



Universidad de Valladolid

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA E
INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

TESIS DOCTORAL:

**ETANOL CELULÓSICO: DESARROLLO DE
UNA TECNOLOGÍA ÓPTIMA PARA LA
PRODUCCIÓN SEMI-CONTINUA**

Presentada por Patricia Portero Barahona para
optar al grado de
Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dr. Jesús Martín Gil
Dr. Enrique Javier Carvajal

DEDICATORIA

A mi ángel, Carlos Francisco

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mis directores Dr. Jesús Martín Gil y Dr. Javier Carvajal por su paciencia y apoyo constante en el desarrollo del trabajo doctoral. Porque a pesar de todos los impasses en este proceso aún siguen conmigo, guiándome y acompañándome.

Al Dr. Pablo Martín-Ramos, por su paciencia, apoyo y guía. Por su profesionalismo y buena predisposición de ayuda.

Al Dr. Luis Manuel Navas, por darme la apertura en la UVA para el programa doctoral, y sobre todo por su colaboración en todo el proceso.

A la Dra. Adriana Correa por ser una buena anfitriona en el laboratorio de la UVA. Y por el cariño brindado en mi estancia en Palencia.

Agradecer hoy y siempre a mi familia. A mis padres Francisco y Guadalupe, hermanos Paco y Vanne, cuñada Pao y sobrino Nico, por su amor y apoyo incondicional. Y sobre todo por creer y confiar en mí.

A Carlos mi querido esposo, por su amor, por estar junto a mi y darme la fuerza y fortaleza que a veces necesito. Gracias por hacer mi vida de colores.

A Bernardo, por su amistad sincera. Por ser siempre tú.

Al equipo CNIB, que en todos estos años me han acompañado en este proceso

A Iosody y Marciabella que fueron mis compañeras de laboratorio en Palencia. A Iosody que hasta el último momento me ha brindado su ayuda.

A la comunidad UVA que de una u otra forma han contribuido en el desarrollo de este trabajo doctoral.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
0 MÉRITO CIENTÍFICO.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 MATERIAS PRIMAS PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL.....	3
1.1.1 Fuente de azúcar	3
1.1.2 Fuente de almidón	4
1.2 CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN DIFERENTES MATERIAS PRIMAS	5
1.2.1 Azúcares mono y disacáridos	5
1.2.2 Almidón.....	5
1.2.3 Biomasa lignocelulósica.....	6
1.3 BIOETANOL DE PRIMERA GENERACIÓN	9
1.3.1 Bioetanol a partir de fuente de azúcar	9
1.3.2 Bioetanol a partir de fuentes de almidón	10
1.4 BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	10
1.4.1 Bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica.....	11
1.5 PRODUCCIÓN DE ETANOL LIGNOCELULÓSICO	11
1.5.1 Técnicas de pretratamiento de biomasa.....	11
1.5.2 Sacarificación de polímeros de glucosa.....	19
1.5.3 Fermentación	22
1.6 ENFOQUES TECNOLÓGICOS PARA MEJORAR EL RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD DEL ETANOL	27
1.6.1 Proceso de fermentación e hidrólisis por separado (SHF)	28
1.6.2 Proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF).....	28
1.6.3 Proceso de sacarificación y co-fermentación simultánea (SSCF).....	29
1.6.4 Bioproceso consolidado (CBP)	29
1.7 JUSTIFICACIÓN.....	31
1.8 OBJETIVOS.....	34
2. MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1 MATERIALES.....	36
2.1.1 Reactivos	36

2.1.2 Equipos	36
2.1.3 Softwares	37
2.2 SELECCIÓN DE LEVADURAS PARA FERMENTACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL CELULÓSICO	38
2.2.1 Cepas de Levaduras	38
2.2.2 Identificación de levaduras a nivel de especie.....	38
2.2.3 Pruebas de asimilación y fermentación de azúcares.....	40
2.2.4 Efecto de la fuente y concentración inicial de nitrógeno en el perfil de consumo de glucosa de <i>S. cerevisiae</i>	41
2.2.5 Concentración mínima de nitrógeno requerida para la fermentación.....	42
2.2.6 Co-fermentaciones de diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> con reutilización de biomasa celular	43
2.2.7 Cinética de producción de etanol y consumo de glucosa	44
2.3 CARACTERIZACIÓN DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR	45
2.3.1 Materia prima: Bagazo de caña de azúcar	45
2.3.2 Análisis químico del bagazo de caña de azúcar	45
2.4 PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	46
2.4.1 Preparación de la muestra.....	46
2.4.2 Pretratamientos químicos con reactor de presión	46
2.4.3 Pretratamientos químicos con irradiación de microondas	47
2.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA FRACCIÓN DE HOLOCELULOSA DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR.....	48
2.6 FERMENTACIÓN EN BATCH.....	49
2.7 SISTEMA DE FERMENTACIÓN SEMI-CONTINUO ACOPLADO A SACARIFICACIÓN SIMULTÁNEA (SFSS).....	50
2.7.1 Pretratamiento de biomasa lignocelulósica	51
2.7.2 Pre-hidrólisis enzimática	52
2.7.3 Acondicionamiento del sistema de fermentación semi-continuo acoplado a sacarificación simultánea (SFSS)	52
2.8 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	53
2.8.1 Determinación de azúcares reductores totales (TRS).....	53
2.8.2 Análisis de HPLC	54
2.8.3 Análisis de ATR-FTIR	55
2.8.4 Análisis estadístico	55
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
3.1 SELECCIÓN DE LEVADURAS PARA PRODUCCIÓN DE ETANOL CELULÓSICO	56

3.1.1	Identificación molecular a nivel de especie de levaduras.....	57
3.1.2	Caracterización fisiológica de levaduras en base a la utilización de diferentes fuentes de carbono	58
3.1.3	Efecto de la fuente y concentración inicial de nitrógeno en el perfil de consumo de glucosa de <i>S. cerevisiae</i>	64
3.1.5	Co-fermentación de diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> con reutilización de biomasa celular	68
3.1.6	Cinética de fermentación	71
3.2	CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.....	73
3.3	CONDICIONES DE PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO.....	74
3.3.1	Pretratamientos álcali y ácidos en reactor de presión.....	75
3.3.2	Pretratamiento alcalino con organosolvente en microondas	80
3.4	SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LA FRACCIÓN HOLOCELULÓSICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR	86
3.5	FERMENTACIÓN DE AZÚCARES	90
3.6	SISTEMA DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA SEMICONTINUA (SFSS)	92
4.	CONCLUSIONES.....	96
	REFERENCIAS	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas que presentan los sistemas combinados de producción de bioetanol: SHF, SSF, SSCF y CBP.	30
Tabla 2. Respuestas de asimilación y fermentación de diferentes fuentes de carbono de 150 cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
Tabla 3. Efecto de diferentes fuentes y concentración de nitrógeno en el consumo de glucosa de levaduras	66
Tabla 4. Concentración de etanol y rendimiento teórico de etanol de diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Condiciones de fermentación: 34°C, 200 rpm por 24 horas.	73
Tabla 5. Composición del bagazo de caña de azúcar (estudio y referencias)	74
Tabla 6. Fracción sólida (%) obtenida después de pretratamiento de bagazo de caña de azúcar.....	78
Tabla 7. Resultados de la prueba de Tukey (HSD). Análisis de las diferencias entre los dos medios de reacción con un intervalo de confianza del 95% (TRS (%) rendimiento). "1" significa el medio de pretratamiento con sulfolane-TiO ₂ y "2" para el medio sin este	81
Tabla 8. Producción de TRS a partir de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar para diferentes temperaturas, concentraciones de NaOH y tiempos de reacción con y sin sulfolane-TiO ₂	83
Tabla 9. Producción de TRS a partir de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar para pretratamientos alcalinos con diferentes temperaturas y tiempos con reactor de presión	85
Tabla 10. Prueba de Tukey (HSD) para el pretratamiento de mw + sulfolane-TiO ₂ . Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% (rendimiento TRS (%)) para temperatura (arriba), concentración de NaOH (centro) y tiempo (abajo)	85
Tabla 11. Composición de sacáridos obtenidos a partir de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar pretratado.....	88
Tabla 12. Etanol y rendimiento de etanol producido por fermentación de bagazo de caña de azúcar pretratado.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de etanol (2007 – 2017)	1
Figura 2. Ilustración de la estructura de lignocelulosa: celulosa, hemicelulosa y lignina	7
Figura 3. Reacción de la lignocelulosa con NaOH.....	16
Figura 4. Acción del complejo enzimático de celulasas.....	21
Figura 5. Acción del complejo enzimático de xilanasas	22
Figura 6. Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a partir de glucosa durante la fermentación	24
Figura 7. Metabolismo de <i>Zymomonas mobilis</i> a partir de glucosa durante la fermentación.....	25
Figura 8. Sistemas de fermentación: discontinuo (batch), alimentado (fed-batch) y continuo	27
Figura 9. Esquema de los sistemas SHF, SSF, SSCF y CBP.....	30
Figura 10. Región ITS del ADN ribosomal, que comprende gen 5.8S y espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2.....	40
Figura 11. Plano isométrico de la biorrefinería CNIB-PUCE.....	52
Figura 12. Esquema general del proceso SFSS	53
Figura 13. Perfil de restricción de la región ITS. Carril 1: ladder 100 pb; carril 2: región its (800 pb); carril 3: digestión de ITS con la enzima HhaI (390 pb, 380 pb, 270 pb); carril 4: digestión de ITS con la enzima HaeIII (305 pb, 260 pb, 200 pb, 170 pb); y carril 5: digestión de ITS con la enzima HinfI (350 pb)	57
Figura 14. Glucosa consumida por diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> después de 24 horas de fermentación a diferentes concentraciones de hidrolizado de levadura (0; 0,2; 0,3 y 0,4 gN/l).....	67
Figura 15. . Patrones de restricción del DNA mitocondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Carriles: 1 y 16 marcador 1000 bp. Cepas tipo:CLQCA-10-099 (carril 2), CLQCA-INT-001 (carril 3), CLQCA-INT-005 (carril 4) y UCLM (carril 5). Cepas (carril 6 -15).....	69
Figura 16. Reutilización de biomasa celular en co-cultivo de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por ciclos de fermentación (ciclo de fermentación: 24 horas)	71
Figura 17. Concentración de glucosa y etanol durante la fermentación con diferentes cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Condiciones 34°C, 160 rpm por 24 horas....	72

Figura 18. Espectro de ATR-FTIR de la fracción sólida recuperada después de pretratamientos álcali y ácidos a 160°C for 20 min en reactor de presión.	80
figura 19. Cinética sfss de bagazo de caña de azúcar usando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : concentración de etanol (% v/v) y concentración de glucosa (%).....	95

RESUMEN

El bioetanol como combustible tiene una alta demanda en todo el mundo. Los principales actores en el mercado del etanol son Estados Unidos, Brasil, China, Canadá y Alemania. Sin embargo, otros países necesitan expandir su producción de etanol para reemplazar los combustibles fósiles. En este contexto, las tecnologías de etanol celulósico se enfrentan a nuevos desafíos y oportunidades. En este trabajo, reportamos la producción de etanol a partir de celulosa (bagazo de caña de azúcar) utilizando un enfoque novedoso que disminuye el tiempo de sacarificación, reduce la necesidad de enzimas y reduce los costos de producción. La cepa de levadura CLQCA-INT-005 se seleccionó entre 150 aislados de *Saccharomyces cerevisiae* por su alta dominancia en co-cultivos y alto rendimiento de etanol. Por otro lado, la biomasa se trató previamente con hidróxido de sodio, ácido sulfúrico, ácido oxálico y ácido maleico (1% p/v) a diferentes temperaturas (130-170°C) y tiempos (10-30 minutos) en un reactor de presión. Además se realizaron pretratamientos alcalinos con irradiación con microondas y organosolvente (sulfolane-TiO₂) a diferentes temperaturas y tiempos. El pretratamiento con NaOH al 1% p/v a 160°C durante 20 minutos demostró ser el más eficaz para la sacarificación enzimática. Una vez establecidos los parámetros de pretratamiento y fermentación se utilizó un sistema de fermentación y sacarificación simultánea semi-continua (SFSS) con producción de etanol cada 24 h. Una mezcla sólido: líquido en la proporción 1:3 se sometió a hidrólisis y fermentación; el proceso se produjo a lo largo de 30 días con un agotamiento casi total de la glucosa, obteniendo concentraciones de etanol que oscilaron entre 8,36 y 10,79% (v/v). Con este sistema se optimizó la cantidad de enzimas necesarias para la sacarificación, así como el tiempo de producción y la concentración de etanol, alcanzando niveles similares a los del etanol de primera generación. Todo el sistema mostró estabilidad, facilidad de gestión y control, así como la repetitividad de los resultados a lo largo de 30 días. Por lo tanto, el sistema propuesto en esta investigación podría mejorar la rentabilidad en la producción de etanol celulósico a escala industrial.

ABSTRACT

Bioethanol such as fuel around the world has a high demand. The main players in the ethanol market are the United States, Brazil, China, Canada and Germany. However, other countries need to expand their ethanol production to replace fossil fuels. In this context, cellulosic ethanol technologies face new challenges and opportunities. In this work, we report the production of ethanol from cellulose (sugar cane bagasse) using a novel approach that shortens saccharification time, reduces the need for enzymes and reduces production costs. The yeast strain CLQCA-INT-005 was selected from 150 isolates of *Saccharomyces cerevisiae* due to its high dominance in co-cultures and high ethanol yield. However, the biomass was previously treated with sodium hydroxide, sulfuric acid, oxalic and maleic acid (1% w/v) in a pressure reactor at different temperatures (130-170°C) and times (10-30 minutes). In addition, alkaline pretreatments were carried out with irradiation using microwave and organosolvent (sulfolane-TiO₂) at different temperatures and times. The pretreatment with NaOH at 1% w/v at 160°C for 20 minutes proved to be the most effective for enzymatic saccharification. Once the pretreatment and fermentation parameters were established a semi-continuous fermentation and simultaneous saccharification (SFSS) strategy was used, attaining fermented liquor every 24 h. A ratio of solid: liquid mixture (1:3) was subjected to hydrolysis and fermentation; the process took place over 30 days with an almost total depletion of glucose, obtaining ethanol concentrations ranging between 8.36 and 10.79% (v/v). The amount of enzymes needed for saccharification was optimized, as well as the production time and ethanol concentration, reaching levels similar to those of the first generation ethanol. The entire system showed stability, ease of management and control, as well as the repetitiveness of the results over 30 days. Hence, the system can improve profitability in the production of cellulosic ethanol for industrial scale.

0 MÉRITO CIENTÍFICO

Solicitud de patente de invención: Producción de etanol celulósico por sacarificación y fermentación simultánea en un sistema de cultivo semi-continuo (SSFSCC)

SERVICIO NACIONAL DE DERECHOS INTELECTUALES

SOLICITUD A LA DIRECCIÓN DE PATENTES

Datos de la Solicitud	
Tipo de Patente	Patente de Invención
No. de Solicitud	SENADI-2018-86358
Fecha y hora de presentación	04/12/2018 15:11:07

Oficina que atenderá el trámite
MATRIZ QUITO: (todas las demás provincias e internacionales)

Título de la patente
PRODUCCIÓN DE ETANOL CELULÓSICO POR SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA EN UN SISTEMA DE CULTIVO SEMI-CONTÍNUO (SSFSCC)

Clasificación internacional de patentes
C12P7/10,C12P7/06

Solicitantes	
- 1 -	
Tipo de identificación	Ruc
Número de documento	1790105601001
Nombre	Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Dirección	Av. 12 de Octubre 1076 y Roca
País de Nacionalidad	Ecuador
Ciudad	Quito
Email	LAVERA@puce.edu.ec
Teléfono	(593)2991700
Fax	(593)22991700

Inventores/Diseñadores	
- 1 -	
Tipo de identificación	Cédula
Número de documento	1706348768
Nombre	ENRIQUE JAVIER CARVAJAL BARRIGA
Dirección	Av. 12 de Octubre 1076 y Roca
País de Nacionalidad	Ecuador
Ciudad	Quito
Email	ejcarvajal@puce.edu.ec
Teléfono	59323820319
Fax	

- 2 -	
Tipo de identificación	Cédula
Número de documento	1803431640
Nombre	PORTERO BARAHONA PATRICIA
Dirección	Av. 12 de Octubre 1076 y Roca
País de Nacionalidad	Ecuador
Ciudad	Quito

SERVICIO NACIONAL DE
DERECHOS INTELECTUALES

Email	pportero@puce.edu.ec
Teléfono	59322991700
Fax	

Invencción referente a procedimiento biológico	
Lugar de depósito	Fecha

Declaraciones de prioridad		
País	Número	Fecha

Representante Legal o Apoderado	
Tipo de representación	Representante
Tipo de identificación	Cédula
Número de documento	1801667476
Nombre	Fernando Clemente Ponce León
Dirección	Av. 12 de Octubre 1076 y Roca
Email	rektorado@puce.edu.ec
Teléfono	022991700
Fax	

Resumen
Esta invencción describe la producción de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica pretratada física y químicamente, la misma que es sometida a una sacarificación enzimática y fermentación simultánea en un sistema de cultivo semi-continuo (SSFSCC) El proceso comprende las siguientes etapas: 1.- Prehidrólisis (licuefacción) de la biomasa lignocelulósica pretratada; 2.- Aclimatación de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; de preferencia la cepa CLQCA-INT-005, perteneciente a la Colección de Levaduras Quito Católica, CLQCA-PUCE; 3.- Sacarificación enzimática y fermentación simultánea en cultivo semi-continuo (SSFSCC). La concentración de etanol se mantiene dentro del rango de 8 a 11% (v/v), en un período de tiempo de 24 horas o menos.

Observaciones
Se adjunta una figura, con su respectiva descripción, la misma que está referida en la memoria técnica

Descuento
Se adjunta un documento habilitante para acceder a un descuento.

Documentos que se acompañan a la solicitud
<ul style="list-style-type: none">• Comprobante de tasa de Mantenimiento• Memorias técnicas• Reivindicaciones• Dibujos• Cesión de Derecho• Declaración Juramentada

Memoria descriptiva de la patente: Producción de etanol celulósico por sacarificación y fermentación simultánea en un sistema de cultivo semi-continuo (SSFSCC)

TÍTULO DE LA INVENCIÓN:

**PRODUCCIÓN DE ETANOL CELULÓSICO POR SACARIFICACIÓN Y
FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA *EN UN SISTEMA DE CULTIVO SEMI-
CONTÍNUO (SSFSCC)***

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE PATENTES

C12P7/10, C12P7/06

CAMPO TECNOLÓGICO

Esta invención se relaciona con procesos de producción de etanol mediante un sistema SSFSCC; siendo características esenciales de la invención las etapas particulares de su proceso; de tal forma que cada una de ellas en conjunto permite la optimización del mismo.

En este contexto, la invención se circunscribe dentro del ámbito de la química orgánica, bioquímica y procesos enzimáticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El agotamiento de los combustibles fósiles y el cambio climático son problemas que han fomentado la investigación y el desarrollo de tecnologías alternativas que generan sustitutos y/o complementos a las fuentes de combustibles fósiles¹. Los combustibles

¹ TESFAW A. & ASSEFA F., “*Current Trends in Bioethanol Production by Saccharomyces cerevisiae: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth variables, Coculture, and Immobilization*”. International Scholarly Research Notices, 2014.

fósiles se generan a partir de materia orgánica acumulada durante largos períodos de tiempo. El reemplazo natural de estas fuentes ocurre a tasas muy bajas, por lo tanto, estas se consideran fuentes no renovables. Por otro lado, los biocombustibles que provienen de una fuente renovable, como la biomasa, se han considerado como un sustituto de los combustibles derivados del petróleo ⁽²⁾. Principalmente, la biomasa vegetal es un material de interés porque está disponible, tanto como cultivos o residuos de actividades industriales, y puede usarse con fines energéticos ⁽³⁾.

Las residuos y/o desechos obtenidos de la agricultura y la industria como el bagazo de caña de azúcar, el rastrojo de maíz, paja de trigo y arroz, astillas de madera, etc., pueden considerarse materiales lignocelulósicos adecuados para la producción de bioetanol de segunda generación ⁽⁴⁾. La producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica (principalmente compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina) requiere cuatro pasos: (i) pretratamiento de biomasa, (ii) sacarificación enzimática a monómeros de azúcar, (iii) fermentación de azúcares hidrolizados a etanol, y (iv) destilación ⁽⁵⁾.

La mayoría de las investigaciones se ha centrado en la optimización de la hidrólisis y la fermentación por separado (SHF). Como resultado de la hidrólisis enzimática, la glucosa

² CHEN H. & FU X., “*Industrial Technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass*”. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016.

³ RASTOGI M. & SHRIVASTAVA S., “*Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes*”. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2017.

⁴ NANDA S., AZARGOHAR R., DALAI A.K. & KOZINSKI J.A., “*An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining*”. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2015.
MANIOCHIO C., ANDRADE B.R., RODRÍGUEZ R.P. & MORAES B.S., “*Ethanol from biomass: a comparative overview*”. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2017.

⁵ ZABED H., SAHU J.N., BOYCE A.N. & FARUQ G., “*Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches*”. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2016.

BEHERA S., ARORA R., NANDHAGOPAL N. & KUMAR S., “*Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass*”. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2014a.

y celobiosa pueden acumularse en el medio, produciendo un efecto inhibitor sobre las enzimas celulasas (⁶); siendo este el principal problema en el proceso de SHF.

Por otro lado, en el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) descrito en el estado de la técnica, la glucosa liberada (sacarificación enzimática) puede fermentarse rápidamente en etanol mediante la utilización simultánea de levaduras. Este consumo continuo de productos (glucosa) minimiza la inhibición de la actividad enzimática, previene el estrés osmótico en las células de levadura y reduce el riesgo de contaminación por transformación inmediata de azúcares en etanol, manteniendo bajos niveles de azúcar y una alta concentración de etanol (⁷). Sin embargo, esta SSF presenta desventajas, principalmente en términos de la temperatura a la que se debe ejecutar el proceso; la temperatura óptima para la hidrólisis enzimática es de 50-55°C, mientras que la temperatura adecuada para la fermentación está entre 35-37°C⁸. Por lo que se debe establecer una temperatura óptima que no afecte la actividad enzimática y de fermentación durante el proceso.

Con estos antecedentes, esta invención se ha centrado en modificar ciertas etapas del proceso, a fin de hacerlo más rentable y tecnológicamente más factible.

Respecto al estado de la técnica de patentes; se puede apreciar que todos los documentos descritos están relacionados con el proceso de pretratamiento de la biomasa seguida de una etapa de sacarificación y fermentación simultánea (SSF).

⁶ ALFANI F., GALLIFUOCO A., SAPOROSI A., SPERA A. & CANTARELLA M., “*Comparison of SHF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat Straw*”. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2000.

⁷ DAHNUM D., TASUM S.O., 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.

ALBERNAS-CARVAJAL Y., CORSANO G., GONZÁLEZ CORTÉS M. & GONZÁLEZ SUÁREZ E., “*Preliminary design for simultaneous saccharification and fermentation stages for ethanol production from sugar cane bagasse*”. Chemical Engineering Research and Design. 2017.

⁸ OLOFSSON K., BERTILSSON M. & LIDÉN G., “*A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks*”, Biotechnological Biofuels. 2008.

Las solicitudes de patentes ES2382575, CU23986, US2017321231, US2017044329, WO2004046333, ES2559177, ES2427731, WO2009025547, US2011171710, WO2010098694 y US20100035318, consideradas las más cercanas a la invención, describen procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SSF), sin embargo ninguno de ellos hace referencia a un sistema de cultivo semi-continuo (SSFSCC) como una etapa esencial que se incorpora en esta invención; así como también, el estado de la técnica no describe características esenciales ni condiciones específicas utilizadas en esta invención, para lograr la optimización del proceso de producción de bioetanol, como se verá más adelante.

Adicionalmente, se encuentran artículos científicos que dan cuenta de investigaciones relacionadas solamente con procesos de hidrólisis y fermentación por separado (SHF) y/o sacarificación y fermentación simultánea (SSF), o una combinación de las mismas, pero en ningún caso describen –como parte de sus procesos- etapas de *cultivo semi-continuo (SSFSCC)*.

Para superar los problemas anteriormente mencionados, esta invención trabaja en el efecto de varias modificaciones en el proceso destinadas a lograr un aumento en la productividad y en el rendimiento del etanol.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un proceso de sacarificación y fermentación simultánea en un sistema de cultivo semi-continuo (SSFSCC), que implica la optimización de los procesos para la producción de etanol de segunda generación mediante la implementación de un sistema de cultivo semi-continuo; a condiciones específicas para su desarrollo.

PROCESO DE SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA EN CULTIVO SEMI-CONTINUO (SSFSCC)

Este proceso comprende las siguientes etapas:

1. Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica y prehidrólisis (licuefacción) de la fracción celulósica;
2. Aclimatación de las cepas de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*; de preferencia, cepas de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* CLQCA-INT-005, perteneciente a la Colección de Levaduras Quito Católica, CLQCA-PUCE;
3. Sacarificación enzimática y fermentación simultánea *en cultivo semi-continuo (SSFSCC)*.

1. Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica y prehidrólisis (licuefacción) de la fracción celulósica

Pretratamiento físico-químico:

La biomasa lignocelulósica se tritura y tamiza para luego pretratarla con soluciones de hidróxido de sodio (1%, p/v) a 160°C durante 20 minutos. El proceso se lleva a cabo en un reactor a presión.

Como resultado se obtiene la biomasa lignocelulósica pretratada.

Este pretratamiento físico-químico es un paso previo en el proceso SSFSCC, y no es materia de protección de esta invención.

Prehidrólisis (licuefacción):

Se añade en el biorreactor del 10%-30% de la fracción celulósica de la biomasa lignocelulósica pretratada (producto obtenido del pretratamiento físico-químico) con una solución tampón a fin de llevar la mezcla a un pH 4,5; posteriormente se añade entre el 1-8 UPF/g de enzimas celulasas/hemicelulasas y se incuba por un periodo de tiempo de 2-6 horas a 55°C a 200 rpm. Finalmente, a esta mezcla licuada (prehidrolizada) se añade del 5%-15% de la fracción celulósica de la biomasa lignocelulósica pretratada, para alcanzar una concentración de sólidos entre el 15 al 45%.

En esta etapa se obtiene la fracción celulósica hidrolizada a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada

2. Aclimatación de las cepas de levadura

Se aclimatan cepas de *Saccharomyces cerevisiae*; en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* CLQCA-INT-005 (perteneciente a la Colección de Levaduras Quito Católica, CLQCA-PUCE), en medios de hidrolizado de biomasa pretratada (producto obtenido en la etapa 1.) y medio de cultivo YPD (extracto de levadura, peptona y de dextrosa) en relación: 0,25:0,75; 0,5:0,5; 0,75:0,25 v/v, respectivamente.

En esta etapa se obtienen cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* aclimatadas; en particular, cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* CLQCA-INT-005 aclimatadas.

3. Sacarificación enzimática y fermentación simultánea en cultivo semi-continuo (SSFSCC)

La sacarificación y fermentación simultánea en cultivo semi-continuo (SSFSCC) se lleva a cabo en un biorreactor donde se añade la mezcla de la fracción celulósica hidrolizada a

partir de la biomasa lignocelulósica (producto obtenido en la etapa 1.) con $1 \times 10^6 - 1 \times 10^9$ células/mL de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* aclimatada; de preferencia, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* CLQCA-INT-005 (producto obtenido en la etapa 2.), y se lleva a una temperatura de 30°C y 100 rpm por 25 días.

Cada 24 horas o menos, se retira el 10% (del volumen total) de la mezcla del biorreactor y se añade el 10% de la mezcla de fracción celulósica hidrolizada a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada (producto obtenido en la etapa 1).

ENSAYOS QUE SUSTENTAN LA INVENCION

1. Análisis químico de la biomasa lignocelulósica

Se caracteriza la biomasa lignocelulósica por tres métodos diferentes: (i) fibra detergente neutra FDN (Método MO-LSAIA-02.01); (ii) fibra detergente ácida: FDA (Método MO-LSAIA -02.02); y, (iii) detergente ácido lignina: ADL (Método MO-LSAIA-02.03).

La celulosa, la hemicelulosa y la lignina se cuantifican de acuerdo con McIntosh & Vancov (McIntosh & Vancov, 2011).

2. Medición del rendimiento de azúcar y etanol

Las concentraciones de azúcar y etanol se analizan mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), a 79°C, con H₂SO₄ a 5 mM como eluyente a un caudal de 0,6 ml/min y un volumen de inyección de 10 µL. Se usa una columna de intercambio iónico H⁺ de ácido orgánico. Los azúcares y etanol se detectan por un detector de índice de refracción. Los compuestos se identifican por sus tiempos de retención relativa y se cuantifican sobre la base de una curva de calibración preparada con azúcares estándar y productos de fermentación.

El rendimiento teórico de etanol (%) es calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de etanol (\%)} = (\text{Cetanol} / 0.51 \times \text{Cglucosa}) \times 100$$

Donde:

Cetanol = concentración de etanol al final de la fermentación (en g/L);

Cglucosa = concentración de glucosa en el comienzo de la fermentación (en g/L); y,

0,51 = es el factor de conversión para la glucosa a etanol basado en la bioquímica estequiométrica de la levadura.

3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los procesos de sacarificación enzimática y fermentación simultánea en cultivo semi-continuo (SSFSCC) se analizan en el software IBM SPSS Statistics. Los resultados se someten al análisis de varianza (ANOVA) y los medios se comparan mediante la prueba HSD de Tukey.

RESULTADOS (Fig. 1).

En el proceso de sacarificación y fermentación simultánea en un sistema de cultivo semi-continuo SSFSCC, la concentración del etanol cada 24 horas o menos se mantiene dentro del rango de 8 a 11% (v/v), mediciones realizadas durante un periodo de 25 días.

Tabla 1. Resultados obtenidos de concentración de glucosa (g/L) y concentración de etanol (% v/v) en un período de 25 días:

RESULTADOS		
Tiempo días	Concentración de etanol <i>Cetanol</i> (% v/v)*	Concentración de glucosa <i>Cglucosa</i> (g/L.)*
1	10,79	0,00
2	8,98	0,00
3	9,14	0,00
4	8,43	8,31
5	9,27	22,61
6	8,75	4,70

7	9,80	4,33
8	9,73	4,82
9	8,36	4,33
10	8,60	7,01
11	9,21	8,25
12	9,47	7,36
13	9,09	7,84
14	9,83	4,64
15	8,57	3,76
16	9,57	8,62
17	9,81	8,68
18	9,75	9,51
19	9,12	9,54
20	9,05	7,52
21	9,67	0,00
22	9,66	0,00
23	9,08	0,00
24	9,68	0,00
25	9,39	0,00

* Promedio de tres pseudorréplicas

EJEMPLO DE REALIZACIÓN

A continuación se describe un ejemplo de realización de esta invención, sin que ello implique o limite el alcance de protección de la misma:

- a) La biomasa lignocelulósica se tritura y tamiza para luego pretratarla con hidróxido de sodio (1% p/v) a una temperatura de 160°C por 20 minutos, en un reactor a presión.
- b) Se añade en el biorreactor el 30% de la fracción celulósica hidrolizada a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada, con una solución tampón y se lleva a un pH 4,5; luego se añade a la mezcla 3 UPF/g. de enzimas celulasas/hemicelulasas, y se incuba por 4 horas a 55°C a 200 rpm.
- c) A esta mezcla licuada (prehidrolizada) se añade el 5% de la fracción celulósica hidrolizada a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada
- d) Paralelamente, se aclimata cepas de *Saccharomyces cerevisiae*; de preferencia, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* CLQCA-INT-005, en cuatro soluciones de

hidrolizado y medio de cultivo YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) en relación: 0,25:0,75; 0,5:0,5; 0,75:0,25 v/v.

