificación con Cellic CTec2 (100 FPU/ g biomasa) durante 72 horas a 50°C, para finalmente fermentar utilizando la cepa MS04 (pTrc99A-EndoG) durante 72 horas a 38°C, permitió la generación de 26 g/L de etanol, con un rendimiento del 94% respecto al máximo teórico. Mientras que realizando la sacarificación y fermentación en simultáneo se obtuvieron 24,4 g/L de etanol, siendo esta configuración más ventajosa en términos económicos. Estos resultados demuestran que el cultivo de *Arundo donax* posee gran potencial para la producción de etanol carburante y que, la expresión de enzimas celulolíticas en la etapa de fermentación, permiten una mayor conversión de la biomasa a etanol.

Palabras clave

Biocombustible, bioetanol, biomasa lignocelulósica, cultivos energéticos, *Arundo donax*, hidrólisis ácida, SSF, SHF.

Abreviaturas

AFEX - *Explosión de fibra con solución de amoníaco*

CBP - Proceso bioconsolidado

DNS - 3,5-dinitrosalicilato

HMF - Hidroximetilfurfural

LB - Luria Bertani

LI – Líquidos iónicos

OA- Ácido oxálico

SHF - Sacarificación y fermentación por separado

SSF - Sacarificación y fermentación en simultaneo

Índice

1. Introducción	9
1.1. Combustibles fósiles	9
1.2. Biocombustibles	9
1.3. Biomasa lignocelulósica	11
1.4. <i>Arundo donax</i>	12
1.5. Proceso de producción de etanol de segunda generación	14
1.5.1. Pretratamiento	15
1.5.1.1. Métodos físicos	15
1.5.1.2. Métodos químicos	16
1.5.1.3. Métodos biológicos	18
1.5.2. Sacarificación	19
1.5.3. Fermentación	20
1.5.3.1. Configuraciones de fermentación	21
1.6. Situación en Uruguay	22
1.7. Plantas con biomasa lignocelulósica a nivel mundial	23
2. Objetivos	24
2.1. General	24
2.2. Específicos	24
3. Metodología	25
3.1. Materiales	25
3.1.1. Cepas	25
3.1.2. Enzimas	25
3.1.3. Biomasa	25
3.2. Métodos	25
3.2.1. Determinación de peso seco	25
3.2.2. Pretratamiento: Hidrólisis ácida	26
3.2.3. Ensayo para evaluar el efecto inhibitor	26
3.2.4. Ensayos de sacarificación	27
3.2.4.1. Efecto de enzimas hidrolíticas en las fracciones sólidas	27
3.2.4.2. Dosificación del cóctel enzimático Cellic CTec2	27
3.2.5. Ensayos de fermentación	28
3.2.5.1. Sacarificación y fermentación por separado	28
3.2.5.2. Sacarificación y fermentación en simultáneo	28

3.2.6.	Determinaciones analíticas	28
3.2.6.1.	Determinación de azúcares reductores	28
3.2.6.2.	Cuantificación de etanol.....	29
3.2.6.3.	Determinación de monosacáridos mediante HPLC.....	29
3.2.6.4.	Cuantificación de la actividad celulotítica.....	29
3.2.6.5.	Análisis estadístico	29
4.	Resultados y discusión	30
4.1.	Efecto del pretratamiento en <i>Arundo donax</i>	30
4.1.1.	Modificaciones en aspecto físico	30
4.1.2.	Solubilización de azúcares.....	31
4.1.3.	Evaluación del efecto inhibitor de las fracciones liquidas en el crecimiento de cepas etanológicas	35
4.2.	Sacarificación	39
4.2.1.	Efecto de enzimas hidrolíticas en las fracciones sólidas	39
4.2.2.	Curva de dosificación del cóctel enzimático Cellic CTec2	41
4.3.	Producción de etanol	41
4.3.1.	Efecto de la expresión de EndoG	42
4.3.2.	SHF.....	43
4.3.3.	SSF.....	45
5.	Análisis Económico	50
6.	Conclusiones	51
7.	Perspectivas	52
8.	Referencias bibliográficas.....	53
9.	Anexos.....	58
8.1.	Anexo I. Medios de cultivo	58
8.1.1.	LB.....	58
8.1.2.	AM1	58
8.2.	Anexo II. Soluciones amortiguadoras	59
8.2.1.	Buffer citrato de sodio 0,05M	59
8.2.2.	Buffer ácido cítrico-Na ₂ HPO ₄ pH 2,6 – 7,6	59
8.3.	Anexo III. Reactivos analíticos	60
8.3.1.	Reactivo ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS).....	60

1. Introducción

1.1. Combustibles fósiles

En los últimos tiempos ha aumentado la demanda de los combustibles derivados del petróleo, los cuales no son renovables y sus limitadas fuentes son consumidas de forma muy rápida. La emisión de gases de efecto invernadero, principalmente metano y dióxido de carbono¹, ha dado lugar a efectos negativos como el cambio climático y el calentamiento global².

A su vez, la distribución de los yacimientos de petróleo no es equitativa. Aproximadamente el 70% de las reservas están concentradas en un área pequeña del planeta. Esto conlleva a la dependencia del resto del mundo frente a estos países³.

Esto ha dado lugar a la búsqueda de materias primas alternativas para la producción de combustibles con mejores características que los anteriores. Se espera que los mismos sean rentables, que se obtengan a partir de fuentes ubicuas, sustentables, eficientes y que su producción y utilización no dañe al medio ambiente². Encontrar un suministro de energía limpia y suficiente es uno de los retos más difíciles de la sociedad⁴.

1.2. Biocombustibles

Los biocombustibles son combustibles renovables derivados de materias primas biológicas. Se considera que tiene un balance neutro de carbono ya que el dióxido de carbono liberado durante la combustión de los mismos se ve compensado por la fijación de carbono durante el crecimiento de las plantas¹.

Los beneficios de la producción de biocombustibles son incuestionables. No solo reduce las emisiones de gases de efecto invernadero al medio ambiente¹, a la vez, implementar su producción puede ayudar a países no productores de petróleo a reducir su dependencia energética⁴. En comparación con los combustibles fósiles, los biocombustibles pueden ser producidos en diferentes regiones alrededor del mundo³ y su producción puede generar nuevos ingresos y fuentes de trabajo en áreas rurales⁵.

Mediante el uso de diversos procesos y a partir de variadas materias primas se pueden producir diferentes tipos de biocombustibles. El etanol y el biodiesel son los más importantes y en los que hay más desarrollo. Éstos se mezclan con gasolinas y gasoil respectivamente².

El etanol (alcohol etílico) es un biocombustible líquido que puede ser producido a partir de diferentes materias primas, generalmente material renovable y mediante tecnologías de conversión adaptadas a cada materia prima. En términos generales, se obtiene a partir de la

fermentación microbiana de azúcares simples y puede ser utilizado como combustible en si o mezclado con gasolina^{5,6}.

El biodiesel es producido a partir de aceites vegetales o grasas animales mediante un proceso de trans-esterificación mono-alcohólica, donde los triglicéridos reaccionan con un alcohol, en presencia de un catalizador alcalino, ácido o enzimático. Tiene propiedades de combustión similares a las del diesel y es producido comercialmente para vehículos⁷.

Dependiendo de las materias primas utilizadas para la elaboración de los biocombustibles, estos se clasifican en tres generaciones.

En la primera generación se agrupan aquellos biocombustibles que se producen a partir de biomasa rica en azúcares, almidón o aceites, como la caña de azúcar, la remolacha azucarera, el maíz, el trigo, diversos granos y semillas, como el girasol, aceite de colza y la soja. Estos cultivos son alimentos para el hombre y los animales, por lo tanto, la producción sostenible de biocombustibles de primera generación ha sido objeto de un análisis exhaustivo^{2,8}. Entre otros factores, destinarlos para la producción de combustibles puede conllevar un aumento en los precios de los alimentos. También se debe tomar en cuenta las necesidades de estos cultivos para su crecimiento, la caña de azúcar, por ejemplo, necesita un clima tropical, ya que la temperatura está directamente vinculada con el rendimiento y la cantidad de azúcar producida⁹, por lo que su cultivo está limitado a determinadas regiones climáticas.

Los biocombustibles de segunda generación al contrario que los de primera, se obtienen a partir de materias primas ricas en lignocelulosa, como residuos agronómicos –pajas, bagazos y rastrojos-, de la industria forestal –chips y cortezas- y cultivos energéticos, los cuales son materiales baratos y abundantes. Los biocombustibles producidos a partir de estas biomásas podrían ayudar a reducir la dependencia en la utilización de combustibles derivados del petróleo y disminuir las emisiones de CO₂⁵, sin interferir con la producción de alimentos.

La tercera generación de biocombustibles son los generados a partir de algas, ofreciendo una excelente alternativa para desplazar a los combustibles fósiles¹⁰. Estas presentan una serie de ventajas que las hacen atractivas para su uso en biocombustibles. Por ejemplo, se puede producir durante todo el año, genera una disminución en los impactos ambientales y no hay interferencia con la producción de alimentos. El crecimiento es rápido y no requiere de fertilizantes ni de pesticidas⁸. Por otra parte, una de las mayores desventajas de las microalgas para la producción de biocombustibles es su necesidad de reactores especialmente diseñados para que tengan una mayor exposición a la radiación solar, lo que, combinado con los pequeños tamaños de las algas hace la cosecha de la biomasa de algas relativamente costosa⁷.

1.3. Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es un sustrato renovable, derivado de árboles, residuos agroforestales, hierbas, y plantas acuáticas². Está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 1).

La celulosa es el componente principal de las paredes celulares, es un polisacárido que se forma por la unión de moléculas de β -glucopiranosas mediante enlaces β -1,4-O-glucosídicos, formando una estructura altamente ordenada gracias a la interacción entre las fibrillas de celulosa mediante enlaces de hidrógeno.

La hemicelulosa es el segundo componente en mayor cantidad, es una barrera física que cubre las fibras de celulosa y la protege de la hidrólisis enzimática. Está compuesta por pentosas -xilosa y arabinosa- y hexosas -galactosa, glucosa y manosa-, la estructura no es cristalina y por lo tanto es más fácil de hidrolizar¹¹. Se ha demostrado que la eliminación de la hemicelulosa aumenta la accesibilidad y la hidrólisis de la celulosa¹¹. Algunos azúcares de la hemicelulosa presentan sustituyentes como acetilo o 4-O-metil glucurónico. Se ha visto, que el grado de acetilación en la hemicelulosa es un factor importante, éstos grupos se unen a la matriz de hemicelulosa, dificultando la ruptura del polisacárido y generando ácido acético durante el pretratamiento¹².

La lignina es un polímero fenólico que proporciona resistencia estructural siendo el tercer componente principal de la biomasa lignocelulósica. Es responsable de la integridad, la rigidez estructural y la prevención de la hinchazón de material lignocelulósico¹¹, la presencia de lignina dificulta el acceso de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa, reduciendo así la eficiencia de la hidrólisis¹³. Por lo tanto, los procesos de deslignificación eficientes mejoran la hidrólisis enzimática¹¹. La celulosa y la hemicelulosa representan aproximadamente el 70% de toda la biomasa y están estrechamente vinculados a la lignina a través de enlaces covalentes y puentes de hidrógeno¹⁴. Otros componentes de menor importancia presentes en la biomasa son proteínas, cenizas, ácidos orgánicos y otros materiales no estructurales^{3,15-17}.

Actualmente las materias primas celulósicas más abundantes derivadas de residuos vegetales en los Estados Unidos, América del Sur, Asia y Europa son: rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar, cáscara de arroz y paja de trigo, respectivamente¹⁴.

Los cultivos perennes son los principales candidatos para ser utilizados como cultivos energéticos, ya que producen biomasa lignocelulósica para la producción de combustible a bajo costo y porque muestran una buena capacidad de adaptación a distintos entornos. Idealmente, los cultivos energéticos deben dar altos rendimientos de energía y deben ser producidos con el mínimo aporte energético¹⁸.

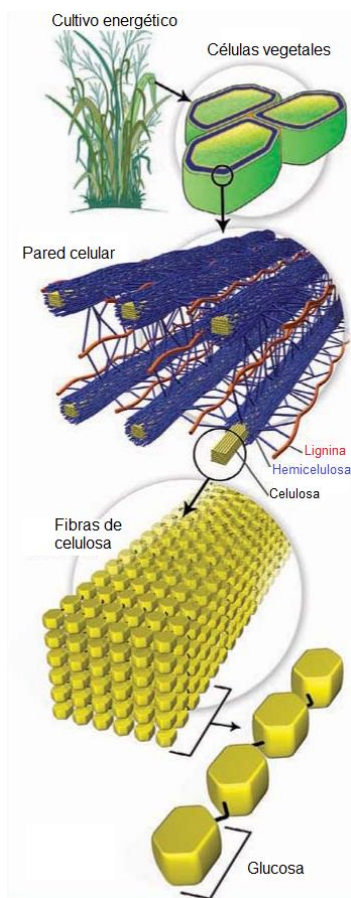


Figura 1. Componentes estructurales en biomasa lignocelulósica. Se muestra la estructura ordenada de la celulosa, fibras, y su interacción con la hemicelulosa y la lignina. Fuente: Genome Management Information System, Oak Ridge National Laboratory. <http://ucce.ucdavis.edu/files/repository/calag/fig6304p186thumb.jpg>

1.4. *Arundo donax*

Arundo donax, también conocido como caña común (Figura 2), es uno de los cultivos más prometedores para la producción de energía debido a su rápida tasa de crecimiento, su capacidad de adaptarse en diferentes tipos de suelo y condiciones climáticas, los altos rendimientos y la resistencia a la sequía¹⁹.

A. donax es una planta anual perenne rizomatosa de la familia *Poaceae*. Es originaria de Asia, aunque crece de manera espontánea en varias regiones, encontrándose usualmente en ambientes cálidos y húmedos. Alcanza entre 2 a 8 metros de altura, y puede generar hasta 100 toneladas/hectárea de biomasa¹⁹.

Actualmente es posible encontrar *A. donax* en Asia, sur de Europa, norte de África, Medio Oriente, también en América del Norte y del Sur y en Australia. Esta expansión

internacional se explica ya que es un cultivo multi-propósito. Los tallos se utilizan para hacer cercas, cestas, cañas de pescar, estacas para plantas, techos, instrumentos musicales, entre otros. En la medicina tradicional, se utiliza como diurético, sudorífico y para el tratamiento de edemas e industrialmente ha sido utilizada para producir rayón, celulosa y papel²⁰.



Figura 2. Fotografía de la planta *Arundo donax*. Fuente: <http://ichn.iec.cat/>

En la bibliografía existen varios estudios que reportan la composición de *A. donax* (Tabla 1), las diferencias de los diferentes estudios citados se deben a que la misma varía en función de las condiciones de crecimiento y la maduración de la planta al momento de la determinación.

Tabla 1. Composición de *A. donax* por diferentes autores.

Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Referencia
31,10 ± 1,03	35,27 ± 2,80	18,49 ± 0,10	19
33,85 ± 0,06	25,61 ± 0,07	24,02 ± 0,04	15
39,1 ± 0,25	24,4 ± 0,52	19,4 ± 3,25	21
34,8	20,9	23,0	22a

Porcentaje calculado por peso seco.

^a Los autores no reportaron el desvío estándar.

La celulosa y hemicelulosa son los sustratos para la producción de etanol de segunda generación. La conversión de la hemicelulosa es esencial para aumentar el rendimiento del alcohol producido. Para el fraccionamiento y su solubilización hay varias opciones de

pretratamientos y técnicas hidrolíticas. Dependiendo del proceso y de las condiciones utilizadas, los azúcares de la hemicelulosa pueden ser degradados a ácidos débiles que potencialmente pueden actuar como inhibidores microbianos durante la fermentación. También los productos derivados de la lignina pueden formarse e interferir a lo largo del proceso²³, por ejemplo ácido siríngico, ácido vanílico y siríngaldehído. Hasta la fecha hay pocos informes evaluando la producción de etanol a partir de *A. donax*.

Comparando la composición de *A. donax* con los materiales lignocelulósicos más utilizados en la actualidad mencionados previamente, podemos ver como la cantidad de hemicelulosa presente en *A. donax* es mayor a la presente en rastrojo de maíz, cáscara de arroz y paja de trigo y similar a la hemicelulosa del bagazo de caña de azúcar²⁴. Respecto a los valores de lignina, se encontró en *A. donax* porcentajes mayores que en rastrojo de maíz, cáscara de arroz y paja de trigo, y análogo a la cantidad presente de lignina en bagazo de caña de azúcar²⁵. Acerca de la cantidad de celulosa, esta resulta ser similar para los materiales nombrados en este párrafo, variando de 32 a 39%^{24,25}.