- e) La sacarificación y fermentación simultánea *en cultivo semi-continuo (SSFSCC)* se lleva a cabo en un biorreactor donde se añade la mezcla de la fracción celulósica hidrolizada a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada con 1×10^6 UFC-mL⁻¹ de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CLQCA-INT-005 aclimatada, y se lleva a una temperatura de 30°C y 100 rpm por 25 días.
- f) Cada 18 horas, se retira el 10% del volumen de la mezcla del biorreactor (producto fermentado) y se añade el 10% de la fracción celulósica hidrolizada enzimáticamente a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada

VENTAJAS TÉCNICAS

Este sistema en general ofrece una mayor eficiencia en la producción de etanol celulósico, debido a la reducción en el tiempo de producción, la optimización del espacio en los biorreactores; disminución en los tiempos de puesta en marcha de los reactores; y, lo más importante, el ahorro de enzimas. Todas estas mejoras apuntan a reducir los costos de producción industrial del etanol de segunda generación.

De los resultados del proceso se obtiene una concentración de etanol (Cetanol) que se mantiene dentro del rango de 8 a 11% (v/v), en un periodo de tiempo de 24 horas o menos. Estos valores no han sido superados por el estado de la técnica en este tiempo (24 horas o menos), como se puede apreciar en la tabla 2:

Tabla 2. Valores comparativos de los resultados de esta invención vs los resultados encontrados en el estado de la técnica:

Proceso**	Levaduras	Enzimas UPF/g	Tiempo (horas)	Concentración de etanol Cetanol (% v/v)	Referencias Bibliográficas
SSFSCC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CLQCA-INT-005	1-8	24 h o menos	8-11	<u>Esta invención</u>
S-SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> comercial	15-50	18 horas de pre- hidrólisis enzimática, 60 horas de fermentación	4, 99	Jie Lu, <i>et al</i> (2013) ⁹
SSCF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SyBE005	20	48 h. 24 – 96h.	3,15 2,53 – 3,80	Lei Qin, <i>et al.</i> , (2017) ¹⁰
SSF	----	-----	29,5 – 45,5 h.	2,52 – 2,79	Yailet Albornas- Carvajal, <i>et al.</i> , (2016) ¹¹
SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast No. 1701 (DER CIEMAT Culture Collection, Spain)	-----	30 – 50 h.	2,53 – 2,79	Yailet Albornas- Carvajal, <i>et al.</i> , (2017) ¹²
SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 180 (60x 6 tiempos)	72h.	11,14	Cheng Ningning, <i>et al.</i> , (2017) ¹³
SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JRC5	15	24 h.	2,90	Jairam Choudhary, <i>et al.</i> , (2017) ¹⁴
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JRC6			2,85	
SHF SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40	72 horas de fermentación por SHF 24 horas por SSF	4,74 6,05	Deliana Dahnum, <i>et al.</i> , (2015) ¹⁵
SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15	48 h.	2,45	Jianlong He, <i>et al.</i> , (2016) ¹⁶

⁹ JIE LU, et al., “Fed-batch semi-simultaneous saccharification and fermentation of reed pretreated with liquid hot water for bio-ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*”. Table 2. Bioresource Technology. 2013

¹⁰ LEI QIN, et al., “Dual effect of soluble materials in pretreated lignocellulose on simultaneous saccharification and co-fermentation process for the bioethanol production”. Bioresource Technology. 2017

¹¹ YAILET ALBERNAS-CARVAJAL, et al., “Preliminary desing for simultaneous saccharification and fermentation stages for ethanol production from sugar cane bagasse”. Chemical Engineering Research and Design. 2016.

¹² YAILET ALBERNAS-CARVAJAL, et al., “Preliminary desing for simultaneous saccharification and fermentation stages for ethanol production from sugar cane bagasse”. Chemical Engineering Research and Design. 2017.

¹³ CHENG NINGNING, et al., “Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation Conditions with Amphipathic Lignin Derivatives for Concentrated Bioethanol Production”, página 132. Bioresource Technology.2017

¹⁴ CHOUDHARY JAIRAM, et al., “Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse enviroments”, página 345, Tabla 4. Vol. 123. Elsevier. 2017

¹⁵ DAHNUM DELIANA, et al., “Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty Fruit bunch”, página 115, ScienceDirect. Elsevier. 2015

¹⁶ JIANLONG HE, et al., “Optimization of prehydrolysis time and substrate feeding to improve ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of furfural process residue”, página 1, abstract. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol xx, No. xx, 1-7. 2016

SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR5048	123	96 h.	2,18	Sureeporn Kumneadklang, <i>et al.</i> , (2015) ¹⁷
SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> As2.489	10-15	72 h.	1,93	Jingbo Li, <i>et al.</i> , (2014) ¹⁸
L+PSSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KF-7	10-20	96h 48h	5,90 – 5,52 5,77	Hiroto Nishimura, <i>et al.</i> , (2017) ¹⁹
SSF		20	96 h	2,19	Hilares Ruly Terán, <i>et al.</i> , (2017) ²⁰
SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	----	5,07	Holofsson Kim, <i>et al.</i> , (2008) ²¹

*Los valores de la concentración de etanol encontrados en el estado de la técnica son transformados de g/L. a %v/v

**Proceso:

SSFSCC: Sacarificación y fermentación simultánea en un sistema de cultivo semi-continuo

S-SSF: Sacarificación y fermentación semi-simultánea

SSCF: Sacarificación y co-fermentación simultánea

SSF: Sacarificación y fermentación simultánea

SHF: Hidrólisis y fermentación por separado

L+PSSF: Licuefacción sucesiva, pre-sacarificación, sacarificación y fermentación simultánea.

Del pretratamiento de la biomasa lignocelulósica y prehidrólisis (licuefacción) de la fracción celulósica.-

El objetivo de un pretratamiento y prehidrólisis (licuefacción) de la biomasa lignocelulósica -como una primera etapa de este proceso-, es facilitar el acceso de las enzimas celulasas para convertir la celulosa en azúcares fermentables mediante hidrólisis. Un pretratamiento y prehidrólisis adecuado puede aumentar la digestibilidad del material, generando un impacto en el rendimiento de etanol después de la fermentación.

¹⁷ SUREEPORN KUMNEADKLANG, *et al.*, “Bioethanol production from oil palm frond by simultaneous saccharification and fermentation”, página 790. ScienceDirect. Elsevier. 2015.

¹⁸ JINGBO LI, *et al.*, “One-pot simultaneous saccharification and fermentation: A preliminary study of a novel configuration for cellulosic ethanol production”, páginas 176-177, Tabla 2, Figura 3. Bioresource Technology. 2014

¹⁹ HIROTO NISHIMURA, *et al.*, “Production of ethanol from a mixture of Waste paper and kitchen Waste via a process of successive liquefaction, presaccharification, and simultaneous saccharification and fermentation”, abstract. Waste Management. Elsevier. 2017

²⁰ HILARES RULY TERÁN, *et al.*, “Ethanol production in a simultaneous saccharification and fermentation process with interconnected reactors employing hydrodynamic cavitation-pretreated sugarcane bagasse as raw material”. Bioresource Technology. 2017

²¹ KIM OLOFSSON, *et al.*, “A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks”. Biotechnology for Biofuels. 2008

En pretratamientos químicos se pueden generar inhibidores de fermentación; por lo que, la elección de un adecuado pretratamiento es uno de los aspectos importantes como parte del desarrollo de SSFSCC.

Es importante una adecuada selección de cepas de levadura; en nuestro caso en particular, las cepas de la Colección de Levaduras Quito Católica CLQCA-PUCE, pueden convertir eficientemente los azúcares en etanol y lograr así una satisfactoria capacidad fermentativa de levadura.

La prehidrólisis de la fracción celulósica permite manejar grandes cargas de sólidos; así como, tiene la ventaja de utilizar una menor cantidad de enzimas, dando como resultado una mayor productividad de etanol y optimización del proceso.

La reducción sustancial en el uso de enzimas (1-8 UPF/g.), es una de las mayores ventajas de esta invención, misma que se desprende del proceso SSFSCC, y que no ha sido superado por ninguno de los procesos descritos en las anterioridades; pues el estado de la técnica menciona la utilización de no menos de 10 UPF/g.

De la sacarificación enzimática y fermentación simultánea en un sistema de cultivo semi-continuo SSFSCC. -

A partir de los resultados obtenidos en esta invención (Tabla 2), se puede observar que el proceso SSFSCC presenta evidentes ventajas y diferencias notables:

1.- Se trata de un proceso SSFSCC en la cual incorpora una etapa de cultivo semi-continuo, a diferencia de los procesos citados en los artículos científicos donde no contemplan esta etapa.

2.- La utilización de cepas de levaduras muy particulares (*Saccharomyces cerevisiae* CLQCA-INT-005), perteneciente a la Colección de Levaduras Quito Católica, CLQCA-PUCE.

3.- La reducción en la cantidad de enzimas (1-8 UPF/g.), ningún documento del estado de la técnica logra desarrollar un proceso con la utilización de una concentración similar o menor de enzimas como la lograda en esta invención.

4.- La obtención de etanol en una concentración de 8 a 11 % v/v en un tiempo de 24 horas o menos, no se alcanza en periodos de tiempo cortos por el estado de la técnica.

Todas estas mejoras del proceso que se traducen en ventajas técnicas evidentes que tienen un impacto positivo en la economía de los proyectos de biorrefinería a escala industrial para la obtención de etanol a partir de materia lignocelulósica.

De la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* CLQCA-INT-005, perteneciente a la Colección de Levaduras Quito Católica, CLQCA-PUCE.

El rendimiento de la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* CLQCA-INT-005 está directamente relacionado a su alta tolerancia a etanol, dominancia ante otras cepas similares y alto rendimiento en fermentación.

Ventajas frente a solicitudes de patentes y artículos científicos. -

En relación a las solicitudes de patentes del estado de la técnica ES2382575, CU23986, US2017321231, US2017044329, WO2004046333, ES2559177, ES2427731, WO2009025547, US2011171710, WO2010098694 y US20100035318, consideradas las más cercanas a la invención, describen procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SSF), ninguno de ellos hace referencia a un sistema de cultivo semi-continuo

(SSFSCC) como una etapa esencial de esta invención que se incorpora al proceso SSF; así como también, el estado de la técnica no describe características esenciales ni las condiciones específicas utilizadas en esta invención, para lograr la optimización del proceso de producción de bioetanol.

La solicitud de patente española ES2382575, se refiere a un proceso de sacarificación enzimática y fermentación simultánea SSF, donde se añade porciones adicionales de biomasa pretratada y de enzimas de sacarificación, pudiendo repetir uno o más pasos por varias veces; como consecuencia de esto puede conducir a una sobrecarga de sólidos. Para poder superar este problema en la presente invención, cada 24 horas o menos, se retira el 10% (del volumen que alberga el biorreactor) del producto de fermentación del biorreactor y se añade el 10% de la biomasa lignocelulósica pretratada e hidrolizada (producto obtenido en la etapa 1.), obteniéndose una producción diaria de producto fermentado.

Con la incorporación de esta etapa del proceso SSFSCC se evita la inhibición enzimática por acumulación de producto y se llega a una fermentación completa de glucosa, con concentraciones de 8 – 11 % de etanol a lo largo de todo el proceso.

Adicionalmente las etapas y condiciones del proceso SSF de esta solicitud española son diferentes a los de la presente invención.

Las solicitudes CU23986, US2017321231, US2017044329, ES2559177, ES2427731, WO2009025547, US2011171710, WO2010098694 y US20100035318 son similares a esta invención solamente en el pretratamiento físico y químico (que no es materia de protección de esta invención) del proceso SSF, mientras que las siguientes etapas difieren totalmente; así como, en estas solicitudes de patente no se menciona el sistema de cultivo semi-continuo SSFSCC.

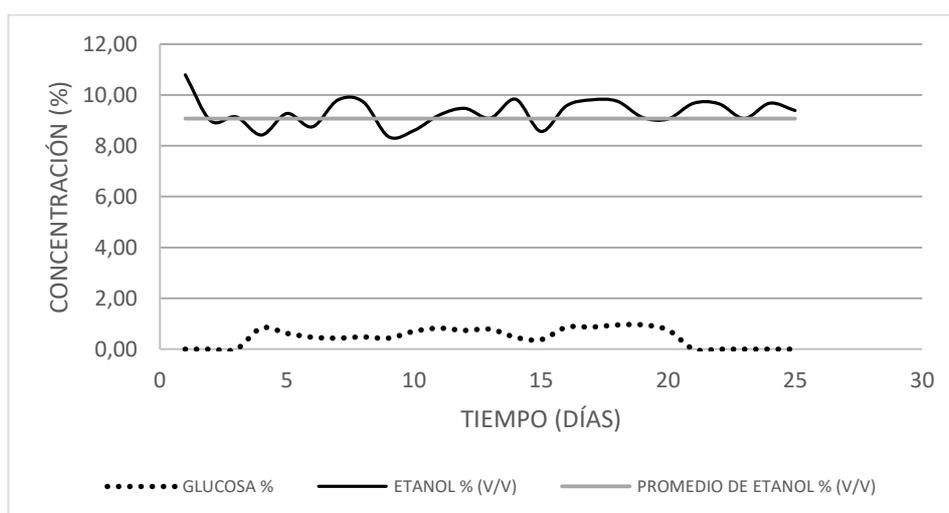
La solicitud de patente WO2004046333, presenta un proceso SSF diferente a la presente invención; toda vez que esta solicitud de patente –a diferencia de esta invención- se fundamenta en el uso de una glucoamilasa y una levadura termotolerante.

Adicionalmente, en esta solicitud no se menciona el sistema de cultivo semi-continuo SSFSCC.

En relación a artículos científicos publicados, se puede apreciar que los mismos dan cuenta de investigaciones relacionadas solamente con procesos de hidrólisis y fermentación por separado (SHF) y/o sacarificación y fermentación simultánea (SSF), o una combinación de las mismas, en condiciones que difieren de la presente invención y en ningún caso describen –como parte de sus procesos- una etapa de cultivo semi-continuo (SSFSCC).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL GRÁFICO

Fig. 1. Cinética del proceso SSFSCC de la fracción celulósica hidrolizada a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada de la biomasa usando *Saccharomyces cerevisiae*.



REIVINDICACIONES

1.- Un proceso de sacarificación y fermentación simultánea *en un sistema de cultivo semi-continuo SSFSCC*, para la producción de etanol de la fracción celulósica a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada física y químicamente, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

1. Prehidrólisis (licuefacción) de la fracción celulósica a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada;
2. Aclimatación de las cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*; de preferencia la cepa CLQCA-INT-005;
3. Sacarificación enzimática y fermentación simultánea *en cultivo semi-continuo (SSFSCC)*.

2.- El proceso de la reivindicación 1 caracterizado porque la prehidrólisis (licuefacción) de la fracción celulósica a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada de la etapa 1 del proceso, comprende: **(i)** suspender el 10%-30% de la fracción celulósica a partir de la biomasa lignocelulósica pretratada, en solución tampón a un pH 4,5; **(ii)** adicionar a la mezcla entre 1-8 UPF/g de enzimas celulasas/hemicelulasas e incubar por un periodo de tiempo de 2-6 horas a 55°C a 200 rpm; **(iii)** a esta mezcla prehidrolizada (licuada) añadir el 5%-15% restante de la biomasa celulósica pretratada.

3.- El proceso de la reivindicación 1 caracterizado porque en la etapa 2 del proceso, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, de preferencia la cepa CLQCA-INT-005, se aclimata en medios de cultivo en concentraciones crecientes de hidrolizado lignocelulósico.

4.- El proceso de la reivindicación 3 caracterizado porque los medios de cultivo comprenden: la biomasa lignocelulósica pretratada e hidrolizada resultante de la etapa 1

del proceso, y un medio de cultivo YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa), en relación: 0,25:0,75; 0,5:0,5; 0,75:0,25 v/v, respectivamente.

5.- El proceso de la reivindicación 1 caracterizado porque la sacarificación enzimática y fermentación simultánea en *cultivo semi-continuo (SSFSCC)* de la etapa 3 del proceso, comprende: (i) en un biorreactor conteniendo la biomasa lignocelulósica pretratada e hidrolizada resultante de la etapa 1 del proceso, inocular $1 \times 10^6 - 1 \times 10^9$ UFC-mL⁻¹ de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*; de preferencia la cepa CLQCA-INT-005 aclimatadas resultantes de la etapa 2 del proceso; (ii) mantener en el reactor a una temperatura de 30°C y agitación de 100 rpm; (iii) cada 24 horas o menos, retirar el 10% de la mezcla del biorreactor y alimentar el sistema con igual volumen de mezcla de biomasa lignocelulósica pretratada e hidrolizada obtenida en la etapa 1 del proceso y 1-8 UPF/g enzimas celulasas/hemicelulasas, por un lapso de 25 días.

6.- El proceso de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la concentración de etanol se mantiene dentro del rango de 8 a 11% (v/v), en un periodo de tiempo de 24 horas o menos.

7.- El proceso de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque dicho proceso se desarrolla a escala laboratorio, planta piloto y escalamiento industrial.

RESUMEN

Esta invención describe la producción de etanol a partir de una biomasa lignocelulósica pretratada física y químicamente, la misma que es sometida a una sacarificación enzimática y fermentación simultánea en un sistema de cultivo semi-continuo (SSFSCC).

El proceso comprende las siguientes etapas:

1. Prehidrólisis (licuefacción) de la biomasa lignocelulósica pretratada;

2. Aclimatación de levadura *Saccharomyces cerevisiae*; de preferencia la cepa CLQCA-INT-005, perteneciente a la Colección de Levaduras Quito Católica, CLQCA-PUCE;
3. Sacarificación enzimática y fermentación simultánea *en cultivo semi-continuo* (SSFSCC).
4. La concentración de etanol se mantiene dentro del rango de 8 a 11% (v/v), en un periodo de tiempo de 24 horas

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la seguridad energética y ambiental son los principales problemas en el mundo que han impulsado la búsqueda de fuentes de energías alternativas y amigables con el ambiente. (Arevalo-Gallegos, Ahmad, Asgher, Parra-Saldivar, & Iqbal, 2017).

El bioetanol es una de las alternativas más prometedoras para los combustibles fósiles, ya que éste puede ser producido a partir de diversas fuentes renovables. Algunos países, como Estados Unidos, Brasil, miembros de la Unión Europea (UE), China, Canadá y varios estados ya tienen en marcha programas de producción de bioetanol para reducir el consumo y dependencia de los combustibles fósiles. Estados Unidos y Brasil principalmente producen etanol a partir de maíz y caña de azúcar, respectivamente, siendo los mayores productores de etanol en el mundo (aproximadamente 85%). Es evidente el aumento de la producción de bioetanol con el tiempo, por ejemplo Estados Unidos ha incrementado drásticamente desde 175 millones de galones en 1980 hasta 16000 millones de galones e 2017 (Figura 1) (U.S. Department of Energy, 2017).

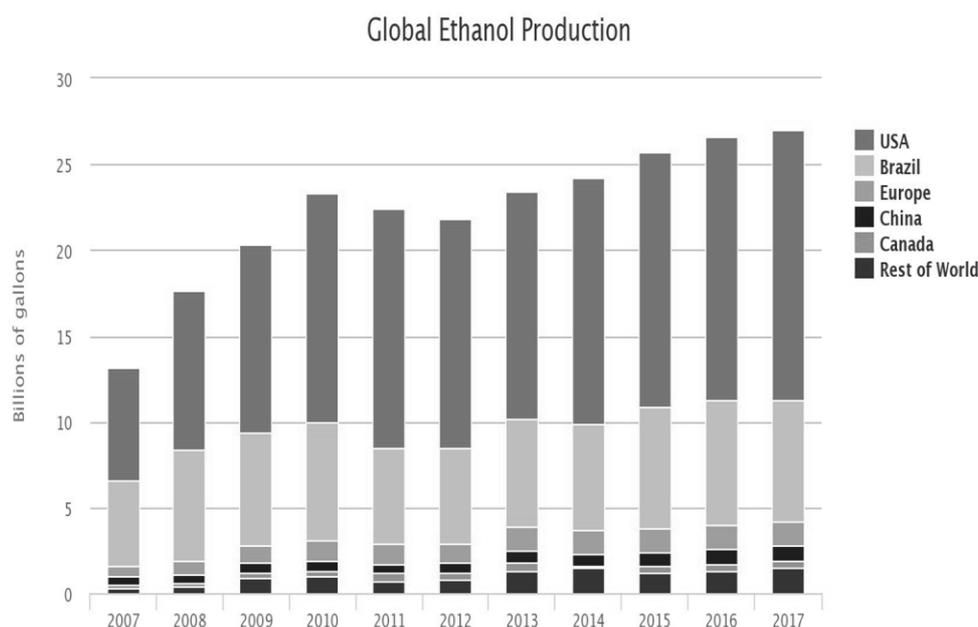


Figura 1. Producción mundial de etanol (2007 – 2017)

El etanol (C_2H_5OH) es una fuente energética que presenta ventajas sobre la gasolina (C_7H_{17}). A pesar de que un litro de etanol contiene el 66% de energía en comparación con la energía proporcionada por la misma cantidad de gasolina, el bioetanol presenta algunas ventajas: i) tiene mayor octanaje en relación a la gasolina, permitiendo que se quemé a una compresión más alta con menor tiempo de combustión; ii) presenta una alta entalpía de evaporación; iii) mayor velocidad de llama laminar; y iv) mayor calor de vaporización. Todas estas características garantizan la eficiencia volumétrica de la mezcla de etanol en comparación con la gasolina pura, mejorando la potencia de salida (Nigam & Singh, 2011).

Por otro lado, el etanol contiene 34,7% de oxígeno, resultando en un 15% más eficiente en la combustión con relación a la gasolina, esto particularmente implica la disminución de la emisión de partículas y óxidos de nitrógeno. Además, el etanol contiene una cantidad insignificante de azufre, disminuyendo la emisión de óxido de azufre al ambiente (Nigam & Singh, 2011). De igual forma, se ha comprobado que el etanol es un sustituto seguro al metil terciario butil éter (MTBE) que se utiliza para potenciar el octanaje en la gasolina y para disminuir la producción de monóxido y dióxido de carbono. Por lo tanto, con todas las características mencionadas se corrobora que el etanol es un combustible eficiente alternativo a los combustibles fósiles.

Las principales fuentes renovables utilizadas para la producción de bioetanol se clasifican en azúcares, almidón y biomasa lignocelulósica. El etanol obtenido de azúcares y almidón es referido a bioetanol de primera generación; mientras que a partir de la biomasa lignocelulósica se produce bioetanol de segunda generación (Vohra, Manwar, Manmode, Padgilwar, & Patil, 2014)

1.1 MATERIAS PRIMAS PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

1.1.1 Fuente de azúcar

Las materias primas a base de azúcar incluyen los cultivos energéticos de caña de azúcar, remolacha azucarera y sorgo dulce; frutas como la uva, dátiles, melón de agua y manzana; y los residuos de la refinación de azúcar como la melaza de la caña de azúcar y remolacha.

Las ventajas de utilizar cultivos de azúcar como materia prima para la producción de bioetanol son el alto rendimiento de azúcar y los bajos costos de conversión; sin embargo su limitante es la disponibilidad estacional de los cultivos (Ferreira, Brancoli, Agnihotri, Bolton, & Taherzadeh, 2018)

La caña de azúcar es una de las principales materias primas utilizada para la producción de etanol, tanto el jugo del tallo y el subproducto de las refinerías de azúcar (melaza) se han utilizado para producción de bioetanol a lo largo de muchos años, principalmente en Brasil. Esta es una planta C4 que tiene una alta capacidad para convertir energía solar en biomasa, y crece en países tropicales y subtropicales. El jugo de caña contiene azúcares fácilmente fermentables (alto contenido de sacarosa), además de nutrientes orgánicos y minerales. La disponibilidad del cultivo es alta, presentando una producción global de 360 millones de toneladas/año y un rendimiento del cultivo de 60–79,5 t/ha. Por otro lado, los residuos son una buena fuente para generar electricidad y bioetanol de segunda generación. Por lo tanto, la caña de azúcar se ha convertido en una materia prima prometedora para el bioetanol (Tyagi, Lee, Mulla, Garg, & Chae, 2019) (Khattab & Watanabe, 2019)

1.1.2 Fuente de almidón

Los cultivos de almidón son ampliamente utilizados para la producción de bioetanol debido a su disponibilidad en todo el mundo, facilidad de conversión, capacidad de almacenamiento por períodos largos y alto rendimiento de etanol. Estas materias primas incluyen cereales (60–80% de almidón), tubérculos y raíces (60–90% de almidón), leguminosas (25–50% almidón), y frutas verdes e inmaduras (hasta un 70% de almidón). Los granos de maíz, sorgo, trigo, yuca, papas y camotes son fuentes conocidas de etanol combustible.

El maíz es un importante cultivo de cereales ampliamente utilizado para la producción de bioetanol a escala comercial y su uso se ha incrementado en los últimos años. América del Norte, Asia, Europa y América del Sur, son los mayores productores de maíz. Estados Unidos es el productor principal de etanol a partir de maíz; en el 2014 produjo 14,3 billones de galones, y exportó 825 millones de galones de etanol a 51 países de todo el mundo.

1.1.3 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica puede dividirse en cultivos energéticos, plantas acuáticas, materiales forestales, residuos agrícolas y fracción sólida orgánica de desechos municipales. En general la biomasa lignocelulósica parece ser una fuente abundante en todo el mundo; la producción global de biomasa vegetal es aproximadamente 200×10^9 t/año, donde se pueden usar casi 8×10^9 - 20×10^9 toneladas para la producción de biocombustible.

La mayoría de los residuos agrícolas provienen de los cultivos de maíz, trigo, arroz y caña de azúcar, mientras que el resto de residuos contribuye solo con una pequeña cantidad.

El residuo de maíz es uno de los residuos agrícolas más prometedores (tallos, hojas y mazorcas), con una producción de 4 toneladas/acre. Otro residuo importante es el bagazo obtenido del procesamiento del azúcar a partir de caña de azúcar, el cual ha sido estimado entre 317 – 380 millones de ton/año.

1.2 CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN DIFERENTES MATERIAS PRIMAS

Los carbohidratos son los principales componentes fermentables para la producción de bioetanol, e incluyen a monosacáridos y disacáridos (azúcares solubles) y polisacáridos (almidón, celulosa y hemicelulosa). Los azúcares solubles son los componentes en las materias primas a base de azúcar; el almidón es el principal carbohidrato en los cultivos de almidón; y la celulosa y la hemicelulosa son los principales carbohidratos de la biomasa lignocelulósica.

1.2.1 Azúcares mono y disacáridos

Los azúcares fermentables presentes en las materias primas de fuentes basadas en azúcar son principalmente monosacáridos como la glucosa y fructosa, y disacáridos como la sacarosa. Estos son azúcares solubles que pueden ser fácilmente fermentados y convertidos en etanol, por la acción de microorganismos fermentadores. En este caso la biomasa no requiere de un pretratamiento, ya que los azúcares están disponibles inmediatamente para ser metabolizados y transformados a etanol.

1.2.2 Almidón

El almidón es la reserva de carbohidratos más abundante en las plantas y se encuentra en hojas, flores, frutos, semillas, tallos y raíces. El almidón es utilizado por las plantas como fuente de carbono y energía. La síntesis bioquímica del almidón involucra moléculas de

glucosa producidas en las células de la planta por fotosíntesis (Schmiele, Sampaio, & Pedrosa Silva Clerici, 2019).

El almidón está formado por dos tipos de polímeros: amilopectina y amilosa. La amilopectina consiste en cadenas lineales de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 y es altamente ramificado en las posiciones α -1,6 en intervalos de 20 enlaces glucosídicos a lo largo del eje de la molécula (constituye entre 70 - 85% del almidón común). La amilosa es esencialmente un polímero lineal de alrededor de 1000 unidades de glucosa con enlaces α -1,4 de (constituye entre 15-30% de almidón común) (BeMiller, 2019).

1.2.3 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es la fuente de carbono más abundante en la naturaleza; esta contiene cantidades variables de celulosa, hemicelulosa y lignina dependiendo del tipo de biomasa. La biomasa en general consiste entre 40 - 50% de celulosa, 25 - 30% de hemicelulosa; y 15 - 20% de lignina y otros componentes extraíbles (Figura 2). En conjunto, la celulosa y la hemicelulosa constituyen aproximadamente dos tercios del peso seco total de la biomasa, siendo los principales sustratos para el etanol (Menon & Rao, 2012). En la biomasa lignocelulósica, los polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina forman una matriz compleja, robusta y recalcitrante a la despolimerización. La recalcitrancia está asociada a las propiedades de la biomasa, e incluyen: la naturaleza cristalina de la celulosa, baja área de superficie disponible, lignina, y la naturaleza heterogénea de la biomasa (composición y estructura).

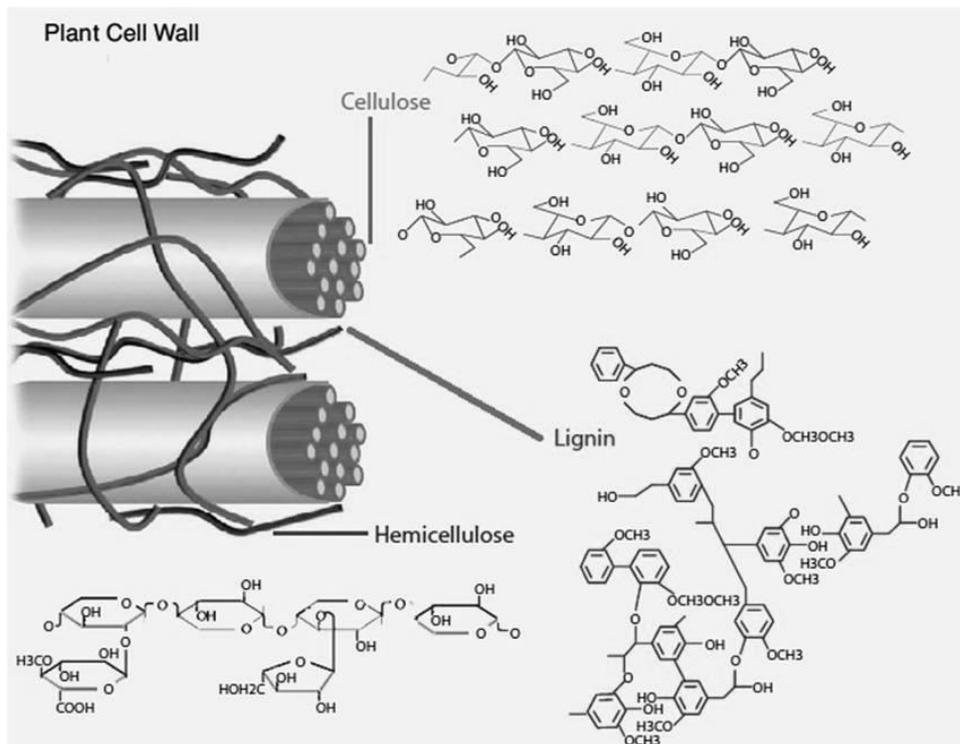


Figura 2. Ilustración de la estructura de lignocelulosa: celulosa, hemicelulosa y lignina

1.2.3.1 Celulosa

La celulosa es el componente predominante de la biomasa lignocelulósica. La celulosa es un homopolímero lineal de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos β -1,4. El dímero, dos residuos de glucosa con enlace β -1,4, llamado celobiosa es la unidad repetitiva estructural de la celulosa. La celulosa contiene regiones cristalinas y amorfas. Por su parte, las fibrillas paralelas, alineadas y altamente ordenadas, son una propiedad característica de las moléculas de celulosa (región cristalina). La unidad fibrilar más pequeña (fibrilla elemental) tiene una sección transversal aproximada de 3,0-3,5 nm. Las fibrillas elementales, separadas por regiones menos ordenadas, están agrupadas formando microfibrillas con diámetros superiores a 25 nm (Nagarajan, Skillen, Irvine, Lawton, & Robertson, 2017).