Esta hierba demanda poco trabajo tanto en la siembra, en el cuidado de la cosecha y en el cultivo. Por otra parte, debido al reciclado de los nutrientes por parte de sus rizomas, las hierbas perennes tienen una baja demanda de aportes nutricionales y pueden ser producidos sin el uso de pesticidas, también es capaz de crecer en hábitats acuáticos. En algunos países es considerada como una maleza invasora o plaga ya que tiene efectos negativos en la conservación de los ecosistemas y en la biodiversidad^{20,26}.

Debido a su fácil adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales y de suelo, su rápido crecimiento y la alta productividad de biomasa, recientemente se lo ha considerado como un material con gran potencial para la producción de combustibles y productos químicos¹⁹.

1.5. Proceso de producción de etanol de segunda generación

Los procesos involucrados en la producción del bioetanol lignocelulósico incluyen: un pretratamiento físico-químico, la hidrólisis del material para convertir la pared celular en azúcares simples utilizando enzimas, la fermentación microbiana para transformar los azúcares en etanol y por último la destilación y purificación del alcohol. Estos procesos tienen diferentes alternativas que incluyen procesos termodinámicos o bioquímicos²⁷.

1.5.1. Pretratamiento

Los objetivos del pretratamiento son hidrolizar los polímeros de lignina y hemicelulosa, y mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa durante la etapa de hidrólisis, mediante un aumento en la porosidad y del área superficial del sustrato^{13,28}.

Los factores principales que determinan el éxito de esta etapa son: la alta producción de azúcares, la solubilización de la lignina, una reducida degradación de azúcares, una mínima producción de compuestos tóxicos, una alta compatibilidad con la fermentación y un bajo gasto de energía²⁹.

Para este paso existen diferentes métodos físicos, químicos y biológicos, que se pueden aplicar de manera independiente o combinados³⁰.

1.5.1.1. Métodos físicos

El objetivo del pretratamiento físico es la reducción del tamaño de las partículas con el fin de aumentar la superficie y reducir el grado de polimerización. El requerimiento de energía de este pretratamiento es relativamente alto, por lo que este proceso no es económicamente viable¹¹.

Se puede realizar mediante la molienda o la trituración de la biomasa resultando en partículas de 0,2-2,0 mm de tamaño, mientras que el picado resulta en partículas de 10-30 mm de tamaño³¹.

También se puede someter la biomasa a procesos de extrusión, el cual es un tratamiento termo-físico en el que los materiales se someten a mezcla, calentamiento y disrupción que conduce a la alteración física y química de su estructura, que resulta en el acortamiento y ruptura de las fibras, lo que aumenta la accesibilidad a las enzimas durante la hidrólisis³¹.

1.5.1.1.1. Explosión de vapor

La explosión de vapor es el pretratamiento físico-químico más ampliamente utilizado para la biomasa lignocelulósica. Es un pretratamiento hidrotérmico en el que la biomasa se somete a vapor presurizado durante un período de tiempo que puede variar desde segundos a varios minutos y luego de repente se despresuriza. Los efectos mecánicos son causados debido a la disminución rápida de la presión, por lo que las fibras se separan²⁵. Se logra la hidrólisis parcial y la solubilización de la hemicelulosa y la redistribución de la lignina. Este proceso presenta ventajas en comparación con otras tecnologías de pretratamiento,

incluyendo: la reducción del impacto ambiental, una menor inversión de capital, mayor potencial de eficiencia energética, y recuperación completa del azúcar²⁸.

1.5.1.2. Métodos químicos

Los pretratamientos químicos se desarrollaron originalmente, y se han utilizado ampliamente, en industrias papeleras para la deslignificación de materiales celulósicos, con el fin de obtener productos de alta calidad. Es la técnica de tratamiento previo más estudiada entre las categorías de pretratamiento³².

Este tipo de pretratamiento tiene como objetivo principal mejorar la biodegradabilidad de celulosa mediante la eliminación de la lignina y/o la hemicelulosa, y en menor grado, la disminución del grado de polimerización y la cristalinidad de la celulosa³².

Existen muchas alternativas de pretratamientos químicos, siendo los más comúnmente usados: la hidrólisis ácida, el pretratamiento alcalino, la aplicación de líquidos iónicos, la AFEX y el organosolv, entre otros^{11,32}.

1.5.1.2.1. Hidrólisis ácida

Consta de la impregnación de un ácido fuerte a altas presiones. El principal objetivo del pretratamiento ácido es solubilizar la fracción de hemicelulosa de la biomasa y hacer que la celulosa sea más accesible para las enzimas. El pretratamiento ácido puede realizarse a bajas concentraciones de ácido con altas temperaturas o a altas concentraciones de ácido con bajas temperaturas^{28,33}. El ácido más comúnmente utilizado es ácido sulfúrico diluido, el cual es usado a nivel comercial para pretratar una gran variedad de tipos de biomasa. Otros ácidos que también se han estudiado son: ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y ácido oxálico^{29,34}.

La aplicación con ácidos diluidos presenta la ventaja de solubilizar hemicelulosa, principalmente el xilano y la conversión de la hemicelulosa solubilizada en azúcares fermentables. Sin embargo, dependiendo de la temperatura de proceso, se detectan algunos compuestos tóxicos a partir de la degradación de azúcares tales como: derivados de furano (furfural y 5-hidroxymetylfurfural (HMF)), ácidos orgánicos (ácido acético y ácido fórmico), así como compuestos aromáticos de degradación de la lignina²⁷. Estos compuestos pueden afectar el metabolismo de los microorganismos en la etapa de fermentación. De todos modos, este pretratamiento tiene menos generación de productos tóxicos que al usar ácidos concentrados²⁸ y estos pueden minimizarse encontrando las condiciones óptimas del pretratamiento²⁹.

1.5.1.2.2. Pretratamiento alcalino

En el tratamiento alcalino, la biomasa es tratada con soluciones de hidróxido de sodio, de potasio, de calcio o amonio a temperatura y presión normal. El tiempo del pretratamiento, sin embargo, se registra en términos de horas o días, siendo mucho más largo que otros métodos de pretratamiento³⁵. La ventaja principal del proceso es la eliminación eficaz de la lignina de la biomasa. El mecanismo de acción se cree que es la saponificación de enlaces éster intermoleculares presentes entrecruzando xilano y otros componentes, por ejemplo, la lignina y otros azúcares de la hemicelulosa³⁵. Este proceso elimina los grupos acetilo presentes en la hemicelulosa, por lo tanto mejora la accesibilidad de la enzima en la hidrólisis^{11,28}. Una desventaja significativa del pretratamiento alcalino es la conversión de la base utilizada en sales irrecuperables³⁵.

El pretratamiento alcalino causa una menor degradación de azúcares que el pretratamiento con ácido y se ha demostrado ser más eficaz en residuos agrícolas que en los materiales de madera¹³. Por otra parte, no se detectaron furfural ni HMF en los hidrolizados obtenidos con el pretratamiento alcalino, lo cual va a favorecer la etapa de fermentación²⁸.

1.5.1.2.3. Líquidos iónicos (LI)

Los líquidos iónicos son sales, normalmente compuestas por cationes orgánicos grandes y aniones inorgánicos pequeños, que existen como líquidos a temperaturas relativamente bajas, como a temperatura ambiente. Dado que no se forman gases tóxicos o explosivos, los líquidos iónicos se denominan disolventes “verdes”²⁸. Los factores más atractivos de este método son: que se puede disolver grandes cantidades de celulosa en condiciones suaves y que se logra recuperar casi el 100% de los líquidos iónicos utilizados. Como disolventes de la celulosa, los LI poseen varias ventajas sobre los disolventes regulares orgánicos: baja toxicidad, una amplia selección de combinaciones de aniones y cationes, baja hidrofobicidad, baja viscosidad, mejora en la estabilidad electroquímica, estabilidad térmica, altas tasas de reacción, baja volatilidad con potencialmente mínimo impacto ambiental y no son inflamables³⁵.

Se necesita más investigación de este método para mejorar los aspectos económicos, previo a que se puedan aplicar a escala industrial. La tecnología para la recuperación de líquidos iónicos todavía es cara y no se ha desarrollado plenamente. Además, se debe estudiar el cómo recuperar la hemicelulosa y la lignina a partir de la solución luego de la extracción de la celulosa²⁸.

1.5.1.2.4. AFEX (Explosión de fibra con amoníaco)

Es un proceso de pretratamiento físico-químico en el que la biomasa lignocelulósica se expone a amoníaco líquido a alta temperatura (90-100°C) y presión durante un período de tiempo (30-60 minutos), y luego la presión se reduce repentinamente¹¹. El proceso de AFEX (Ammonia Fiber Expansion) es muy similar a la explosión de vapor. Causando hinchazón y ruptura física de las fibras de biomasa y decristalización parcial de la celulosa²⁸. La principal ventaja del pretratamiento con amoníaco es que no produce inhibidores, por lo que el resto del proceso no se ve perjudicado. Se ha observado que en condiciones óptimas, el AFEX puede alcanzar más del 90% de conversión de la celulosa y la hemicelulosa en azúcares fermentables para una amplia variedad de materiales lignocelulósicos²⁸. Se requieren de la actividad de celulasas y hemicelulasas en el proceso de hidrólisis debido a los restos de hemicelulosa en el material pretratado. La principal desventaja del proceso de AFEX es que es más eficaz en la biomasa que contiene menos lignina. Además, el amoníaco se debe reciclar después del tratamiento para reducir el costo y la protección del medio ambiente¹¹.

1.5.1.2.5. Organosolv

Este tipo de tratamiento, utiliza mezclas de solventes orgánicos (tales como etanol, metanol, o acetona), con catalizadores ácidos inorgánicos, para solubilizar y extraer lignina de alta calidad (producto de valor agregado) e hidrolizar la fracción de hemicelulosa. Las temperaturas de proceso pueden variar desde temperatura ambiente hasta 205°C, dependiendo principalmente de la elección de disolvente orgánico. En este proceso hay producción de furfural²³. El inconveniente principal del proceso es el costo del disolvente, aunque utilizando etanol se puede reciclar por destilación y reducir considerablemente el costo operativo. Otro aspecto importante son las medidas de seguridad que tienen que ser implementadas, porque los disolventes orgánicos son inflamables y su utilización incontrolada puede provocar incendios y explosiones. Los disolventes orgánicos son también inhibidores de la hidrólisis enzimática, por lo que es necesaria su adecuada eliminación^{11,23}.

1.5.1.3. Métodos biológicos

Los métodos biológicos emplean microorganismos principalmente hongos, que son capaces de degradar la lignina y la hemicelulosa. Este tipo de proceso ofrece ventajas tales como bajo costo, poco gasto de energía, no hay necesidad del uso de productos químicos y las condiciones ambientales que se requieren son suaves. El principal inconveniente para el desarrollo de métodos biológicos es la baja velocidad de hidrólisis obtenida en comparación con otras tecnologías²⁸.

1.5.2. Sacarificación

La sacarificación es un procedimiento mediante el cual los almidones y materias celulósicas se hidrolizan y convierten en azúcares fermentables. Los agentes empleados en la sacarificación son químicos o enzimáticos o bien una combinación de los dos. Entre los primeros está la utilización de ácidos diluidos, particularmente el ácido clorhídrico. En la hidrólisis enzimática, se utilizan principalmente celulasas y hemicelulasas^{36,37}.

Las celulasas (EC 3.2.1.4) pertenecen a la familia de enzimas glucosidasas, éstas actúan sobre la celulosa de la pared celular vegetal hidrolizando los oligosacáridos y polisacáridos en glucosa³⁶. Las condiciones óptimas de las celulasas del coctel CellicCTec2 de Novozymes son temperatura de 40-50°C y pH entre 4-5³⁸. Por lo que la capacidad de generar mediante ingeniería genética celulasas termoestables es un aspecto importante, éste podría ser un factor decisivo a partir de menores temperaturas obtener un rendimiento satisfactorio de azúcares a partir de materiales lignocelulósicos³⁶.

Algunos de los factores que afectan la hidrólisis de la celulosa incluyen: el acceso a la superficie, la cristalinidad de la fibra de celulosa y el contenido de lignina y de hemicelulosa. La presencia de lignina y la hemicelulosa hace que el acceso de las enzimas a la celulosa sea más difícil. La eliminación de lignina y hemicelulosa, la reducción de la cristalinidad de la celulosa y el aumento de la porosidad en los procesos de pretratamiento puede mejorar significativamente la hidrólisis².

Las celulasas son sintetizadas por hongos, bacterias y plantas. Algunos de los microorganismos productores de celulasas comerciales son; *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium oxysporum* y *Cellulomonas biazotea*^{32,39}. La secuenciación del genoma de estos organismos se ha llevado a cabo durante la última década, y ha sido muy útil para aumentar la información sobre los mecanismos de degradación de la celulosa³⁶. Se cree que están involucrados por lo menos tres tipos de actividades en la hidrólisis de la celulosa: endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa³².

Las endoglucanasas cortan las uniones internas de la celulosa exponiendo extremos reductores o no reductores de las fibras de celulosa, las exoglucanasas liberan unidades de polisacáridos cortos desde los extremos de las cadenas, como celobiosa, u oligosacáridos pequeños. Por último la β -glucosidasa hidroliza la celobiosa a unidades monoméricas de glucosa³⁶.

Las hemicelulasas son enzimas más complejas debido a la naturaleza heterogénea de la hemicelulosa³⁷, este grupo está formado por una mezcla de al menos ocho enzimas tales como: endoxilanasas, exoxilocuronidasas, arabinofuranosidasas, endomananasas, β -manosidasas, acetil xilano estererasas, α -glucuronidasas y a α -galactosidasas. A diferencia de las celulasas que hidrolizan glucano a glucosa, las hemicelulasas dan lugar a varias pentosas y hexosas²⁵.

Para obtener rendimientos satisfactorios en la hidrólisis del material lignocelulósico pretratado, se requiere de la acción en conjunto de exoglucanasas, endoglucanasas, β -glucosidasas, xilanasas y otras enzimas auxiliares. Con el fin de alcanzar este objetivo, a nivel industrial se desarrollaron cócteles enzimáticos que poseen diferentes enzimas de diversos sistemas microbianos³⁶.

1.5.3. Fermentación

En la fermentación se utilizan microorganismos capaces de fermentar azúcares a etanol. Los más usuales son *Saccharomyces cerevisiae*, que convierte eficientemente hexosas no pudiendo co-fermentar de forma natural glucosa y xilosa, o *Escherichia coli*, la cual puede metabolizar un amplio rango de pentosas y hexosas^{14,32}.

Aunque las cepas sean productoras naturales de etanol, generalmente la ruta alcohólica es modificada mediante ingeniería genética para que sea capaz de producir más cantidad de etanol, metabolizando hexosas como pentosas en simultáneo¹⁴. A su vez, se busca que las mismas sean tolerantes a altas concentraciones de etanol y a inhibidores generados en el pretratamiento o en la hidrólisis enzimática. Un ejemplo de la modificación exitosa de cepas de *Escherichia coli* etanológica es el caso de MS04. Esta cepa, deriva de MG1655, a la cual se han eliminado los genes *pfB*, *adhE*, *frdA*, *xyFGH* y *ldhA*, y se han integrado en el cromosoma los genes *pdcZm-adhBZm* bajo el promotor *pfB*. Es capaz de producir etanol a partir de pentosas y hexosas con un alto rendimiento y tolera altas concentraciones de acetato. A continuación se puede apreciar la ruta metabólica de producción de etanol en la cepa de *E. coli* MS04¹².

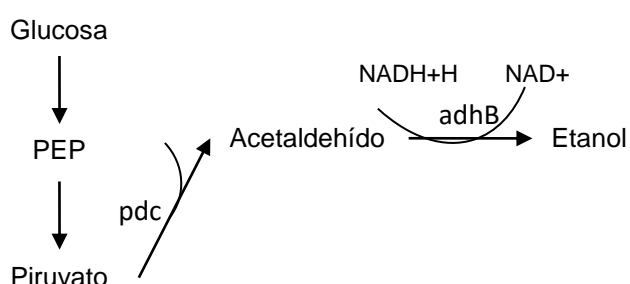


Figura 3. Ruta metabólica de conversión de glucosa en etanol de la cepa etanológica *E. coli* MS04. PEP: fosfoenolpiruvato, pdc: piruvato descarboxilasa, adhB; alcohol deshidrogenasa B de *Zymomonas mobilis*¹².