El patrón de enlaces de hidrógeno entre las cadenas de celulosa difiere en la composición de las regiones cristalinas y amorfas, el enlace de hidrógeno inter-molecular O_6-H-O_3 es dominante en la forma amorfa, mientras que el O_6-H-O_2 es el principal enlace de hidrógeno inter-moleculares en la forma cristalina. Por otro lado, los enlaces intra-moleculares de hidrógeno O_3-H-O_5 que existe entre las dos regiones, es responsable de la rigidez y forma lineal de las cadenas de celulosa.

1.2.3.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es el componente más complejo de la pared celular de la biomasa vegetal. La hemicelulosa es un heteropolímero ramificado compuesto por diferentes monómeros de hexosas (β -D-glucosa, β -D-manosa, α -D-galactosa) y pentosas (β -D-xilosa, α -L-arabinosa). Además, las cadenas de hemicelulosa pueden contener ácidos α -D-glucurónico, α -D-galacturónico y α -D-4-O-metilgalacturónico. La cadena principal de hemicelulosa está conformada por xilanos unidos por enlaces β -1,4 de D-xilosa (90%, aproximadamente) y L-arabinosa (10%, aproximadamente) (Han, Guo, Liu, Xia, & Wang, 2019).

La hemicelulosa tiene un bajo grado de polimerización (DP 80 – 200). Como resultado de su menor DP, también exhiben una menor estabilidad química y térmica y, en consecuencia, son más solubles y susceptibles a la hidrólisis. La composición de la fracción de la hemicelulosa (hexosas y pentosas) depende de la materia prima; la madera dura se compone principalmente de azúcares pentosas (xilosa y arabinosa), mientras que la madera blanda tiene una fracción mayor de azúcares hexosas (galactosa, manosa y glucosa) (Ajao, Marinova, Savadogo, & Paris, 2018).

1.2.3.3 Lignina

La lignina está presente en la pared celular de las plantas; constituye una estructura rígida, impermeable y resistente a ataques microbianos y al estrés oxidativo. La lignina es un biopolímero aromático ramificado, complejo e hidrofóbico. Está compuesto principalmente por tres diferentes monómeros de fenilpropano o unidades de monolignol: alcohol p-coumaril, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. La unidad de monolignol tiene una unidad de fenilpropano sustituida con un grupo (-OH) y metoxi (-OCH₃), que se unen mediante enlaces para formar la estructura de la lignina (Van Dyk & Pletschke, 2012).

1.3 BIOETANOL DE PRIMERA GENERACIÓN

El bioetanol de primera generación se produce directamente de cosechas que pueden ser utilizados para la alimentación humana o animal. Entre las ventajas de su producción se incluyen la accesibilidad a estos tipos de cultivos y la tecnología de transformación más simplificada. Sin embargo, presenta algunas desventajas que incluyen: el conflicto de uso ético-moral (cultivos para combustible o alimentación), uso intensivo de suelo, disminución de biodiversidad por mayores plantaciones destinadas a combustibles, entre otras (Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2010).

1.3.1 Bioetanol a partir de fuente de azúcar

Para la producción de etanol a partir de fuente de azúcar se ha investigado un sin número de materias primas, en función de mejorar la eficiencia y rentabilidad del proceso. Aproximadamente cerca del 40% de etanol se produce a partir de este tipo de fuente, siendo Brasil su principal productor a partir de caña de azúcar. A continuación se puede resumir el procedimiento tecnológico general: i) extracción de jugo de los cultivos de

azúcar mediante trituración (tallos o frutos); ii) preparación del mosto: filtración del jugo, concentración de la solución de azúcar entre 14 y 18%, adición de fuente de nitrógeno y esterilización; iii) fermentación con microorganismos (levaduras), y viii) destilación y deshidratación (etanol anhidro) (Dias et al., 2015).

1.3.2 Bioetanol a partir de fuentes de almidón

Actualmente, la mayor producción de bioetanol se base en fuentes de almidón (principalmente maíz); cerca del 60% del etanol total, se produce a partir de estas materias primas. Los co-productos resultantes hacen de este un proceso económicamente más viable. Los pasos para la obtención de etanol incluyen: i) molienda seca o húmeda (granos o tubérculos); ii) licuefacción de suspensión (harina y agua) con enzima α -amilasa; iii) sacarificación de la suspensión líquida con enzima glucoamilasa; iv) fermentación con microorganismos (levaduras); y viii) destilación y deshidratación (etanol anhidro) (Mohanty & Swain, 2019).

1.4 BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

El bioetanol de segunda generación se diferencia principalmente del bioetanol de primera generación, por la materia prima utilizada para su producción, ya que estos no corresponden al uso de cultivos que se destinarán para alimentación. Los biocombustibles de segunda generación utilizan los residuos agrícolas valorizando los desechos generados de cultivos pre-establecidos sin destinar extensiones de cultivo adicionales. Sin embargo, esta tecnología también presenta desventajas ya que al ser un proceso más complejo, involucra un incremento en el costo de producción (Aditiya, Mahlia, Chong, Nur, & Sebayang, 2016).

1.4.1 Bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es una fuente promisoriosa y versátil para la producción de etanol, sin embargo la variación en las propiedades físico-químicas interfieren en el diseño de procesos estandarizados. Para la obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica se requiere degradar sus fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina. El proceso general de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica se detalla a continuación: i) pretratamiento físico, químico o biológico, ii) sacarificación enzimática de polímeros (celulosa y hemicelulosa), iii) fermentación microbiana, y iv) destilación y deshidratación (etanol anhidro) (Adekunle, Orsat, & Raghavan, 2016).

1.5 PRODUCCIÓN DE ETANOL LIGNOCELULÓSICO

1.5.1 Técnicas de pretratamiento de biomasa

El pretratamiento es un paso crucial para la producción de bioetanol lignocelulósico, influyendo directamente en el balance económico del proceso general de bioconversión ya que todos los procesos subsiguientes (sacarificación enzimática y fermentación) dependen de los resultados del pretratamiento. El pretratamiento permite la separación de los componentes principales, es decir, la celulosa, hemicelulosa y lignina. Los pretratamientos principalmente eliminan la lignina y hemicelulosa de la matriz lignocelulósica, disminuyen la cristalinidad de la celulosa, incrementan el área superficial y aumentan la porosidad de la biomasa (Brodeur et al., 2011). Los pretratamientos tienen características específicas que deben cumplir: evitar la formación de inhibidores, minimizar el gasto de energía y ser económicamente viables. Además debe considerarse, la recuperación de sub-productos de valor agregado, reciclaje de catalizadores y tratamiento de residuos o desechos (Kim, Lee, & Kim, 2016a).

Los pretratamientos para biomasa lignocelulósica incluyen: métodos biológicos, mecánicos, químicos y varias combinaciones de ellos; estos pretratamientos difieren en cuanto al modo de acción y condiciones de reacción (Chen et al., 2017).

1.5.1.1 Pretratamiento físico

Los métodos físicos comúnmente utilizados para la degradación de materiales celulósicos incluyen: trituración o molienda mecánica, irradiación con microondas, ultrasonido y pirolisis. El pretratamiento físico en la biomasa aumenta el área de superficie y el volumen de los poros, disminuye el grado de polimerización y cristalinización de la celulosa, hidroliza la hemicelulosa y despolimeriza parcialmente la lignina.

Molienda mecánica

La molienda es una técnica que implica la reducción del tamaño de la partícula en el tratamiento previo de la biomasa. El tamaño de la muestra se reduce mediante corte y posterior molienda. El polvo resultante es tamizado, y el tamaño depende directamente del tamiz utilizado. Los efectos de la molienda incluyen alteraciones en el grado de polimerización, porosidad, superficie; y cristalinidad (Chen et al., 2017).

Pretratamiento con ultrasonido

El pretratamiento con ultrasonido emplea radiación de ultrasonido para descomponer la compleja red de polimerización de la biomasa. La suspensión de biomasa se irradia generalmente entre 20 kHz y 1MHz, por cortos periodos de tiempo. El pretratamiento de ultrasonido de biomasa resulta en la alteración de la estructura superficial y producción de radicales oxidantes que atacan químicamente la matriz lignocelulósica. Adicionalmente, el ultrasonido rompe los enlaces α -O-4 y β -O-4 de la lignina resultando en la separación de los polisacáridos estructurales y las fracciones de lignina mediante

cavitación (formación de pequeñas burbujas). En general, el pretratamiento con ultrasonido rompe los enlaces éter entre la lignina y hemicelulosa e incrementa la accesibilidad y extractibilidad de las hemicelulosas; mejorando la reactividad enzimática de la celulosa (Sul'man, Sul'man, & Prutenskaya, 2011).

Pretratamiento con radiación de microondas

El pretratamiento con microondas se refiere a una radiación electromagnética de alta frecuencia (300 MHz – 300 GHz). La irradiación de microondas puede penetrar en el interior de las moléculas orgánicas, lo que hace que las moléculas dipolares o componentes polares de las moléculas orgánicas de cadena larga oscilen con una alta frecuencia, generando una fuente de calor masiva. En comparación con el calentamiento convencional, el calentamiento asistido por microondas presenta varias ventajas, que incluyen un calentamiento uniforme, disminución del tiempo de reacción, incremento de la eficiencia de energía y calentamiento controlado. Actualmente, las técnicas de conversión asistidas por microondas han sido estudiadas ampliamente e incluyen tecnologías combinadas con solvólisis y pirolisis. La solvólisis asistida por microondas ocurre a bajas temperaturas (<200 ° C) facilitando la despolimerización de la biomasa. Por el contrario, la pirolisis asistida por microondas de lignina sin oxígeno, ocurre a altas temperaturas (> 400 ° C) convirtiendo la biomasa en bio-aceite o bio-gas. Ambas tecnologías capaces de realizarse con o sin catalizadores. El pretratamiento con microondas mejora la adaptabilidad de la lignocelulosa a las enzimas, y aumenta el efecto posterior de la actividad enzimática (Aguilar-Reynosa et al., 2017).

Pretratamiento de pirolisis

Este pretratamiento se puede realizar de dos formas; proceso de pirolisis y descomposición líquida con agua caliente. Durante la pirolisis, la celulosa se puede

descomponer rápidamente cuando se calienta a más de 300 ° C. Por otro lado, el pretratamiento líquido con agua caliente que se lleva a cabo en un biorreactor de presión se puede combinar con catalizadores ácidos o básicos, promoviendo la hidrólisis de la materia prima en forma de oligosacáridos e incrementando la eficiencia de la hidrólisis. La temperatura de reacción es generalmente a 200 – 230°C con alta presión, donde el agua puede hidrolizar la celulosa y degradar la hemicelulosa (Savou et al., 2018).

1.5.1.2 Pretratamiento químico

El tratamiento químico tiene como objetivo mejorar la biodegradabilidad de la celulosa, eliminando la lignina y/o hemicelulosa; y disminuyendo el grado de polimerización y cristalinización de la celulosa. Los pretratamientos químicos que se utilizan frecuentemente incluyen: ácidos (orgánicos e inorgánicos), álcalis, líquidos iónicos y organosolventes.

Pretratamiento ácido

En los pretratamientos ácidos, tanto ácidos inorgánicos (ácido sulfúrico, H_2SO_4 ; ácido clorhídrico, HCl ; ácido fosfórico, H_3PO_4 ; y ácido nítrico, HNO_3) como ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y ácido maleico) han sido ampliamente utilizados. Sus funciones principalmente responden a la separación o eliminación de la lignina e hidrólisis de las fibras vegetales; refiriéndose específicamente a la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa.

En tratamientos con ácidos concentrados (mayor a 30%), las condiciones de reacción son a 100°C por 2 – 10 horas, con 1 atmósfera de presión. Por otro lado, en el tratamiento con ácidos diluidos (igual o menor a 10%), las condiciones de reacción son a 100 – 240°C por unos segundos a varios minutos con una presión mayor a 10 atm. El tratamiento con

ácido diluido requiere de menor tiempo de reacción, sin embargo, en comparación con el tratamiento de ácido concentrado; la temperatura es relativamente alta (Ravindran & Jaiswal, 2016).

A pesar de presentar altas tasas de conversión de la celulosa y hemicelulosa (mayor a 90%), los pretratamientos ácidos producen sub-productos inhibidores de fermentación; además, muestra alta toxicidad y corrosividad. Bajo condiciones ácidas, los azúcares pentosa y ácidos urónicos que resultan de la de la hidrólisis de la hemicelulosa sufren deshidratación formando 2-furaldehído (furfural) mientras las hexosas se deshidratan a 5-hidroxi-2-furaldeído (HMF), siendo los principales inhibidores en la fermentación (Jönsson & Martín, 2016).

Pretratamiento alcalino

En los pretratamientos alcalinos de lignocelulosa comúnmente se utilizan hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de calcio Ca(OH)_2 e hidróxido de amonio. En los pretratamientos alcalinos las principales reacciones incluyen la disolución de la lignina y hemicelulosa, y de-esterificación (saponificación) de los enlaces éster intermoleculares. Como resultado, se altera el grado de polimerización (DP) de cada componente incrementando la porosidad, área de superficie y cristalinidad de la lignocelulosa. El aumento en el grado de cristalinidad se debe principalmente a la eliminación de las regiones amorfas de la hemicelulosa y lignina, por lo tanto el grado de cristalinidad aumenta; mientras las fibras de celulosa no sufren ningún cambio en sí (Figura 3). Las condiciones de este pretratamiento puede ser a temperatura ambiente y presión atmosférica natural y el tiempo de reacción puede ocurrir de segundos a días; una de las ventajas de este pretratamiento es que genera menos degradación del azúcar que el pretratamiento con ácido (Kim et al., 2016a).

Por otro lado, en condiciones alcalinas, ocurren reacciones de peeling lo cual produce la degradación de polisacáridos formando ácidos sacarínicos, así como ácidos láctico, fórmico, dihidroxi y dicarboxílico (Jönsson & Martín, 2016).

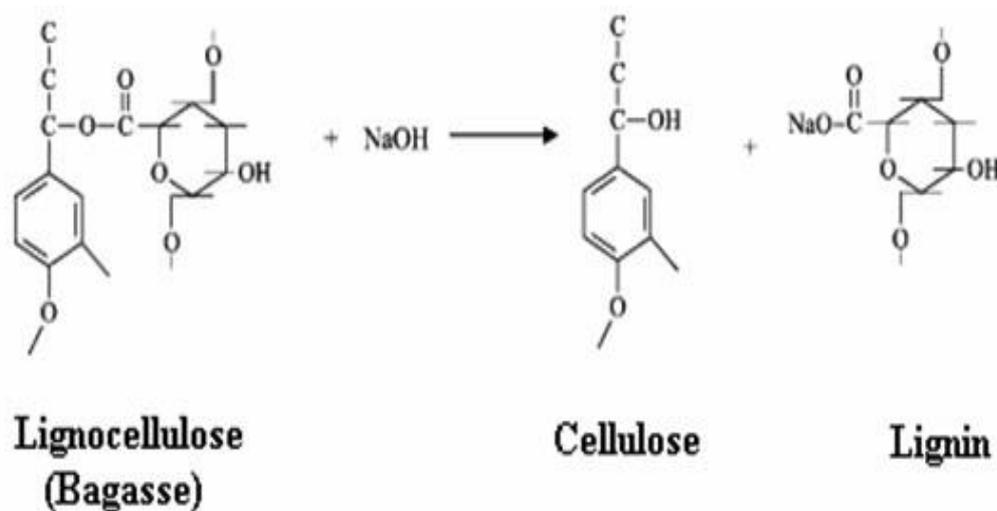


Figura 3. Reacción de la lignocelulosa con NaOH (Soundarrajan, Vennison, Saraswathi, & Emmanuel, 2016)

Pretratamiento con líquidos iónicos (IL)

Los líquidos iónicos son disolventes orgánicos que están en estado líquido a baja temperatura (<100°C). Los ILs están compuestos por cationes orgánicos grandes y aniones inorgánicos pequeños. Los ILs no son volátiles, son termoestables (desde temperatura ambiente hasta 300°C) y tienen alta estabilidad química (da Costa Lopes et al., 2013). Los pretratamientos con ILs disuelven simultáneamente la lignina y los carbohidratos, los ILs forman enlaces de hidrógeno entre los protones hidroxilo del azúcar y los residuos no hidratados de los ILs con estequiometría 1:1; rompiendo la estructura de interacciones no covalentes de la lignocelulosa. Los pretratamientos con ILs son eficientes y no son tóxicos, sin embargo tienen un alto costo. El pretratamiento con IL implica mezclarlo con la biomasa en una proporción de 20:1 y luego calentarlo a 120°C durante 30 minutos. Posteriormente, se agrega agua desionizada a la mezcla para formar

una proporción de 5:1. La mezcla de IL/agua se filtra para separar la fracción sólida (Moniruzzaman & Goto, 2018).

Pretratamiento con organosolvente

Los pretratamientos con organosolvente generalmente utilizan un disolvente orgánico o mezclas de disolventes orgánicos con agua para la eliminación de lignina e hidrólisis de hemicelulosa llevando a una mejor digestibilidad enzimática de la fracción de celulosa. Los solventes comúnmente utilizados incluyen etanol, metanol, acetona y etilenglicol; además puede incluirse catalizadores como ácidos orgánicos e inorgánicos. Las temperaturas utilizadas pueden alcanzar los 200°C, sin embargo temperaturas más bajas pueden ser utilizadas dependiendo del tipo de biomasa y catalizador. El pretratamiento con organosolventes orgánicos actúa por ósmosis rompiendo y degradando los enlaces químicos internos de la celulosa y hemicelulosa, como resultado de este proceso, ambos polímeros son separados de la fracción de lignina (Zhao, Cheng, & Liu, 2009).

1.5.1.3 Pretratamiento físico - químico

Pretratamiento con explosión de vapor

La explosión de vapor (con o sin catalizador) es uno de los métodos físico-químicos más utilizados para los pretratamientos de biomasa lignocelulósica. Con este método, vapor de alta presión se inyecta en un reactor continuo o discontinuo que contiene la biomasa y se eleva la temperatura hasta 160-260°C (0,69 y 4,83 MPa). Finalmente la presión se reduce bruscamente produciendo una descompresión explosiva de la biomasa (fractura mecánica de las fibras) resultando en la degradación de la hemicelulosa y ruptura de la matriz de la lignina. Además, la alta temperatura y la alta presión destruyen los enlaces internos de hidrógeno y la región cristalina de la celulosa, promoviendo la transformación

de la hemicelulosa y la hidrólisis de lignina (Duque, Manzanares, Ballesteros, & Ballesteros, 2016).

Pretratamiento AFEX

El pretratamiento AFEX (ammonia fibre expansion) es una combinación de la explosión de vapor y tratamiento químico con álcali (amoníaco anhidro) a alta temperatura (90–100°C) y alta presión (1–5,2 MPa) en un tiempo de reacción de aproximadamente 20 a 30 minutos. Después que ocurre el tratamiento en las condiciones antes indicadas la presión se libera rápidamente. Este método produce un cambio rápido de temperatura, después que se libera la presión, y el amoníaco que estaba atrapado en la biomasa se evapora. Este fenómeno físico produce un daño en la estructura, disminuyendo la cristalinidad de la celulosa, hidrolizando la hemicelulosa, despolimerizando la lignina e incrementando la porosidad, esto consecuentemente mejora la accesibilidad de la enzima (Bals, Rogers, Jin, Balan, & Dale, 2010).

1.5.1.4 Pretratamiento biológico

El pretratamiento biológico involucra la utilización de hongos (*Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus ostreatus*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Pycnoporus cinnabarinus*, y *Phanerochaete chrysosporium*), y bacterias para degradar la lignina. El pretratamiento biológico de lignocelulosa presenta algunas ventajas como bajo consumo de energía y ausencia de contaminación. Sin embargo, el tiempo requerido es largo, y parte de la celulosa y hemicelulosa son utilizados como fuente de carbono para los hongos (Sharma, Xu, & Qin, 2017).

1.5.2 Sacarificación de polímeros de glucosa

La sacarificación o hidrólisis es necesaria para convertir los polímeros de glucosa (almidón, celulosa y hemicelulosa) en azúcares fermentables. Los métodos utilizados pueden ser ácidos o enzimáticos, siendo los últimos los más utilizados.

1.5.2.1 Sacarificación de almidón

La sacarificación del almidón consiste en la conversión bioquímica de las moléculas de amilosa y amilopectina para producir azúcares solubles. Esta hidrólisis ocurre en dos fases: licuefacción y sacarificación, en donde actúan las enzimas amilasas (α y β) y glucoamilasas, respectivamente. Las α -amilasas (α -1, 4-glucano-glucanohidrolasa), degradan los enlaces glucosídicos α -1,4 de la región central de la cadena de amilosa y amilopectina produciendo oligosacáridos. Las β -amilasas (1, 4- α -D-glucano-maltohidrolasa; glicogenasa; amilasa sacarogénica) hidrolizan el penúltimo enlace α -1,4 en los extremos no reductores de la cadena, resultando en moléculas de maltosa. Posteriormente, actúan las glucoamilasas hidrolizando los enlaces α - 1,4 y α - 1,6 liberando una molécula de glucosa a partir de los oligosacáridos producto de la licuefacción del almidón. La disponibilidad del almidón durante la hidrólisis enzimática depende de su estructura y esta a la vez influye el rendimiento de azúcar y consecuentemente el rendimiento final de etanol (Kumar & Singh, 2019).

1.5.2.2 Sacarificación de celulosa y hemicelulosa

La sacarificación o hidrólisis de holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) de la biomasa lignocelulósica es requerida para convertirla en azúcares solubles. En la mayoría de los pretratamientos de biomasa lignocelulósica, se producen dos fracciones: una sólida insoluble que contiene celulosa y lignina; y una líquida que contiene hemicelulosa y

azúcares. La conversión de la hemicelulosa depende de las condiciones de los pretratamientos, la hidrólisis completa produce azúcares monoméricos y la despolimerización parcial genera oligosacáridos. Por el contrario la mayoría de celulosa no sufre ningún cambio, por lo que se requiere de hidrólisis para la conversión a glucosa.

La conversión de celulosa y hemicelulosa, puede ocurrir por vía química (ácidos) o enzimática. La hidrólisis ácida presenta inconvenientes como altas temperaturas de reacción, corrosión de equipos y principalmente producción de inhibidores de fermentación por la degradación de azúcares. Por lo tanto la hidrólisis enzimática ha prestado más interés (Rastogi & Shrivastava, 2017).

La conversión de la celulosa y hemicelulosa mediante enzimas produce azúcares fermentables entre 45 – 55°C. Para ello se utiliza sistemas de complejos enzimáticos de celulasas y hemicelulasas (xilanasas). Las celulasas actúan sinérgicamente e incluyen a endo-glucanasas, exo-glucanasas y β -glucosidasas. Las endo-glucanasas actúan aleatoriamente en los enlaces β – 1,4 glucosídicos de las cadenas D-glucano de las regiones amorfas de la celulosa, resultando en cadenas de extremos libres. Las exo-glucanasas continúan la acción de las endoglucanasas sobre la misma cadena. La acción de la endo y exo-glucanasa liberan como el dímero de glucosa, la celobiosa. Finalmente la β -glucosidasa actúa convirtiendo la celobiosa en glucosa (Figura 4) (Patel, Chapla, & Shah, 2017).

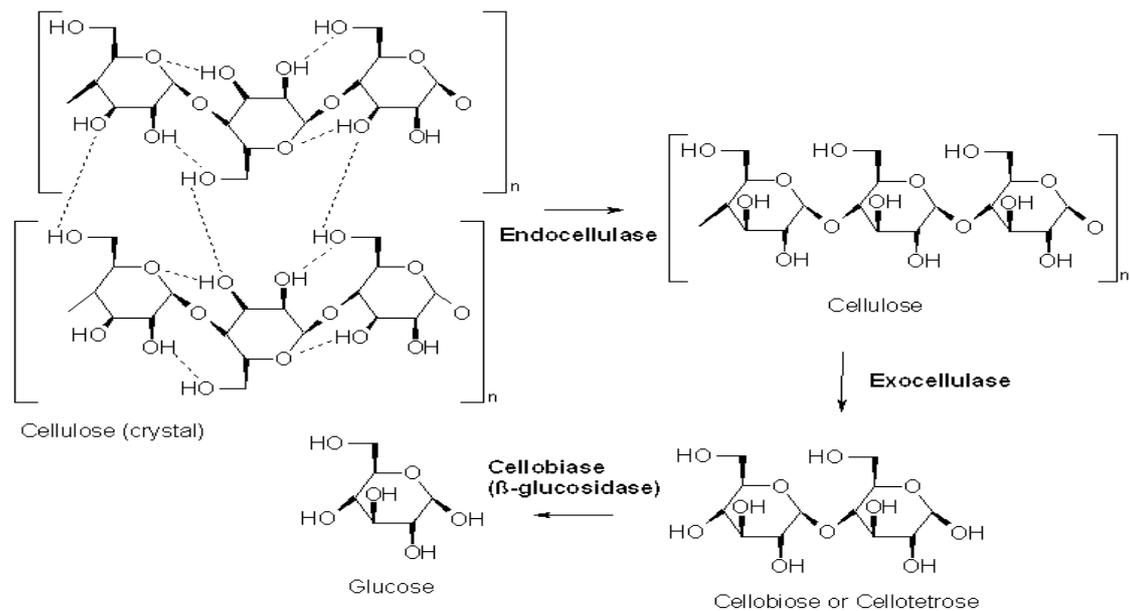


Figura 4. Acción del complejo enzimático de celulasas

Debido a la estructura compleja de la hemicelulosa su degradación requiere de un sistema múltiple enzimático que incluyen endo-xilanasas, exo-xilanasas, β -xilosidasas, α -arabinofuranosidasas, α -glucoronidasas, acetil xilano esterasa y ácido ferúlico esterasa. Las endo y exo - xilanasas, actúan sobre las cadenas de xilanos generando cadenas más pequeñas. La β -xilosidasa ataca a los xilo-oligosacáridos produciendo xilosa. Por otro lado, las enzimas α -arabinofuranosidasa y α -glucoronidasasa actúan en el esqueleto del xilano resultando en la remoción de arabinosa y ácido 4-O-metilglucurónico, respectivamente. Las enzimas acetil xilano esterasa, actúan en las sustituciones de acetilo en los residuos de xilosa y las enzimas ácido ferúlico esterasa hidroliza los enlaces éster entre las sustituciones de arabinosa y ácido ferúlico (Figura 5) (Manju & Singh Chadha, 2011).

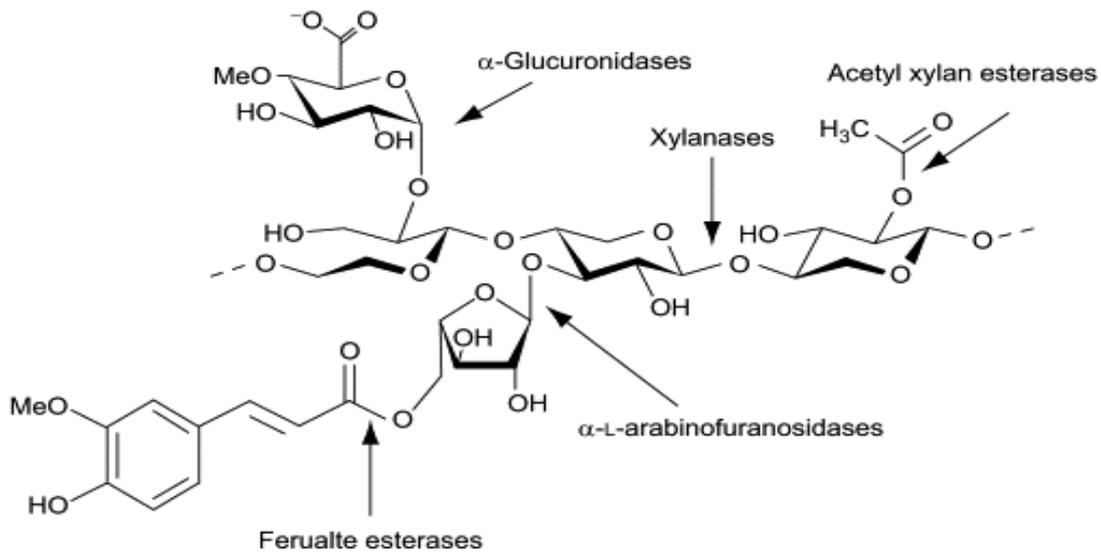


Figura 5. Acción del complejo enzimático de xilanasas

1.5.3 Fermentación

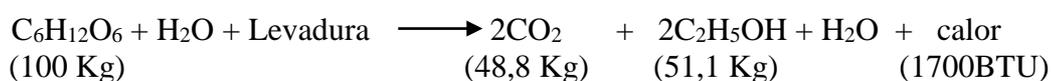
La fermentación es un proceso metabólico que convierte azúcares solubles en etanol. Algunos microorganismos (bacterias y levaduras) son capaces de fermentar monosacáridos (glucosa y fructosa) y disacáridos (maltosa y sacarosa) resultando en la producción de etanol y dióxido de carbono. Los principales azúcares para la producción de etanol de primera generación son sacarosa (fuente de azúcar), glucosa y maltosa (fuente de almidón); mientras que para el etanol de segunda generación son hexosas y pentosas (biomasa lignocelulósica) (Lopes et al., 2016).

Un microorganismo etanológico debe cumplir con algunas características, tales como, altas tasas de crecimiento en medios simples y baratos, alto rendimiento de etanol (> 90% teórico), tolerancia a una alta concentración de etanol (> 40,0 g/L), buena productividad de etanol (> 1,0 g/L/h) y alta tolerancia osmótica. Los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* han sido ampliamente utilizados para la obtención de etanol a partir de una gran variedad de fuentes de azúcar principalmente hexosas. Además, se han reportado microorganismos que fermentan pentosas como *Pachysolen*

tannophilus, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Candida shehatae* (Dasgupta, Ghosh, Bandhu, & Adhikari, 2017) (Lee, Jin, Cha, & Seo, 2017).

La especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta algunas características atractivas para la fermentación a etanol. Entre ellas podemos mencionar una mayor eficiencia de conversión de azúcares a etanol y alta tolerancia al mismo; capacidad de floculación (facilitando la separación de la biomasa celular después de fermentación) y finalmente es un microorganismo generalmente reconocido como seguro (GRAS) (Jansen et al., 2017).

La glucólisis es la vía metabólica anaerobia utilizada por *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación. La glucólisis ocurre en el citoplasma de las células de levadura, y a partir de una molécula de glucosa se obtiene dos moléculas de piruvato. En ausencia de oxígeno, cada molécula de piruvato se reduce resultando en una molécula de etanol y una molécula de CO₂ (Figura 6). Las dos moléculas de ATP producidas como ganancia neta a partir de la glucólisis siendo utilizadas para la biosíntesis de macromoléculas en el crecimiento celular. El balance de la utilización de la fuente de carbono y energía a partir de azúcares corresponde al 95% de azúcares metabolizados a etanol y CO₂, 1 % convertido a materia celular de levaduras y 4% es convertido en subproductos solubles (glicerol). A continuación se muestra la ecuación de la reacción de conversión de glucosa a etanol, a partir de esta se puede calcular el rendimiento teórico de etanol; 100 kg de glucosa pueden producir 51,1 kg de etanol y 48,8 kg de CO₂ (Stanbury, Whitaker, & Hall, 2017).