1.5.3.1. Configuraciones de fermentación

Hay dos configuraciones principales del proceso para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica (Figura 3): hidrólisis y fermentación por separado (SHF, Separate hydrolysis and fermentation) y sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF, simultaneous saccharification and fermentation). La elección de cuál es el más adecuado para determinada materia prima se va a determinar evaluando las ventajas y desventajas asociadas con los dos conceptos, en cada caso en particular⁴⁰.

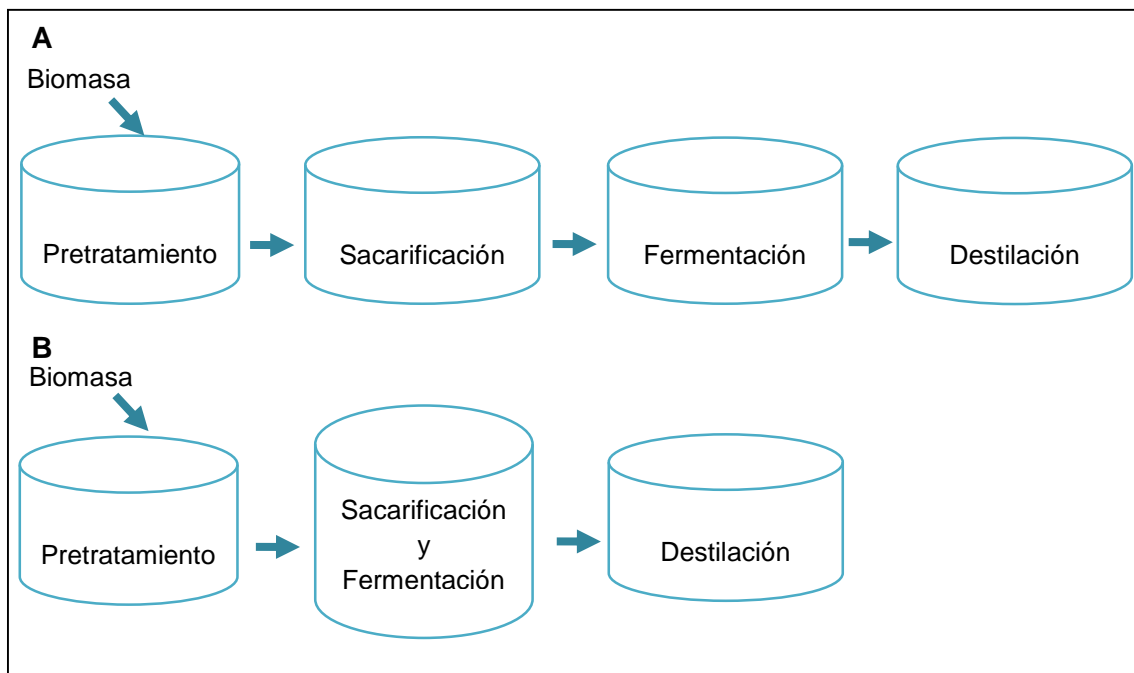


Figura 4. Esquema de producción de etanol A, Sacarificación y fermentación por separado, SHF; B, Sacarificación y fermentación en simultáneo, SSF.

En la SHF tanto la sacarificación como la fermentación se ejecutan en sus condiciones óptimas. La inhibición de las enzimas celulolíticas por acumulación de producto final (glucosa y celobiosa) en la etapa de sacarificación es un factor limitante. Entre las ventajas de la SHF está que ofrece la posibilidad de reciclar las células y la posibilidad de obtener un mayor rendimiento en cada paso del proceso⁴⁰.

Debido a que en la SSF la sacarificación y la fermentación se realizan en un mismo reactor, esta configuración permite que los azúcares liberados en la hidrólisis sean consumidos rápidamente por el microorganismo fermentador, minimizando la inhibición por producto de las enzimas celulolíticas. Los dos factores que hacen a este diseño más atractivo son, que requiere menos capital y que el tiempo del proceso puede ser menor. La mayor desventaja de

este método es que las condiciones para la hidrólisis enzimática y la fermentación son las mismas, no siendo óptima para ninguna de las etapas⁴⁰.

Una variante del SSF es bioproceso consolidado (CBP, consolidated bioprocessing) que encierra los cuatro procesos biológicos en un solo reactor: la producción de enzimas celulolíticas, la despolimerización de los hidratos de carbono estructurales en sus constituyentes monoméricos, la fermentación de hexosas y de pentosas en etanol³⁹. Esta tecnología tiene el potencial de reducir el costo de la producción de bioetanol de manera significativa³⁶. Desde que se propuso esta técnica en 1996 el foco de investigación en esta área es la búsqueda de microorganismos con capacidad de actuar en un CBP, los principales candidatos han sido bacterias y levaduras. Sin embargo los hongos no han sido reportados de poder ser utilizados en un CBP, debido a las dificultades de ser modificados mediante técnicas moleculares clásicas⁶.

1.6. Situación en Uruguay

Uruguay es un gran importador de combustibles, por lo que incorporar fuentes de energía renovable es necesario para así poder lograr la independencia energética del país.

En el año 2007 se divulgó la Ley N° 18.195 sobre agrocombustibles, ésta regula su fomento y regulariza su producción, comercialización y utilización. Específicamente, el artículo 6 indica la incorporación de bioetanol a las gasolinas en un porcentaje mínimo de 5%, obligatorio a partir del 1 de Enero de 2015⁴¹.

Actualmente ANCAP es el mayor productor de etanol en el país. La elaboración de este alcohol la desarrollan en el complejo Agro Industrial de Alcoholes del Uruguay, ALUR, (Empresa del grupo ANCAP) en Bella Unión, Departamento de Artigas. La materia prima que utilizan es caña de azúcar y sorgo dulce. La mezcla con la gasolina en una proporción prefijada de 5% a 10% se realiza en las plantas de ANCAP y se distribuye ya mezclado a través de la red de estaciones de servicio^{42,43}.

ALUR construyó una planta de bioetanol, en un predio lindero a la actual destilería de la Planta de Paysandú, con tecnología de la empresa Katzen de Estados Unidos. Demanda anualmente más de 200.000 toneladas de cereales como sorgo, maíz, trigo y cebada equivalente a 50 mil hectáreas y posee una capacidad de producción de 70 millones de litros de bioetanol al año⁴³.

Otro de los biocombustibles producidos en el país es biodiesel donde ALUR produce 50.000 toneladas/año a partir de granos oleaginosos como canola, girasol y soja⁴⁴.

Estudios agropecuarios realizados por el INIA, evalúan cultivos energéticos para la producción de etanol, entre ellos se incluyen switchgrass (*Panicum virgatum*), paso elefante

(*Pennisetum purpureum*) y caña común (*Arundo donax*)⁴⁵. La producción de etanol a partir de fuentes lignocelulósicas es una alternativa prometedora para el país⁴⁵.

Respecto a otro tipo de energías renovables Uruguay posee amplios recursos para el desarrollo de energía eólica, solar e hidráulica. A partir de estas fuentes renovables se puede producir energía eléctrica⁴⁶.

1.7. Plantas con biomasa lignocelulósica a nivel mundial

En este momento ya hay plantas produciendo etanol en escala comercial a partir de materiales lignocelulósicos en Europa, Estados Unidos y Brasil. A continuación se mencionan tres de las más importantes a nivel mundial.

- Beta Renewables - Crescentino

La planta de Crescentino es la primera en el mundo que se han diseñado y construido para producir bioetanol a partir de subproductos agrícolas o plantas que no son aptas para el consumo humano. A plena capacidad, la planta producirá 40.000 toneladas de etanol por año. La tecnología utilizada es de PROESA, y fue desarrollada en los laboratorios Biochemtex. Utilizan la combinación de un pretratamiento enzimático seguido de sacarificación y fermentación en simultáneo. Este proceso tiene un tiempo de residencia más corto que otros enfoques de hidrólisis enzimática, produciendo subproductos mínimos. Los parámetros son ajustables, proporcionando flexibilidad en la producción de los azúcares y de la lignina deseada. La tecnología está protegida por las 26 solicitudes de patentes, de las cuales 14 son públicas. Existe una colaboración entre Beta Renewables y Novozymes, que les permite reducir sustancialmente el costo de las enzimas por unidad de etanol. Esta tecnología desarrollada por PROESA ya está siendo utilizada en países como: Brasil, Estados Unidos, Eslovaquia y China⁴⁷.

- DuPont

Su planta produce etanol a partir de rastrojo de maíz cultivado en un radio de 48 kilómetros alrededor de la industria. Tiene una capacidad de 113 millones de litros. Para la sacarificación utilizan un cóctel enzimático llamado Accellerase, que ellos mismos producen, y para la fermentación levaduras⁴⁸.

- POET-DSM

Esta industria reúne a dos empresas líderes en la transición de una economía basada en el petróleo a una de base biológica. Está diseñada para producir más de 76 millones de litros de etanol de segunda generación, replicando la tecnología que utiliza POET para las plantas de etanol a partir de maíz, utilizando enzimas para la sacarificación y levaduras en la fermentación⁴⁹.

2. Objetivos

2.1. General

Determinar las condiciones óptimas para la producción de bioetanol utilizando *Arundo donax* como biomasa renovable.

2.2. Específicos

- Evaluar el mejor pretratamiento modificando ácidos utilizados, sus concentraciones y el tiempo.
- Poner a punto el proceso de sacarificación.
- Realizar fermentaciones en dos configuraciones diferentes: sacarificación y fermentación por separado, SHF, y sacarificación y fermentación en simultáneo, SSF, para las cepas MS04 wt y MS04 pTrc99A-Endo G.

3. Metodología

3.1. Materiales

Los reactivos e insumos utilizados fueron provistos en su totalidad por el Laboratorio de Bioquímica y Genómica Microbianas, del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.

3.1.1. Cepas

Durante este proyecto se trabajó con diferentes cepas de *Escherichiacoli*: MS04 wt⁵⁰, MS04(pTrc99A-EndoG)⁵¹ y LY180⁵². Para su mantenimiento se las conservó en freezer de -80 y -20°C en tubos con medio Luria Bertani (LB) y 25% de glicerol. Semanalmente se sembraron placas frescas de LB-agar (ver Anexo I) con antibióticos ampicilina o kanamicina 50 mg/mL cuando corresponde.

3.1.2. Enzimas

Se utilizó el cóctel enzimático Cellic CTec2 de Novozymes, se almacenó a 4°C. La temperatura óptima para la hidrólisis de la celulosa reportada por el fabricante es entre 45 y 50°C y el pH de 5,0–5,5⁵³.

3.1.3. Biomasa

Se recibió una muestra de *Arundo donax* molida y seca de aproximadamente 2 Kg de la Estación Experimental M.A. Cassinoni de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (UdelaR). A partir de este lote único de biomasa se trabajó en todo el proyecto. La biomasa se almacenó a temperatura ambiente durante todo el año.

3.2. Métodos

3.2.1. Determinación de peso seco

Se determinó la humedad de la muestra inicial y de la biomasa residual luego del pretratamiento, después de la sacarificación y posterior a la fermentación. Para esto, se siguió el protocolo recomendado por el National Renewable Energy Laboratory (NREL)⁵⁴. Todas las

determinaciones de peso seco fueron realizadas por triplicado. Se tuvo en cuenta el porcentaje de humedad de las muestras para la corrección de los rendimientos en todos los ensayos.

3.2.2. Pretratamiento: Hidrólisis ácida

Para el pretratamiento mediante hidrólisis ácida se mezclaron la biomasa y el ácido en una relación de 1:10 (p:v). Se autoclavó a 121°C durante 10, 20 o 30 minutos. Se trabajó con los autoclaves 2540E (Tuttnauer®) y AV CD12 (SIAC). Luego de tratadas, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente. Las fracciones líquida y sólida fueron separadas por centrifugación (3-30K, SIGMA, rotor N°17796) y se almacenaron por separado a 4°C para los posteriores ensayos o a -20°C para el análisis composicional de las muestras.

Se evaluaron dos ácidos, ácido sulfúrico (H₂SO₄) y ácido fosfórico (H₂PO₄). Para el H₂PO₄ se trabajó con dos concentraciones y tres tiempos, mientras que para el caso del H₂SO₄ se eligieron cuatro concentraciones de ácidos y tres tiempos. También se evaluó la autohidrólisis de la biomasa agregando agua en lugar de ácido, en dos tiempos.

En la Tabla 2 se detallan las condiciones ensayadas para los pretratamientos evaluados. Cada caso se ejecutó por triplicado.

Tabla 2. Condiciones de pretratamiento realizadas para *Arundo donax*

H ₂ PO ₄	10'	20'	30'	H ₂ SO ₄	10'	20'	30'	H ₂ O	10'	20'	30'
0.5%	X	X	X	0.5%	X	X	X	-		X	X
1.0%	X	X	X	1.0%	X	X	X				
				1.5%	-	X	X				
				2.0%	-	X	X				

A partir de este punto se utilizará una nomenclatura para referir a los diferentes pretratamientos. En primer lugar se denota la concentración (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 o nada en el lugar del agua), luego la solución utilizada (AS al referirse a H₂SO₄, AF para H₂PO₄ y H₂O para H₂O) y finalmente el tiempo (10, 20 o 30) del pretratamiento. Por ejemplo para el pretratamiento con H₂SO₄ al 2,0% durante 20 minutos se le referirá como 2AS20.

3.2.3. Ensayo para evaluar el efecto inhibitor

Con el fin de determinar el efecto de los posibles inhibidores presentes en las fracciones líquidas obtenidas luego de los pretratamientos, dos cepas de *Escherichia coli*

etanológicas LY180⁵² y MS04⁵⁰ se crecieron en un medio mínimo suplementado con estas fracciones. Se eligieron cinco condiciones de los tratamientos 1AS20, 2AS20, 1AS30, 2AS30 y H2O20. Se neutralizaron las fracciones líquidas a pH entre 5,7 y 7,4 con NaOH 50%, previo a su incorporación en el medio de cultivo.

Las fracciones líquidas seleccionadas fueron diluidas de forma que la concentración de azúcares en el medio de cultivo fuera 1% (p/v) y suplementadas con las sales del medio mínimo AM1 (Anexo I). En tubos de crecimiento se colocaron 5 mL de medio que se inocularon con las cepas (DOI: 0,08) y se incubaron a 37°C y 150 rpm durante 40 horas. El crecimiento fue determinado mediante medidas colorimétricas (AE-22, ERMA) cada dos horas.

Para diferenciar el efecto de los posibles inhibidores de las sales formadas por la neutralización de los ácidos, se incluyeron como control medio AM1 suplementado con glucosa 1%, con el agregado de ácido (H₂SO₄ 1% y 2%) neutralizados (simulando la etapa de neutralización de las fracciones líquidas), pero sin los derivados de la biomasa.

3.2.4. Ensayos de sacarificación

3.2.4.1. Efecto de enzimas hidrolíticas en las fracciones sólidas

Previo a estos ensayos, las fracciones sólidas obtenidas luego de los pretratamientos elegidos fueron lavadas con agua desionizada (400 mL cada 10 g) para eliminar el exceso de ácido y luego se las secaron a temperatura ambiente.

Para el proceso de sacarificación se colocó un 1% (p/v) de biomasa seca en 1,1 mL de buffer citrato de sodio 0.05M (Anexo II) y se incubó a 50°C por 24 horas con agitación continua con enzima Cellic CTec2 al 0.1% (v/v) y se incluyeron controles sin enzima. Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

3.2.4.2. Dosificación del cóctel enzimático Cellic CTec2

Se evaluó la producción de azúcares luego de la sacarificación de 1g de la fracción sólida obtenida luego de los pretratamientos 1AS30 y H2O20 con celulasa comercial Cellic CTec2 (Novozymes) entre 0 a 150 FPU/g de biomasa en buffer ácido cítrico-Na₂PO₄ 50mM pH 5, durante 72 horas, a 50°C y 120 rpm. Se realizó una única repetición de este ensayo.

3.2.5. Ensayos de fermentación

3.2.5.1. Sacarificación y fermentación por separado

Se colocaron 50 mL del producto de los pretratamientos (fracción sólida y líquida) 1AS30, 2AS20 y H2O20 en buffer ácido cítrico- Na_2PO_4 50mM pH 5 (Anexo II), 0,2% tween y se incubó a 50°C y 100 rpm por 72 horas con Cellic CTec2 100 FPU/ g biomasa. Luego se lo inoculó con la sepa MS04 wt o MS04 (pTrc99A-EndoG) a una densidad óptica inicial (DOi) de 5, suplementado con IPTG 0,01mM durante 72 horas a 38°C a pH 6,20 – 6,60. Se tomaron muestras cada 24 horas durante la etapa de sacarificación y al final de la fermentación para medir los azúcares residuales. Se midió la concentración de etanol a tiempo final. Y se cuantificaron los sólidos residuales luego de cada etapa. Se realizaron controles sin enzima. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

3.2.5.2. Sacarificación y fermentación en simultáneo

Se tomaron 50 mL del producto de los pretratamientos seleccionados sin separar la fracción sólida de la líquida y se los suplementó con buffer ácido cítrico- Na_2PO_4 50mM pH 6,2-6,4 (Anexo II), 0,2% tween, se agregó Cellic CTec2 100 FPU/ g biomasa y se lo inoculó con la cepa MS04 wt o MS04 (pTrc99A-EndoG) con una DOi 5, suplementado con IPTG 0,01mM durante 96 horas a 39°C. Se midió la concentración de etanol a tiempo final. Se tomaron muestras al final de la fermentación para medir los azúcares y sólidos residuales. Se realizaron controles sin enzima. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

3.2.6. Determinaciones analíticas

3.2.6.1. Determinación de azúcares reductores

Para poder medir azúcares reductores y así poder comparar la efectividad de los diferentes pretratamientos se utilizó el método del ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS)⁵⁵. Para esto, 0,6 mL del reactivo DNS (Anexo III) se mezclaron con 0,2 mL de la muestra problema en una dilución adecuada.

Se incubó cinco minutos a 100°C en termobloque (17600, Marshall). Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro (Shimadzu, UV-1800 UV-VIS).

Se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de glucosa en el rango de 0 a 0,5 mg/mL. La linealización de la misma permitió obtener la ecuación por la que se calculó la concentración de azúcares en las muestras problema.

3.2.6.2. Cuantificación de etanol

Para obtener los valores de etanol se utilizaron sensores (BlueSens, Herten, Germany) capaces de medir la concentración de etanol de una solución. Se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas entre 0 – 35 g/L de etanol para así poder extrapolar de la linealización obtenida los niveles de etanol de las fermentaciones.

3.2.6.3. Determinación de monosacáridos mediante HPLC

Muestras obtenidas luego del pretratamiento, post sacarificación y luego de las diferentes fermentaciones fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, de sus siglas en inglés) (Shimadzu, HPX-87H, Bioredaminex) según el protocolo 42623 de NREL⁵⁶, para la determinación de azúcares e inhibidores. Las muestras fueron centrifugadas a temperatura ambiente y el sobrenadante fue congelado hasta su análisis.

3.2.6.4. Cuantificación de la actividad celulotítica

Para esta cuantificación se pesó la fracción sólida de la biomasa resultante de todas las fermentaciones y se las dejó secar hasta que su peso fuera constante. Se realizó el mismo proceso para 50 mL de los productos de los diferentes pretratamientos, así como luego de la sacarificación (en caso de la SHF).

3.2.6.5. Análisis estadístico

Se utilizó en test de Tukey mediante el programa InfoStat (Versión 2008), con un p valor de 0,05.

4. Resultados y discusión

4.1. Efecto del pretratamiento en *Arundo donax*

En primer lugar, nos planteamos evaluar el efecto de diferentes condiciones de pretratamiento con ácido diluido sobre la estructura de *Arundo donax*. Se decidió trabajar con ácido sulfúrico y fosfórico ya que son los más reportados para este tipo de procesos^{15,21,57}. Debido a las limitaciones de equipamiento solo se pudo realizar el mismo a 121°C, aunque se ha reportado que los procesos más eficientes suelen hacerse a temperaturas mayores¹⁵.

El efecto del tratamiento de *Arundo donax* con ácido diluido a 121°C fue determinado impregnando en una relación 1:10 (p:v) de biomasa con solución de catalizador. En primer lugar, se evaluó el tratamiento con ácido sulfúrico (AS) y ácido fosfórico (AF) a 0,5 y 1,0 % (v/v) (Figura 6). En base a los resultados obtenidos, se continuó trabajando con AS a mayores concentraciones (Figura 7). Para comparar los diferentes pretratamientos se evaluó el cambio en el aspecto físico de la biomasa, la solubilización de azúcares y el efecto inhibitor de la fracción líquida generada en el crecimiento de cepas etanológicas de *Escherichia coli*.

4.1.1. Modificaciones en aspecto físico

Tras el pretratamiento lo primero que se observó fue la modificación en la apariencia de la biomasa. Se registró la fracción sólida ya seca para algunos de los pretratamientos y se las comparó con la biomasa sin tratar (Figura 5).

Se puede apreciar que la biomasa inicial con la que se trabajó en este proyecto, estaba molida de tal forma que era similar a un polvo. Luego de los pretratamientos el factor macroscópico que sufrió una modificación fue el color, pudiéndose suponer que los diferentes pretratamientos tuvieron efectos desiguales en la biomasa.

A su vez, los dos pretratamientos con ácido provocaron un mayor oscurecimiento en la biomasa comparado con el pretratamiento con agua. Siendo mayor el efecto en la biomasa tratada con el ácido sulfúrico 2%, aunque el pH final de la biomasa es similar.

Aunque está claro que hay un cambio, al no haber realizado un análisis de composición no se puede determinar la razón.

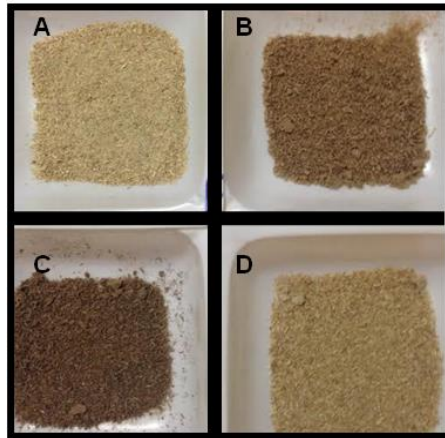


Figura 5. Apariencia física de las partículas de *A. donax*. Sin pretratar (A); fracción sólida seca sin neutralizar luego del pretratamiento con ácido sulfúrico 1% por 30 minutos (pH 1,4) (B), ácido sulfúrico 2% por 20 minutos (pH 1,3) (C) y agua durante 20 minutos (pH 5,5) (D).

4.1.2. Solubilización de azúcares

En las fracciones líquidas obtenidas luego de los pretratamientos de *A. donax* se determinaron los azúcares totales (como azúcares reductores) liberados, para así comparar la efectividad de los diferentes pretratamientos. Los azúcares reductores fueron determinados usando el método del ácido 3.5-dinitro salicílico (DNS). En la Figura 6 se presentan los resultados obtenidos y se incluye, mediante letras, el resultado del análisis estadístico de los datos mediante el test de Tukey con $p < 0,05$; cuando las letras son diferentes significa que los valores son significativamente diferentes.

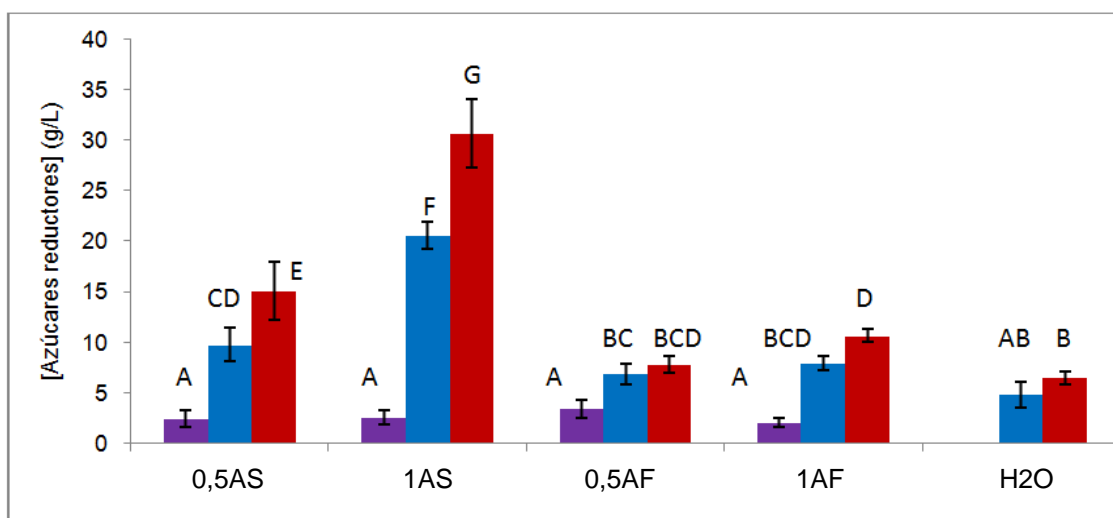


Figura 6. Concentración de azúcares reductores obtenidos luego del pretratamiento de *Arundo donax* con H_2PO_4 o H_2SO_4 a 0.5% o 1% y H_2O durante 10 (violeta), 20 (azul) y 30 (rojo) minutos, a $121^\circ C$. Se realizó el análisis estadístico mediante el test de Tukey, con un nivel de confianza del 95%.

A partir de los resultados de la Figura 6 se puede observar que las concentraciones de azúcares reductores obtenidos luego del tratamiento con ácido sulfúrico fueron mayores a las obtenidas luego del pretratamiento con ácido fosfórico. Generando el pretratamiento 1AS20 y el 1AS30 una cantidad significativamente mayor de azúcares que el resto de los tratamientos, alcanzando 20,6 g/L y 30,7 g/L, respectivamente.

El pretratamiento con agua suele denominarse autohidrólisis, ya que la hemicelulosa posee sustituyentes acetilo, los cuales catalizan la ruptura de las fibras en condiciones de alta presión y temperatura²³. En este caso, se logró la liberación 4,8 g/L de azúcares luego de 20 minutos y 6,4 g/L luego de 30 minutos de reacción. La variación del tiempo de residencia no tuvo un efecto significativo en este caso.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió descartar el ácido fosfórico debido a que los valores de azúcares obtenidos fueron significativamente menores, comparando con los pretratamientos con ácido sulfúrico. Por otro lado, debido a que el pretratamiento con ácido sulfúrico al 1% fue el que mostró un mayor rendimiento, se planteó indagar si a una mayor concentración de ácido, la cantidad de azúcares resultante sería mayor. Solo fueron realizados a 20 y 30 minutos ya que los valores de éstos fueron significativamente mayores que a 10 minutos de reacción.

En la Figura 7 se presentan los resultados obtenidos de los azúcares liberados luego de tratar la biomasa con ácido sulfúrico a diferentes concentraciones: 0,5, 1, 1,5, y 2,0% (v/v) y el pretratamiento con agua durante 20 y 30 minutos.

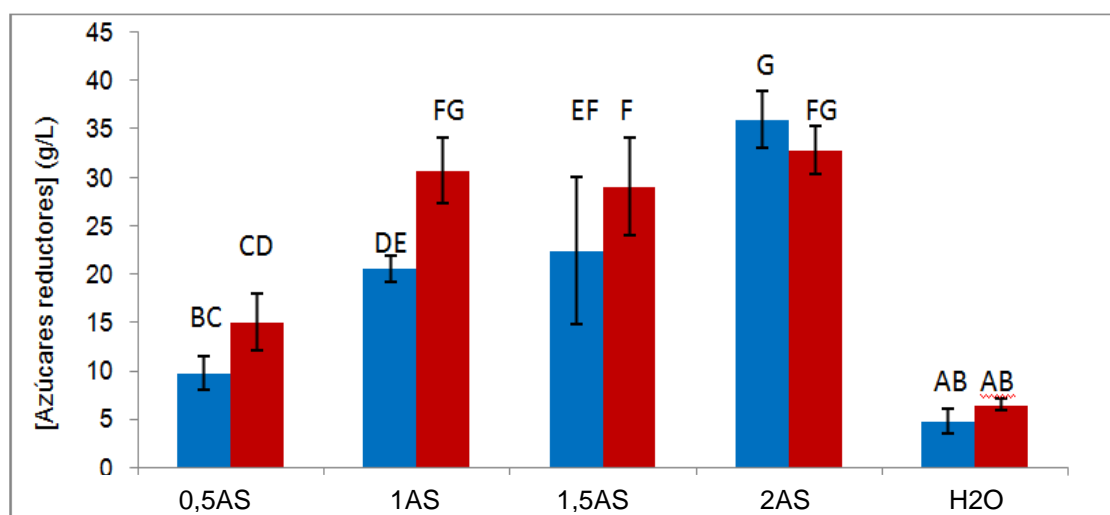


Figura 7. Concentración de azúcares reductores obtenidos luego del pretratamiento de *Arundo donax* con H₂SO₄ 0.5%, 1%, 1.5%, 2% y H₂O a tiempos 20 minutos (azul) y 30 minutos (rojo). Se realizó el análisis estadístico mediante el test de Tukey, con un nivel de confianza del 95%.

Comparando los resultados presentados en la Figura 7 podemos observar que los rendimientos que se obtuvieron con 1,5 o 2 % de ácido están en el mismo orden que los obtenidos cuando se aplicó 1 % de ácido, siendo el que libera más azúcares el tratamiento 2AS20, el cual logra la solubilización de 36,0 g/L de azúcares reductores, pero sin diferencias significativas con el pretratamiento 2AS30 ni con el 1AS30. A la vez, la cantidad de azúcares liberados con este proceso no fue significativamente mayor que los pretratamientos 2AS30 y 1AS30 por lo que se seleccionaron estos para seguir trabajando. Para poder comparar estos pretratamientos también se incluyó 1AS20.

La técnica de hidrólisis ácida fue utilizada por varios autores para *Arundo donax*. Shatalov y colaboradores¹⁵ aplicaron ácido sulfúrico 1,5% a 140°C durante 30 minutos alcanzando concentraciones de 25,76 g/L de azúcares¹⁵. Mientras que, Scordia y colaboradores³⁴ utilizaron ácido oxálico (OA), obteniendo 43,8 g/L de azúcares utilizando 5% de ácido, siendo la xilosa el 80% del total de los azúcares detectados⁵⁷.

Otro método reportado para tratar *A. donax* es la explosión de vapor, utilizando este método a 196°C durante 5 minutos se obtuvieron 42 g/L de carbohidratos aproximadamente en la fracción insoluble en agua y 8 g/L de carbohidratos solubles⁵⁸.

Respecto a los pretratamientos se debe tener en cuenta que el elegido en este trabajo, la hidrólisis ácida, fue debido a los equipos y las limitaciones del laboratorio. Dentro de los ácidos se eligió probar con sulfúrico y fosfórico, mientras que en otras investigaciones se utilizó ácido oxálico que esta reportado que genera menos inhibidores que otros ácidos³⁴.

Se seleccionaron las fracciones líquidas en las que se obtuvo más cantidad de azúcares por DNS (1AS20, 2AS20, 1AS30 y 2AS30) y estas fueron analizadas por HPLC para determinar los monosacáridos mayoritarios presentes en las diferentes fracciones. Los resultados obtenidos mostraron que el azúcar mayoritario fue la xilosa, representando entre un 67,4 y 75,9% del total. Los otros sacáridos detectados fueron glucosa y arabinosa, pero en concentraciones menores.

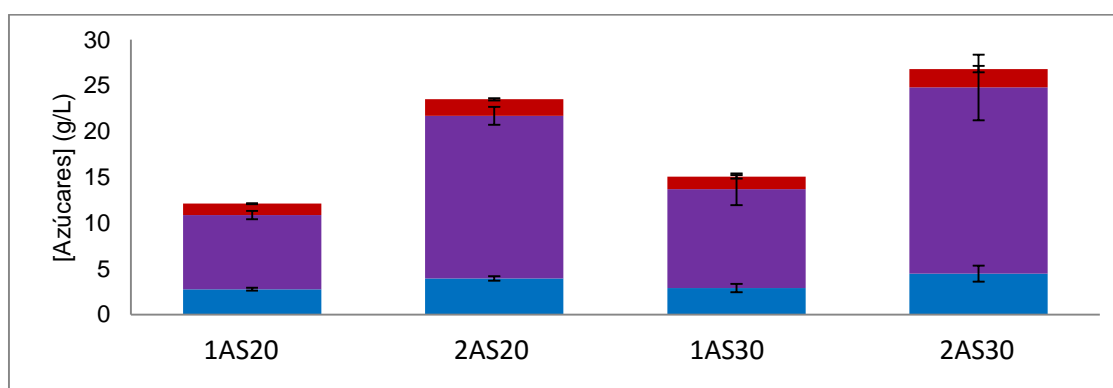


Figura 8. Concentración de glucosa (azul), xilosa (violeta) y arabinosa (rojo) obtenidos luego del pretratamiento de *Arundo donax* con H₂SO₄ 1% y 2% durante 20 y 30 minutos. Se presenta el promedio de triplicados, las barras representan la desviación estándar.