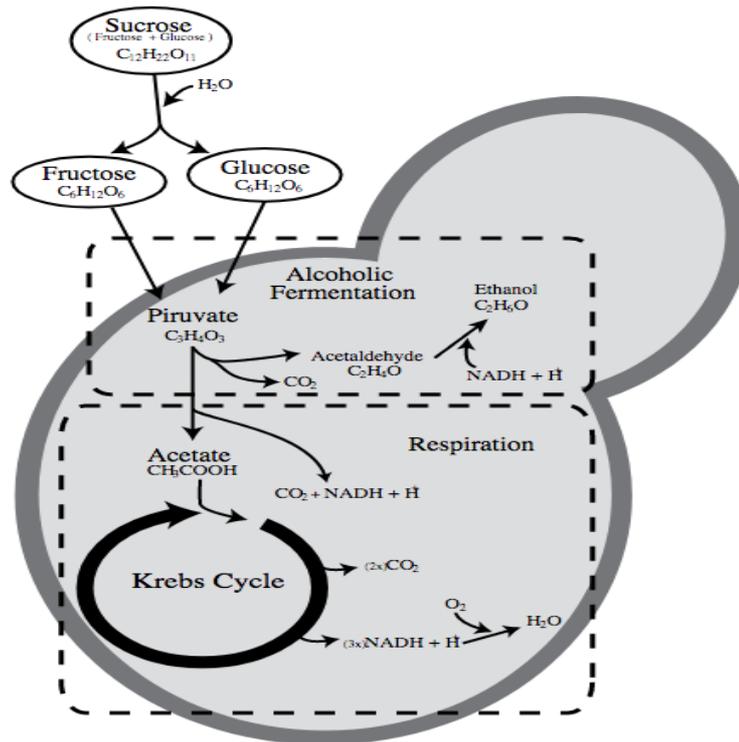


Figura 6. Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de glucosa durante la fermentación

La especie de bacteria *Zymomonas mobilis*, es otro microorganismo utilizado para la fermentación de etanol a partir de azúcares. Se ha reportado que *Z. mobilis* tiene una alta tolerancia a etanol, mayor consumo de glucosa y alto rendimiento de etanol. Sin embargo, tiene un limitado rango de sustratos. La bacteria *Z. mobilis* utiliza la vía metabólica Entner-Doudoroff para catabolizar glucosa a piruvato (Figura 7), a diferencia del metabolismo de *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* tiene una ganancia neta de una molécula de ATP a partir de una molécula de glucosa, esto ocasiona una disminución en el rendimiento de biomasa celular, sin embargo el crecimiento celular y la fermentación no están relacionados en este tipo de bacterias (Cazetta, Celligoi, Buzato, & Scarmino, 2007).

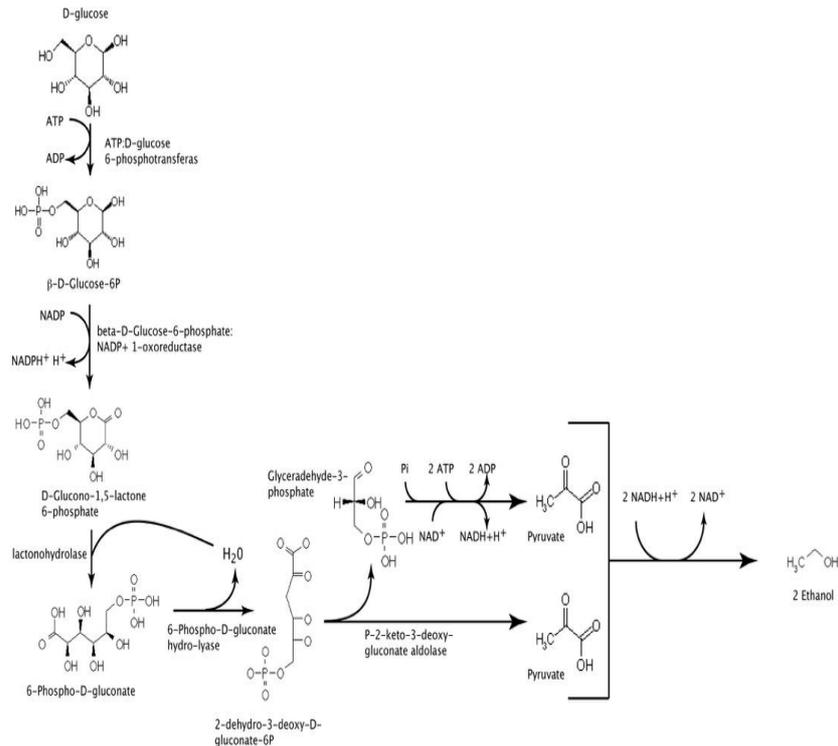


Figura 7. Metabolismo de *Zymomonas mobilis* a partir de glucosa durante la fermentación.

La utilización de microorganismos nativos en la fermentación de etanol presenta limitaciones en la optimización de un proceso a escala industrial. Los microorganismos *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* utilizan sólo azúcares solubles como glucosa, fructosa y sacarosa para metabolizarlos a etanol, lo cual implica un paso previo para convertir los polímeros de carbohidratos (almidón, celulosa y hemicelulosa). Por otro lado, los microorganismos no tienen la capacidad de fermentar eficientemente ambos azúcares hexosas y pentosas a partir de celulosa y hemicelulosa, respectivamente (biomasa lignocelulósica). Para solucionar estos inconvenientes, se ha utilizado la tecnología del ADN recombinante, aumentando el rendimiento de azúcares y consecuentemente el etanol. Algunas cepas de levadura recombinantes han sido desarrolladas, tanto para convertir el almidón directamente en etanol (con co-expresión de enzimas amilolíticas) como para co-fermentar azúcares hexosas y pentosas; en ambos casos presentando altos rendimientos (Lee et al., 2017).

1.5.3.1 Métodos de fermentación

En la industria de las fermentaciones, para que un proceso sea viable es importante minimizar los costos de operación e incrementar los rendimientos. Por lo tanto, se debe establecer el tipo de fermentación más adecuado que se acople a las necesidades de producción. Existen tres tipos de fermentaciones: discontinua (batch), alimentada (fed-batch) y continua (Figura 8) (Stanbury et al., 2017).

En la fermentación discontinua (cultivo cerrado), al inicio del proceso se añade la solución de nutrientes y se inocula el microorganismo. La composición del medio y la producción de metabolitos cambia por el metabolismo de los microorganismos, y se observa cuatro fases de crecimiento: fase de latencia, exponencial, estacionaria y muerte.

La fermentación alimentada se refiere a la adición escalonada de la solución de nutrientes; al inicio del proceso se añade medio de cultivo menos concentrado, y en la fase de producción se añade dosis más pequeñas de medio de cultivo más concentrado.

En la fermentación continua (cultivo abierto) los nutrientes se añaden continuamente en el biorreactor y simultáneamente se saca una cantidad equivalente de producto de fermentación. A pesar de que las fermentaciones continuas presentan algunas ventajas, desventajas como el manejo estéril libre de contaminación por un periodo largo de tiempo y estabilidad genética de microorganismos, prevalecen en la decisión de elegir que proceso realizar.

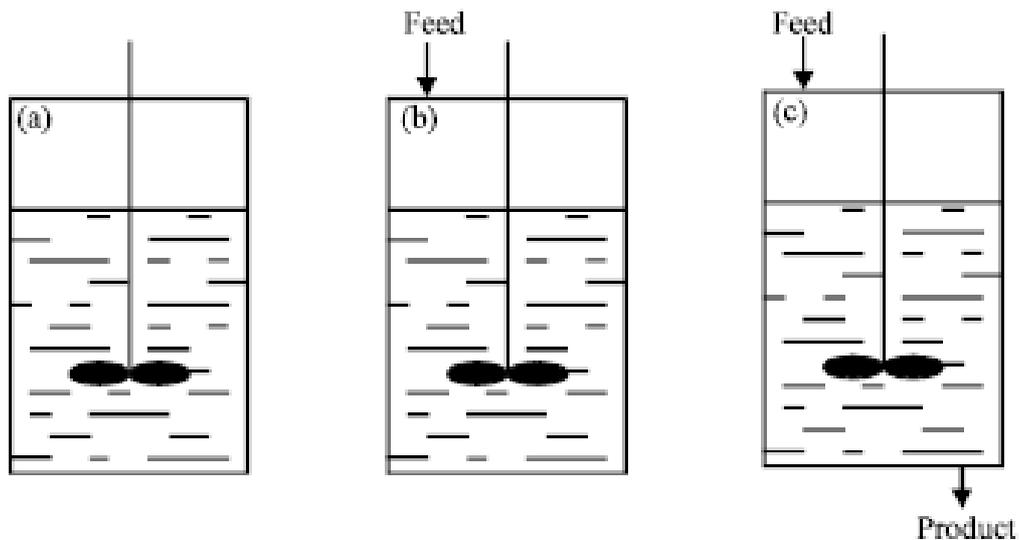


Figura 8. Sistemas de fermentación: discontinuo (batch), alimentado (fed-batch) y continuo

1.6 ENFOQUES TECNOLÓGICOS PARA MEJORAR EL RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD DEL ETANOL

Actualmente, la industria de producción de etanol se ha enfocado en las mejoras tecnológicas que implican aumentar el rendimiento de etanol por unidad de biomasa, disminuir del tiempo del proceso y minimizar los pasos del proceso; lo cual tiene como consecuencia la reducción de los costos de producción haciendo de los procesos económicamente más viables.

Como se mencionó anteriormente el proceso de obtención de etanol de segunda generación es más costoso porque implica pasos adicionales en relación al etanol de primera generación. Sin embargo, se han realizado investigaciones en las cuales se ha integrado de varias formas los pasos de pretratamiento e hidrólisis con fermentación para aumentar la productividad volumétrica del etanol.

Particularmente, una de las principales mejoras para el etanol lignocelulósico es la reducción de los pasos del proceso (Procesos integrados), disminuyendo el tiempo de

proceso así como los costos de capital y de operación. Estos procesos incluyen: SHF, sacarificación y fermentación por separado; SSF, sacarificación y fermentación simultánea; SSCF, sacarificación y co-fermentación simultánea; y CBP, Bioproceso consolidado; SSFF, sacarificación, filtración y fermentación simultánea (Figura 9). Cada proceso tiene ventajas y limitaciones, que se resumen en la Tabla 1.

1.6.1 Proceso de fermentación e hidrólisis por separado (SHF)

En el proceso de SHF, se añaden mezclas enzimáticas para hidrolizar la biomasa lignocelulósica previamente tratada, obteniéndose azúcares monómeros solubles. Posteriormente, el producto (hidrolizado enzimático) se fermenta por la acción de microorganismos. Ambos procesos se realizan por separado, utilizando las diferentes temperaturas óptimas independientemente, 40 – 55°C para sacarificación enzimática y 30 – 35°C para fermentación. Sin embargo, su principal desventaja es la inhibición de las celulasas por el producto de hidrólisis enzimática (glucosa) (Alfani, Gallifuoco, Saporosi, Spera, & Cantarella, 2000)(Dahnum, Tasum, Triwahyuni, Nurdin, & Abimanyu, 2015).

1.6.2 Proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF)

En este proceso la sacarificación enzimática de la biomasa pretratada y la fermentación del hidrolizado enzimático se realizan en un mismo reactor. Para ello, se utilizan enzimas con acción catalítica a temperaturas más bajas y levaduras termófilas, a una temperatura consenso de óptima acción, generalmente entre 34 y 40°C. El producto de la hidrólisis enzimática (glucosa) es simultáneamente metabolizado y convertido en etanol. Por lo tanto SSF, supera la limitación de inhibición enzimática por producto final que ocurre en SHF, mejorando la eficiencia de sacarificación enzimática y rendimiento de etanol (Kumneadklang, Larpkittaworn, Niyasom, & O-Thong, 2015) (Olofsson, Bertilsson, & Lidén, 2008).

1.6.3 Proceso de sacarificación y co-fermentación simultánea (SSCF)

En SSCF la sacarificación enzimática y la co-fermentación de azúcares hexosas y pentosas se realizan simultáneamente. La utilización de microorganismos capaces de fermentar azúcares hexosas y pentosas es crucial en este proceso. En SSCF se opera con fermentación discontinua alimentada, lo cual facilita la sacarificación de alto contenido de sólidos y disminuye la concentración de glucosa facilitando una co-fermentación eficiente tanto de glucosa como de xilosa, resultando en mayores rendimientos de etanol (Bondesson & Galbe, 2016)

1.6.4 Bioproceso consolidado (CBP)

El CBP es un proceso que integra en un solo paso la producción de enzimas, sacarificación enzimática y fermentación. Para que este proceso sea eficiente se debe utilizar una cepa microbiana capaz de hidrolizar polisacáridos lignocelulósicos y fermentar hexosas y pentosas. Para que esto sea posible la ingeniería genética ha sido utilizada diseñando microorganismos etanogénicos productores de celulasas y hemicelulasas, y microorganismos degradadores de lignocelulosa capaces de producir etanol (Shahab, Luterbacher, Brethauer, & Studer, 2018).

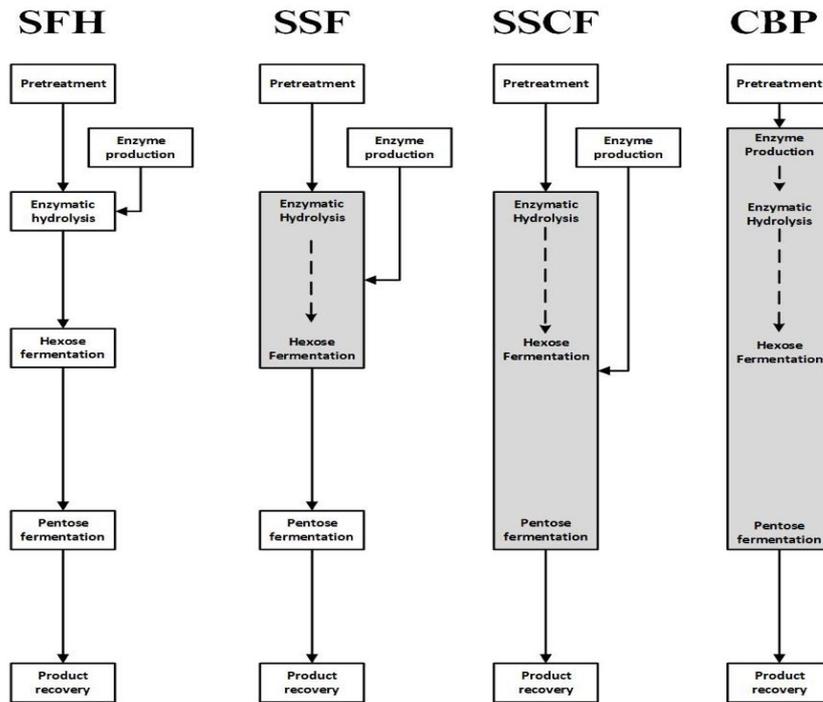


Figura 9. Esquema de los sistemas SHF, SSF, SSCF y CBP.

A continuación se resume las ventajas y desventajas que presentan los sistemas de producción de bioetanol:

Tabla 1. Ventajas y desventajas que presentan los sistemas combinados de producción de bioetanol: SHF, SSF, SSCF y CBP.

Proceso	Ventajas	Desventajas	Referencia
SHF	La sacarificación y fermentación se realizan separadamente a las temperaturas óptimas	Alto costo Mayor tiempo Las enzimas utilizadas en sacarificación sufren inhibición por producto (glucosa)	(Alfani et al., 2000)
SSF	La sacarificación y fermentación se realizan simultáneamente disminuyendo el tiempo de producción Reduce el riesgo de contaminación Reducción en los costos de enfriamiento, no se requiere un enfriador para bajar la	Diferentes temperaturas óptimas de sacarificación y fermentación Las celulasas pueden afectar el crecimiento celular Dificultad de reciclar las levaduras	(Olofsson, Bertilsson, & Lidén, 2008)

	temperatura del licor dulce para fermentación	La concentración de etanol >0.2 M afecta la acción de las exoglucanasas en la celulosa	
SSCF	Completa utilización del sustrato (glucosa y xilosa) Reducción en el costo de capital Continua remoción del producto final de sacarificación (evita la inhibición por retroalimentación)	La alta afinidad de la glucosa para ingresar a la célula de levadura	(Bondesson & Galbe, 2016)
CBP	Reducción en el costo de capital Utilización de un solo reactor para tres pasos (producción enzimas, sacarificación y fermentación) Simplificación del proceso	Alta carga de sólidos puede afectar procesos operativos El complejo desarrollo de un microorganismo efectivo para producción de enzimas y fermentación	(Shahab et al., 2018)

1.7 JUSTIFICACIÓN

Según el reporte estadístico de energía del mundo BP, el consumo global de energía primaria incrementó fuertemente en el año 2017 (2,2%), siendo el gas natural, energías renovables y petróleo los más consumidos. Además, se reporta el aumento de las emisiones de carbono (1,6%), después de poco o ningún crecimiento para el periodo comprendido entre los años 2014 a 2016. Según la Agencia Internacional de Energía (AIE), las emisiones de gases de carbono se atribuyen principalmente a la producción y utilización de energía fósil y constituye el 83 %, siendo el CO₂ el mayor componente de las emisiones generadas (IEA, 2013).

Con lo mencionado anteriormente el incremento de la demanda y consecuente consumo de energía; y los efectos ambientales que causan la producción y consumo de los combustibles fósiles ha incentivado el desarrollo de tecnologías alternativas que generen sustitutos y/o complementos a las fuentes de combustible fósil. Los combustibles fósiles provienen de la materia orgánica acumulada durante largos períodos de tiempo, a

diferencia de los biocombustibles que provienen de una fuente renovable, la biomasa. Principalmente, la biomasa vegetal (de origen forestal, agrícola o urbano) es un material de interés debido a que son fuentes de carbono disponibles, que pueden emplearse con fines energéticos (An, Wilhelm, & Searcy, 2011; Azapagic & Stichnothe, 2011; Biofuels, the Green alternative, 2012; Brito Cruz, Souza, & Barbosa Cortez, 2014; Connelly, 2014).

En la última década, la producción mundial de biocombustibles ha incrementado de 37429 a 84121 miles de toneladas equivalentes de petróleo, con un aumento anual de 3.5% en 2017, siendo el más rápido en los últimos tres años. Los principales biocombustibles producidos incluyen bioetanol y biodiesel de primera y segunda generación. En la actualidad los principales productores de bioetanol son Estados Unidos y Brasil con 58% y 26% de la producción mundial, respectivamente (“World Fuel Ethanol production,” 2017)

Debido a que los biocombustibles de primera generación se obtienen de productos agrícolas con valor alimenticio estos han sido sujetos a polémica de índole social, económica y ética (Mohr & Raman, 2013; RFA, 2014). Por lo tanto los biocombustibles de segunda generación aparecen como una alternativa para la producción de bioetanol y otros derivados con valor agregado en la optimización y aprovechamiento de residuos agrícolas e industriales. Sin embargo, la producción industrial de biocombustibles de segunda generación también han presentado desventajas que incluyen i) proceso complejo que requiere múltiples pasos incluyendo pretratamiento, sacarificación enzimática y fermentación (recalcitrancia de lignocelulosa), ii) fermentación de azúcares pentosas derivados de hemicelulosa, iii) altas dosis de enzimas, iv) alta concentración de sólidos (lodos celulósicos), y v) tiempo de producción. Por ello, se hacen esfuerzos en la investigación de estrategias que ayuden a superar los factores que desafían la aplicación competitiva en costos de la tecnología de etanol de segunda generación.

Estados Unidos tiene la mayor capacidad instalada para la producción biocombustible de segunda generación, seguido de China, Canadá, Unión Europea (UE) y Brasil. Los proyectos de producción comercial en estos países varían significativamente tanto en sus enfoques tecnológicos como en las materias primas utilizadas. En el año 2014, se evidenció un incremento en la producción de bioetanol de segunda generación. Las empresas Abengoa, Dupont, POET-DSM y Quad County Corn Processors fueron los pioneros en la producción industrial de bioetanol de segunda generación (RFA, 2014).

A nivel mundial una gran cantidad de biomasa residual lignocelulósica se genera. Siendo la celulosa, considerada uno de los biopolímeros más abundantes del planeta, esta es una fuente importante de carbono para ser utilizada en la producción de biocombustibles. La caña de azúcar es uno de los principales cultivos a nivel mundial. Actualmente es cultivada por más de 100 países en aproximadamente 26 millones de hectáreas en el mundo, en donde se producen aproximadamente 1.8 billones de toneladas de caña (FAO, 2013). El aumento en el cultivo de caña de azúcar se debe principalmente a la alta demanda de azúcar tanto para el consumo alimentario como para la producción de bioetanol.

Una tonelada de la caña que se procesa en una planta produce aproximadamente 0.3 toneladas (húmedo) de bagazo de caña. El bagazo es el residuo fibroso de los tallos de la caña de azúcar de los procesos de refinamiento de azúcar (Hofsetz & Silva, 2012). El bagazo de caña de azúcar se compone de 48 % de celulosa, 31 % de hemicelulosa (principalmente xilosa y galactosa) y un 19 % de lignina, aproximadamente. El bajo contenido de cenizas (alrededor de 2-3 %) y el rendimiento de masa/área de cultivo (aproximadamente 80 toneladas/hectárea) en comparación con otros residuos de cosechas generan ventajas competitivas en los procesos tecnológicos para producción de energía y/o bio-productos. Por lo tanto, la valorización de este tipo de residuo lignocelulósico

junto con la aplicación de nuevas tecnologías de aprovechamiento energético son potenciales para la obtención de biocombustibles de segunda generación.

1.8 OBJETIVOS

Este trabajo apunta a la optimización de los procesos involucrados en la producción de etanol celulósico mediante el empleo de una nueva estrategia que implica la obtención de mostos concentrados gracias a un proceso de pre-digestión de la biomasa, seguido de sacarificación y fermentación simultánea. A esto se incorpora además un proceso de fermentación continua, lo que redundará en la mayor eficiencia en la producción de etanol reflejado en mayores contenidos de etanol; la reducción del tiempo de producción de etanol; la optimización del espacio en fermentadores por el empleo de cultivos continuos; el ahorro de enzimas; y, la consecuente optimización en los costos de producción.

Para cumplir el objetivo general de la tesis, se ha planificado la investigación en tres fases experimentales: Selección de una cepa de levadura con habilidades de fermentación para producción de etanol celulósico, determinación y establecimiento de las condiciones más adecuadas de pretratamiento del bagazo de caña de azúcar en función de los rendimientos que se obtengan tanto en sacarificación, como en fermentación y el diseño de un nuevo proceso con mejor rendimiento para la producción de etanol celulósico con miras a escalamiento industrial.

A continuación se describen los objetivos específicos:

- Determinar la fuente y concentración óptima de nitrógeno requerida por levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* para procesos de fermentación de etanol
- Evaluar la dominancia en co-cultivos de diferentes cepas de levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* con reutilización de biomasa celular.

- Determinar el efecto de la reutilización de biomasa celular en co-fermentaciones discontinuas (batch) con diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Estudiar la cinética de fermentación en batch y el rendimiento de etanol, con las mejores condiciones pre-establecidas de concentración de nitrógeno.
- Seleccionar una cepa de levadura en función de las características más adecuadas para procesos de fermentación: dominancia y mejor rendimiento de producción de etanol
- Determinar el efecto de diferentes catalizadores, temperaturas, tiempos de reacción y sistemas de calentamiento en los pretratamientos de biomasa lignocelulósica
- Definir las condiciones más adecuadas de pretratamiento de biomasa lignocelulósica en relación a la sacarificación de polímeros y fermentación de azúcares solubles
- Establecer un modelo completo y estandarizado del proceso de sacarificación y fermentación simultánea semi-continua (SFSS)

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se resumen los materiales, equipos y softwares utilizados en la presente investigación. Además, se detallan las técnicas de caracterización, procesos y ensayos; y métodos de análisis estadísticos, entre otros. Todo lo mencionado anteriormente conforma la parte metodológica y experimental utilizada en el desarrollo de la tesis

2.1 MATERIALES

2.1.1 Reactivos

- Enzimas Cellic® CTec2 y HTec2 donadas por Novozymes
- Hidróxido de sodio, NaOH (No. CAS 1310-73-2; $\geq 97\%$) de Sigma Aldrich
- Ácido sulfúrico, H₂SO₄ (No. CAS 7664-93-9; 98%) de Merck
- Ácido maleico, C₄H₄O₄ (No. CAS 110-16-7) de Merck
- Ácido oxálico, H₂C₂O₄ (No. CAS 144-62-7) de Merck
- Dióxido de titanio, TiO₂ (No. CAS 1317-70-0, anatase, 99.7%)
- Ácido fosfórico, H₃PO₄ (No. CAS 7664-38-2; 85%) de Panreac
- Sulfolane, C₄H₈O₂S (No. CAS 126-33-0; 99%)

2.1.2 Equipos

- Espectrofotómetro Spectronic Helios Beta de Thermo Fisher Scientific
- Microscopio de contraste de fases Olympus BX51
- Termociclador Techne TC-412
- Cámara de electroforesis Enduro de Labnet

- NanoDrop 2000c de Thermo Scientific
- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) de Agilent con una columna Rezex ROA-Organic acid H+. Condiciones: 79°C; fase móvil: H₂SO₄ 0.005 N; flujo: 0.6 mL·min⁻¹)
- Termobloque de VWR Scientific products
- Incubadora con agitación horizontal Labnet 311DS
- Ultracentrífuga Sorvall RC6
- Microcentrífuga Sigma 1-15K
- Molino de bolas Retsch MM400
- Reactor de Presión Parr 4848
- Espectrómetro FTIR Nicolet iS50 de Thermo Scientific equipado con un sistema de reflexión Total Atenuada (ATR) de diamante
- Reactor de presión de Biorrefinería CNIB-PUCE
- Bioreactor Bioflo & Celligen 310 de New Brunswick Scientific
- Microondas Milestone Ethos-One
- Sonicador model CSA 20-S500

2.1.3 Softwares

- IBM SPSS

2.2 SELECCIÓN DE LEVADURAS PARA FERMENTACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL CELULÓSICO

2.2.1 Cepas de Levaduras

Se trabajó con 150 aislados de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* provistas por la Colección de Levaduras Quito Católica. Estas levaduras incluyeron principalmente aislados de levaduras relacionadas a bebidas fermentadas, levaduras recuperadas de vasijas arqueológicas (método utilizado RHM, secreto industrial PUCE), levaduras comerciales (vino, cerveza y destileras) y levaduras aisladas a partir de sustratos naturales (insectos, material vegetal, suelo, cuerpos de agua y material en descomposición).

2.2.2 Identificación de levaduras a nivel de especie

Las levaduras fueron caracterizadas a nivel de especie mediante técnicas moleculares: se utilizó la técnica de RFLPs de la región ITS del ADN ribosomal.

2.2.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se resuspendió la biomasa celular obtenida a partir de un cultivo de 48 horas (medio YPD) en 500 μ L de tampón de lisis (Tris 50mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM pH8, SDS 0,3% y aforar con agua a 200 mL) y 0,4 g de microesferas de vidrio. La mezcla se agitó durante 3 minutos en vórtex a máxima velocidad y se incubó a 65°C por 1 hora. Luego, la mezcla se agitó nuevamente por 3 minutos y se centrifugó a 7000 rpm por 15 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se conservó el ADN a -20°C.

2.2.2.2 Amplificación de la región ITS del ADN ribosomal

Se amplificó la región ITS (gen 5,8S y los espaciadores ITS1 e ITS2) (Figura 10). El amplificado se digirió con tres enzimas de restricción (HhaI, HaeIII y HinfI). El perfil de digestión obtenido permitió identificar las especies de acuerdo al patrón específico de cada especie (Sanguandeeikul, Chanprasartsuk, & Prakitchaiwattana, 2018).

Con el objetivo de confirmar el género y determinar la especie de los aislados de levaduras se realizó la amplificación de la región ITS con los primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3').

Para la amplificación de la región ITS se preparó un mix con volumen final de 50 µL que contenía: 1X de tampón Go Taq Reaction, 1,5 mM de MgCl₂, 0,8 mM de dNTPs, 0,3 uM de cada primer, 2 U de taq polimerasa, 28,1 µL de agua libre de nucleasa y 30 ng de ADN molde. Las condiciones de la PCR fueron: una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a: 93°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos; y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

2.2.2.3 ITS-RFLPs

La región amplificada ITS se digirió independientemente con las enzimas de restricción: HhaI (5'GCG C 3'), HaeIII (5'GG CC 3') y HinfI (5'G ANTC 3'). El mix de digestión que contiene 10 µL de producto de PCR, 4X de tampón de React®2, 8U de la enzima respectiva y 2,2 µL de agua libre de nucleasa fue incubado a 37°C por 8 horas.

Para identificar las levaduras a nivel de especie, el tamaño del amplificado de la región ITS junto con los tamaños de los fragmentos obtenidos de la digestión con enzimas de restricción se compararon con la base de datos de la Colección de Levaduras Quito Católica, CLQCA (www.cnib.com.ec).

La amplificación del ITS junto con los fragmentos de digestión se evidenciaron en geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (8,5 ug/mL). El ladder de ADN 100 bp fue utilizado como escalera de pesos moleculares. Los geles fueron visualizados en transiluminador UV y procesados en un sistema de fotodocumentación.

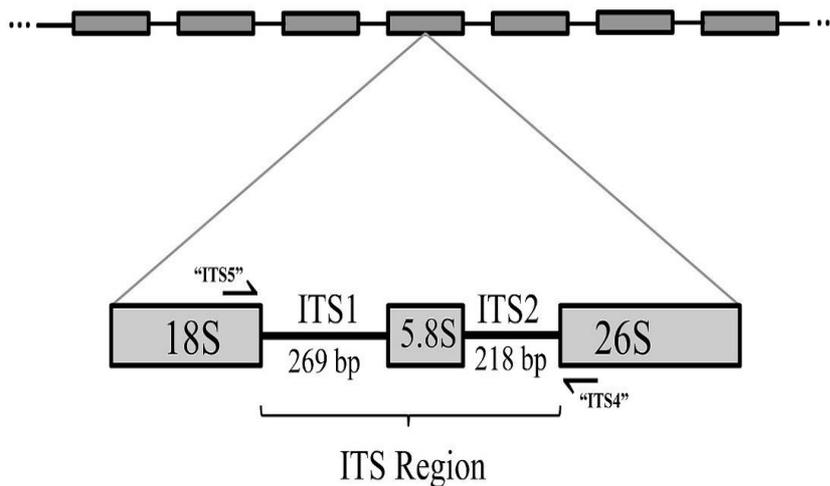


Figura 10. Región ITS del ADN ribosomal, que comprende gen 5.8S y espaciadores intergénicos ITS1 e ITS2

2.2.3 Pruebas de asimilación y fermentación de azúcares

Las pruebas de asimilación y fermentación de azúcares permitieron evaluar la capacidad de degradación de diferentes azúcares y especialmente su habilidad para fermentarlos. Los sustratos probados fueron: glucosa, xilosa, sacarosa, galactosa, fructosa, lactosa, rafinosa y maltosa.

Las pruebas se hicieron en tubos de 10 mL con tapa rosca, los cuales contenían una campana Durham invertida para coleccionar el CO₂ desprendido durante la fermentación. El medio contenía 20 g/L de cada azúcar y 6,7 g/L de YNB (Yeast Nitrogen Base). Este medio fue inoculado con 10 µL de un pre-cultivo de levadura en crecimiento exponencial.

La respuesta de asimilación se determinó en base a la turbidez generada por el crecimiento de las levaduras, mientras que la fermentación se determinó en base al CO₂ desprendido. En ambos casos, la asimilación y la fermentación de azúcares se evaluó a los 3, 7, 14 y 21 días. En donde se realizó un análisis del comportamiento de las levaduras para poder determinar el grado de respuesta: (+) positivo, (S) positivo lento, (W) positivo débil, (L) positivo retardado y (-) negativo (Kurtzman, C, Fell, J, & Boekhout, T, 2010). Adicionalmente, se evaluó la respuesta de asimilación y fermentación de cada cepa a las 24 horas de la prueba. Esto nos permitió seleccionar aquellas levaduras de rápida respuesta en asimilación y fermentación de azúcares (glucosa)

2.2.4 Efecto de la fuente y concentración inicial de nitrógeno en el perfil de consumo de glucosa de *S. cerevisiae*

Para este estudio se trabajó con cuatro cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*: CLQCA–INT–001, CLQCA–INT–005 y CLQCA–10–099 provistas por la Colección de Levaduras Quito Católica del Ecuador (CLQCA) y UCLM 325 provista por el Laboratorio de Biotecnología de Levaduras de la Universidad de Castilla la Mancha. Estas levaduras fueron escogidas entre 150 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*; en relación a su habilidad fermentativa a las 24 horas.