Esto es concordante con el hecho de que la aplicación de ácido diluido afecta principalmente la estructura de la hemicelulosa ²⁸.

El análisis estadístico de los resultados (Tabla 3) muestra como la cantidad de azúcares liberados en los tratamientos con H₂SO₄ al 2% son significativamente mayores que los azúcares liberados del pretratamiento con H₂SO₄ al 1%. Por lo que se puede afirmar que un aumento en la concentración de ácido es más influyente que aumentar la duración del pretratamiento.

Tabla 3. Análisis estadístico de los resultados de la composición de las fracciones líquidas obtenidas

Pretratamiento	Glucosa ^a (g/L)	Xilosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	Azúcares totales (g/L)
1AS20	2,76 ± 0,15 a	8,10 ± 0,44 a	1,24 ± 0,66 a	12,01 ± 0,64 a
2AS20	3,94 ± 0,24 ab	17,76 ± 0,99 b	1,80 ± 0,12 ab	23,49 ± 1,34 b
1AS30	2,87 ± 0,45 a	10,80 ± 1,73 a	1,36 ± 0,21 a	15,03 ± 2,39 a
2AS30	4,46 ± 0,88 b	20,33 ± 3,58 b	1,99 ± 0,36 b	26,78 ± 4,8 b

^a Las letras representan valores diferentes (Tukey (p <0,05)) para un mismo azúcar entre pretratamientos.

A partir de los resultados de composición obtenidos mediante HPLC vemos que el total de azúcares detectados es menor que cuando se determinaron mediante el método de DNS, esto puede explicarse ya que hay azúcares complejos que no pueden ser detectados mediante este método analítico, pero cuyos extremos reductores reaccionan de forma positiva con el reactivo del DNS. Por lo que se puede concluir que los pretratamientos, además de solubilizar monosacáridos, también permiten la liberación de oligosacáridos pequeños.

Los resultados obtenidos son concordantes con los presentados por Shatalov y colaboradores¹⁵ donde los tres azúcares que obtuvieron a partir de la hidrólisis ácida de *Arundo donax* fueron glucosa, xilosa y arabinosa. Al igual que en nuestros ensayos, la cantidad de xilosa obtenida fue significativamente mayor que los otros azúcares. Si se compara con la condición más cercana a la utilizada en este trabajo (130°C, H₂SO₄1%, 30 minutos) vemos se obtuvieron: 15,28 g/L de xilosa, 2,18 g/L de glucosa y 1,53 g/L de arabinosa, las diferencias pueden deberse a desemejanza en la composición de la biomasa usada y en la diferencia de temperatura del proceso.

4.1.3. Evaluación del efecto inhibitor de las fracciones líquidas en el crecimiento de cepas etanológicas

Para determinar, de manera indirecta, si se generaron compuestos tóxicos en las fracciones líquidas, que puedan afectar el crecimiento de cepas fermentadoras se evaluó el crecimiento de dos cepas etanológicas de *Escherichia coli* (LY180 y MS04) en medio mínimo suplementado con las fracciones líquidas obtenidas luego de los pretratamientos, esperando que las que tuvieran más compuestos inhibitorios dificultaran más el crecimiento bacteriano. Se debe tomar en cuenta que estas cepas etanológicas de *E. coli* son capaces de cofermentar glucosa y xilosa, ya que como se vio en los resultados de la figura 8 los azúcares presentes en las fracciones líquidas obtenidas luego de los pretratamientos fueron glucosa, arabinosa y principalmente xilosa.

Para esto, medio AM1 fue suplementado con cantidad suficiente de cada fracción líquida (previamente neutralizada) de manera que la concentración de azúcares totales final sea de 1%. Para poder diferenciar el efecto del ácido y su neutralización de los posibles compuestos inhibitorios se incluyeron controles a los que se colocaron H₂SO₄ 1 o 2% y se neutralizaron con la misma base que las fracciones líquidas obtenidas de los pretratamientos, debido a la falta de fuentes de carbono se los complementó con glucosa al 1%. También se realizó un control con medio mínimo y glucosa como fuente de carbono para evaluar la capacidad de crecimiento sin factores externos.

Por un lado, vemos que en el crecimiento celular de la cepa LY180 (Figura 9) en la fracción líquida generada luego del pretratamiento 2AS20, es mayor que en las fracciones líquidas de los pretratamientos 1AS20 y 1AS30. En cambio el crecimiento de MS04 (Figura 10) en medio suplementado con estos tres está casi en el mismo nivel.

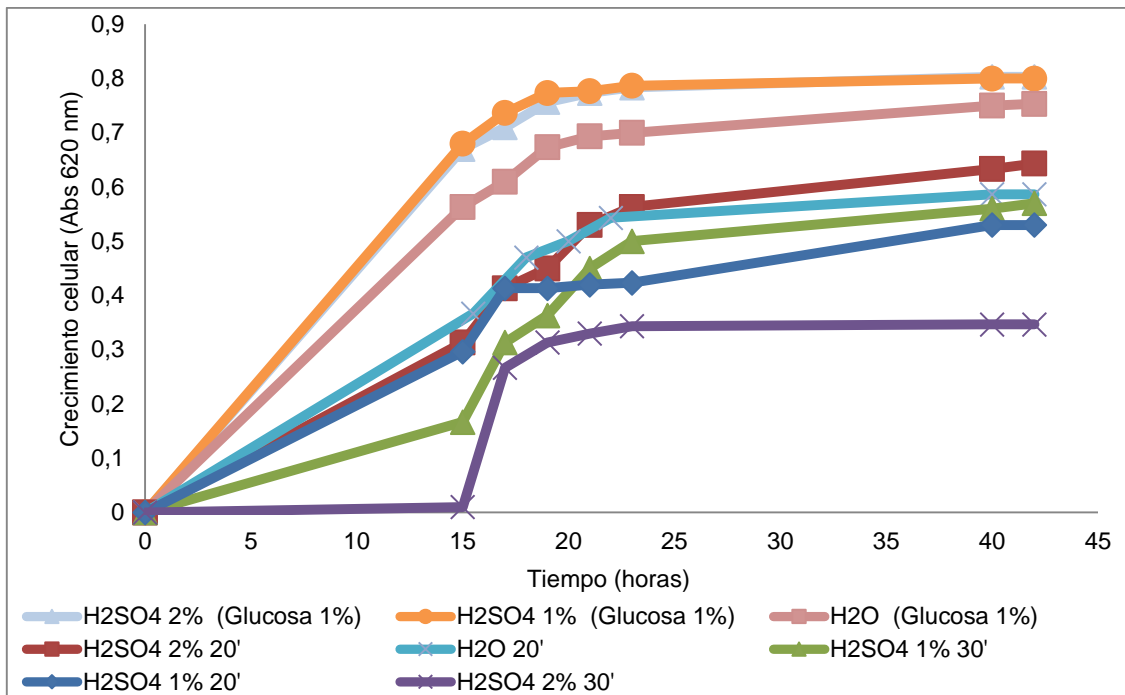


Figura 9. Crecimiento de la cepa de *E. coli* LY180 a 37°C, 150 rpm en medio suplementado con las fracciones líquidas obtenidas a partir de diversos pretratamientos de *Arundo donax* (1AS20, 2AS20, 1AS30, 2AS30, H2O); medio suplementado con H₂SO₄ 1% con glucosa, H₂SO₄ 2% con glucosa y control positivo (medio AM1 con glucosa).

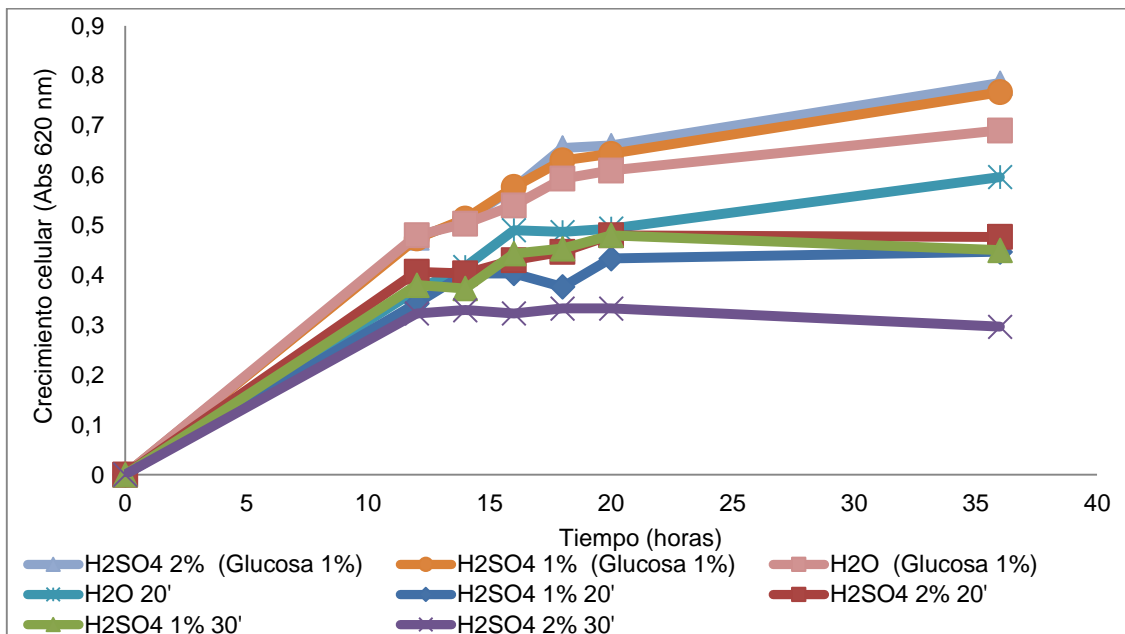


Figura 10 Crecimiento de cepa de *E. coli* MS04 en presencia de fracciones líquidas obtenidas a partir de diversos pretratamientos de *Arundo donax* (1AS20, 2AS20, 1AS30, 2AS30, H2O); H₂SO₄ 1% con glucosa, H₂SO₄ 2% con glucosa y control positivo (AM1 con glucosa).

Para poder comparar mejor los resultados obtenidos, se analizaron estadísticamente los la densidad óptica de los cultivos a tiempo final (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis estadístico del crecimiento de las cepas de *E. coli* LY180 y MS04.

Fracción líquida	Densidad óptica ^a LY180	Densidad óptica ^a MS04
2AS30	0,347 ± 0,006 a	0,297 ± 0,006 a
1AS30	0,57 ± 0,010 b	0,45 ± 0,015 b
1AS20	0,583 ± 0,015 b	0,457 ± 0,012 b
H2O20	0,587 ± 0,015 b	0,597 ± 0,050 c
2AS20	0,643 ± 0,015 c	0,477 ± 0,015 b
H2O (Glucosa 1%)	0,753 ± 0,006 d	0,69 ± 0,010 d
H2SO4 1% (Glucosa 1%)	0,8 ± 0,010 e	0,767 ± 0,006 e
H2SO4 2% (Glucosa 1%)	0,803 ± 0,006 e	0,785 ± 0,021 e

^a Se presenta la densidad óptica final (DO_{620nm}) del cultivo, porcentaje de triplicados acompañado por el desvío estándar. Las letras diferentes representan valores significativamente diferentes entre la misma cepa (Test de Tukey con nivel de confianza del 95%). Incubación a 37°C y 150 rpm, durante 44 (LY180) o 36 (MS04) horas.

Como era de esperarse el crecimiento de las cepas en medio mínimo suplementado con glucosa, sin el agregado de fracción líquida, fue significativamente mayor al alcanzado en medio en presencia de fracción líquida obtenida luego del pretratamiento como fuente de carbono.

Paralelamente, se quiso determinar si el hecho de la neutralización del ácido tenía algún efecto en el crecimiento de la cepa. Para las dos cepas estudiadas se observó que en estas condiciones, tuvieron un mayor crecimiento que cualquiera de los otros ensayos.

Para explicar este fenómeno, es posible plantear la hipótesis de que, la neutralización del ácido podría generar una sal que aporte al crecimiento de los microorganismos. La sal que genera a partir de la mezcla de ácido sulfúrico y hidróxido de sodio es sulfato de sodio (Na₂SO₄) y esta podría ser la responsable del mayor crecimiento de *E. coli* en estas condiciones. Debido a que es un nutriente que el medio no tiene inicialmente.

Por otro lado si observamos el crecimiento en las cepas con la fracción líquida del pretratamiento con agua podemos ver cómo el crecimiento de *E. coli* MS04 es significativamente mayor que el crecimiento en presencia de las fracciones obtenidas de los otros pretratamientos, en cambio el crecimiento *E. coli* LY180 con esta fracción fue similar a los otros pretratamientos incluidos en el ensayo. Se puede concluir que las dos cepas a pesar de

que hayan sido modificadas para ser utilizadas en procesos industriales de producción de etanol, hay diferencias entre sus metabolismos.

Comparando los resultados del crecimiento bacteriano en presencia de los hidrolizados de *A. donax*, se puede ver como el pretratamiento que afectó más el crecimiento de las dos cepas, por lo que se puede asumir en el que se generaron más inhibidores, fue el realizado con ácido sulfúrico al 2% durante 30 minutos (2AS30). Este resultado era de esperar ya que a mayor tiempo de pretratamiento y mayor concentración de ácido se generan mayor cantidad de inhibidores, por ejemplo furfural, HMF y ácido acético^{14,40}.

Con el fin de determinar la presencia de inhibidores en las fracciones líquidas obtenidas, se realizó, mediante HPLC, la cuantificación de furfural, HMF y acetato.

En todas las fracciones analizadas se pudo detectar acetato (Tabla 5), compuesto tóxico, que potencialmente va a inhibir la fermentación alcohólica^{29,59}, pero no se detectó furfural ni HMF. El ácido acético es producido por la desacetilación de la hemicelulosa durante el pretratamiento¹².

Se puede ver cómo, a mayor concentración de ácido, la producción de acetato tiende a ser mayor. A su vez, observamos como al utilizar la misma concentración de ácido sulfúrico, tanto 1 como 2% no hay diferencias significativas de producción de este inhibidor entre los dos tiempos evaluados.

Se puede concluir entonces que el aumento en la concentración del ácido conlleva a que se generen más inhibidores, siendo más significativo que el aumento en el tiempo de residencia.

Tabla 5. Concentración de acetato en la fracción líquida luego de diferentes pretratamientos de *Arundo donax* (1AS20, 2AS20, 1AS30, 2AS30)

Pretratamiento	Acetato (g/L) ^a
1AS20	2,51 ± 0,37 a
2AS20	4,28 ± 0,53 b
1AS30	3,34 ± 0,46 ab
2AS30	4,05 ± 0,40 b

^a El acetato fue detectado mediante análisis por HPLC. Se muestra el promedio de triplicados y el desvío estándar. Las letras diferentes representan valores significativamente diferentes entre la misma cepa (Test de Tukey con nivel de confianza del 95%).

Comparando estos resultados (Tabla 5) con las curvas de crecimiento (Figura 9 y 10) se puede observar como el efecto inhibitor sobre las cepas de las fracciones líquidas, se correlaciona con la concentración presente de ácido acético en ellas. La única excepción es 2AS20, era de esperarse que la fracción líquida de este pretratamiento hubiera afectado más el crecimiento, ya que la concentración de acetato en ella es mayor. En cambio fue en la que las cepas crecieron más, comparando con el efecto de la fracción líquida de los otros pretratamientos.

Previamente se ha reportado la formación de ácido acético luego de la hidrólisis ácida de *A. donax*, siendo acompañada de la formación de furfural y 5-hidroxymetylfurfural, en cantidades que aumentaban a mayores concentraciones de ácido y a mayor duración del pretratamiento¹⁵.

El daño celular causado por inhibidores como el ácido acético se debe a la coexistencia de una forma disociada y una no disociada¹². A pesar que es más tóxica la forma disociada, ambas formas tienen efectos inhibitorios sobre el crecimiento microbiano⁶⁰ ya que el ácido acético es capaz de disociarse en el citoplasma causando una disminución en el pH y la acumulación de aniones, produciendo un aumento en la turgencia, generando así problemas en la osmosis celular⁶¹.

La cepa de *E. coli* MS04 es resistente a ácido acético¹², por lo que se hubiera esperado, sabiendo que este es el inhibidor presente en las fracciones líquidas luego del pretratamiento, que el efecto en el crecimiento de esta cepa hubiera sido menor.

4.2. Sacarificación

Para evaluar las condiciones óptimas de la sacarificación el primer paso fue probar la efectividad del coctel enzimático en la fracción sólida obtenida luego de los diferentes pretratamientos.

4.2.1. Efecto de enzimas hidrolíticas en las fracciones sólidas

La sacarificación tiene como finalidad la degradación enzimática de las fibras de celulosa y hemicelulosa en azúcares simples que puedan ser fermentados en la siguiente etapa del proceso de producción de bioetanol. En este trabajo evaluamos el efecto de un cóctel enzimático comercial, Cellic CTec2, desarrollado por Novozymes. En primer lugar, se evaluó la efectividad del cóctel enzimático realizando una sacarificación de las diferentes fracciones sólidas obtenidas luego de los pretratamientos seleccionados (1AS30, 2AS20 y H2O20), en las condiciones reportadas como óptimas para las enzimas (50°C, pH 5.0). A su vez, se evaluó la actividad β -glucosidasa de la mezcla, utilizando celobiosa como sustrato, se tuvo en cuenta

que este es un azúcar reductor, por lo que para evaluar esta actividad se calculó la diferencia de los azúcares totales y los iniciales.

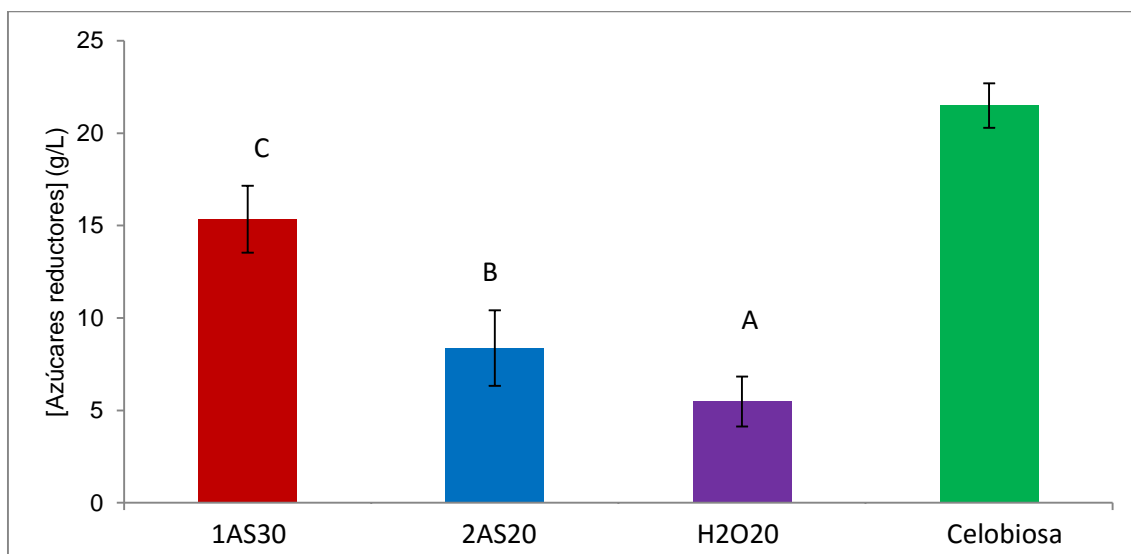


Figura 11. Concentración de azúcares reductores después de la sacarificación con Cellic CTec2 durante 24 horas a 50°C, de las fracciones sólidas obtenidas luego de los diferentes pretratamientos de *Arundo donax* (1AS30, 2AS20, H₂O₂) y de celobiosa. Los ensayos se realizaron por triplicado; las barras de error representan el desvío estándar de los resultados. Las letras distintas muestran resultados diferentes significativamente (Test de Tukey con valor de confianza del 95%).

En la Figura 11 se puede apreciar como la sacarificación de la biomasa pretratada con ácido, genera concentraciones significativamente mayores que la pretratada con agua, lo cual muestra que la aplicación de ácido mejora la accesibilidad de las enzimas a las fibras de celulosa.

A su vez, se observa que en la hidrólisis enzimática de la biomasa pretratada con 1AS30, hay una mayor liberación de azúcares reductores que en la tratada con 2AS20. Teniendo en cuenta que los azúcares solubilizados en las fracciones líquidas luego de los pretratamientos eran similares, se hubiera esperado que la producción de azúcares luego de la sacarificación de la biomasa sólida fuera similar. De todos modos, el hecho de que un pretratamiento libere una mayor cantidad de azúcares, no implica que las enzimas posean un mejor acceso a las fibras de celulosa, ya que este no es el único factor determinante del rendimiento de la sacarificación.

La sacarificación de *A. donax* pretratado con 1AS30 libera 15,3 g/L. Recientemente Lemons e Silva y colaboradores¹⁹, obtuvieron 13,9 g/L de azúcares a partir de *A. donax* después de la hidrólisis enzimática (25 FPU/g biomasa) durante 30 horas a 50°C de la fracción sólida obtenida luego del pretratamiento con ácido sulfúrico 1,1% (v/v) a 121°C por 30 minutos¹⁹.

Estos resultados los podemos comparar con el trabajo publicado por Jeon y colaboradores. Reportan haber obtenido 43,2 g/L de azúcares, luego de la hidrólisis ácida de *Arundo donax* utilizando H₂SO₄ 2% (v/v) a 132°C por 1 hora, para posteriormente sacarificarlo a 60°C, pH 5 y 180 rpm durante 22 horas utilizando una celulasa y una β-glucosidasa de Novozymes, lo cual representó recuperar un 59% de la biomasa en forma de azúcares²⁴.

Por otro lado se confirmó que el cóctel posee actividad β-glucosidasa, ya que fue capaz de hidrolizar eficientemente la celobiosa en las condiciones ensayadas.

4.2.2. Curva de dosificación del cóctel enzimático Cellic CTec2

A partir del bajo rendimiento de sacarificación obtenido se realizó una curva de dosificación del cóctel, para saber si la producción de azúcares a partir de esta biomasa aumenta al utilizar mayor cantidad de enzimas.

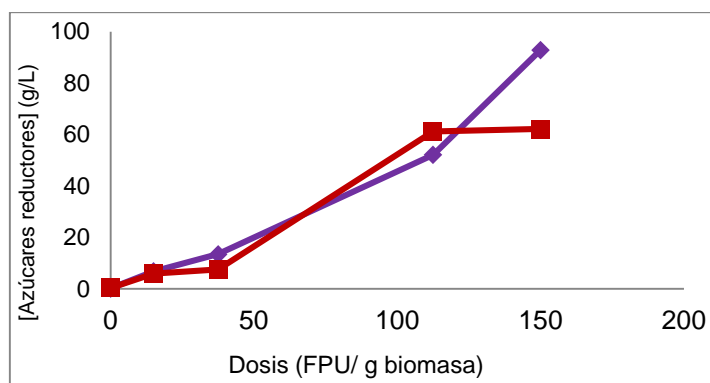


Figura 12. Concentración de azúcares obtenidos luego de la sacarificación con Cellic CTec2 durante 72 horas a 50°C, de las fracciones sólidas obtenidas luego de los pretratamientos 1AS30 (rojo) y H2O20 (violeta) de *Arundo donax*. Este ensayo se realizó una única vez.

Se determinó a partir de la Figura 12 que utilizando 100 FPU/g biomasa se lograba la liberación cerca de 60 g/L de azúcares tanto como para la fracción sólida obtenida luego del pretratamiento 1AS30 como H2O20, por lo que se decidió continuar trabajando con esta dosis del cóctel enzimático.

4.3. Producción de etanol

El objetivo último de este trabajo fue determinar el potencial de producción de etanol a partir de *A. donax* sembrado en nuestro país, luego de evaluar diferentes condiciones de pretratamientos y de establecer las condiciones óptimas de sacarificación. Por consiguiente, y teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió evaluar la fermentación de la biomasa obtenida luego de los pretratamientos 1AS30, 2AS20 y H2O20, utilizando el cóctel Cellic CTec2

para la sacarificación. A su vez, se utilizaron dos cepas etanológicas de *Escherichia coli* MS04 wt y MS04 (pTrc99A-EndoG). Esta última, expresa una celulasa multifuncional, capaz de degradar celulosa y xilano, en condiciones moderadas de temperatura y pH, mientras que tolera altas concentraciones de etanol y otros compuestos inhibidores presentes en los procesos industriales⁵¹.

4.3.1. Efecto de la expresión de EndoG

La cepa etanológica de *E. coli* MS04 es una cepa modificada tolerante al acetato. Esta cepa fue complementada con un plásmido que codifica una celulasa (EndoG), la cual tiene actividad exoglucanasa, endoglucanasa y xilanasas. Denominando esta nueva cepa MS04 (pTrc99A-EndoG)^{12,51}.

Para determinar el efecto de la expresión de enzimas hidrolíticas durante la sacarificación y posterior fermentación se comparó la fermentación de los hidrolizados utilizando la fracción sólida y la líquida obtenidas luego del tratamiento con 1AS30 y 2AS20, utilizando las cepas MS04 wt y MS04 (pTrc99A-EndoG) (Figura 13).

En la fermentación del hidrolizado de 1AS30 no se ve una diferencia en la producción de etanol comparando ambas cepas. Sin embargo, en la fermentación de la biomasa obtenida luego del pretratamiento 2AS20, se puede observar como en presencia de EndoG, la cepa MS04 fue capaz de producir una cantidad significativamente mayor de etanol. El etanol producido por MS04 wt es únicamente generado a partir de los azúcares solubilizados durante los pretratamientos, por lo que los valores obtenidos representan un 50 y 22% del máximo teórico para 1AS30 y 2AS20, respectivamente. Seguramente, la presencia de inhibidores explica que estos sean bajos, pero queda claro que hay una tendencia a que la expresión de una celulasa mejore la conversión de la biomasa a etanol.

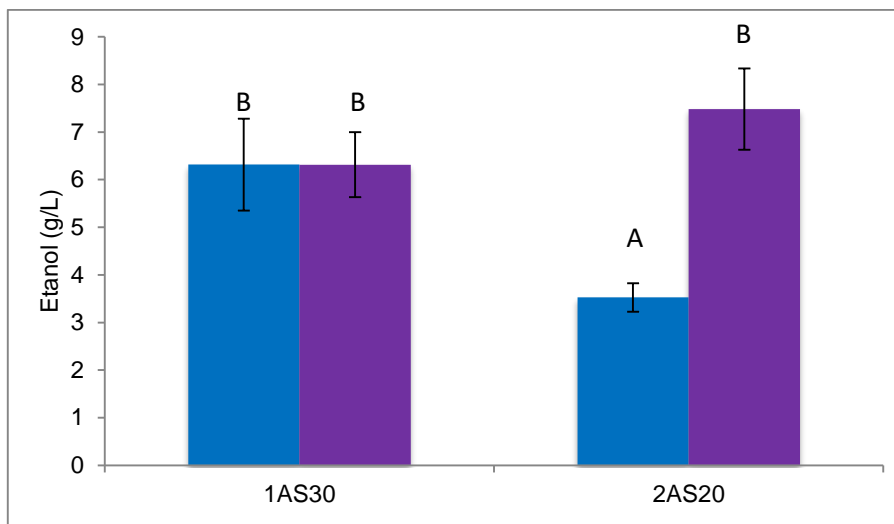


Figura 13. Producción de etanol después de la fermentación utilizando MS04 wt (azul) o MS04 (pTrc99A-EndoG) (violeta) por 72 horas, a 38°C, pH 7 para diferentes hidrolizados de Arundo donax (1AS30, 2AS20). Las barras de error representan el desvío estándar de los resultados. Se realizó análisis estadístico por tukey con $p < 0,05$.

Para determinar si la configuración del proceso tiene un efecto en los niveles de etanol generados a partir de *A. donax*, se compararon los procesos de sacarificación y fermentación por separado (SHF) y en simultáneo (SSF).

4.3.2. SHF

A continuación, se realizó la sacarificación y fermentación por separado de los hidrolizados de *A. donax*. Esto se hizo utilizando tanto la fracción sólida y la líquida generadas luego de los diferentes pretratamientos (es decir que las mismas no fueron separadas luego de la etapa de pretratamiento). La mezcla obtenida fue suplementada con buffer ácido cítrico- Na_2PO_4 50 mM, tween 0,2 % y se ajustó el pH con NaOH a 5,0.

En primer lugar, las fracciones fueron incubadas con el cóctel Cellic CTec2 (100 FPU/g biomasa), durante 72 horas, a 50°C, pH 5,0. A continuación, se ajustó el pH a 7,0, ya que este es el óptimo para el crecimiento de *E. coli*, y se incubó durante 72 horas a 38°C.

La sacarificación y fermentación por separado (Figura 14) de las diferentes biomásas (con el mismo pretratamiento) no presentan diferencias significativas en los niveles de etanol generados por las dos cepas evaluadas *E. coli* MS04wt y MS04 (pTrc99A-EndoG), aunque existe una tendencia clara en los tres casos de que la expresión de la endoglucanasa EndoG durante la fermentación mejora la producción de etanol.

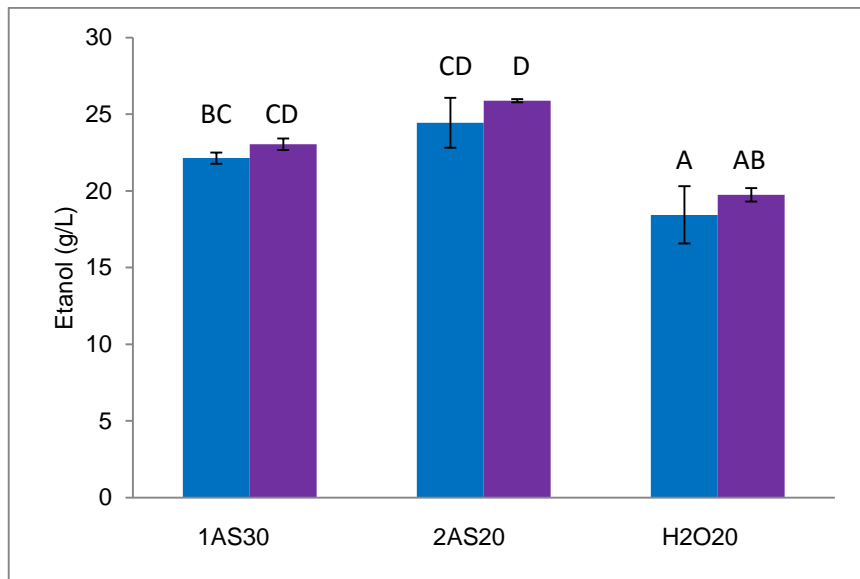


Figura 14. Concentración de etanol después de la sacarificación con Cellic CTec2 (100 FPU/g de biomasa) durante 72 horas a 50°C, pH 5,0 y fermentación utilizando MS04 wt (azul) o MS04 (pTrc99A-EndoG) (violeta) por 72 horas a 38°C, pH 7,0, de la biomasa obtenida luego de los diferentes pretratamientos de *Arundo donax* (1AS30, 2AS20, H2O20). Las barras representan el desvío estándar de los triplicados. Las letras diferentes implican que los resultados son significativamente diferentes (Test de Tukey, $p < 0,05$).

Podemos ver como en la fermentación utilizando ambas cepas, del hidrolizado de 2AS20, tiene una tendencia a una mayor producción de etanol alcanzando 25,9 g/L para MS04 wt y 24,4 g/L para MS04 (pTrc99A-EndoG), siendo significativamente mayor que el etanol obtenido a partir del hidrolizado de H2O20.

En el caso de la fermentación de la biomasa pretratada con agua durante 20 minutos, se puede apreciar a partir que el valor de etanol que se obtuvo es significativamente menor al etanol obtenido de las fermentaciones con biomasa pretratada con ácido, con excepción de la producción de etanol de la fermentación del hidrolizado del pretratamiento 1AS30 con la cepa MS04 wt.

Estos resultados plantean que aplicar el pretratamiento con agua puede ser una buena alternativa ya que generaría una disminución de costos, al no usar ácido para el pretratamiento y una cantidad menor de base para la neutralización.

En la siguiente tabla se resumen los resultados del proceso SHF con Cellic CTec2 para la sacarificación y la fermentación con las cepas MS04 wt y MS04 (pTrc99A-EndoG), para los hidrolizados de los pretratamientos 1AS30, 2AS20 y H2O20.

Tabla 6. Azúcares y sólidos consumidos, etanol producido y rendimientos de la sacarificación y fermentación por separado de *Arundo donax*.