Para la preparación del inóculo de levaduras, en un matraz de fermentación de 250 mL se agregó 100 mL de medio de cultivo (glucosa 50 g/L, peptona 10 g/L y extracto de levadura 10 g/L) y 2 asadas de colonias de cada cepa de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de cajas de Petri con medios de cultivo sólidos (YPD). Los matraces fueron incubados a 30°C, con agitación continua a 200 rpm durante 48 horas.

Para la formulación de los medios, se probó diferentes fuentes y concentraciones de nitrógeno: fosfato de amonio (1 y 2 gN/L), amoníaco (1 y 2 gN/L) e hidrolizado de

levadura (0,5 – 2,5 gN/L). Las pruebas de fermentación se realizaron en matraces con un medio de cultivo compuesto por 100 g/L de glucosa, 38,5 g/L de glicerol y la concentración de nitrógeno correspondiente a cada uno de los tratamientos del diseño experimental. El medio de cultivo fue autoclavado a 121°C por 15 min, e inoculado con 1×10^8 células/mL de cada cepa de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*. El cultivo fue incubado a 34°C, a 200 rpm por 24 horas.

La glucosa residual del medio de cultivo fue determinada por el método de Rebelein. Y el consumo de la glucosa fue calculada con la ecuación 1.

$$\text{Consumo de glucosa (\%)} = \frac{\text{Glucosa}_i - \text{Glucosa}_f}{\text{Glucosa}_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

2.2.5 Concentración mínima de nitrógeno requerida para la fermentación

Una vez elegida la mejor fuente de nitrógeno para la fermentación, se determinó la concentración mínima necesaria de nitrógeno que influye tanto en el crecimiento celular como en el consumo de glucosa en un medio de cultivo determinado. Las fermentaciones se realizaron en matraces de fermentación de 250 mL, con 100 mL de medio que contiene 100 g/L de glucosa, 38,5 g/L de glicerol y diferentes concentraciones de nitrógeno (0,2; 0,3 y 0,4 gN/L de hidrolizado de levadura), una prueba control se realizó en donde no se adicionó fuente de nitrógeno. El medio de fermentación se inoculó con una suspensión de 1×10^8 células/mL de cada cepa de *S. cerevisiae* para evaluar el crecimiento y consumo de glucosa en fermentaciones individuales. Finalmente, se incubó a 34°C, 200 rpm por 24 horas. Al finalizar la fermentación se cuantificó la glucosa consumida, según la ecuación 1.

2.2.6 Co-fermentaciones de diferentes cepas de *S. cerevisiae* con reutilización de biomasa celular

Estas pruebas permitieron determinar el comportamiento de las cepas de levadura en fermentaciones en co-cultivo. Para ello, se adicionó en un matraz de fermentación: 100 mL de medio de cultivo (100 g/L de glucosa; 38,5 g/L de glicerol y 0,4 gN/L de hidrolizado de levadura) y 2.5×10^7 células/mL de cada cepa de *S. cerevisiae*; y se incubó a 34°C, 200 rpm por 96 horas. Cuando un ciclo de fermentación terminó (24 horas), el consumo de glucosa fue cuantificado (Ecuación 1) y la biomasa de levaduras fue recuperada por centrifugación a 7000 rpm por 5 minutos, para su reutilización en el siguiente ciclo de fermentación. Se realizaron 4 ciclos de co-fermentación reutilizando biomasa celular de levaduras, con adición de medio de cultivo fresco.

Al finalizar los cuatro ciclos de co-fermentación, se determinó la dominancia de las cepas de *S. cerevisiae* utilizando técnicas de biología molecular (análisis de restricción de ADN mitocondrial). Se sembró en cajas de Petri con medio de cultivo sólido (YM) diluciones seriadas del medio resultante de co-fermentación. Se utilizó la técnica de siembra en superficie, en donde 100 µL del medio fue colocado directamente en el medio sólido y posteriormente fue extendido con un asa Drigalski. Después del periodo de incubación a 34°C por 72 horas, se trabajó con las placas que presentaron un número entre 30 y 300 colonias por placa (estadísticamente aceptable).

Se eligió 10 colonias al azar por placa, y se realizó el protocolo propuesto por Querol et al. (1992) de extracción de ADN y digestión con enzimas de restricción del ADN mitocondrial. Cultivos puros de cada cepa de *S. cerevisiae* fueron utilizados como referencia para compararlos con los perfiles obtenidos después de co-fermentación. Los productos de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% p/v

con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. El ladder de ADN 1Kb fue utilizado como escalera de pesos moleculares. Los geles fueron visualizados en transiluminador UV y procesados en un Sistema de fotodocumentación.

Para determinar el porcentaje de dominancia de las cepas en co-cultivo, el número de aislados de la misma cepa (identificados por mtADN) se dividió para el número de aislados de la muestra (n=10) y luego se multiplicó por 100.

Para determinar el efecto de la reutilización celular en procesos de fermentación se evaluó la habilidad de consumo de glucosa en los cuatro ciclos de co-fermentación.

2.2.7 Cinética de producción de etanol y consumo de glucosa

Una vez determinado el medio de fermentación adecuado (100 g/L de glucosa; 38,5 g/L de glicerol y 0,4 gN/L de hidrolizado de levadura), se estableció la cepa de *S. cerevisiae* más efectiva en relación a la producción de etanol. La cinética de producción de etanol y consumo de glucosa se monitoreó en un ciclo de fermentación en los intervalos de tiempo de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 24 horas. Se tomó una alícuota de 1 mL, se centrifugó a 7000 rpm por 5 minutos y se analizó el sobrenadante por HPLC; estos resultados permitieron establecer la cinética de fermentación y además se calculó el rendimiento de etanol usando la ecuación 2.

$$\text{Rendimiento de etanol (\%)} = \left(\frac{C_{\text{etanol}}}{0.51 \times C_{\text{glucosa}}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

C_{etanol} : concentración de etanol al final de la fermentación (en g/L)

C_{glucosa} : concentración de glucosa al inicio de la fermentación (en g/L)

0.51: factor estequiométrico de conversión de glucosa a etanol mediado por el metabolismo de levaduras.

2.3 CARACTERIZACIÓN DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

2.3.1 Materia prima: Bagazo de caña de azúcar

La materia prima (material lignocelulósico) con la cual se trabajó en este estudio fue el bagazo de caña de azúcar, el mismo que fue proporcionado por el Ingenio azucarero del Norte (Imbabura, Ecuador). La variedad de caña de azúcar CC85-92, fue cultivada y recolectada en la provincia de Imbabura, sector Tababuela 00°28'56''N 078°05'44''W a 1520 m.s.n.m. Después de la recolección, se realiza la extracción del jugo de la caña obteniéndose el bagazo como residuo o remanente (principalmente tallos) de la caña de azúcar; resultando en un sub-producto de la elaboración y refinación de azúcar.

2.3.2 Análisis químico del bagazo de caña de azúcar

Para la determinación de la composición del bagazo de caña de azúcar se utilizaron: la fibra de detergente neutro, FDN (método MO-LSAIA-02.01), la fibra de detergente ácido, FDA (method MO-LSAIA-02.02), y la lignina de detergente ácida, ADL (method MO-LSAIA-02.03).

Las muestras son tratadas con diferentes disolventes para determinar la fracción de fibra. Los residuos que no se disuelven, luego se secan, pesan e incineran. El ADF, NDF y ADL de la muestra, corresponde a la pérdida de masa producida durante la incineración; y permiten determinar el porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina que conforman el material. La materia que no se disuelve con solución detergente ácida se denomina ADF, por otro lado la materia que no se separa con solución detergente neutra se denomina NDF. Finalmente, la solución de ADF se disuelve con ácido sulfúrico para obtener lignina pura, ADL. Por lo tanto, la diferencia entre NDF y ADF corresponde al porcentaje de hemicelulosa, mientras la diferencia de FDA y ADL corresponde a la celulosa.

Los ensayos fueron realizados en los laboratorios del INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias) de Ecuador.

2.4 PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

El pretratamiento de la biomasa tiene como objetivos la deslignificación de la biomasa lignocelulósica, disminución de la cristalinidad de la celulosa y aumento de la porosidad; mejorando la accesibilidad y digestibilidad de los polisacáridos para la hidrólisis enzimática.

2.4.1 Preparación de la muestra

La reducción de tamaño de la materia prima genera una mayor área superficial de contacto siendo indispensable para cualquier otro pretratamiento.

El material seco fue cortado hasta obtener fibras de 5 a 10 cm de largo, luego se molió en un molino de bolas obteniéndose partículas más pequeñas, y finalmente el polvo fue tamizado secuencialmente hasta obtener partículas menores a 100 μm .

2.4.2 Pretratamientos químicos con reactor de presión

Para seleccionar el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar más adecuado se estudió el efecto de diferentes catalizadores, temperaturas y tiempos de reacción, en un reactor de presión. El reactor tiene un sistema de agitación interna mecánica con un eje radial con 6 aspas, que facilita la homogenización de la muestra y la solución en la reacción. Además el equipo emplea un control de temperatura PID, lo cual garantiza una precisión controlada de temperatura.

Los catalizadores utilizados para los diferentes pretratamientos incluyeron: NaOH, H₂SO₄, ácido oxálico y ácido maleico, todos ellos a una concentración de 1% (p/v).

En un reactor de presión se agregó 10% (p/v) de biomasa seca y la solución de catalizadores al 1% (p/v) en una relación sólido a líquido 1:10. Esta mezcla se sometió a diferentes condiciones de temperatura: 130, 140, 150, 160 y 170°C y tiempos de reacción: 10, 20 y 30 minutos. Una vez alcanzada la temperatura de reacción, el tiempo fue cuantificado. Al finalizar la reacción, la fracción sólida obtenida de la hidrólisis físico-química fue lavada por centrifugación (7000 rpm por 5 minutos) con agua destilada, hasta alcanzar un pH neutro. Finalmente, el residuo sólido fue secado a 105°C hasta alcanzar un peso constante $\pm 0,1$ % de cambio de peso. La recuperación de la fracción sólida (%) fue determinada de acuerdo a la ecuación 3:

$$\text{Fracción sólida (\%)} = \frac{\text{Peso final de biomasa pretratada}}{\text{Peso inicial de biomasa}} \times 100$$

Ecuación 3

2.4.3 Pretratamientos químicos con irradiación de microondas

El pretratamiento de bagazo de caña de azúcar se realizó en un horno de microondas, en condiciones alcalinas a diferentes concentraciones de NaOH (0,5; 1; 3 y 5%). Se realizaron experimentos en los cuales se determinó el efecto del sulfolane y TiO₂ en pretratamientos alcalinos con irradiación de microondas. En este sentido se probó pretratamientos con y sin medio organosolv (Sulfolane-TiO₂). El experimento se realizó con bagazo de caña de azúcar (carga de sólidos del 10%, p/v), 0,2% de TiO₂, y una solución de NaOH y sulfolane en relación de 1:1. La mezcla fue sometida a sonicación (1000 W, 20kHz) por un minuto e irradiación de microondas a diferentes temperaturas (120, 130 y 140°C) y tiempos de reacción (5, 15, 30, 45 y 60 minutos). La fracción sólida fue lavada por centrifugación (5000 rpm, por 10 minutos) hasta alcanzar pH neutro.

2.5 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA FRACCIÓN DE HOLOCELULOSA DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

La hidrólisis enzimática libera azúcares fermentables a partir de los polisacáridos de celulosa y hemicelulosa. Para ello se utiliza complejos enzimáticos de celulasas y hemicelulasas. Se utilizaron las enzimas Cellic®Ctec2 y Htec2 de Novozymes. El complejo enzimático de Ctec2 incluye: celulasas (exo y endoglucanasas), β -glucosidasas y hemicelulasas. Mientras que el complejo de Htec2 está conformado por endoxilanasas. Ambas, Ctec2 y Htec2 actúan sinérgicamente, mejorando la hidrólisis de la celulosa.

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en frascos de 100 mL, se adicionó biomasa seca y tampón citrato de sodio 0,05 M a pH 4,5, en un relación líquido a sólido; 1,5:10. Finalmente, se adicionó a la mezcla 10 FPU de Ctec2 y el 20% del volumen total de Ctec2 se agregó de Htec2. La reacción se incubó a 55°C, siendo esta la temperatura óptima de acción de ambos complejos enzimáticos, con una agitación de 200 rpm por 72 horas. El hidrolizado (fracción líquida) fue recuperado por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos. Finalmente el hidrolizado, fue almacenado en congelación.

Para el análisis del hidrolizado por HPLC, una alícuota de 1 mL fue nuevamente centrifugada (10000 rpm por 5min), filtrada (0,22 μ m) y diluida en fase móvil (H₂SO₄).

Mediante HPLC se cualificó y cuantificó azúcares como glucosa, celobiosa y celotriosa; como productos de la hidrólisis de la celulosa; y xilosa como producto de la hidrólisis de la hemicelulosa. El rendimiento de sacáridos a partir del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar pretratado se calculó con la ecuación 4.

$$\text{Rendimiento de sacáridos (\%)} = \frac{\left(\frac{C_{\text{glucosa}} \times 0.9}{C_{\text{Celulosa}}} + \frac{C_{\text{xilosa}} \times 0.88}{C_{\text{Hemicelulosa}}} \right) \times \text{fracción sólida}}{C_{\text{sustrato}}} \times 100$$

Ecuación 4

Donde:

C_{glucosa} : concentración de glucosa en el hidrolizado (en g/L)

C_{xilosa} : concentración de xilosa del hidrolizado (en g/L)

0,9: factor de conversión de glucano a glucosa

0,88: factor de conversión de xilano a xilosa

C_{sustrato} : concentración de sustrato (en g/L)

Celulosa: composición inicial en el bagazo de caña de azúcar (en g/g)

Hemicelulosa: composición inicial en el bagazo de caña de azúcar (en g/g)

2.6 FERMENTACIÓN EN BATCH

Todos los procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad para evitar contaminación. El material utilizado en la fermentación se autoclavó a 121°C por 15 minutos.

La cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* CLQCA-INT-005 fue utilizada en la fermentación. La levadura fue sembrada en medio sólido YM (Yeast malt) e incubada a 30°C por 72 horas. Posteriormente se inoculó una colonia en un frasco con 50 mL de medio líquido YPD e incubó a 30°C a 200 rpm por 48 horas.

Las células de levadura fueron aclimatadas en el medio de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar por un período de 96 horas. Se realizaron cultivos sucesivos de las células de levadura en medios líquidos de YPD e hidrolizado; se utilizó proporciones crecientes graduales de hidrolizado (25% a 100%) cada 24 horas, y se incubaron a 30°C en agitación a 200 rpm. Finalmente, la biomasa de células de levadura se lavó por centrifugación (5000 rpm por 5 minutos) con agua destilada estéril.

La fermentación se realizó en tubos con 5 mL de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar y 0,67% (p/v) de YNB (Yeast Nitrogen Base) como suplemento de fuente de nitrógeno. Este medio de cultivo (hidrolizado + fuente de nitrógeno) se esterilizó por filtración; para ello se utilizó un filtro millipore de 0,22 μm . A esta mezcla se inoculó 1×10^8 células/ mL de levadura de *S. cerevisiae* previamente aclimatada. La incubación se llevó a cabo a 30°C, a 100 rpm por 72 horas. Finalmente, el producto de fermentación fue centrifugado (7000 por 10 minutos), y la fracción líquida se recuperó para el análisis por HPLC.

Para el análisis del producto de fermentación por HPLC, una alícuota de 1 mL fue nuevamente centrifugada (10000 rpm por 5 min), filtrada (0,22 μm) y diluida en fase móvil (H_2SO_4).

Mediante HPLC se cualificó y cuantificó el etanol como producto de la fermentación. El rendimiento de etanol teórico se calculó con la ecuación 5.

$$\text{Rendimiento de etanol (\%)} = \left(\frac{C_{\text{etanol}}}{0.51 \times C_{\text{glucosa}}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

2.7 SISTEMA DE FERMENTACIÓN SEMI-CONTINUO ACOPLADO A SACARIFICACIÓN SIMULTÁNEA (SFSS)

El sistema de SFSS permite aumentar el rendimiento de etanol con menor tiempo de operación y costos de producción. Por lo tanto, para la producción de etanol celulósico fue necesario optimizar todas las fases del proceso incluyendo: pretratamiento de biomasa lignocelulósica, sacarificación de polisacáridos y fermentación de azúcares solubles (principalmente glucosa). Una vez determinadas las condiciones óptimas de operatividad se propone el sistema SFSS como una alternativa de producción de etanol celulósico a escala industrial.

2.7.1 Pretratamiento de biomasa lignocelulósica

Una vez determinadas las condiciones óptimas de pretratamiento en el laboratorio se escaló a planta piloto en la Biorrefinería del Centro Neotropical para Investigación de la Biomasa de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (CNIB-PUCE) (Figura 11). El bagazo de caña de azúcar fue cortado y molido, con molino de martillos y discos de piedra, respectivamente. El polvo obtenido fue directamente agregado en el reactor de presión (400 L, volumen de capacidad). El catalizador utilizado para el pretratamiento fue NaOH (1%, p/v). La solución de NaOH fue preparada en una tolva (400 L), y luego se agregó al reactor de presión en una relación sólido a líquido de 1:10. El sistema de calentamiento del reactor es por aceite térmico, el mismo que es calentado en un caldero a 200°C. El equipo emplea un control PID y sensores de temperatura lo cual evita fluctuaciones de temperatura que puedan interferir en el proceso. Una vez alcanzada la temperatura de reacción (160°C) se contabilizó el tiempo de reacción (20 minutos).

El producto del pretratamiento alcalino de bagazo de caña de azúcar, fue transferido a un filtro prensa mediante un sistema de bombas neumáticas. La fracción sólida fue separada de la líquida por filtración y fue lavada con agua destilada hasta alcanzar pH neutro. La biomasa fue secada y molida hasta obtener partículas menores de 100 µm.

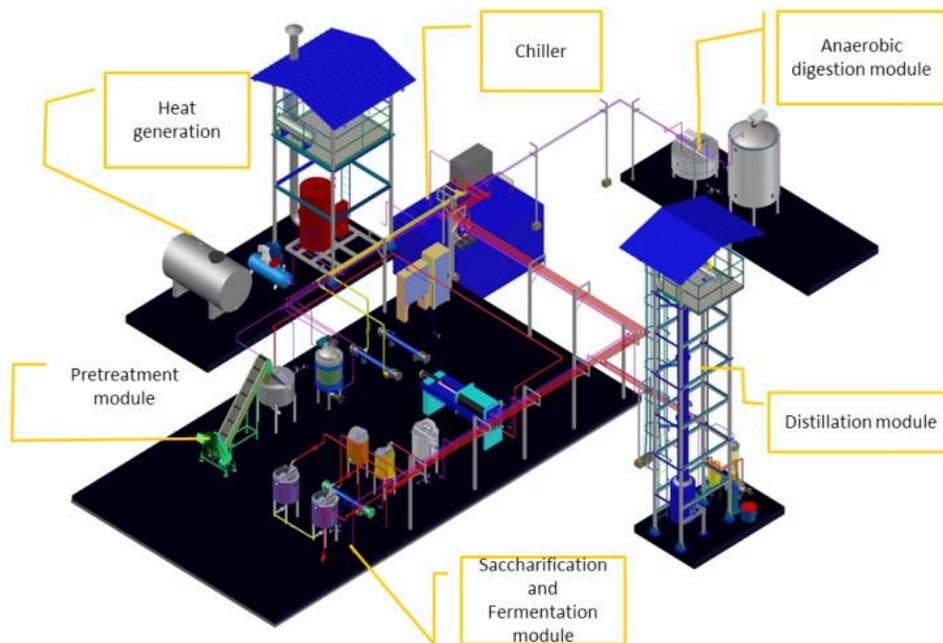


Figura 11. Plano isométrico de la biorrefinería CNIB-PUCE

2.7.2 Pre-hidrólisis enzimática

Un paso de pre-hidrólisis es requerido para aumentar la carga de sólidos en un proceso de sacarificación enzimática. El bagazo de caña de azúcar pretratado fue añadido en frascos en conjunto con una solución de tampón citrato 0,05 M (pH 4,5). Además, se agregó 6 FPU de la enzima Cellic® Ctec2 y Htec2 (que constituyó el 20% del volumen de la celulasa incorporada a la mezcla). La primera carga de sólidos (10%, p/v) fue incubada a 55°C con agitación (200 rpm) por 4 horas. Luego, la segunda carga de sólidos fue agregada a la mezcla, alcanzando el 25% de sólidos totales.

2.7.3 Acondicionamiento del sistema de fermentación semi-continuo acoplado a sacarificación simultánea (SFSS)

El sistema de SFSS fue llevado a cabo en un biorreactor de 2 litros en condiciones estables de temperatura, agitación y pH; 30°C, 100 rpm y pH 4,5, respectivamente. Se añadió 1 litro de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar con un cultivo iniciador de levaduras aclimatadas de *S. cerevisiae* (1×10^8 células/mL). Cada 24 horas, el 10% del volumen

total fue retirado del biorreactor e inmediatamente fue alimentado el sistema con el 10% de prehidrolizado de bagazo de caña de azúcar, completando el volumen final. Se estableció la cinética de producción de etanol y consumo de glucosa por un período de 30 días. Para ello, una alícuota del producto de sacarificación y fermentación simultánea fue centrifugado, filtrado y analizado por HPLC, para determinar la concentración de etanol; y glucosa u otros sacáridos. Se presenta un esquema del proceso de SFSS en la Figura 12:

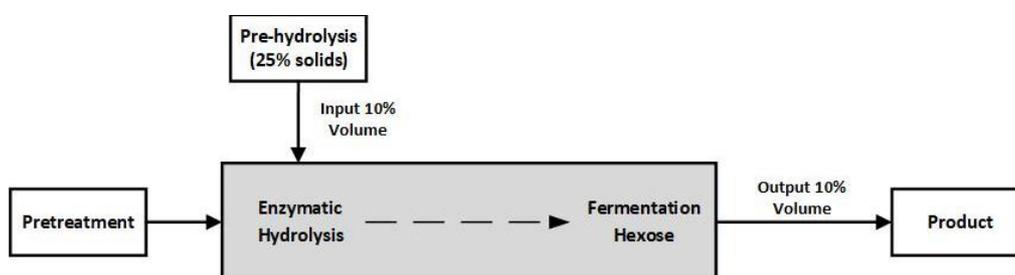


Figura 12. Esquema general del proceso SFSS

2.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.8.1 Determinación de azúcares reductores totales (TRS)

El método de Miller es el más conocido para la cuantificación de azúcares reductores (total reducing sugar, TRS). Este es un método colorimétrico, que en determinadas condiciones el ácido 3,5 – dinitrosalicílico, DNS (color amarillo) es reducido a 3-amino, 5-nitrosalicílico (pardo oscuro) en presencia de azúcares reductores (azúcares con grupos carbonilos libres). Este cambio de color se usa para cuantificar los azúcares reductores mediante espectrofotometría UV-VIS a 540 nm. La curva de calibración se realiza con diluciones del estándar de glucosa, y relaciona la absorbancia con la concentración de azúcares.

El reactivo de DNS se preparó según la bibliografía. En un tubo se mezclan 2 mL de la disolución de la muestra con 2 mL del reactivo de DNS, luego se incuba en un baño maría

en ebullición por 10 minutos e inmediatamente se sumerge el tubo en un baño de hielo. Finalmente se agrega 10 mL de agua destilada. La absorbancia de la solución fue medida a 540 nm. El rendimiento de TRS se calculó con la siguiente ecuación 6:

$$\text{TRS (\%)} = \frac{\text{Concentración of TRS (g}\cdot\text{L}^{-1})}{\text{Concentración de biomasa inicial (g}\cdot\text{L}^{-1})} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

2.8.2 Análisis de HPLC

La cromatografía líquida de alta eficiencia es una técnica utilizada para separar componentes de una mezcla. La separación cromatográfica es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra (que es llevada por una fase móvil) y una fase estacionaria empaquetada dentro de una columna.

Los productos de hidrólisis enzimática y fermentación fueron analizados por un equipo de HPLC marca Agilent Technologies, 1200 Series, que tiene una bomba cuaternaria, automuestreador, horno de columna con control de temperatura y detector de índice de refracción. La columna de intercambio iónico utilizada fue Rezex ROA-Organic Acid H⁺. El análisis por HPLC se realizó con una solución de H₂SO₄ 0,005 N como fase móvil. Las condiciones de operación fueron las siguientes: 79°C y flujo de 0.6 mL/min. El volumen de muestra inyectada fue de 10 µL y el tiempo de corrida fue de 30 minutos.

Los compuestos fueron identificados por su tiempo de retención específico y la concentración fue cuantificada en relación a la curva de calibración realizada con los estándares de glucosa, xilosa, celobiosa, celotriosa, celodextrina, etanol, glicerol, ácido acético y ácido láctico.

2.8.3 Análisis de ATR-FTIR

Un análisis vibracional del bagazo de caña de azúcar con y sin pretratamiento se realizó con un espectrómetro FTIR (Thermo Scientific, Nicolet iS50 (Waltham, MA, USA) equipado con un sistema de diamante de reflexión total atenuada (ATR). El espectro fue colectado en el rango de 400-4000-1 con una resolución de 1 cm⁻¹ a temperatura ambiente; un total de 64 scans fue co-añadido, y el interferograma resultante fue promediado. Este método provee información acerca de enlaces químicos y la estructura molecular del material.

2.8.4 Análisis estadístico

Se realizó ANOVA para la sacarificación enzimática, fermentación y SFSS; y la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan los resultados de la investigación. En el escalamiento de procesos a nivel industrial para la producción de bioetanol (principalmente de segunda generación), continuamente se busca superar las barreras de producción enfocándose en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica y fermentación de azúcares solubles. En ambos casos, es necesario encontrar soluciones en relación a la operatividad y costos de producción que hagan el proceso más viable. Con lo mencionado anteriormente, los resultados de este estudio muestran las condiciones de pretratamientos más adecuados en función del incremento de la digestibilidad enzimática de los polímeros de celulosa resultando en el mejoramiento de los rendimientos de sacaridos. Por otro lado, se seleccionó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con las características más óptimas que incluyen mejores rendimientos de etanol, adaptación y dominancia en co-cultivos, lo cual garantiza las habilidades de producción de etanol y una fuerte implantación en procesos de fermentación. Finalmente, una vez establecidas las condiciones de pretratamiento y fermentación, se propone un sistema estable y eficiente en la producción continua de bioetanol.

3.1 SELECCIÓN DE LEVADURAS PARA PRODUCCIÓN DE ETANOL CELULÓSICO

Uno de los objetivos del estudio es la selección de las levaduras más aptas y con mayor desempeño en la producción de etanol con el fin de utilizarla en la estrategia de sacarificación y fermentación simultánea en cultivo semi-continua SFSS propuesta en este estudio.

3.1.1 Identificación molecular a nivel de especie de levaduras

Este estudio se basó principalmente en levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto su identificación es el primer paso para posteriores pruebas de fermentación. A pesar de que la bibliografía reporta a levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismos con gran poder fermentativo, existen diferencias entre sus habilidades fermentativas y desempeño en la producción de etanol. Estas diferencias se dan en parte por la fisiología de la levadura que está determinada por la variabilidad genética de las cepas.

El análisis de ITS-RFLPs mostró el perfil de fingerprinting de los 150 aislados de levaduras (Figura 13). Todos coincidieron con los perfiles de la base de datos de la CLQCA, correspondiendo a la especie de *Saccharomyces cerevisiae*: los resultados mostraron una variación de 10 – 20 pb (pares de bases) en algunos casos. A continuación se muestra el patrón de bandas y el tamaño de la región ITS amplificada y los fragmentos generados por la digestión con enzimas de restricción.

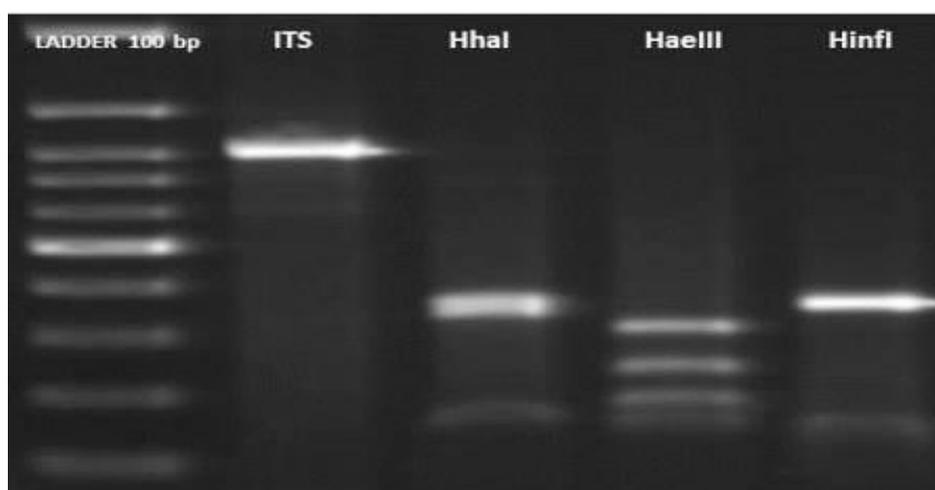


Figura 13. Perfil de restricción de la región ITS. Carril 1: Ladder 100 pb; carril 2: Región ITS (800 pb); carril 3: Digestión de ITS con la enzima HhaI (390 pb, 380 pb, 270 pb);

carril 4: Digestión de ITS con la enzima HaeIII (305 pb, 260 pb, 200 pb, 170 pb); y carril 5: Digestión de ITS con la enzima HinfI (350 pb)

3.1.2 Caracterización fisiológica de levaduras en base a la utilización de diferentes fuentes de carbono

Para determinar la fisiología de acuerdo a la utilización de fuentes de carbono se realizaron pruebas de asimilación y fermentación. Se estudió el comportamiento de 150 levaduras durante 21 días.

Los resultados mostraron que todas las levaduras asimilaron positivamente la glucosa. Por otro lado, los azúcares de maltosa, galactosa, sacarosa y rafinosa mostraron una asimilación positiva, con pocas excepciones de asimilación positiva lenta, débil y retardada. Por el contrario, azúcares como xilosa, lactosa y celobiosa no fueron asimilados.

En referencia a la actividad fermentativa de las levaduras, se observa una relación metabólica entre la asimilación y fermentación. Por lo tanto, los resultados muestran que las levaduras también fermentaron los azúcares que fueron asimilados (glucosa, maltosa, galactosa, sacarosa y rafinosa) dando resultados positivos y todas las variantes de este (S, D y L). En este sentido, los azúcares que no fueron asimilados tampoco fueron fermentados (Tabla 2).

Con lo mencionado anteriormente las levaduras asimilaron de forma positiva la glucosa, sin embargo las respuestas de fermentación fueron variables. Estas diferencias pueden atribuirse a características intrínsecas propias de cada aislado.

Además de la evaluación a los 3, 7, 14 y 21 días, que permite determinar el panorama general de asimilación y fermentación de estas levaduras; se hizo una prueba para

seleccionar las levaduras que tienen una respuesta positiva de fermentación a las 24 horas de incubación. Los resultados mostraron que de las 150 levaduras evaluadas, sólo 4 presentaron esta característica: CLQCA-10-099, CLQCA-INT-001, CLQCA-INT-005 y UCLM 325.