Pretratamiento	Cepa ¹	Azúcares post sacarificación (g/L)	Azúcares post fermentación (g/L)	Sólidos consumidos ² (g)	Etanol (g/L)	% de rendimiento teórico ³	g etanol/ g biomasa consumida
1AS30	wt	81,87 ± 11,2	12,29 ± 2,04	2,14 ± 0,55	22,1 ± 0,4	64	0,59
	EndoG		14,89 ± 3,54	3,10 ± 0,36	23,0 ± 0,4	69	0,43
2AS20	wt	69,46 ± 8,2	14,01 ± 4,85	2,73 ± 0,04	24,4 ± 1,6	88	0,51
	EndoG		14,30 ± 5,29	2,64 ± 0,22	25,9 ± 0,1	94	0,56
H2O20	wt	66,9 ± 11,1	9,67 ± 1,92	1,43 ± 0,10	18,4 ± 1,8	64	0,74
	EndoG		9,57 ± 0,73	1,61 ± 0,66	19,8 ± 0,4	69	0,71

¹wt, MS04 wt; EndoG, MS04 (pTrc99A-EndoG).

²Posterior a todo el proceso (sacarificación y fermentación).

³ Porcentaje de rendimiento respecto al máximo teórico, 0,51 g etanol/ g glucosa. Calculado usando el promedio de producción de etanol y azúcares consumidos durante la fermentación.

Para la fermentación de la biomasa obtenida luego de los tres pretratamientos, se observa que el rendimiento de etanol por gramo de azúcar, es mayor para la cepa MS04 (pTrc99A-EndoG) respecto a la cepa MS04 wt. Esta ventaja no se ve representada en los niveles de etanol por gramo de sólido consumido, por lo cual se puede asumir que esta enzima facilita la degradación y posterior utilización de los oligosacáridos solubles.

La fermentación de la biomasa obtenida luego del pretratamiento con 2AS20 mostró un rendimiento de 24,4 g/L de etanol y 25,9 g/L de etanol para MS04 wt y MS04-pTrc99A-EndoG, respectivamente.

Se puede apreciar que luego de la fermentación siguen habiendo azúcares solubles en el medio, esto puede deberse a que el tiempo de la fermentación no fue suficiente para que sean consumidos todos los azúcares. Otra explicación, es que el etanol producido esté inhibiendo el metabolismo celular, por lo que los microorganismos son incapaces de seguir procesando los azúcares disponibles y generando etanol¹⁴. Por último, se podría suponer que hubiera azúcares reductores luego de la fermentación que los microorganismos no son capaces de fermentar, por ejemplo celobiosa.

4.3.3. SSF

A continuación, se realizó la sacarificación y fermentación en simultáneo. En este proceso, las dos etapas se realizan en un único reactor, por lo que se ajustaron las condiciones de incubación de forma de no comprometer ninguno de los procesos. 50 mL de hidrolizado fueron incubados con 100 FPU/ g de biomasa y 5 DO de las cepas MS04 wt o MS04 (pTrc99A-EndoG). Se incubó a 39°C, pH 6,2 a 6,4 y 300 rpm durante 96 horas.

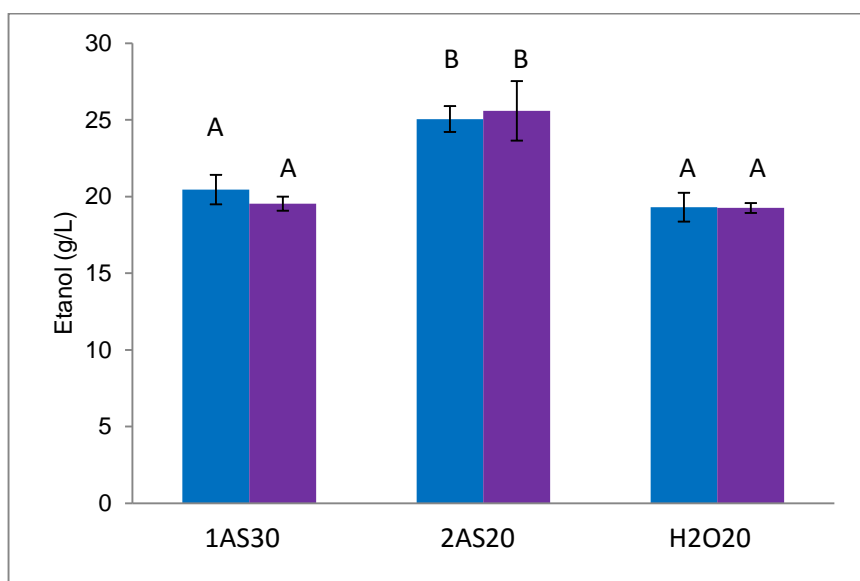


Figura 15. Concentración de etanol después de la sacarificación y fermentación en simultáneo con Cellic C Tec2 (100 FPU/g de biomasa) y utilizando MS04 wt (azul) o MS04 (pTrc99A-EndoG) (violeta) (con IPTG) (DOi 5) durante 96 horas a 39°C, pH 6,2-6,4 para diferentes hidrolizados de *Arundo donax* (1AS30, 2AS20, H₂O₂0). Se realizó análisis estadístico por tukey con p<0,05.

La sacarificación y fermentación en simultáneo (Figura 15) de las diferentes biomásas (con el mismo pretratamiento) no presentan diferencias significativas en los niveles de etanol generados si se comparan las dos cepas evaluadas.

En la fermentación del producto del pretratamiento 2AS20, para ambas cepas, se presenta una producción de etanol significativamente mayor a la del producto de los otros pretratamientos, alcanzando 25,6 g/L de etanol para MS04 wt y 25,06 g/L para MS04 (pTrc99A-EndoG). En este caso, no se ve un patrón tan claro de mayor producción de etanol cuando se utilizó la cepa con actividad endoglucanasa.

Respecto a la producción de etanol luego de la fermentación y sacarificación en simultáneo con el producto de los pretratamientos 1AS30 y H₂O₂0 se obtienen resultados similares, no destacándose la biomasa pretratada con ácido frente a la que se procesó mediante autohidrólisis.

Una hipótesis de los niveles de etanol producidos luego de la fermentación y sacarificación con el producto del pretratamiento con H₂O₂0 es que al no tener inhibidores (ácido acético), las cepas etanológicas no se ven inhibidas, por lo que se produce una cantidad similar de etanol con un menor nivel de azúcares. Otra explicación, es que al haber

menos concentración de azúcares en la fracción líquida inicial las enzimas presentes en el cóctel no estén inhibidas por su propio producto.

En general en la SSF se obtuvieron valores de producción de etanol más altos de lo esperado al comparar con SHF, ya que en la sacarificación y fermentación en simultáneo las condiciones de reacción no son las óptimas ni para las enzimas ni para las bacterias. En ésta se buscan condiciones de reacción que sean medias, para que tanto las enzimas puedan hidrolizar la celulosa como los microorganismos puedan consumir los azúcares presentes transformándolos a etanol.

A continuación se resumen los resultados del proceso SSF con Cellic CTec2 y las cepas MS04 wt y MS04 pTrc99A-EndoG, para los hidrolizados 1AS30, 2AS20 y H2O20.

Tabla 7. Azúcares remanentes, sólidos consumidos, etanol producido y rendimiento para el proceso de sacarificación y fermentación en simultáneo.

Pretratamiento	Cepa ¹	Azúcares solubles post fermentación (g/L)	Sólidos consumidos ² (g)	Etanol (g/L)	g etanol/g biomasa consumida
	wt	16,42 ± 2,14	1,40 ± 0,35	20,46 ± 0,96	0,84
1AS30	EndoG	10,86 ± 1,91	1,70 ± 0,17	19,54 ± 0,46	0,66
	wt	9,07 ± 0,41	1,81 ± 0,61	25,06 ± 0,85	0,80
2AS20	EndoG	10,72 ± 1,19	1,99 ± 0,68	25,60 ± 1,95	0,74
	wt	8,89 ± 0,89	1,00 ± 0,37	19,31 ± 0,94	1,11
H2O20	EndoG	8,10 ± 1,11	1,10 ± 0,11	19,26 ± 0,32	1,01

¹wt, MS04 wt; EndoG, MS04 (pTrc99A-EndoG).

²Posterior a todo el proceso (sacarificación y fermentación).

De esta fermentación no podemos sacar la concentración de azúcares previa a la fermentación ya que estos se van consumiendo a medida que se forman, si podemos comparar la cantidad de etanol que se produce por la cantidad de biomasa consumida.

Podemos ver como la fermentación del hidrolizado a partir del pretratamiento H2O20 es el que tiene un mayor rendimiento respecto a la cantidad de etanol producido a partir de una misma cantidad de sólido consumido, alcanzando 1,11 gramos de etanol por gramo de biomasa consumida con la cepa MS04 wt y 1,01 gramos de etanol por gramo de biomasa consumida en el caso de MS04 (pTrc99A-EndoG). Esto se debe a que la utilización de sólidos es muy baja siendo solamente cerca de un 30% de la biomasa inicial. Dentro de las razones se puede considerar, la agitación durante la fermentación y que el tiempo de residencia no haya sido suficiente. Por un lado, es negativo ya que hay mucha biomasa residual, pero existe un gran potencial si toda la biomasa fuera hidrolizada. En un proceso industrial, se espera que las enzimas logren consumir más biomasa, para así asegurar un rendimiento de producción de azúcares mayor. En todos los casos, las fermentaciones utilizando la cepa MS04 (pTrc99A-

EndoG) muestran una mejor utilización de los sólidos, confirmando la ventaja de expresión *in situ* de celulasas.

Vemos como luego de la fermentación todavía quedan azúcares solubles disponibles, que no fueron aprovechados por los microorganismos para la producción de etanol. Para mejorar la utilización de los mismos, se podría aumentar el tiempo del proceso SSF.

Este proyecto tuvo como fin determinar la combinación del mejor pretratamiento de la biomasa con la configuración de fermentación y la cepa etanológica utilizada para obtener la mayor concentración de etanol. En la figura 16, se comparan los niveles de etanol para SHF y SSF tanto como para la cepa MS04 wt y MS04 (pTrc99A-EndoG) a partir de los hidrolizados 1AS30, 2AS20 y H2O20.

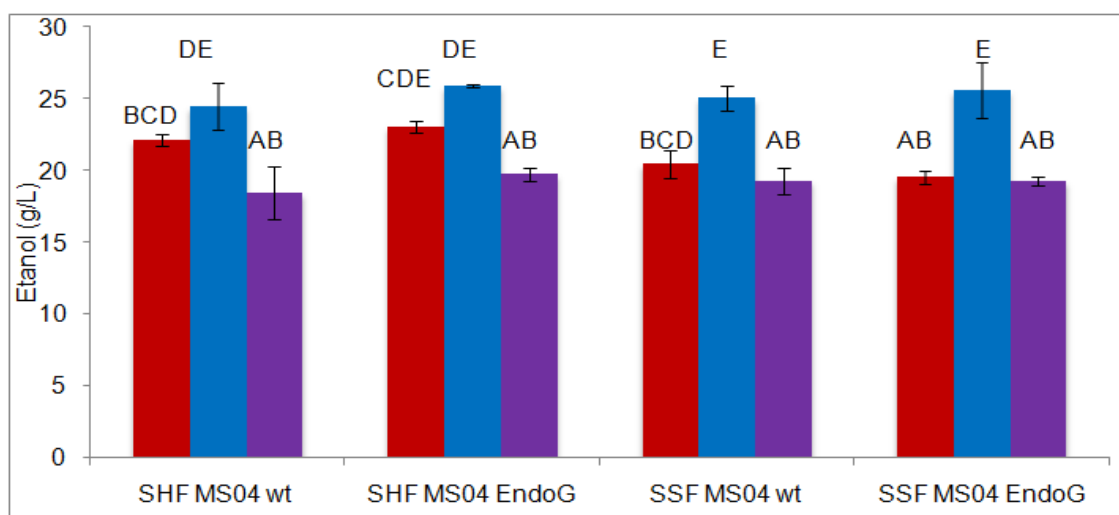


Figura 16. Producción de etanol en esquemas SHF y SSF de las biomásas obtenidas luego de los pretratamientos 1AS30 (rojo), 2AS20 (azul) y H2O20 (violeta), utilizando las cepas MS04 wt y MS04 (pTrc99A-EndoG). Los ensayos se realizaron por triplicado; las barras de error representan el desvío estándar de los resultados. Las letras distintas muestran resultados diferentes significativamente (Test de Tukey con valor de confianza del 95%).

A partir de la Figura 16 se puede observar como en todas las configuraciones la fermentación del producto del pretratamiento 2AS20 tiene una tendencia a producir mayores concentraciones de etanol, siendo significativamente mayor para SHF con MS04 wt y SSF con las dos cepas. También se puede apreciar, comparando un mismo pretratamiento, para SHF y SSF que no hay diferencias significativas entre la concentración de etanol final. Este resultado se puede comparar con la fermentación de *A. donax* utilizando la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* VTT C-10880 capaz de consumir xilosa, en la que se obtuvieron 18,9 g/L de etanol en SSF y 20,6 g/L de etanol en SHF⁴⁰.

Otras investigaciones en las que también compararon estas dos configuraciones utilizando diferentes biomásas a la de este trabajo y *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo productor de etanol, concluyeron que SSF era un mejor proceso debido al tiempo de reacción necesario para producir etanol^{62,63}, uno de ellos fue Saha y colaboradores que utilizando paja de trigo como material lignocelulósico, obtuvieron 13,2 y 13,0 gramos de etanol por litro para SHF y SSF, respectivamente⁶². En otro de estos casos se utilizaron algas como biomasa y la cepa *S. Cerevisiae* KCTC 1126 donde obtuvieron; 8,6 g/L en SHF y 7,6 g/L en SSF⁶⁴.

Utilizando fibras de papel y una levadura (*Pichia stipitis* CBS 5773) se logró obtener en SHF una concentración de 19,6 g/L de etanol, pero este proceso tuvo una duración de 179 horas. En cambio el proceso de SSF fue completado luego de 48 horas produciendo 18,6 g/L de etanol⁶⁵. A partir de rastrojo de maíz, también utilizando levadura se lograron obtener 20,5 gramos de etanol por litro en SSF y 16,8 gramos de etanol por litro en SHF⁶⁶.

A pesar que los resultados obtenidos son de mayor orden o el mismo que los encontrados para otros trabajos de producción de etanol de segunda generación estos valores no llegan a ser suficientes para la destilación y así pudiendo extraer el etanol para su uso. En cambio, si se ha podido investigar más los combustibles de primera generación perfeccionando la obtención de etanol. Se ha logrado obtener con sorgo dulce como biomasa y *Saccharomyces cerevisiae* NP 01 como microorganismo fermentador niveles de hasta 140 g/L de etanol⁶⁷, por otro lado con remolacha se obtuvieron valores de hasta 80 g/L de etanol con *Saccharomyces cerevisiae* IR2⁶⁸.

Respecto al uso de la cepa con actividad endoglucanasa se observa que genera una mayor producción de etanol en la configuración SHF que para la SSF. Esto podría deberse a que a los niveles de EndoG en esta última no son suficientes para hidrolizar los sólidos en presencia del cóctel enzimático, pero si determinan una mejor conversión de la biomasa cuando se usa un proceso de etapas independientes. Como se planteó anteriormente, seguramente la ventaja de EndoG esté relacionada con la degradación de oligosacáridos generados en la sacarificación previa. Por consiguiente, con los valores obtenidos sería mucho más conveniente el uso de la configuración SSF ya que no sólo hay una reducción de costos por la necesidad de solo un reactor y condiciones de temperatura y pH constantes, sino que el tiempo de la reacción es menor, precisamente 48 horas menos que SHF.

5. Análisis Económico

Esta sección no aplica para el proyecto planteado.

6. Conclusiones

Arundo donax tiene un gran potencial como cultivo energético debido a su rápida tasa de crecimiento, fácil adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales y baja demanda de aportes nutricionales, entre otros aspectos.

Luego de probar distintos pretratamientos a esta biomasa, se observó que la aplicación de ácido sulfúrico 1% durante 30 minutos, 2% durante 20 minutos y 2% por 30 minutos, logró una liberación de más de 30 g/L de azúcares reductores. Siendo, los azúcares liberados glucosa, arabinosa y xilosa, representando este último un 76% del total. Se vio claramente un mayor efecto en la solubilización de azúcares con el aumento de ácido que con el aumento del tiempo del pretratamiento.

Como era de esperarse, los pretratamientos generan inhibidores, detectándose ácido acético, en concentraciones crecientes cuanto más concentrado el ácido utilizado. No se detectó furfural ni hidroximetilfurfural en ninguno de los hidrolizados.