Tabla 2. Respuestas de asimilación y fermentación de diferentes fuentes de carbono de 150 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

SECUENCIA DE CODIGO	CLASE DE SUSTRATO	ASIMILACIÓN						FERMENTACIÓN									
		GLU	XIL	MAL	GAL	LAC	SAC	RAF	CEL	GLU	XIL	MAL	GAL	LAC	SAC	RAF	CEL
CLQCA-02-003	MATERIAL VEGETAL	+	-	+	+	-	+	+	W	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-04-021	INSECTO	+	-	-	+	-	+	+	-	W	-	-	+	-	+	L	-
CLQCA-04-048	MATERIAL VEGETAL	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
CLQCA-05-006	MATERIAL VEGETAL EN DESCOMPOSICIÓN	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	W	+	-	+	+	-
CLQCA-09-001	MATERIAL VEGETAL	+	-	S	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
CLQCA-09-002	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	S	-	+	S	-	+	W	-
CLQCA-09-003	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	S	-	S	+	-	S	S	-
CLQCA-09-004	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-09-005	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-09-006	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	L	-	+	+	-
CLQCA-09-008	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	L	-	+	+	-
CLQCA-09-009	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	L	+	-	+	+	-
CLQCA-09-011	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	S	-	S	+	-	L	W	-
CLQCA-09-012	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	L	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-09-015	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-09-016	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-09-017	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	S	+	-	+	+	-
CLQCA-09-018	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	W	-	W	W	-	+	+	-
CLQCA-09-019	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	L	-	L	S	-	+	+	-
CLQCA-09-021	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	S	-	+	S	-	L	S	-
CLQCA-09-022	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CLQCA-09-024	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	S	+	-	+	S	-
CLQCA-09-025	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	S	+	-	+	S	-
CLQCA-09-027	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	S	-	+	+	-	L	L	-
CLQCA-09-028	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	L	-	+	+	-	L	W	-
CLQCA-09-030	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	W	-	+	+	-	W	W	-
CLQCA-09-037	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	W	W	-	W	+	-
CLQCA-09-038	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	W	-	W	+	-	W	W	-
CLQCA-09-040	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-09-042	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-09-043	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-09-044	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-09-046	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-10-003	INSECTO	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-004	INSECTO	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-10-027	MATERIAL VEGETAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-082	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-

CLQCA-10-083	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	L	L	-	+	+	-
CLQCA-10-084	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-096	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
CLQCA-10-097	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-098	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-099	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-100	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-101	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-169	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-170	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-171	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	W
CLQCA-10-173	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-193	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CLQCA-10-215	MATERIAL VEGETAL	+	-	+	+	-	+	+	W	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-10-234	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	W	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-10-235	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	S	+	-
CLQCA-10-255	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-10-319	INTESTINO DE ANFIBIO	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-323	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-324	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-326	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-10-330	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	S	+	-
CLQCA-10-384	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	+	-	W	-	-	W	-	+	L	-	S	+	-
CLQCA-10-385	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	L	-	+	+	-	W	-	W	+	-	+	W	-
CLQCA-10-386	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	L	-	+	+	-	W	-	W	W	-	+	W	-
CLQCA-10-675	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-10-694	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-11-024	MATERIAL VEGETAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-11-027	MATERIAL VEGETAL	+	-	+	+	-	+	+	W	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-13-023	SUSTANCIA CEBOSA NO DETERMINADA	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-13-024	SUSTANCIA CEBOSA NO DETERMINADA	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-14-006	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-14-007	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	W	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-14-008	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-14-010	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	S	S	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-14-013	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-14-015	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-17-060	INSECTO	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-17-111	MATERIAL VEGETAL EN DESCOMPOSICIÓN	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-18-003	MATERIAL VEGETAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-18-006	MATERIAL VEGETAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-

CLQCA-18-008	MATERIAL VEGETAL	+	-	+	S	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-19-001	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-19-011	EXCREMENTO DE CABALLO	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-060	CUERPO DE AGUA	+	-	S	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-072	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-20-073	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-075	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-080	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	S	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-081	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-20-082	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-083	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	S	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-084	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-20-085	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-088	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-089	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	S	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-090	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-20-092	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-093	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	S	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-098	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-20-099	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-100	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	S	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-102	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	S	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-104	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-20-105	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	S	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-109	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	S	S	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-120	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-20-121	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-122	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-124	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	S	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-128	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	S	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-20-156	MATERIAL VEGETAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-184	MATERIAL VEGETAL	+	-	S	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-221	MATERIAL VEGETAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-20-246	TERMITERO	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-248	SUELO	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-259	MATERIAL VEGETAL EN DESCOMPOSICIÓN	+	-	S	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-20-314	TERMITERO	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	S	-
CLQCA-20-368	MATERIAL VEGETAL EN DESCOMPOSICIÓN	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-23-002	VASIJAS ARQUEOLÓGICAS	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-24SC-054	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	W	-	-
CLQCA-24SC-055	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	W	+	+	W	W	-	W	+	-	+	+	-

CLQCA-24SC-056	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	L	+	+	L	W	-	+	W	-	W	W	-
CLQCA-24SC-057	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	W	+	+	W	W	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-24SC-067	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	W	+	+	+	W	-	+	+	-	+	-	-
CLQCA-24SC-069	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	W	+	+	L	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-24SC-071	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	W	+	+	L	W	-	+	+	-	-	W	-
CLQCA-24SC-137	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	W	-	-	W	+	-	W	-	-
CLQCA-24SC-138	FERMENTACIONES RELACIONADAS A HUMANOS	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	W	-
CLQCA-24SC-235	EXUDADO	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	L	+	-
CLQCA-INT-001	LEVADURA MODIFICADA (BREW FERM ALDC 7)	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-INT-002	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	+	+	W	+	-	+	-	-	+	+	-
CLQCA-INT-003	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-INT-004	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	W	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-INT-005	LEVADURA COMERCIAL (TURBO YEAST)	+	-	+	+	-	+	+	W	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-INT-006	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
CLQCA-INT-009	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-INT-012	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	W	-
CLQCA-INT-013	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	-	-	+	+	W	+	-	+	-	-	+	+	-
CLQCA-INT-014	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
CLQCA-INT-025	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	W	+	-
CLQCA-INT-026	LEVADURA COMERCIAL	+	-	W	W	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLQCA-INT-027	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLQCA-INT-029	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-INT-031	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	L	-	+	+	-
CLQCA-INT-032	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	W	+	+	-	+	-	+	+	-	+	W	-
CLQCA-INT-033	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-
CLQCA-INT-034	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	W	-	+	+	-
CLQCA-INT-041	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
CLQCA-INT-043	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	L	-	+	+	-
CLQCA-INT-046	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	W	+	+	-	+	-	+	+	-	+	W	-
CLQCA-INT-083	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-
UCLM325	LEVADURA COMERCIAL	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-

Respuesta: Positivo (+), positivo débil (W), positivo lento (S), positivo retardado (L) y negativo (-)

3.1.3 Efecto de la fuente y concentración inicial de nitrógeno en el perfil de consumo de glucosa de *S. cerevisiae*

El primer factor que se analizó fue la fuente de nitrógeno utilizada por las levaduras. La fuente de carbono fue glucosa, y la concentración utilizada fue de 100 g/L en todas las pruebas. Las variables estudiadas fueron fuente y concentración de nitrógeno: fosfato de amonio (1 y 2 gN/L), amoníaco (1 y 2 gN/L) e hidrolizado de levadura (0,5; 1; 1,5; 2 y 2;5 gN/L).

Se trabajó con cuatro cepas de levadura de la especie *S. cerevisiae*: CLQCA-10-099, CLQCA-INT-001, CLQCA-INT-005 y UCLM325, las mismas que fueron seleccionadas en estudios previos por su rápida respuesta de fermentación.

El análisis estadístico indica que hay diferencias significativas referentes a la fuente de nitrógeno utilizada. Las fuentes de nitrógeno que incluyen al fosfato de amonio y amoníaco, muestran ser menos eficientes cuando son añadidas a un medio de fermentación, provocando en las levaduras menor consumo de glucosa. En todos los casos, al aumentar la concentración de la fuente de nitrógeno, se observa un incremento en el consumo de glucosa, lo cual indica que la concentración de nitrógeno si influye en el metabolismo celular de la levadura (Tabla 3).

Por otro lado, la adición de hidrolizado de levadura al medio de fermentación evidenció un mayor consumo de glucosa entre 78,2 y 99,9%. En este caso, no se observan diferencias significativas en la concentración de nitrógeno adicionadas al medio, lo cual indica que se podría utilizar la concentración mínima de nitrógeno probada (0,5 gN/L) siendo aún eficiente para el consumo de glucosa.

El comportamiento de cada cepa de levadura de *S. cerevisiae* también fue demostrado. Las tres cepas CLQCA-10-099, CLQCA-INT-001 y CLQCA-INT-005 fueron muy

similares en su capacidad de consumo de glucosa frente a las diferentes fuentes y concentraciones de nitrógeno. Por el contrario, la cepa UCLM 325, mostró ser menos eficiente. Esto responde al hecho, de que las cepas de levadura a pesar de pertenecer a la misma especie tienen diferentes requerimientos nutricionales y habilidades metabólicas.

En un estudio similar, donde se evaluaron diferentes fuentes únicas de nitrógeno que incluían extracto de levadura, urea y sulfato de amonio a diferentes concentraciones en medios de fermentación; reportan que un suministro adecuado de nutrientes, incluido el nitrógeno, beneficia el crecimiento y mantiene la viabilidad de las células de levadura. Por lo tanto, el uso de una fuente y concentración de nitrógeno adecuada puede aumentar el metabolismo fermentativo (consumo de glucosa, rendimiento de etanol y eficiencia de fermentación) (Z. Li, Wang, & Shi, 2017).

Otro estudio, coincide con lo mencionado anteriormente, en donde la adición de hidrolizado de levadura mejora la viabilidad celular, estimulando la tasa de fermentación y la producción de etanol (Bafrcová, šmogrovičová, Sláviková, Pátková, & Dömény, 1999). Esto también demuestra que el hidrolizado de levadura, proporciona polisacáridos, componentes de ácido nucleico y vitaminas que también pueden mejorar los procesos de fermentación.

De esta manera se mejoran las condiciones óptimas para el crecimiento de la levadura y consecuentemente la fermentación. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio, que muestran que la adición de una fuente de nitrógeno asimilable en un proceso de fermentación es fundamental para el metabolismo del azúcar.

Tabla 3. Efecto de diferentes fuentes y concentración de nitrógeno en el consumo de glucosa de levaduras

Fuente de nitrógeno	Consumo de glucosa (%)			
	UCLM 325	CLQCA-INT-001	CLQCA-10-099	CLQCA-INT-005
Fosfato de amonio, 1 gN/L	12,7±1,65	36,1±2,26	33,1±0,89	37,9±0,09
Fosfato de amonio, 2 gN/L	15,4±1,47	36,5±1,58	36,5±1,56	41,7±1,45
Amoníaco, 1 gN/L	5,9±1,42	18,3±0,71	14,2±0,79	24,3±1,63
Amoníaco, 2 gN/L	9,8±1,47	19,3±0,71	16,6±1,56	26,2±0,47
Hidrolizado de levadura, 0,5 gN/L	78,2±2,5	99,3±0,83	99,5±0,49	99,7±0,24
Hidrolizado de levadura, 1 gN/L	79,6±3,1	99,8±0,13	99,2±0,81	99,6±0,46
Hidrolizado de levadura, 2 gN/L	80,6±2,9	99,3±0,93	99,6±0,47	99,9±0,18
Hidrolizado de levadura, 2,5 gN/L	83,9±0,3	99,6±0,64	99,7±0,20	99,9±0,08

3.1.4 Concentración mínima de nitrógeno requerida para la fermentación

El segundo factor que se analizó fue la concentración mínima de nitrógeno requerida para el consumo eficiente de glucosa. La concentración fue establecida en referencia al valor mínimo utilizado en la prueba anterior con hidrolizado de levadura. Para ello, se realizaron pruebas de fermentación con 0,2; 0,3 y 0,4 g N/L de hidrolizado de levadura. Este estudio es importante, considerando que el nitrógeno es una limitante en los mostos obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica, y los costos de esta fuente influyen en la viabilidad económica del proceso en general. El estudio del efecto de la concentración de nitrógeno en el perfil de fermentación de las levaduras conllevará a la adición mínima de esta fuente sin que afecte el metabolismo de la levadura.

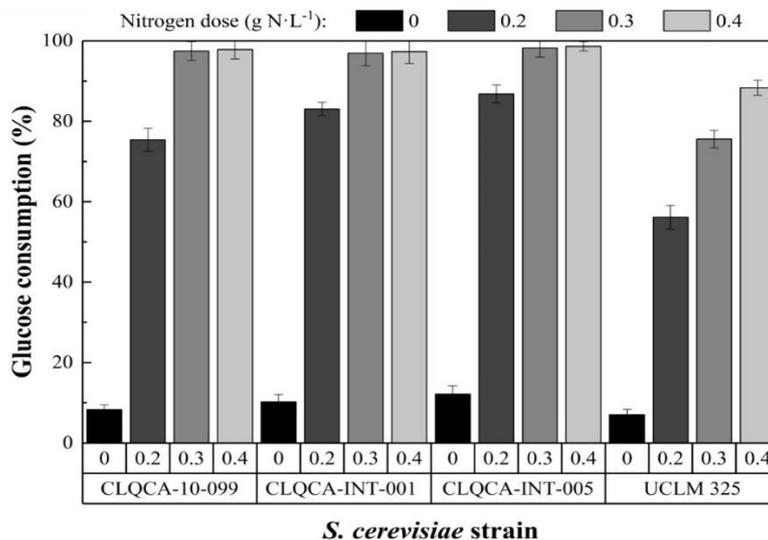


Figura 14. Glucosa consumida por diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* después de 24 horas de fermentación a diferentes concentraciones de hidrolizado de levadura (0; 0,2; 0,3 y 0,4 gN/L)

Los resultados muestran que el consumo de glucosa es directamente proporcional con el incremento de la concentración de nitrógeno adicionado al medio, siendo más eficiente a 0,4 gN/L (Figura 14). Después de 24 horas de fermentación, las cepas de levadura CLQCA-10-099, CLQCA-INT-001 y CLQCA-INT-005 muestran mayor consumo de glucosa 97,8%, 97,3 y 98,6%, respectivamente, en comparación con la cepa de levadura UCLM 325 con un consumo de glucosa de 88,3%. Estos resultados son similares a los presentados en la sección anterior, esto indica que los requerimientos de nitrógeno pueden estar relacionados fuertemente con la fisiología de la cepa de levadura, lo cual indica un grado de susceptibilidad a bajas concentraciones de nitrógeno además de necesidades específicas de esta fuente.

En este sentido, se podría decir que las cepas CLQCA-10-099, CLQCA-INT-001 y CLQCA-INT-005 tienen una baja demanda de nitrógeno, lo cual indica que estos niveles de concentración no afecta al metabolismo fermentativo de las levaduras; lo contrario ocurre con la cepa de levadura UCLM325, que posiblemente tiene una mayor demanda,

y esto se ve reflejado en un menor consumo de glucosa. Estos resultados sugieren que las cepas de levaduras pueden aprovechar de diferente forma el nitrógeno (Manginot, Roustan, & Sablayrolles, 1998)

El ANOVA muestra diferencias altamente significativas en relación a las cepas de levadura y las concentraciones de nitrógeno de hidrolizado de levadura. La prueba de significación de Tuckey, indica que la cepa CLQCA-INT-005 y 0,4 gN/L, son las más óptimas para ser utilizadas en las siguientes pruebas.

3.1.5 Co-fermentación de diferentes cepas de *S. cerevisiae* con reutilización de biomasa celular

El tercer factor que se estudió fue el comportamiento de las cuatro cepas de levadura en co-cultivos. Para ello se realizaron 4 ciclos de co-fermentación (cada uno de 24 horas), con la adición de la concentración mínima de nitrógeno previamente establecida (0.4 gN/L). En todos los casos, la biomasa celular de levaduras fue reutilizada con la reposición de medio de cultivo fresco. Al finalizar los cuatro ciclos de fermentación, se analizó la composición de la población de levaduras en el medio de fermentación. Los perfiles del análisis de restricción del ADN mitocondrial, mostraron que el 80% de la población corresponde a la cepa de levadura CLQCA-INT-005, 10% a CLQCA-INT-001 y 10% a UCLM325 (Figura 15). Por el contrario, la cepa CLQCA-10-099 fue completamente desplazada y su crecimiento fue inhibido; esto demuestra una baja competitividad con relación a las otras cepas de *S. cerevisiae* en co-cultivo.

Ciani et al. (2016) reporta que *S. cerevisiae* en co-fermentación compite al inicio de la fermentación y solo aquellas que están mejor adaptadas prevalecen. En fermentaciones en co-cultivo existe una interacción entre las diferentes cepas de levaduras. Se ha reportado, diferencias en la expresión génica entre cepas dominantes y no-dominantes de

levaduras de *S. cerevisiae* en co-cultivos, mostrando una sobreexpresión de genes cuando las levaduras están en condiciones de competencia (Pérez-Torrado et al., 2017). La expresión de genes puede ser clave tanto para el ataque o protección de las células de levaduras en co-cultivos; siendo un factor crucial en la dominancia en un medio. Además, los factores extrínsecos (pH, temperatura, presión osmótica y productos metabólicos) así como factor killer y la densidad celular de levaduras influyen en el desempeño de cada cepa de levadura (Williams, Liu, & Fay, 2015).

Por lo tanto, al finalizar la fermentación sólo aquellas levaduras que han logrado sobrepasar las limitantes que se generan por estrés en condiciones de competencia, sobreviven y dominan el medio de fermentación. En este estudio, la cepa CLQCA-INT-005 mostró una alta dominancia en el medio al finalizar los cuatro ciclos de fermentación, evidenciando su alta predominancia y competencia entre las cepas que fueron probadas.

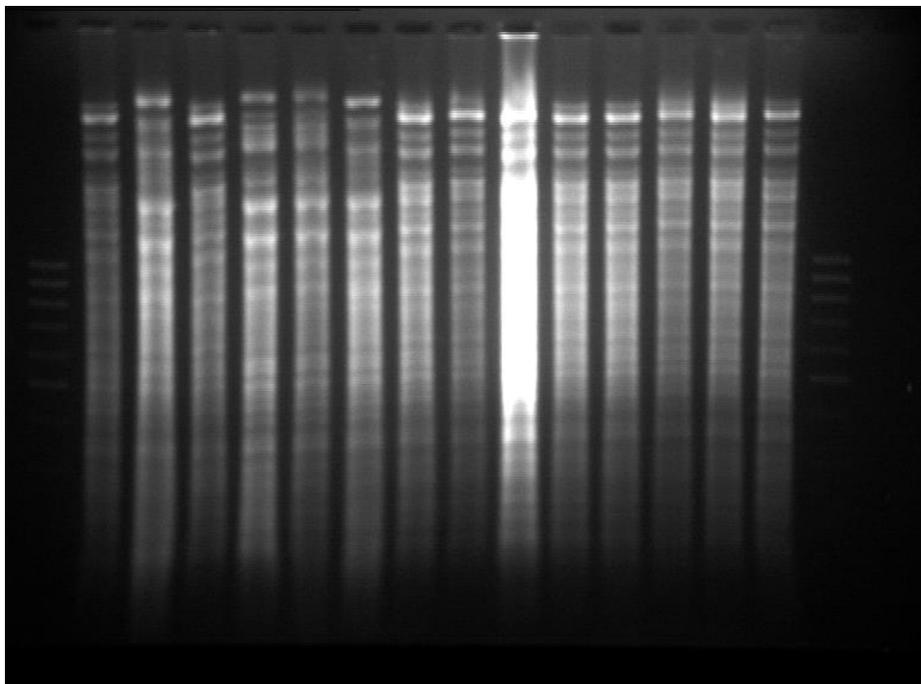


Figura 15. . Patrones de restricción del DNA mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*. Carriles: 1 y 16 marcador 1000 bp. Cepas tipo: CLQCA-10-099 (Carril 2), CLQCA-INT-001 (Carril 3), CLQCA-INT-005 (Carril 4) y UCLM (Carril 5). Cepas (Carril 6 -15).

El cuarto factor que se estudió fue el desempeño de las levaduras en fermentaciones sucesivas con reutilización de biomasa celular. Al finalizar cada ciclo de fermentación (24 horas) se determinó el consumo de glucosa. Como resultado de los experimentos se concluyó que las levaduras pueden utilizarse hasta 2 veces (ciclos) en las condiciones experimentales ensayadas, mostrando que más del 98% de la glucosa fue consumida del medio. Es notable que la habilidad de fermentación disminuye progresivamente en cada reutilización de biomasa celular, mostrando valores de consumo de glucosa de 96,97% y 95,79% en el tercer y cuarto ciclo de fermentación, respectivamente (Figura 16).

En un proceso industrial, la levadura representa el 10% de los costos de producción. Después de un ciclo de fermentación aproximadamente entre 90 y 95% de las células pueden ser recuperadas y recicladas, lo cual significa una alta densidad de células que podrían ser reutilizadas haciendo el proceso económicamente más viable (Basso, Luiz C., Basso, Thiago., & Nitsche Rocha, 2011). Sin embargo, el desempeño de las células de levaduras depende de la viabilidad y capacidad metabólica al finalizar cada ciclo de fermentación. Por lo tanto, es necesario buscar cepas de levaduras que además de tener alta tolerancia a etanol, estas puedan resistir a las condiciones de estrés de fermentación impuestas por una reutilización celular.

Teniendo en cuenta que los procesos de fermentación deben optimizarse en términos de rendimiento, productividad y costos de producción, el uso de altas densidades celulares y el reciclaje de células se considera una alternativa para mejorar la productividad del etanol (Verbelen, De Schutter, Delvaux, Verstrepen, & Delvaux, 2006).

El reciclaje de células aumenta la productividad en la fermentación, siendo 4.6 veces mayor en comparación con fermentaciones donde no se recicla células de levadura (Palmqvist, Galbe, & Hahn-Hägerdal, 1998) . Sin embargo, el rendimiento depende de la

viabilidad de las levaduras al final de cada ciclo de fermentación. Generalmente, las cepas industriales están sometidas al estrés impuesto por la fermentación, y se intensifica con el reciclaje celular. Por lo tanto, la búsqueda de cepas tolerantes a etanol y más específicamente para el caso del reciclaje celular son factores determinantes en las fermentaciones industriales (Basso, Luiz C. et al., 2011).

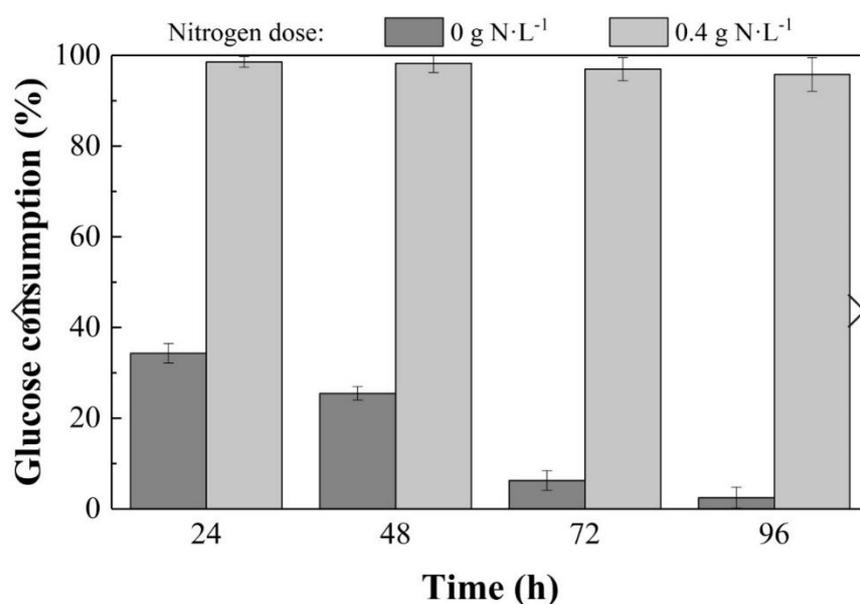


Figura 16. Reutilización de biomasa celular en co-cultivo de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* por ciclos de fermentación (Ciclo de fermentación: 24 horas)

3.1.6 Cinética de fermentación

Finalmente, se evaluó la cinética de fermentación en relación al consumo de glucosa y consecuente producción de etanol. Para estas pruebas se trabajó con las cepas de levadura CLQCA-10-099, CLQCA-INT-001 y CLQCA-INT-005 debido a que estas presentaron el mejor perfil metabólico atribuido al consumo de glucosa. La cinética fue evaluada durante un periodo de 24 horas. Los resultados muestran que a las 7 horas de fermentación aproximadamente el 90% de la glucosa ha sido consumida. Además, los resultados muestran que hay diferencias en el grado y rapidez de consumo de glucosa, mostrando

un mayor consumo de glucosa la cepa de levadura CLQCA-10-099 (a las 7 horas). Sin embargo, en todos los casos a las 24 horas de fermentación se observa un consumo casi total de glucosa, sin mostrar diferencias significativas entre las cepas de levaduras probadas (Figura 17).

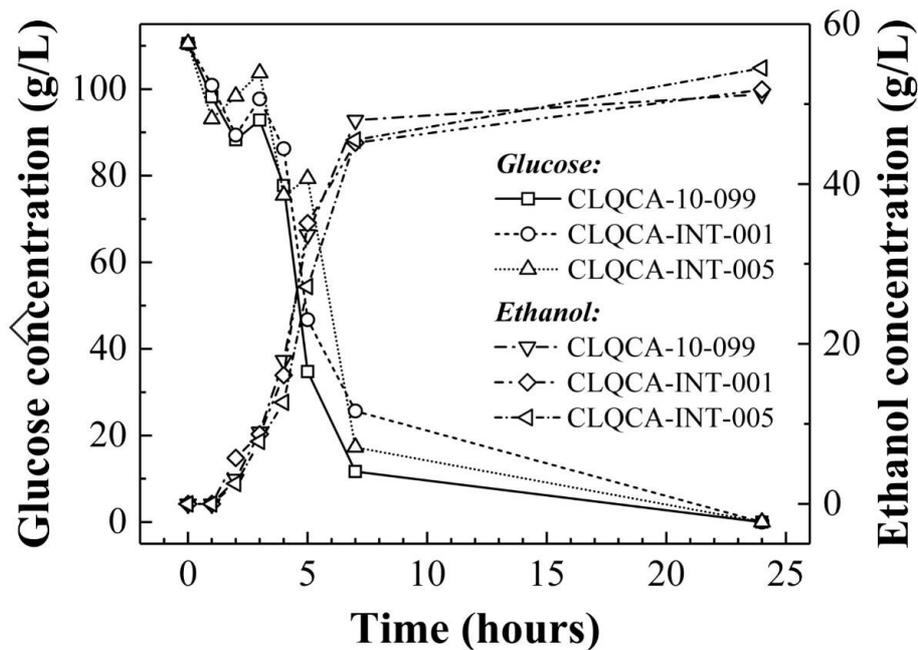


Figura 17. Concentración de glucosa y etanol durante la fermentación con diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Condiciones 34°C, 160 rpm por 24 horas.

En relación a la producción y rendimiento teórico de etanol, los resultados muestran diferencias significativas referentes a las distintas cepas de levaduras utilizadas. En todos los casos, el rendimiento de etanol es mayor a 0,46 g de etanol por gramos de glucosa, y específicamente la cepa de levadura CLQCA-INT-005 evidencia el mejor rendimiento de etanol, 0,49 g de etanol por gramos de glucosa (Tabla 4).

La relación entre el consumo de glucosa y la producción de etanol, reflejan diferencias entre las cepas de levaduras utilizadas, en donde cada una tiene aparentemente necesidades específicas y utilización diferenciada de la fuente de carbono tanto para crecimiento celular como para la fermentación. Esto indica, que el consumo de glucosa

no puede atribuirse sólo a la conversión a etanol, sino también a la utilización en el crecimiento celular.

En estudios similares, en donde se estudió la habilidad de fermentación de cepas silvestres de *S. cerevisiae* para etanol de segunda generación, las cepas de levadura muestran rendimientos de etanol entre 0,421 y 0,451 g/g de glucosa, que corresponde a rendimientos de etanol teórico de 82,5 y 88,4%, respectivamente (H. Li et al., 2015). Por otro lado, estudios con cepas de levaduras de *S. cerevisiae* industriales muestran un rendimiento teórico de etanol de 94% (0.48 g de etanol por gramos de glucosa) (Pereira, Romaní, Ruiz, Teixeira, & Domingues, 2014).

En este estudio, el rendimiento de etanol, calculado al final de la fermentación, fue obtenido por la cepa de levadura CLQCA-INT-005 mostrando 96,72 % de rendimiento teórico de etanol.

Tabla 4. Concentración de etanol y rendimiento teórico de etanol de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Condiciones de fermentación: 34°C, 200 rpm por 24 horas.

Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	Concentración de etanol (g/g)	Rendimiento de etanol g etanol/g glucosa	Rendimiento teórico de etanol (%)
CLQCA-INT-001	51,82±0,12	0,47±0,01	91,93±1,03
CLQCA-INT-005	54,52±0,53	0,49±0,01	96,72±0,40
CLQCA-10-099	51,25±0,29	0,46±0,01	90,92±1,51

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La caracterización del bagazo de caña de azúcar se realizó en el laboratorio de análisis físico químico de alimentos del INIAP. En la Tabla 5 se muestra los datos obtenidos a partir de FDN, FDA y ADL para la determinación de la celulosa, hemicelulosa y lignina.

Tabla 5. Composición del bagazo de caña de azúcar (Estudio y Referencias)

Componente	En este estudio (2019)	Canilha et al. (2012)	Karimi et al. (2016)
Celulosa	42,78	45	38,4
Hemicelulosa	32,07	25,8	23,2
Lignina	14,16	19,1	25
Cenizas	2,58	1	1,5

Los resultados muestran que las fracciones de celulosa (42,78%) y hemicelulosa (32,07%) son los componentes mayoritarios de esta biomasa lignocelulósica, resultando en un contenido total de carbohidratos de 74,85%. Por lo tanto el alto contenido de esta fracción holocelulósica (celulosa y hemicelulosa) hace del bagazo de caña de azúcar un material adecuado para la producción de etanol. Estos resultados coinciden con los de otros estudios, en los cuales representan más del 70% de carbohidratos totales. Sin embargo, hay una diferencia considerable en relación a la composición individual de cada uno de estos, lo cual podría indicar que el origen, variedad y condiciones de cultivo, pueden interferir en su composición.

3.3 CONDICIONES DE PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO

La primera fase en el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento de la materia prima. El objetivo de un pretratamiento es la separación y recuperación del polímero de celulosa, para facilitar la accesibilidad de las enzimas celulasas e hidrolizar la celulosa en azúcares monoméricos (glucosa) (Karimi & Taherzadeh, 2016). Debido a que un pretratamiento está estrechamente relacionado con la composición del material, la elección del pretratamiento tiene un impacto crucial en el rendimiento de etanol. Además, el catalizador y factores como temperatura y tiempo de reacción tienen un efecto adicional en el proceso.

En esta sección se presenta los resultados del pretratamiento químico de biomasa lignocelulósica con diferentes sistemas de calentamiento (reactor de presión e irradiación con microondas). En este caso, se utilizaron diferentes catalizadores químicos que incluyen álcali, ácidos y organosolvente.

3.3.1 Pretratamientos álcali y ácidos en reactor de presión

El efecto de las variables estudiadas como catalizador, temperatura y tiempo de reacción permitieron establecer las condiciones más adecuadas para el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar. Para determinar el impacto de los pretratamientos en la composición del bagazo de caña de azúcar, se utilizó un reactor de presión con diferentes catalizadores: NaOH, ácido sulfúrico, ácido maleico y ácido oxálico (1%, p/v), bajo diferentes condiciones de temperatura: 130, 140, 150, 160 y 170°C y tiempo de reacción: 10, 20 y 30 minutos.