La fracción líquida del pretratamiento con ácido sulfúrico 2% durante 30 minutos afecta de mayor manera el crecimiento de *Escherichia coli* debido a los compuestos tóxicos presentes en ella.

Cellic CTec2 presenta actividad β -glucosidasa y es capaz de actuar sobre la fracción sólida luego de los pretratamientos de *A. donax*, aunque se necesitan altas dosis (100 FPU/g de biomasa) de este coctel enzimático para alcanzar mayores rendimientos.

Se observó que para un mismo hidrolizado, los resultados de producción de etanol fueron muy similares, cuando se compara la sacarificación y fermentación por separado con los procesos en simultáneo. La fermentación del hidrolizado obtenido luego del pretratamiento con H_2SO_4 2% durante 20 minutos permitió la generación de 25,9 g/L de etanol en la configuración SHF y 25,6 g/L de etanol en la SSF, utilizando la cepa MS04 (pTrc99A-EndoG). Se puede concluir, entonces, que para la mayor producción de alcohol el mejor pretratamiento para *Arundo donax* es con ácido sulfúrico al 2% por 20 minutos. Respecto a la elección de la configuración de la fermentación se priorizaría SSF, ya que ésta implica una disminución de equipos, materiales, costos provocados por cambios en la temperatura del reactor y reducción del tiempo total de la fermentación.

Respecto a la producción de etanol a partir del hidrolizado del pretratamiento con agua, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos a partir de los otros pretratamientos. Se plantea entonces, considerar esta opción de tratamiento, ya que este generaría un ahorro de gastos, principalmente por la que no requiere de ácidos ni de la etapa de neutralización.

7. Perspectivas

En primer lugar se plantearía realizar el pretratamiento mediante hidrólisis ácida a temperaturas más elevadas, para evaluar si de esta forma se solubilizan más azúcares a la fracción líquida, y se mejora el acceso de las enzimas a la celulosa. También se podrían evaluar otros pretratamientos, como AFEX, Organosolv, pretratamiento alcalino y líquidos iónicos comparando los rendimientos obtenidos.

Esta biomasa tiene la característica que su composición varía dependiendo de las condiciones de cultivo de la planta. Por lo tanto, para un estudio más completo sería una ventaja poder evaluar la composición de *Arundo donax* de partida y luego de cada etapa del proceso.

Los resultados obtenidos en este proyecto son prometedores. Para optimizarlos aún más (el tiempo del proceso, maximizar el consumo de la biomasa sólida, y minimizar los azúcares residuales) es necesario escalar el proceso, evaluando su rendimiento en la producción de etanol, para, potencialmente, montarlo luego en una planta piloto.

8. Referencias bibliográficas

1. Koh LP, Ghazoul J. Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities. *Biol Conserv.* 2008;141(10):2450-2460.
2. Chakraborty S, Aggarwal V, Mukherjee D, Andras K. Biomass to biofuel: a review on production technology. *Asia-Pacific J Chem Eng.* 2012;7:254-262.
3. Seitz F. Raw Material Change in the Chemical Industry and the Role of Biomass. En: Behrens M, Datye K. A, editores. *Catalysis for the Conversion of Biomass and Its Derivatives*; 2013. p 15-42.
4. Gouveia L, Oliveira AC. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009;36(2):269-274.
5. Naik SN, Goud V V., Rout PK, Dalai AK. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2010;14(2):578-597.
6. Xu Q, Singh A, Himmel ME. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Curr Opin Biotechnol.* 2009;20(3):364-371.
7. Li, Y et al. Biofuels from Microalgae. *Biotechnol Prog.* 2008;24:815-820.
8. Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sustain Energy Rev.* 2010;14(2):557-577.
9. Everingham YL, Muchow RC, Stone RC, Inman-Bamber NG, Singels A, Bezuidenhout CN. Enhanced risk management and decision-making capability across the sugarcane industry value chain based on seasonal climate forecasts. *Agric Syst.* 2002;74(3):459-477.
10. Goh CS, Lee KT. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renew Sustain Energy Rev.* 2010;14(2):842-848.
11. Maurya DP, Singla A, Negi S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech.* 2015;5(5):597-609.
12. Fernández-Sandoval MT, Huerta-Beristain G, Trujillo-Martinez B, et al. Laboratory metabolic evolution improves acetate tolerance and growth on acetate of ethanologenic *Escherichia coli* under non-aerated conditions in glucose-mineral medium. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;96(5):1291-1300.
13. Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res.* 2009;48(8):3713-3729.
14. Limayem A, Ricke SC. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog Energy Combust Sci.* 2012;38(4):449-467.
15. Shatalov AA, Pereira H. Xylose production from giant reed (*Arundo donax L.*): Modeling and optimization of dilute acid hydrolysis. *Carbohydr Polym.* 2012;87:210-217.

16. Sluiter JB, Ruiz RO, Scarlata CJ, Sluiter AD, Templeton DW. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *J Agric Food Chem.* 2010;58(16):9043-9053.
17. Templeton DW, Scarlata CJ, Sluiter JB, Wolfrum EJ. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 2. Method Uncertainties. *J Agric Food Chem.* 2010;58(16):9054-9062.
18. Angelini LG, Ceccarini L, Bonari E. Biomass yield and energy balance of giant reed (*Arundo donax* L.) cropped in central Italy as related to different management practices. *Eur J Agron.* 2005;22:375-389.
19. Lemons e Silva CF, Schirmer MA, Maeda RN, Barcelos CA, Pereira N. Potential of giant reed (*Arundo donax* L.) for second generation ethanol production. *Electron J Biotechnol.* 2015;18:10-15.
20. Pilu R. Giant reed (*Arundo donax* L.): A weed plant or a promising energy crop? *African J Biotechnol.* 2012;11(38):9163-9174.
21. Komolwanich T, Tatijareern P, Prasertwasu S, et al. Comparative potentiality of Kans grass (*Saccharum spontaneum*) and Giant reed (*Arundo donax*) as lignocellulosic feedstocks for the release of monomeric sugars by microwave/chemical pretreatment. *Cellulose.* 2014;21(3):1327-1340.
22. López F, García J C, Pérez A, Feria M. J, Zamudio M A.M. GG. Chemical and energetic characterization of species with a high-biomass production: Fractionation of their components. *Environ Prog.* 2010;29(4):499-509.
23. Gírio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol.* 2010;101(13):4775-4800.
24. Jeon YJ, Xun Z, Rogers PL. Comparative evaluations of cellulosic raw materials for second generation bioethanol production. *Lett Appl Microbiol.* 2010;51(5):518-524.
25. Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew Energy.* 2012;37:19-27.
26. Angelini LG, Ceccarini L, Nasso Di Nasso N, Bonari E. Comparison of *Arundo donax* L. and *Miscanthus x giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: Analysis of productive characteristics and energy balance. *Biomass and Bioenergy.* 2009;33(4):635-643.
27. Viikari L, Vehmaanperä J, Koivula A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. *Biomass and Bioenergy.* 2012;46:13-24.
28. Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol.* 2010;101(13):4851-4861.
29. Brodeur G, Yau E, Badal K, Collier J, Ramachandran KB, Ramakrishnan S. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Res.* 2011;2011:1-17.
30. Wahono SK, Darsih C, Rosyida VT, Maryana R, Pratiwi D. Optimization of cellulose enzyme in the simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse on the second-generation bioethanol production technology. *Energy Procedia.* 2014;47:268-

31. Balan V. Current challenges in commercially producing biofuels from lignocellulosic biomass. *ISRN Biotechnol.* 2014;2014:1-31.
32. Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog Energy Combust Sci.* 2012;38(4):522-550.
33. Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 2005;96(6):673-686.
34. Scordia D, Cosentino SL, Lee JW, Jeffries TW. Dilute oxalic acid pretreatment for biorefining giant reed (*Arundo donax L.*). *Biomass and Bioenergy.* 2011;35(7):3018-3024.
35. Zheng Y, Pan Z, Zhang R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agric Biol Eng.* 2009;2(3):51-68.
36. Chandel AK, Chandrasekhar G, Silva MB, Silvério da Silva S. The realm of cellulases in biorefinery development. *Crit Rev Biotechnol.* 2012;32(3):187-202.
37. Jørgensen H, Kutter JP, Olsson L. Separation and quantification of cellulases and hemicellulases by capillary electrophoresis. *Anal Biochem.* 2003;317:85-93.
38. Neves M a, Kimura T, Shimizu N, Nakajima M. State of the Art and Future Trends of Bioethanol Production. *Dyn Biochem Process Biotechnol Mol Biol.* 2007;1:1-14.
39. Lee R. Lynd, Paul J. Weimer WH van Z and IS. *Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008.* *Microbiol Mol Biol.* 2002;66(3):506-577.
40. Ask M, Olofsson K, Di Felice T, et al. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochem.* 2012;47(10):1452-1459.
41. El Senado y la Cámara de Representantes de la República Oriental del Uruguay reunidos en AG. Ley N° 18.195 AGROCOMBUSTIBLES. [Internet]. Uruguay: Parlamento [citado 20 febrero 2016]. Disponible desde: <http://www.parlamento.gub.uy/leyes/ AccesoTextoLey.asp?Ley=18195&Anchor=>
42. ANCAP. Biocombustibles, información general. [Internet]. Uruguay: ANCAP [citado 15 febrero 2016]. Disponible desde: <http://www.ancap.com.uy>
43. ALUR (Alcoholes del Uruguay). Etanol. [Internet]. Uruguay: ALUR 2014 [citado 15 febrero 2016]. Disponible desde: <http://www.alur.com.uy/biodiesel-actualizacion.html>
44. ALUR (Alcoholes del Uruguay). Biodiesel [Internet]. Uruguay: ALUR [citado 20 febrero 2016]. Disponible desde: <http://www.alur.com.uy/biodiesel.html>
45. Siri-Prieto, G. Switchgrass como alternativa energética en el Uruguay. *Cangüe.* 2012;32: 31-39.
46. MIEM (Ministerio de Industria E y M. Energías Renovables [Internet]. Uruguay: MIEM [citado 20 febrero 2016]. Disponible desde: <http://www.miem.gub.uy/web/energia/publicaciones-y-estadisticas/energias-renovables>
47. Renewables B. Beta Renewables. Co Webpage. 2013. [Internet]. Italia: Beta Renewables [citado 20 febrero 2016]. Disponible desde:

<http://www.betarenewables.com/crescentino/project>.

48. DuPont USA Global Headquarters [Internet].USA:DuPont[citado 20 febrero 2016]. Disponible desde:<http://www.dupont.com/>
49. POET-DSM Advanced Biofuels [Internet].USA: POET-DSM[citado 20 febrero 2016]. Disponible desde: <http://www.poetdsm.com/>.
50. Jimenez AM, Gosset G, Hernandez GT, Huerta G, Trujillo B, Inventores; Strains of *Escherichia coli* modified by metabolic engineering to produce chemical compounds from hydrolyzed lignocellulose, pentoses, hexoses and other carbon sources. EUA 8563283, México 31474 and 3127021; October 2013.
51. Loaces I, Bottini G, Moyna G, Fabiano E, Martínez A, Noya F. EndoG: A novel multifunctional halotolerant glucanase and xylanase isolated from cow rumen. J Mol Catal B Enzym. 2016;126:1-9.
52. Miller EN, Jarboe LR, Turner PC, et al. Furfural inhibits growth by limiting sulfur assimilation in ethanologenic *Escherichia coli* strain LY180. Appl Environ Microbiol. 2009;75(19):6132-6141.
53. Novozymes A/S. Cellic® CTec2 and HTec2-Enzymes for Hydrolysis of Lignocellulosic Materials; Applications.Reporte No. 2010-01668-01; Novozymes: Bagsvaerd, Denmark, 2010. [Internet]: [citado 10 febrero 2016]. Disponible desde:<http://bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/cellic/Documents/Cellic%20application%20sheet.pdf>
54. Sluiter J, Nrel a S, Sluiter a. Summative Mass Closure Laboratory Analytical Procedure (LAP).Reporte NREL/TP-510-48087; NREL,July 2011 [Internet]: [citado 10 febrero 2016]. Disponible desde:<http://www.nrel.gov/docs/gen/fy11/48087.pdf>
55. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal Chem. 1959;31(3):426-428.
56. Sluiter a, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of Sugars, Byproducts , and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP).Reporte: NREL/TP-510-42623; NREL2008[Internet]: [citado 10 febrero 2016]. Disponible desde: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42623.pdf>
57. Scordia D, Cosentino SL, Lee J-W, Jeffries TW. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax L.*) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. Biomass and Bioenergy. 2012;39:296-305.
58. De Bari I, Liuzzi F, Villone A, Braccio G. Hydrolysis of concentrated suspensions of steam pretreated *Arundo donax*. Appl Energy. 2013;102:179-189.
59. Cotana F, Cavalaglio G, Gelosia M, Nicolini A, Coccia V, Petrozzi A. Production of bioethanol in a second generation prototype from pine wood chips. Energy Procedia. 2014;45:42-51.
60. Russell JB. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. J Appl Bacteriol. 1992;73(5):363-370.

61. Roe AJ, Mclaggan D, Davidson I, et al. Perturbation of Anion Balance during Inhibition of Growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1998;180(4):767-772.
62. Saha BC, Nichols NN, Cotta MA. Comparison of separate hydrolysis and fermentation versus simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biobased Mater Bioenergy*. 2013;7(3):409-414.
63. Dahnum D, Tasum SO, Triwahyuni E, Nurdin M, Abimanyu H. Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. *Energy Procedia*. 2015;68:107-116.
64. Cho Y, Kim M, Kim S. Ethanol Production from Seaweed, *Enteromorpha intestinalis*, by Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) and Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) with *Saccharomyces cerevisiae*. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J*. 2013;28(6):366-371.
65. Marques S, Alves L, Roseiro JC, Girio FM. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass and Bioenergy*. 2008;32(5):400-406.
66. Ohgren K, Bura R, Lesnicki G, Saddler J, Zacchi G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochem*. 2007;42(5):834-839.
67. Nuanpeng S, Laopaiboon L, Srinophakun P, Klanrit P, Jaisil P, Laopaiboon P. Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation. *Electron J Biotechnol*. 2001;14:4-16.
68. Ogbonna JC, Mashima H, Tanaka H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresour Technol*. 2001;76:1-8.
69. Martinez A, Grabar TB, Shanmugam KT, Yomano LP, York SW, Ingram LO. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli*. *B. Biotechnol Lett*. 2007;29(3):397-404.

9. Anexos

8.1. Anexo I. Medios de cultivo

8.1.1. LB

Componente	Concentración final (g/L)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agar	16

Se disuelven los componentes en 1L de agua destilada y se esteriliza por autoclave durante 20 minutos a 121°C.

8.1.2. AM1

Se realizó según Martínez et al.⁶⁹ con modificaciones.

Componente	Solución stock (g/L)	mL/L	Concentración final (g/L)
NH ₄ H ₂ PO ₄	17,4	50	0,87
Na ₂ HPO ₄	52,6		2,63
KCl	149,0	1	0,149
MgSO ₄ 7H ₂ O	246,5	1	0,247
Betaina	117,2	1	0,117
Ácidocítrico	50,0	2	0,1
Acetato de sodio	200,0	10	2
Micronutrientes		1,5	

Se prepara mezclando los componentes con agua destilada.

8.2. Anexo II. Soluciones amortiguadoras

8.2.1. Buffer citrato de sodio 0,05M

Soluciones madre

Componente	Concentración (M)	Solución
Ácidocitríco	0,1	A
Citrato de sodio	0,1	B

Para obtener un buffer a pH 5, mezclar 10,2 mL de la solución A y 14,7 mL de la solución B y llevar a 50 mL con agua destilada, ajustar el pH y completar a volumen final (50 mL). Conservar a temperatura ambiente.

8.2.2. Buffer ácido cítrico- Na_2HPO_4 pH 2,6 – 7,6

Soluciones madre

Componente	Concentración (M)	Solución
Ácidocitríco	1	A
Na_2HPO_4	2	B

Para conseguir un buffer a pH 5, combinar 48,50 mL de la solución A y 51,50 mL de la solución B y ajustar el pH. Para obtener este buffer a pH 7 mezclar 17,65 mL de la solución A y 82,35 mL de la solución B y ajustar el pH. Almacenar a temperatura ambiente.

8.3. **Anexo III.** Reactivos analíticos

8.3.1. Reactivo ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)

Componente	Concentración final (g/L)
DNS	10,6
NaOH	19,8
Tartrato de NaK	306
Metabifosfito de Na	8,3
Fenol	7,6 mL

Agregar los componentes en agua destilada, agitar hasta la solubilización completa y ajustar el volumen deseado.