El producto obtenido del pretratamiento corresponde a una fracción sólida insoluble y una fracción líquida o hidrolizada. La composición de estas dos fracciones principalmente estará influenciado por el catalizador y condiciones de pretratamiento.

Los resultados obtenidos muestran que la biomasa pretratada con catalizador alcalino sufrió menos pérdida de peso seco comparado con los pretratamientos ácidos. De igual forma, al comparar los resultados obtenidos de los pretratamientos ácidos también se observan diferencias, en donde las muestras que fueron pretratadas con ácido fuerte como el sulfúrico mostró menos recuperación de la fracción sólida en relación a los pretratamientos con ácidos débiles (oxálico y maleico) (Tabla 5).

Es conocido que los pretratamientos con ácido diluido solubilizan principalmente la fracción hemicelulósica de los materiales lignocelulósicos (Deshavath, Dasu, Goud, &

Rao, 2017). Los resultados muestran una disminución considerable de la fracción sólida consecuencia de la hidrólisis de la hemicelulosa, con un aumento de la cantidad de azúcares en el hidrolizado del pretratamiento. Específicamente se ha reportado que el ácido sulfúrico degrada efectivamente la hemicelulosa por el efecto catalítico de protones H^+ . Estudios indican que más del 90% de la hemicelulosa puede ser removida con pretratamientos ácidos diluidos con severidad moderada; esto genera un residuo altamente digerible, ya que principalmente la fracción sólida estará constituida de celulosa y una pequeña cantidad de lignina (Gonzales, Sivagurunathan, & Kim, 2016). Sin embargo, existe un efecto negativo resultado de la protonación, las pentosas y hexosas formadas por la hidrólisis de la hemicelulosa y celulosa son convertidas en 2-furfuraldehído (furfural) y 5-hidroximetilfurfural-2 furfuraldehído (5-HMF), respectivamente (Kootstra, Beeftink, Scott, & Sanders, 2009). Debido a que estos dos compuestos furfural e HMF se forman a partir de los carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) esto afecta a la recuperación final de azúcares para la obtención de etanol y además estos actúan como inhibidores en la fermentación, siendo subproductos no deseables del pretratamiento.

Por otro lado, los pretratamientos alcalinos actúan principalmente en el rompimiento de los enlaces entre los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) y la lignina, disrupción de la lignina; y eliminación de las sustituciones de grupos acetilo y ácidos urónicos (Kim et al., 2016a). Además las reacciones de saponificación destruyen la estructura organizada de la celulosa, reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa. El resultado de los pretratamientos alcalinos, es una mínima alteración o modificación estructural de la celulosa y hemicelulosa, sin pérdida de azúcares lo cual favorece a la accesibilidad y digestibilidad enzimática así como también el rendimiento (Qing et al., 2017).

Además, la temperatura y tiempo de reacción definen la severidad del pretratamiento. Cuando se trabaja con temperatura y tiempos de reacción superiores (condiciones más severas), el material lignocelulósico sufre cambios más notorios lo cual conlleva a una mayor desorganización de los componentes, y aumento de la solubilización de la hemicelulosa y lignina (Raj & Krishnan, 2018). Sin embargo, los pretratamientos con condiciones de severidad alta, también producen la degradación de los carbohidratos disminuyendo el contenido de azúcares potencialmente fermentables.

Con lo mencionado anteriormente, los resultados corroboran que los pretratamientos ácidos y alcalinos así como las condiciones de temperatura y tiempos de reacción afectan a diferente nivel y grado la estructura compleja de la biomasa lignocelulósica. La fracción sólida representa el material disponible para la hidrólisis enzimática, en el caso de los pretratamientos ácidos estará conformada principalmente por celulosa y lignina; mientras que en los pretratamientos alcalinos consistirá principalmente de celulosa y hemicelulosa. Por lo tanto, siendo la celulosa y hemicelulosa los principales componentes de los materiales lignocelulósicos (mayor a 70%), se espera tener en los pretratamientos alcalinos mayor fracción sólida, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

Estudios similares reportan, una fuerte deslignificación de la biomasa lignocelulósica con pretratamientos alcalinos, mientras que los pretratamientos ácidos principalmente hidrolizan y remueven la hemicelulosa de la biomasa, resultando en un alto contenido de subproductos generados por degradación de azúcares (Chang et al., 2017).

Tabla 6. Fracción sólida (%) obtenida después de pretratamiento de bagazo de caña de azúcar

Hidróxido de sodio															
Temp. (°C)	130			140			150			160			170		
Tiempo (min)	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
Fracción sólida (% p/p)	63.67±0.5	61.33±2.8	61.67±1.1	59.67±3.2	61.67±1.5	60.00±1.0	59.00±3.6	57.67±7.5	56.33±5.5	55.00±1.0	57.33±0.5	58.00±2.6	56.33±0.5	54.33±0.5	54.33±1.53
Ácido sulfúrico															
Temp. (°C)	130			140			150			160			170		
Tiempo (min)	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
Fracción sólida (% p/p)	57.00±1.0	57.00±1.0	55.67±0.5	56.00±1.0	55.67±1.1	55.67±0.5	54.67±0.5	54.33±0.5	53.67±0.5	53.67±0.5	52.67±0.5	52.33±0.5	51.33±0.5	51.33±1.5	51.33±0.58
Ácido oxálico															
Temp. (°C)	130			140			150			160			170		
Time (min)	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
Fracción sólida (% p/p)	60.67±0.5	60.33±0.5	59.67±0.5	59.00±0.0	58.67±0.5	59.33±0.5	58.33±0.5	58.00±0.0	57.33±1.1	57.67±0.5	56.33±0.5	55.67±0.5	55.33±1.1	54.00±1.0	54.00±1.00
Ácido maleico															
Temp. (°C)	130			140			150			160			170		
Tiempo (min)	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
Fracción sólida (% p/p)	59.00±1.0	59.33±0.5	58.00±1.0	57.67±0.5	57.67±1.1	57.67±0.5	56.67±0.5	56.33±0.5	55.67±0.5	55.67±0.5	54.00±1.0	52.33±0.5	51.67±0.5	51.67±1.1	52.33±0.58

El análisis de FTIR detectó los cambios en los grupos funcionales y conformación molecular del bagazo de caña de azúcar causados por el proceso de pretratamiento (X. Li, Wei, Xu, Xu, & He, 2018). La figura 18 representa el espectro FTIR del bagazo de caña de azúcar sin y con pretratamiento químico en reactor de presión. Los principales componentes de la biomasa lignocelulósica consisten de alquenos, ésteres, aromáticos, cetonas y alcoholes con diferentes grupos funcionales que contienen oxígeno: por ejemplo OH (3500 a 3200 cm^{-1}), C=O (1770 a 1710 cm^{-1}), C-O-C (1280 cm^{-1}), y C-O-H (1055 cm^{-1}).

La hemicelulosa y lignina, relacionada a la banda de absorción 1245 cm^{-1} , correspondiente al estiramiento de los enlaces C-O, disminuyó después del pretratamiento con NaOH, ácido sulfúrico, ácido maleico y ácido oxálico. La banda de absorción a 1729 cm^{-1} , atribuida a los grupos acilo y éster urónicos de la hemicelulosa o enlaces éster fenil entre la hemicelulosa y lignina, casi desaparece después del pretratamiento alcalino y fue notablemente atenuado por los pretratamientos con ácido sulfúrico, oxálico y maleico mostrando una ruptura completa del enlace éster a partir de la hemicelulosa y lignina con el pretratamiento alcalino y remoción parcial de hemicelulosas después del pretratamiento. Estos resultados demuestran que los pretratamientos ácidos eliminan la mayor parte de la hemicelulosa al romper los enlaces aceto y que los pretratamientos con álcali eliminan compuestos de lignina, estos resultados coinciden con los hallazgos reportados (Qing et al., 2017)

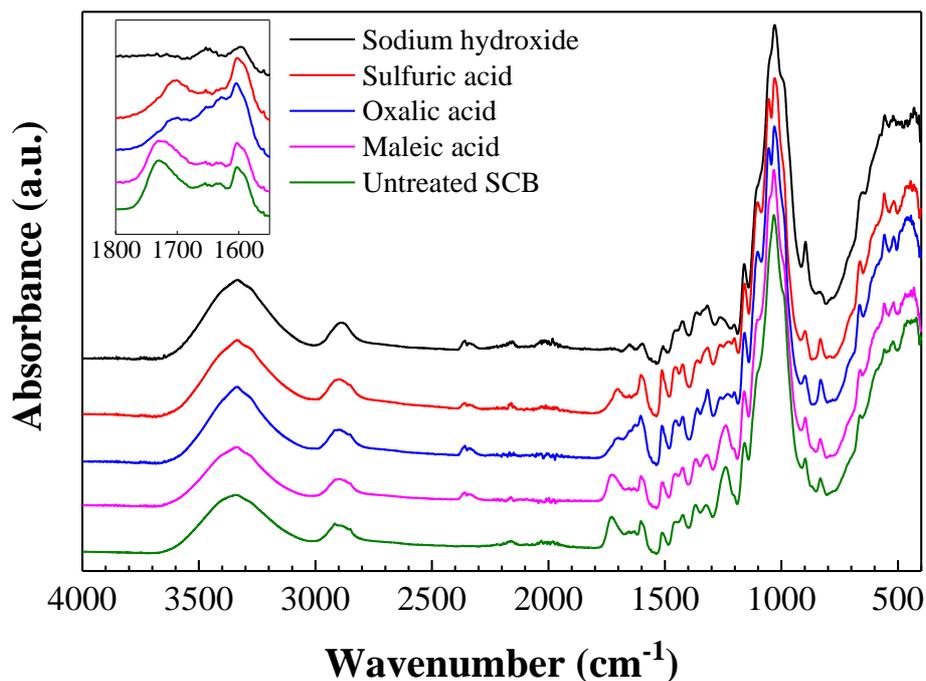


Figura 18. Espectro de ATR-FTIR de la fracción sólida recuperada después de pretratamientos álcali y ácidos a 160°C for 20 min en reactor de presión.

3.3.2 Pretratamiento alcalino con organosolv en microondas

Una vez comprobado que las condiciones alcalinas de los pretratamientos presentan mayor ventaja en relación a los pretratamientos ácidos, se estableció un diseño experimental que permita ver el efecto del organosolvente (Sulfolane-TiO₂) en condiciones alcalinas con irradiación de microondas.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los dos medios de reacción (Tabla 7), lo que indica que el sulfolane-TiO₂ promovió la producción de TRS, logrando rendimientos de hasta 64,8% (vs. rendimientos de hasta 59,5% para el pretratamiento sin la adición de sulfolane-TiO₂). Esta diferencia relativamente pequeña apunta al impacto muy positivo de la irradiación de microondas (MWI), independientemente del medio de reacción.

En los estudios realizados por Peng et al, (2013) y Peng et al, (2014), en los que se ensayó pretratamientos con irradiación de microondas en celulosa microcristalina, reportaron que tiempos significativamente más cortos de reacción son suficientes para alcanzar un rendimiento favorable de los sacáridos.

Tabla 7. Resultados de la prueba de Tukey (HSD). Análisis de las diferencias entre los dos medios de reacción con un intervalo de confianza del 95% (TRS (%) rendimiento). "1" significa el medio de pretratamiento con sulfolane-TiO₂ y "2" para el medio sin este

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significancia
2 vs 1	-2,762	-20,155	1,967	< 0,0001	Yes
Valor crítico de Tukey			2,781		

Categoría	Media LS	Error estándar	Valor mínimo (95%)	Valor máximo (95%)	Grupos
2	45,458	0,097	45,268	45,649	A
1	48,220	0,097	48,030	48,411	B

Los resultados muestran un aumento en los rendimientos de TRS cuando la concentración de álcali se incrementó de 0,5 a 5%, en ambos casos, es decir con y sin adición de organosolv (sulfolane-TiO₂) (Tabla 8). Esto se puede atribuir al hecho de que el NaOH es uno de los catalizadores alcalinos más fuertes, y su eficacia para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica se ha evidenciado por un mayor grado de hidrólisis enzimática en comparación con otros pretratamientos alcalinos reportados en la literatura (Singh, Shukla, Tiwari, & Srivastava, 2014) (Chang et al., 2017).

Durante la reacción de pretratamiento con NaOH, el NaOH se disocia en ion hidróxido (OH⁻) e ion sodio (Na⁺) (Kim, Lee, & Kim, 2016b), y el aumento en la concentración

de iones hidróxido aumenta la velocidad de la reacción de hidrólisis. Esto es consistente con los resultados obtenidos en este estudio, en el cual el aumento en la producción de TRS fue evidente cuando la concentración de NaOH se incrementó a 3% y 5%, alcanzando rendimientos de hasta 61,1% y 64,8% respectivamente. Se encontraron diferencias significativas para ambos pretratamientos, con sulfolane- TiO₂ y sin sulfolane-TiO₂.

En una investigación llevada a cabo por Hoşgün et al, (2017), los pretratamientos a diferentes concentraciones de NaOH en el rango del 2% al 10% (p/v) se probaron en material lignocelulósico (cáscaras de avellana). Los resultados evidenciaron que el aumento en la concentración de NaOH llevó a una mayor eliminación de lignina. Los rendimientos de TRS mejoraron hasta una concentración de NaOH del 6%, pero un aumento adicional resultó en una disminución en la producción de TRS.

En este estudio se confirmó que la temperatura era un parámetro importante, dando como resultado diferencias significativas entre las temperaturas probadas. El aumento de la temperatura de 120°C a 140°C mejoró la formación de TRS a partir de la hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar pretratada en aproximadamente un 5%.

En la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica (tallos de sorgo dulce) pretratados con organosolv utilizando un catalizador ácido, Ostovareh et al, (2015) reportó que un aumento de la temperatura (100 a 160°C) mejoró la conversión enzimática. Sin embargo, Koo et al., (2011) mostró que la hidrólisis enzimática apenas se vio afectada a más de 140°C, lo que sugiere que el pretratamiento no debería realizarse a temperaturas más altas.

Aunque también se encontraron diferencias significativas entre los cinco tiempos de reacción analizados (Tabla 10), es importante mencionar que es el parámetro con menor

influencia: el aumento en el tiempo de reacción de 5 a 60 minutos solo dió como resultado un aumento del 1,9% en rendimiento TRS.

Wang et al, (2017) reportó que los pretratamientos con organosolvente (2-propanol) a temperaturas más altas (entre 200 y 220°C) y tiempos de reacción más largos (60 y 120 min) en un autoclave facilitaron la hidrólisis enzimática. En contraste, el uso de MWI – incluso en condiciones más suaves (en términos de temperaturas y tiempos de reacción, como los que se usan en este estudio) - aceleraría notablemente el proceso, dando como resultado rendimientos de TRS de hasta 62.9% en solo 5 minutos.

En relación a los resultados mencionados anteriormente, NaOH 5%, 140°C y 5 min con organosolvente (sulfolane-TiO₂) fueron las condiciones que mostraron mejor rendimiento de azúcares.

Tabla 8. Producción de TRS a partir de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar para diferentes temperaturas, concentraciones de NaOH y tiempos de reacción con y sin sulfolane-TiO₂

Pretratamiento	T (°C)	Alcalino	TRS (%)				
			5'	15'	30'	45'	60'
Microondas (sin sulfolane-TiO ₂)	120°C	NaOH 0,5%	29,7±1,08	29,5±2,13	30,0±0,92	30,7±1,28	31,0±2,43
		NaOH 1%	35,2±1,21	35,3±0,33	36,4±1,02	36,9±1,34	37,4±1,11
		NaOH 3%	49,0±2,47	49,3±0,51	50,9±1,50	52,0±0,58	52,2±1,04
		NaOH 5%	53,5±1,99	53,0±2,36	54,4±0,19	55,8±0,92	56,1±0,51
	130°C	NaOH 0,5%	31,5±0,42	31,5±1,81	32,1±0,58	32,6±0,92	32,9±1,02
		NaOH 1%	39,1±0,63	39,5±0,98	40,7±1,36	41,8±0,73	42,0±0,67
		NaOH 3%	52,4±1,79	53,0±1,51	53,3±1,79	54,7±1,06	55,0±2,39
		NaOH 5%	56,1±1,58	56,0±2,37	57,0±0,54	57,2±1,51	57,4±1,42
140°C	NaOH 0,5%	35,0±1,27	35,0±1,20	35,4±1,67	35,7±0,19	36,2±0,26	

	NaOH 1%	40,8±0,73	40,6±0,70	41,9±0,98	42,6±0,33	43,3±1,04
	NaOH 3%	53,3±0,51	53,0±0,17	54,2±0,75	55,7±0,60	56,3±1,44
	NaOH 5%	58,0±0,26	57,6±0,29	59,0±0,35	60,0±0,98	59,5±1,60
	NaOH 0,5%	30,4±1,75	30,6±1,94	31,2±0,67	31,6±0,77	32,0±2,07
	120°C					
	NaOH 1%	36,9±0,70	36,8±0,42	37,9±0,19	38,3±0,79	38,5±0,26
	NaOH 3%	52,4±0,77	52,0±0,51	53,4±0,60	54,7±0,88	55,0±0,17
	NaOH 5%	55,3±0,67	56,7±0,48	57,8±0,33	58,0±0,96	57,8±0,88
	NaOH 0,5%	33,9±0,84	33,6±0,35	34,7±1,44	35,0±0,92	35,3±0,86
Microondas + Sulfolane-TiO ₂	130°C					
	NaOH 1%	42,3±0,88	42,0±1,17	42,7±0,75	44,1±2,81	44,4±1,64
	NaOH 3%	55,3±1,18	55,7±0,92	56,8±1,21	57,0±1,11	57,6±1,18
	NaOH 5%	61,1±0,44	60,8±1,07	62,1±0,48	63,6±0,79	63,9±1,37
	NaOH 0,5%	35,9±0,95	36,2±0,92	36,5±0,60	37,1±0,77	37,8±1,34
	140°C					
	NaOH 1%	44,2±0,92	43,7±0,63	44,1±0,63	45,1±0,39	44,9±0,86
	NaOH 3%	56,1±0,19	56,5±0,77	57,6±0,93	58,0±0,60	61,1±0,79
	NaOH 5%	62,9±0,77	62,8±0,77	64,1±0,58	64,6±0,87	64,8±0,35

Al comparar los resultados obtenidos con los pretratamientos alcalinos con microondas + organosolvente (sulfolane-TiO₂), alcalinos con microondas y alcalinos con reactor de presión, se observa que los pretratamientos con reactor de presión muestran rendimiento de TRS más altos (Tabla 9). Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Lai et al, (2014) y Podschun et al, (2017), en donde se reportan la comparación de pretratamientos de biomasa lignocelulósica combinados con catalizador alcalino y diferentes sistemas de calentamiento: explosión de vapor + NaOH, termoquímicos convencionales + NaOH e irradiación de microondas + NaOH. Los resultados demostraron que el MW-A era el método más eficaz que mejora la sacarificación enzimática sugiriendo que puede ser una alternativa debido a su menor consumo de

energía y tiempos de reacción más cortos, lo que lo hace económicamente viable en procesos a escala industrial.

Tabla 9. Producción de TRS a partir de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar para pretratamientos alcalinos con diferentes temperaturas y tiempos con reactor de presión

Pretratamiento	T (°C)	Alcalino	TRS (%)		
			10´	20´	30´
Reactor de presión	130°C	NaOH 1%	68,1±0,14	77±0,05	76±0,09
	140°C	NaOH 1%	82,1±0,14	76±0,09	80,2±0,17
	150°C	NaOH 1%	82,3±0,19	84,9±0,42	85,5±0,24
	160°C	NaOH 1%	86,2±1,13	84,2±0,95	81,6±2,68
	170°C	NaOH 1%	83,7±1,80	87,6±2,08	87,1±4,66

Tabla 10. Prueba de Tukey (HSD) para el pretratamiento de MW + sulfolane-TiO₂. Análisis de las diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95% (Rendimiento TRS (%)) para temperatura (arriba), concentración de NaOH (centro) y tiempo (abajo)

Categoría	Media	Error estándar.	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
120°C	44,865	0,139	44,590	45,140	A
130°C	49,094	0,139	48,819	49,369	B
140°C	50,702	0,139	50,427	50,977	C

Categoría	Media	Error estándar.	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
0,5%	34,116	0,161	33,799	34,434	A
1%	41,729	0,161	41,412	42,047	B
3%	55,951	0,161	55,633	56,268	C
5%	61,085	0,161	60,768	61,403	D

Categoría	Media	Error estándar.	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
5´	47,226	0,180	46,871	47,581	A
15´	47,285	0,180	46,930	47,640	A

30'	48,241	0,180	47,886	48,596	B
45'	48,924	0,180	48,568	49,279	B C
60'	49,427	0,180	49,072	49,782	C

3.4 SACARIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE LA FRACCIÓN HOLOCELULÓSICA DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

Para establecer las condiciones adecuadas de pretratamiento de bagazo de caña de azúcar, se analizó el rendimiento de sacáridos totales y el contenido de azúcares a partir del hidrolizado enzimático del bagazo previamente tratado.

En la tabla 11 se observa la composición de los azúcares solubles y el rendimiento de los sacáridos obtenidos de hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar. Los resultados muestran que diferentes azúcares solubles fueron obtenidos de la sacarificación de los polímeros de celulosa y hemicelulosa. Los azúcares de glucosa, celobiosa y celotriosa obtenidos a partir de la hidrólisis de celulosa; y la xilosa obtenida de la hidrólisis de la hemicelulosa (Hassan, Williams, & Jaiswal, 2018).

En todos los pretratamientos, los azúcares monómeros de glucosa y xilosa, fueron los principales componentes del hidrolizado enzimático. El análisis estadístico muestra diferencias altamente significativas en relación al catalizador químico utilizado. Los pretratamientos con NaOH, mostraron mayor cantidad de glucosa y xilosa entre 64,26 g/L – 87,68 g/L y 29,5 g/L – 35,90g/L, respectivamente. Se observó además la influencia de la severidad del pretratamiento (temperatura y tiempo), por lo tanto el aumento de la severidad resultó en el incremento de la cantidad de azúcares de glucosa y xilosa en el hidrolizado enzimático.

Los resultados también muestran que la celulosa no fue completamente hidrolizada a su unidad de monómero (glucosa). Esto indica una parcial hidrólisis de este polímero,

mostrando valores entre 2,22 – 10,41 g/L de celobiosa y 0,47-4,83 g/L de celotriosa. En el caso de la celotriosa no hay diferencias con respecto al catalizador utilizado, mientras que la celobiosa si fue más evidente en los pretratamientos alcalinos.

Los pretratamientos ácidos incluyeron ácidos inorgánicos (H_2SO_4) y ácidos orgánicos (ácido oxálico y maleico). No se observan diferencias notorias en los azúcares obtenidos con estos catalizadores, excepto para el ácido maleico en el cual se obtuvo mayor cantidad de xilosa en comparación con los otros pretratamientos ácidos.

Es importante mencionar que posterior a un pretratamiento de biomasa lignocelulósica e hidrólisis enzimática de los polímeros de celulosa y hemicelulosa, se espera la mayor cantidad de azúcares fermentables. Es ampliamente conocido, que la glucosa es un azúcar fácilmente metabolizado y puede ser transformado a etanol por levaduras de la especie *S. cerevisiae* (Walker & Walker, 2018). Por otro lado, la xilosa liberada a partir de hemicelulosa también es un azúcar que podría mejorar el rendimiento, si esta es convertida a etanol por fermentación. Sin embargo, la fermentación de xilosa involucra otras vías metabólicas específicas de ciertas cepas de levaduras y bacterias, que no poseen la especie *S. cerevisiae* (Stanbury et al., 2017). Para poder aprovechar eficientemente estos dos azúcares, glucosa y xilosa, un sin número de estrategias han sido investigadas. Entre ellas podemos mencionar a cepas de levadura de *S. cerevisiae* genéticamente modificadas o procesos de co-fermentación con microorganismos con diferentes habilidades fermentativas, lo cual garantiza una mejora en el rendimiento global de producción de etanol.

En este estudio se trabajó con una cepa de *S. cerevisiae* que sólo puede convertir glucosa a etanol, por lo tanto los cálculos del rendimiento de etanol fueron enfocados en la fermentación de la glucosa.

Se determinó el rendimiento de sacáridos totales en base a la glucosa y xilosa. El pretratamiento alcalino mostró valores mayores a 99% de rendimiento de sacáridos, siendo 55% mayor que los pretratamientos ácidos. Los resultados del rendimiento de sacáridos totales mostraron diferencias altamente significativas con relación al catalizador, temperatura y tiempo de reacción utilizados en los pretratamientos. De acuerdo a las pruebas de significación de Tukey el NaOH (15, p/v); 160°C y 170°C; y 20 y 30 minutos, son las mejores condiciones de pretratamiento. Por lo tanto, basados en estos resultados, la combinación de NaOH, 160°C y 20 minutos son las condiciones más adecuadas para el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar.

Tabla 11. Composición de sacáridos obtenidos a partir de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar pretratado

Catalizador	Temp (°C)	Tiempo (min)	Glu (g/L)	Xil (g/L)	Celot (g/L)	Celob (g/L)	Rendimiento de sacáridos (%)
Hidróxido de sodio	130	10	64,26±0,20	29,50±0,14	2,64±0,04	5,72±0,65	91,14±0,00
		20	70,12±0,10	35,70±0,10	2,95±0,09	6,68±4,67	99,68±0,00
		30	70,78±0,10	34,20±0,10	2,65±0,10	6,31±1,82	99,14±0,00
	140	10	78,05±0,20	32,00±0,08	3,25±0,17	9,66±5,47	99,73±0,00
		20	73,52±0,20	32,50±0,08	2,33±0,21	5,48±2,31	99,64±0,00
		30	75,43±0,10	33,40±0,11	2,66±0,14	8,88±1,57	99,34±0,00
	150	10	78,33±0,10	33,20±0,18	2,84±0,22	9,25±6,13	99,85±0,00
		20	80,47±0,60	33,10±0,07	3,15±0,20	10,41±13,56	99,52±0,00
		30	79,79±0,20	35,90±0,18	4,43±0,07	8,16±9,75	99,31±0,00
	160	10	84,66±0,30	34,10±0,10	3,19±0,10	6,68±2,50	99,50±0,00
		20	83,56±2,10	29,40±1,88	4,04±0,17	6,37±1,41	99,77±0,00
		30	83,07±1,20	29,80±0,24	3,03±0,21	6,22±2,88	98,78±0,00
170	10	82,66±1,10	30,90±0,07	2,97±0,09	6,79±2,39	98,33±0,00	
	20	86,93±1,20	35,40±0,39	2,94±0,25	7,13±1,26	99,92±0,00	
	30	87,68±1,50	33,60±0,43	2,76±0,54	7,23±6,47	99,18±0,00	
Ácido sulfúrico	130	10	22,56±0,20	4,20±0,15	0,84±0,42	2,22±0,33	22,29±0,00
		20	31,30±0,20	8,50±0,20	1,88±0,17	2,90±0,28	33,77±0,00
		30	32,89±0,20	6,00±0,23	1,69±0,26	2,79±0,43	31,64±0,00

	140	10	38,41±0,20	7,30±0,18	1,70±0,27	2,76±0,54	37,64±0,00
		20	38,01±0,20	5,50±0,25	1,66±0,12	3,11±0,59	35,35±0,00
		30	39,63±0,30	5,00±0,23	1,59±0,19	3,03±0,65	35,89±0,00
	150	10	38,71±0,20	4,10±0,16	1,58±0,25	2,81±0,60	33,73±0,00
		20	38,56±0,20	4,70±0,20	1,32±0,14	3,06±0,33	34,08±0,00
		30	40,37±0,20	3,20±0,14	2,08±0,09	3,21±0,14	33,52±0,00
	160	10	60,75±0,30	1,00±0,03	1,05±0,11	4,33±0,79	46,37±0,00
		20	59,56±0,30	1,40±0,10	0,97±0,16	3,68±1,35	46,19±0,00
		30	60,29±0,20	1,30±0,79	0,87±2,27	2,48±1,24	46,20±0,00
	170	10	56,79±0,20	1,20±0,56	0,89±0,42	3,95±0,39	41,98±0,00
		20	57,98±0,10	1,70±0,15	1,62±0,29	4,02±3,81	45,75±0,00
		30	60,46±0,50	1,60±0,25	1,31±0,72	4,10±3,37	47,38±0,00
Ácido oxálico	130	10	33,72±0,10	6,80±0,14	2,48±0,07	3,96±0,35	35,98±0,00
		20	29,58±0,20	5,40±0,10	1,82±0,21	3,44±0,50	30,94±0,00
		30	36,26±0,10	5,80±0,20	2,03±0,16	3,73±0,43	36,55±0,00
	140	10	42,02±0,00	6,60±0,13	1,96±0,12	3,32±0,12	41,86±0,00
		20	42,89±0,20	6,50±0,13	1,96±0,19	3,91±0,43	42,09±0,00
		30	43,58±0,20	6,50±0,23	2,01±0,12	3,79±0,33	43,26±0,00
	150	10	42,12±0,10	3,90±0,07	1,98±0,19	3,33±0,41	38,59±0,00
		20	42,69±0,10	5,00±0,00	0,00±0,13	3,61±0,17	39,93±0,00
		30	42,78±0,20	4,30±0,13	1,52±0,25	3,63±0,53	38,88±0,00
	160	10	52,76±0,10	1,00±0,67	1,76±0,26	4,25±2,72	41,82±0,00
		20	47,85±0,10	0,80±0,31	0,81±0,58	3,48±1,67	38,31±0,00
		30	47,99±0,10	0,60±0,11	1,01±0,28	4,00±1,51	39,97±0,00
	170	10	55,98±0,10	0,70±0,08	1,07±0,56	4,24±1,63	42,86±0,00
		20	58,14±0,10	0,50±0,08	0,94±0,01	4,23±0,57	44,33±0,00
		30	57,11±0,10	0,60±0,36	0,95±0,60	4,07±1,88	43,41±0,00
Maleic acid	130	10	25,70±0,10	6,80±0,06	3,17±0,03	2,95±0,47	28,51±0,00
		20	26,23±0,10	8,20±0,02	3,02±0,20	3,24±0,56	30,58±0,00
		30	27,65±0,10	9,00±0,17	2,87±0,15	3,03±0,60	31,91±0,00
	140	10	28,88±0,10	9,30±0,10	2,68±0,07	2,96±0,31	32,95±0,00
		20	27,81±0,10	9,90±0,19	2,55±0,17	2,78±0,79	32,78±0,00
		30	30,60±0,10	11,10±0,08	2,61±0,11	2,81±0,34	36,26±0,00
	150	10	30,68±0,10	10,90±0,10	2,85±0,08	3,03±0,50	35,39±0,00
		20	31,89±0,10	12,80±0,05	2,94±0,23	3,09±0,32	38,16±0,00
		30	30,90±0,10	12,90±0,20	2,66±0,13	2,90±0,28	37,03±0,00
	160	10	45,65±1,70	18,80±0,89	1,02±0,07	3,19±2,01	55,01±0,00
		20	58,70±0,70	23,30±0,00	0,00±0,15	3,76±2,47	66,11±0,00
		30	55,05±1,30	21,70±0,88	0,51±0,12	3,69±2,74	62,57±0,00

170	10	54,12±0,70	20,50±0,00	0,00±0,17	3,30±2,14	58,84±0,00
	20	62,51±0,80	18,80±0,86	0,50±0,20	3,72±0,33	62,60±0,00
	30	68,75±0,70	17,10±0,00	0,00±0,20	3,74±3,13	67,02±0,00

3.5 FERMENTACIÓN DE AZÚCARES

El hidrolizado producto de la sacarificación enzimática de bagazo de caña de azúcar pretratado fue utilizado como medio de fermentación.

Los resultados de etanol (Tabla 12) muestran una diferencia marcada entre los catalizadores utilizados en los pretratamientos. Los pretratamientos con NaOH exhiben entre 32,76 g/L – 43,91 g/L de etanol. Estos resultados reflejan la eficiencia en el pretratamiento alcalino y consecuente fermentación, siendo este el mejor catalizador utilizado. Los pretratamientos con ácido sulfúrico, oxálico y maleico muestran entre 9,50 g/L – 30,27 g/L; 16,84 g/L – 24,76 g/L y 12,50 g/L – 34,03 g/L de etanol; siendo estos pretratamientos menos eficientes.

El rendimiento teórico de etanol estuvo en el rango de 78 – 100%, estos resultados no mostraron relación directa con las variables ensayadas.

Con los resultados obtenidos podemos mencionar que los altos rendimientos tanto de sacarificación como de fermentación, se atribuyen a i) la selección de un pretratamiento adecuado, que pueda liberar la mayor cantidad de azúcares fermentables sin la formación de subproductos inhibidores de fermentación, ii) selección de cepas de levadura que puedan convertir eficientemente los azúcares a etanol, iii) aclimatación de levaduras en hidrolizados de biomasa pretratados, y iv) disponibilidad de los nutrientes necesarios en el mosto, relación adecuada de C:N (Pereira, Guimarães, Teixeira, & Domingues, 2011). Por lo tanto, la combinación de los factores antes mencionados hizo posible el desempeño

satisfactorio de la levadura con resultados favorables para la producción de etanol celulósico.

Tabla 12. Etanol y rendimiento de etanol producido por fermentación de bagazo de caña de azúcar pretratado

Pretratamiento químico	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Etanol (g/L)	Rendimiento teórico de etanol (%)
Hidróxido de sodio	130	10	32,76±0,10	99,85±0,38
		20	34,79±0,15	97,18±0,48
		30	34,94±0,08	96,72±0,28
	140	10	39,41±0,18	98,82±0,28
		20	29,53±0,11	78,63±0,16
		30	37,56±0,07	97,79±0,31
	150	10	39,37±0,07	98,63±0,22
		20	40,72±0,08	99,09±0,08
		30	40,63±0,06	99,84±0,10
	160	10	42,98±0,77	98,76±0,57
		20	43,25±1,27	98,07±1,13
		30	42,22±1,40	99,31±0,29
	170	10	43,02±1,34	99,23±0,80
		20	43,04±1,02	98,26±2,00
		30	43,91±1,86	98,81±1,07
Ácido sulfúrico	130	10	9,50±1,22	82,64±10,92
		20	15,68±0,10	97,96±0,13
		30	16,51±0,18	98,67±0,87
	140	10	19,48±0,08	99,09±0,15
		20	18,94±0,08	97,16±0,39
		30	19,98±0,10	99,06±0,60
	150	10	19,37±0,13	97,92±0,74
		20	19,60±0,12	99,22±0,54
		30	20,50±0,09	99,42±0,21
	160	10	30,11±0,25	97,78±0,93
		20	29,96±0,52	96,74±1,43
		30	30,72±0,45	98,40±1,64
	170	10	24,88±0,52	85,85±1,46
		20	30,27±1,23	96,87±2,01

		30	32,17±1,81	98,88±1,09
Ácido oxálico	130	10	16,84±0,11	98,16±0,71
		20	11,42±0,10	75,47±0,63
		30	17,58±0,10	95,03±0,52
	140	10	21,08±0,13	98,13±0,84
		20	21,75±0,10	99,55±0,43
		30	21,62±0,14	97,16±0,77
	150	10	21,53±0,08	100,00±0,12
		20	21,18±0,04	97,11±0,17
		30	21,28±0,12	97,42±0,42
	160	10	24,84±2,41	96,36±2,86
		20	23,29±0,56	96,18±1,72
		30	24,84±0,87	96,72±1,84
170	10	21,36±1,54	77,00±4,82	
	20	22,49±0,68	76,20±1,54	
	30	24,76±0,64	85,89±4,08	
Ácido maleico	130	10	12,50±0,10	95,29±0,61
		20	13,12±0,12	97,92±1,43
		30	13,57±0,08	95,97±0,76
	140	10	14,40±0,12	97,77±0,71
		20	13,62±0,08	95,75±0,33
		30	14,99±0,11	95,91±0,36
	150	10	14,83±0,13	94,93±0,73
		20	15,22±0,07	93,37±0,67
		30	14,99±0,07	95,11±0,51
	160	10	22,44±0,43	94,92±1,29
		20	27,89±0,72	95,28±4,03
		30	27,78±1,41	94,68±0,79
	170	10	27,25±0,63	97,16±0,56
		20	30,71±0,43	96,57±0,89
		30	34,03±1,52	96,15±2,56

3.6 SISTEMA DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA SEMICONTINUA (SFSS)

Establecidos los parámetros críticos asociados a las fases de pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación del proceso de producción de etanol, se puede determinar las

condiciones óptimas para el sistema de sacarificación y fermentación simultánea semicontinua (SFSS) propuesto en este trabajo de investigación.

Esta estrategia de SFSS es una adecuación a la sacarificación y fermentación simultánea (SSF), en donde un pre-hidrolizado de bagazo de caña de azúcar pretratado es añadido al reactor con alimentación semi-continua. La pre-hidrólisis de la biomasa pretratada permite aumentar la carga de sólidos iniciales en el proceso, lo cual conlleva a un aumento en el rendimiento de etanol. En este caso se incrementó la carga de sólidos del 15% al 25% y disminuyó la cantidad de enzimas celulasas de 10 FPU a 6 FPU (en el apartado 5.5 se describe el proceso con 15% de sólidos y 10 FPU de enzima celulasa). Además, la disminución en el tiempo de producción fue notable, en 24 horas se obtienen concentraciones aceptables de etanol, mayores a las reportadas por fermentación en batch.

La cinética de glucosa y etanol fue evaluado en el sistema SFSS con bagazo de caña de azúcar pre-hidrolizado por un periodo de 30 días (Figura 19). Una fase de adaptación fue necesaria (5 días) hasta que el sistema alcance el estado sostenido, es decir, hasta que la producción de etanol se mantenga constante sin variaciones significativas. Por lo tanto, la glucosa liberada por sacarificación enzimática fue simultáneamente consumida por las levaduras convirtiéndola en etanol. La producción de etanol fue constante y continua mostrando un promedio de 71,6 g/L que corresponde a 9,07% v/v de etanol con una desviación estándar de 0,85 en todo el proceso.

En un proceso a escala industrial, es necesario encontrar el balance entre la producción de etanol y el tiempo de residencia en los fermentadores. Una concentración mínima de 40 g/L de etanol es necesario para que el proceso sea rentable. Se han reportado diferentes estrategias para la producción de etanol. Entre ellas la sacarificación y fermentación simultánea (SSF) es la más eficiente en términos de productividad de etanol; entre las

ventajas del proceso se puede mencionar menor tiempo de producción y mejor viabilidad operativa y financiera, en comparación con los sistemas de sacarificación fermentación por separado (SHF).

Por otro lado, algunos estudios han reportado que la adición gradual de sustrato y/o enzimas mejora la hidrólisis enzimática. Esta técnica permite el aumento de la carga de sustrato (> 10% de sólidos); lo cual aumenta el contenido de azúcares y la consecuente producción de etanol. Sin embargo, estudios previos mostraron una correlación desfavorable entre la carga inicial de sólidos y la conversión final, ya que la alta viscosidad de los lodos hidrolizados en el reactor resulta en una disminución en la transferencia de masa (43). Para superar estas limitaciones, la pre-hidrólisis de la biomasa antes de la SSF permite manejar altas cargas de sólidos con menor viscosidad del lodo, lo que resulta en una mayor productividad del etanol.

En experimentos de SSF de lotes alimentados, Zhang et al, (2010) mostró una mayor concentración de etanol (84,7 g/L después de 96 h) para una carga de sólidos similar a la analizada en este estudio (25% p/v), sin embargo se utilizó una carga de enzimas mayor (22.8 FPU) que en el presente estudio (6 FPU). En otro estudio, Cheng et al, (2017) realizaron pruebas de SSF en lotes alimentados, alcanzando una concentración de 87,9 g/L de etanol, utilizando 10 FPU de celulasas y una carga sólida del 30%. Por otro lado, Gomes et al. (45) reportaron 62,5 g/L de etanol después de 48 h en un sistema semi-simultáneo de sacarificación y fermentación (s-SSF) para una proporción de 1: 4 sólido SCB / líquido.

Al comparar los resultados presentados en esta investigación con otros estudios, la concentración de etanol sería similar si se tuviera en cuenta la menor carga de enzimas y los tiempos de operación más cortos (24 h) utilizados en este estudio. Estos dos factores

operacionales hacen adecuado el proceso aquí descrito para la producción de etanol celulósico en gran escala.

Por lo tanto, de los resultados obtenidos en este estudio, se puede inferir que el sistema SFSS tendría ventajas potenciales en términos de: (i) reducción del uso de las enzimas celulasa/xilanasas; (ii) la adición de una alta carga de sólidos; (iii) producción continua de etanol en un sistema estable; (iv) procesamiento diario de etanol; y (v) sistema operativo práctico y simplificado. Todas estas mejoras tendrían un impacto altamente positivo en la economía de la producción de etanol celulósico a escala industrial.

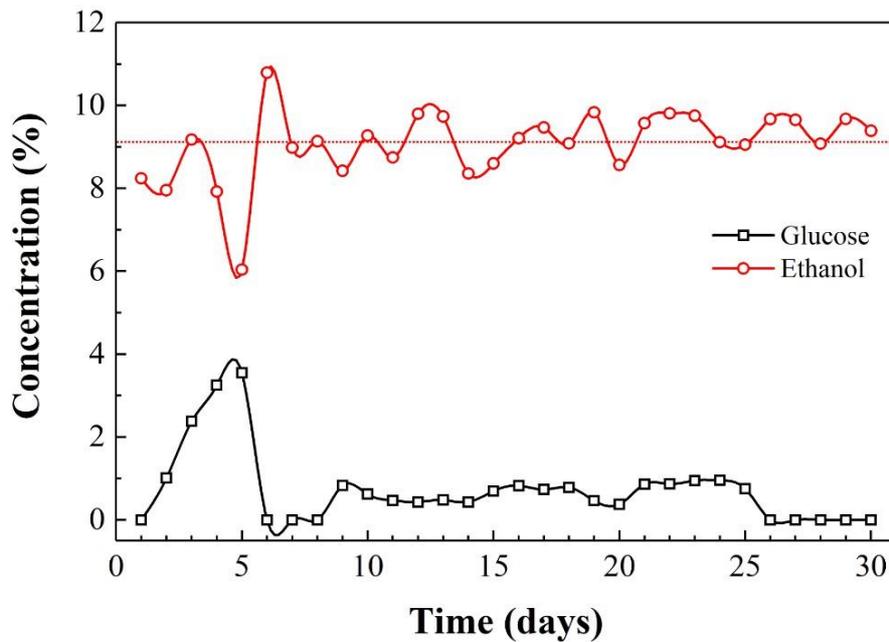


Figura 19. Cinética SFSS de bagazo de caña de azúcar usando *Saccharomyces cerevisiae*:
Concentración de etanol (% v/v) y concentración de glucosa (%)

4. CONCLUSIONES

De las 150 cepas de *S. cerevisiae* se seleccionaron 4 cepas de levadura (CLQCA-10-099, CLQCA-INT-001, CLQCA-INT-005 y UCLM325) en relación a su habilidad de fermentación en menor tiempo. Esto nos lleva a la conclusión de que es necesario un screening de levaduras para poder evaluar el potencial metabólico que garantice la producción de etanol en función del aumento del rendimiento de etanol y disminución en tiempos de producción.

Después del estudio de las diferentes fuentes y concentraciones de nitrógeno (Fosfato de amonio, 1 y 2 gN/L; amoníaco, 1 y 2 gN/L e hidrolizado de levadura, 0,2 – 2,5 gN/L) adicionadas a medios de fermentación se concluye que 0,4 gN/L es la concentración mínima necesaria de nitrógeno a partir de hidrolizado de levadura. La optimización en la utilización de recursos en la producción de etanol es crucial, por lo tanto la determinación de la concentración mínima de nitrógeno a partir de una fuente de fácil acceso es una alternativa a los procesos de fermentación industrializados.

Una vez establecidas las condiciones de fermentación en función de los requerimientos mínimos de nitrógeno, se pudo evaluar la dominancia de diferentes cepas de *S. cerevisiae* en co-fermentaciones. El análisis de los perfiles de ADN mitocondrial mostró que la cepa CLQCA-INT-005 tuvo dominancia en co-cultivo en relación a las otras cepas de *S. cerevisiae*. Esto nos lleva a la conclusión de que la cepa CLQCA-INT-005 presenta mayores ventajas competitivas sobre las otras levaduras estudiadas reflejando un mejor desempeño en la fermentación.

La reutilización de biomasa de levaduras en fermentaciones secuenciales mostró un efecto negativo a partir del tercer ciclo, disminuyendo la capacidad de consumo de glucosa gradualmente en cada ciclo de reutilización. Por lo tanto se concluye que la reutilización de biomasa no es aconsejable ya que las levaduras pierden la capacidad fermentativa disminuyendo los rendimientos de etanol requeridos para la producción de etanol.

Mediante el estudio de la cinética de fermentación se pudo determinar el comportamiento de las cepas de levadura (CLQCA-10-099, CLQCA-INT-001 y CLQCA-INT-005) en función del consumo de glucosa y producción de etanol. Después de 24 horas de fermentación la levadura CLQCA-INT-005 mostró el mayor rendimiento de etanol, por lo tanto se concluye que existen diferencias entre las cepas de levadura de la misma especie en relación al metabolismo.

El estudio de dominancia en co-cultivo y el estudio de cinética de fermentación revelaron resultados importantes en cuanto a la mejor cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de etanol. En ambos casos, y en condiciones preestablecidas la cepa CLQCA-INT-005 exhibió el mejor rendimiento de etanol y mostró una dominancia marcada en co-cultivo. Por lo tanto, se concluye que la cepa CLQCA-INT-005 es una levadura interesante para la producción de etanol celulósico a nivel industrial.

El rendimiento de sacáridos totales y etanol con los pretratamientos alcalinos (NaOH) fue mayor en comparación a los pretratamientos ácidos con reactor de presión. Por lo tanto, en relación a la elección del catalizador que consigue mejores rendimientos de sacarificación a partir de bagazo de caña de azúcar se concluye que es el NaOH (1%) el mejor candidato para pretratamientos de biomasa lignocelulósica.

La mayor producción de TRS por hidrólisis enzimática se consiguió con pretratamientos alcalinos en reactor de presión en comparación con los pretratamientos alcalinos con y sin organosolvente con irradiación de microondas. Por lo tanto se concluye que los pretratamientos en reactor de presión pueden ser utilizados con rendimientos iguales e incluso superiores a los de irradiación con microondas.

En los pretratamientos alcalinos con irradiación de microondas se observaron diferencias entre los pretratamientos con y sin organosolvente (sulfolane-TiO₂). Esto nos permite concluir que la adición del organosolvente mejora el rendimiento de sacarificación. En este sentido el microondas, el catalizador alcalino y organosolvente influyen directamente en el proceso.

Con los resultados obtenidos, la combinación factorial de NaOH 1%, 160°C y 20 min exhibió el mejor rendimiento de sacarificación enzimática y fermentación, por lo tanto se concluye que estas son las condiciones más idóneas para hacer un proceso de producción de etanol más eficiente.

El sistema de SFSS utilizado para la sacarificación y fermentación de bagazo de caña de azúcar pretratada, se ajustó a la utilización de alta carga de sólidos (25%) por su sistema de prehidrólisis. Además este mantuvo una producción de etanol continua cada 24 horas por un periodo de 30 días mostrando una concentración de etanol promedio de 9,07% durante todo el proceso. Por otro lado, la carga enzimática de celulasas se disminuyó en un 40%. Por lo tanto, con los resultados presentados en este trabajo de investigación podemos concluir que este es un sistema prometedor para la producción de bioetanol lignocelulósico, por sus ventajas de alta carga de sólidos, producción de etanol en menor tiempo y disminución en la utilización de enzimas; todas estas aportando a un proceso económicamente más viable.

REFERENCIAS

1. Adekunle, A., Orsat, V., & Raghavan, V. (2016). Lignocellulosic bioethanol: A review and design conceptualization study of production from cassava peels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *64*, 518–530. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.064>
2. Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *66*, 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
3. Aguilar-Reynosa, A., Román, A., Ma. Rodríguez-Jasso, R., Aguilar, C. N., Garrote, G., & Ruiz, H. A. (2017). Microwave heating processing as alternative of pretreatment in second-generation biorefinery: An overview. *Energy Conversion and Management*, *136*, 50–65. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.01.004>
4. Ajao, O., Marinova, M., Savadogo, O., & Paris, J. (2018). Hemicellulose based integrated forest biorefineries: Implementation strategies. *Industrial Crops and Products*, *126*, 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.025>
5. Alfani, F., Gallifuoco, A., Saporosi, A., Spera, A., & Cantarella, M. (2000). Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *25*(4), 184–192. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000054>
6. An, H., Wilhelm, W. E., & Searcy, S. W. (2011). Biofuel and petroleum-based fuel supply chain research: A literature review. *Biomass and Bioenergy*, *35*(9), 3763–3774. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.06.021>
7. Arevalo-Gallegos, A., Ahmad, Z., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., & Iqbal, H. M. N. (2017). Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *99*(Supplement C), 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.097>
8. Azapagic, A., & Stichnothe, H. (2011). 3 - Life cycle sustainability assessment of biofuels. In R. Luque, J. Campelo, & J. Clark (Eds.), *Handbook of Biofuels Production* (pp. 37–60). Woodhead Publishing. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845696795500036>

9. Bafrncová, P., šmogrovičová, D., Sláviková, I., Pátková, J., & Dömény, Z. (1999). Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 21(4), 337–341. <https://doi.org/10.1023/A:1005436816047>
10. Bals, B., Rogers, C., Jin, M., Balan, V., & Dale, B. (2010). Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-1>
11. Basso, Luiz C., L. C., Basso, Thiago., T., & Nitsche Rocha, S. (2011). Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*. <https://doi.org/10.5772/17047>
12. BeMiller, J. N. (2019). 6 - Starches: Molecular and Granular Structures and Properties. In J. N. BeMiller (Ed.), *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third Edition)* (pp. 159–189). AACC International Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812069-9.00006-6>
13. *Biofuels, the Green alternative*. (2012). Retrieved from http://www.youtube.com/watch?v=T_S7Q3Uede4&feature=youtube_gdata_player
14. Bondesson, P.-M., & Galbe, M. (2016). Process design of SSCF for ethanol production from steam-pretreated, acetic-acid-impregnated wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 222. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0635-6>
15. Brito Cruz, C. H., Souza, G. M., & Barbosa Cortez, L. A. (2014). Chapter 11 - Biofuels for Transport. In T. M. Letcher (Ed.), *Future Energy (Second Edition)* (pp. 215–244). Boston: Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080994246000119>
16. Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review [Research article]. <https://doi.org/10.4061/2011/787532>
17. Canilha, L., Chandel, A. K., Suzane dos Santos Milessi, T., Antunes, F. A. F., Luiz da Costa Freitas, W., das Graças Almeida Felipe, M., & da Silva, S. S. (2012). Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about

- Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation [Research article].
<https://doi.org/10.1155/2012/989572>
18. Cazetta, M. L., Celligoi, M. A. P. C., Buzato, J. B., & Scarmino, I. S. (2007). Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*, 98(15), 2824–2828. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.026>
 19. Chang, M., Li, D., Wang, W., Chen, D., Zhang, Y., Hu, H., & Ye, X. (2017). Comparison of sodium hydroxide and calcium hydroxide pretreatments on the enzymatic hydrolysis and lignin recovery of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 244(Part 1), 1055–1058. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.101>
 20. Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., ... Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, 160(Supplement C), 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>
 21. Cheng, N., Koda, K., Tamai, Y., Yamamoto, Y., Takasuka, T. E., & Uraki, Y. (2017). Optimization of simultaneous saccharification and fermentation conditions with amphipathic lignin derivatives for concentrated bioethanol production. *Bioresource Technology*, 232, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.018>
 22. Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., & Romano, P. (2016). Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>
 23. Connelly, R. (2014). Chapter 10 - Second-Generation Biofuel from High-Efficiency Algal-Derived Biocrude. In V. K. Gupta, M. G. Tuohy, C. P. Kubicek, J. Saddler, & F. Xu (Eds.), *Bioenergy Research: Advances and Applications* (pp. 153–170). Amsterdam: Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444595614000103>
 24. da Costa Lopes, A. M., João, K. G., Rubik, D. F., Bogel-Lukasik, E., Duarte, L. C., Andraus, J., & Bogel-Lukasik, R. (2013). Pre-treatment of lignocellulosic biomass using ionic liquids: Wheat straw fractionation. *Bioresource Technology*, 142, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.032>
 25. Dahnum, D., Tasum, S. O., Triwahyuni, E., Nurdin, M., & Abimanyu, H.

- (2015). Comparison of SHF and SSF Processes Using Enzyme and Dry Yeast for Optimization of Bioethanol Production from Empty Fruit Bunch. *Energy Procedia*, 68, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.03.238>
26. Dasgupta, D., Ghosh, D., Bandhu, S., & Adhikari, D. K. (2017). Lignocellulosic sugar management for xylitol and ethanol fermentation with multiple cell recycling by *Kluyveromyces marxianus* IPE453. *Microbiological Research*, 200, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.002>
27. Deshavath, N. N., Dasu, V. V., Goud, V. V., & Rao, P. S. (2017). Development of dilute sulfuric acid pretreatment method for the enhancement of xylose fermentability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11(Supplement C), 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.07.012>
28. Dias, M. O. de S., Maciel Filho, R., Mantelatto, P. E., Cavalett, O., Rossell, C. E. V., Bonomi, A., & Leal, M. R. L. V. (2015). Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. *Environmental Development*, 15, 35–51. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.004>
29. Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., & Ballesteros, M. (2016). Chapter 15 - Steam Explosion as Lignocellulosic Biomass Pretreatment. In S. I. Mussatto (Ed.), *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery* (pp. 349–368). Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00015-3>
30. FAO. (2013). Statistical Yearbooks - World food and agriculture. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>
31. Ferreira, J. A., Brancoli, P., Agnihotri, S., Bolton, K., & Taherzadeh, M. J. (2018). A review of integration strategies of lignocelluloses and other wastes in 1st generation bioethanol processes. *Process Biochemistry*, 75, 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.006>
32. Gonzales, R. R., Sivagurunathan, P., & Kim, S.-H. (2016). Effect of severity on dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass and the following hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(46), 21678–21684. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.198>
33. Han, X., Guo, Y., Liu, X., Xia, Q., & Wang, Y. (2019). Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into hydrocarbons: A mini review. *Catalysis Today*, 319, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.05.013>
34. Hassan, S. S., Williams, G. A., & Jaiswal, A. K. (2018). Emerging technologies

- for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 262, 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.099>
35. Hofsetz, K., & Silva, M. A. (2012). Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. *Biomass and Bioenergy*, 46, 564–573. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.038>
36. Hoşgün, E. Z., Berikten, D., Kıvanç, M., & Bozan, B. (2017). Ethanol production from hazelnut shells through enzymatic saccharification and fermentation by low-temperature alkali pretreatment. *Fuel*, 196, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.01.114>
37. IEA. (2013). CO2 EMISSIONS FROM FUEL COMBUSTION. Retrieved from <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/CO2EmissionsFromFuelCombustionHighlights2013.pdf>
38. Jansen, M. L. A., Bracher, J. M., Papapetridis, I., Verhoeven, M. D., de Bruijn, H., de Waal, P. P., ... Pronk, J. T. (2017). *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Research*, 17(5). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox044>
39. Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
40. Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. (2016). A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. *Bioresource Technology*, 203(Supplement C), 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.035>
41. Khattab, S. M. R., & Watanabe, T. (2019). Chapter 10 - Bioethanol From Sugarcane Bagasse: Status and Perspectives. In R. C. Ray & S. Ramachandran (Eds.), *Bioethanol Production from Food Crops* (pp. 187–212). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813766-6.00010-2>
42. Kim, J. S., Lee, Y. Y., & Kim, T. H. (2016a). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
43. Kim, J. S., Lee, Y. Y., & Kim, T. H. (2016b). A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 199(Supplement C), 42–48.

- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
44. Koo, B.-W., Park, N., Jeong, H.-S., Choi, J.-W., Yeo, H., & Choi, I.-G. (2011). Characterization of by-products from organosolv pretreatments of yellow poplar wood (*Liriodendron tulipifera*) in the presence of acid and alkali catalysts. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *17*(1), 18–24.
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2010.10.003>
45. Kootstra, A. M. J., Beeftink, H. H., Scott, E. L., & Sanders, J. P. M. (2009). Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal*, *46*(2), 126–131.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.04.020>
46. Kumar, D., & Singh, V. (2019). Chapter 22 - Bioethanol Production From Corn. In S. O. Serna-Saldivar (Ed.), *Corn (Third Edition)* (pp. 615–631). Oxford: AACC International Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00022-X>
47. Kumneadklang, S., Larпкиattaworn, S., Niyasom, C., & O-Thong, S. (2015). Bioethanol Production from Oil Palm Frond by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Energy Procedia*, *79*, 784–790.
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.11.567>
48. Kurtzman, C, Fell, J, & Boekhout, T. (2010). The Yeasts | ScienceDirect. Retrieved January 20, 2019, from <https://www.sciencedirect.com/book/9780444521491/the-yeasts>
49. Lai, C., Tu, M., Shi, Z., Zheng, K., Olmos, L. G., & Yu, S. (2014). Contrasting effects of hardwood and softwood organosolv lignins on enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresource Technology*, *163*, 320–327.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.065>
50. Lee, Y.-G., Jin, Y.-S., Cha, Y.-L., & Seo, J.-H. (2017). Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, *228*, 355–361.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.042>
51. Li, H., Wu, M., Xu, L., Hou, J., Guo, T., Bao, X., & Shen, Y. (2015). Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. *Microbial Biotechnology*, *8*(2), 266–274.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12245>
52. Li, X., Wei, Y., Xu, J., Xu, N., & He, Y. (2018). Quantitative visualization of

- lignocellulose components in transverse sections of moso bamboo based on FTIR macro- and micro-spectroscopy coupled with chemometrics. *Biotechnology for Biofuels*, 11. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1251-4>
53. Li, Z., Wang, D., & Shi, Y.-C. (2017). Effects of nitrogen source on ethanol production in very high gravity fermentation of corn starch. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 70, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.10.055>
54. Lopes, M. L., Paulillo, S. C. de L., Godoy, A., Cherubin, R. A., Lorenzi, M. S., Giometti, F. H. C., ... Amorim, H. V. de. (2016). Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>
55. Manginot, C., Roustan, J. L., & Sablayrolles, J. M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(7), 511–517. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00080-5)
56. Manju, S., & Singh Chadha, B. (2011). Chapter 9 - Production of Hemicellulolytic Enzymes for Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. In A. Pandey, C. Larroche, S. C. Ricke, C.-G. Dussap, & E. Gnansounou (Eds.), *Biofuels* (pp. 203–228). Amsterdam: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00009-7>
57. Menon, V., & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 522–550. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
58. Mohanty, S. K., & Swain, M. R. (2019). Chapter 3 - Bioethanol Production From Corn and Wheat: Food, Fuel, and Future. In R. C. Ray & S. Ramachandran (Eds.), *Bioethanol Production from Food Crops* (pp. 45–59). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813766-6.00003-5>
59. Mohr, A., & Raman, S. (2013). Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. *Energy Policy*, 63, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.08.033>
60. Moniruzzaman, M., & Goto, M. (2018). Ionic Liquid Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enhanced Enzymatic Delignification. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. https://doi.org/10.1007/10_2018_64
61. Nagarajan, S., Skillen, N. C., Irvine, J. T. S., Lawton, L. A., & Robertson, P. K.

- J. (2017). Cellulose II as bioethanol feedstock and its advantages over native cellulose. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *77*, 182–192.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.118>
62. Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 578–597.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
63. Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, *37*(1), 52–68.
<https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
64. Olofsson, K., Bertilsson, M., & Lidén, G. (2008). A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, *1*, 7. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>
65. Ostovareh, S., Karimi, K., & Zamani, A. (2015). Efficient conversion of sweet sorghum stalks to biogas and ethanol using organosolv pretreatment. *Industrial Crops and Products*, *66*, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.023>
66. Palmqvist, E., Galbe, M., & Hahn-Hägerdal, B. (1998). Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with *Saccharomyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *50*(5), 545–551.
67. Patel, H., Chapla, D., & Shah, A. (2017). Bioconversion of pretreated sugarcane bagasse using enzymatic and acid followed by enzymatic hydrolysis approaches for bioethanol production. *Renewable Energy*, *109*(Supplement C), 323–331.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.03.057>
68. Peng, H., Chen, H., Qu, Y., Li, H., & Xu, J. (2014). Bioconversion of different sizes of microcrystalline cellulose pretreated by microwave irradiation with/without NaOH. *Applied Energy*, *117*, 142–148.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.12.002>
69. Peng, H., Li, H., Luo, H., & Xu, J. (2013). A novel combined pretreatment of ball milling and microwave irradiation for enhancing enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Bioresource Technology*, *130*, 81–87.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.167>
70. Pereira, F. B., Guimarães, P. M. R., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2011).

- Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bioethanol fermentations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *112*(2), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.03.022>
71. Pereira, F. B., Romaní, A., Ruiz, H. A., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2014). Industrial robust yeast isolates with great potential for fermentation of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *161*, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.043>
72. Pérez-Torrado, R., Rantsiou, K., Perrone, B., Navarro-Tapia, E., Querol, A., & Cocolin, L. (2017). Ecological interactions among *Saccharomyces cerevisiae* strains: insight into the dominance phenomenon. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/srep43603>
73. Podschun, J., Saake, B., & Lehnen, R. (2017). Catalytic demethylation of organosolv lignin in aqueous medium using indium triflate under microwave irradiation. *Reactive and Functional Polymers*, *119*, 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.08.007>
74. Qing, Q., Guo, Q., Zhou, L., Gao, X., Lu, X., & Zhang, Y. (2017). Comparison of alkaline and acid pretreatments for enzymatic hydrolysis of soybean hull and soybean straw to produce fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*, *109*(Supplement C), 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.051>
75. Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D. (1992). A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, *15*(3), 439–446. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80219-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80219-5)
76. Raj, K., & Krishnan, C. (2018). High sugar yields from sugarcane (*Saccharum officinarum*) bagasse using low-temperature aqueous ammonia pretreatment and laccase-mediator assisted enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, *111*, 673–683. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.047>
77. Rastogi, M., & Shrivastava, S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *80*(Supplement C), 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>
78. Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, *199*(Supplement C), 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.106>

79. RFA. (2014). 2014 Ethanol Industry Outlook. Retrieved from <http://www.ethanolrfa.org/page/-/rfa-association-site/Resource%20Center/2014%20Ethanol%20Industry%20Outlook.pdf?nocdn=1>
80. Sanguandeeikul, R., Chanprasartsuk, O., & Prakitchaiwattana, C. (2018). *Comparison of Methods for Identification of Yeasts Isolated during Spontaneous Fermentation of Freshly Crushed Pineapple Juices* (Working Paper). JKUAT. Retrieved from <http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/4360>
81. Savou, V., Grause, G., Kumagai, S., Saito, Y., Kameda, T., & Yoshioka, T. (2018). Pyrolysis of sugarcane bagasse pretreated with sulfuric acid. *Journal of the Energy Institute*. <https://doi.org/10.1016/j.joei.2018.06.003>
82. Schmiele, M., Sampaio, U. M., & Pedrosa Silva Clerici, M. T. (2019). Chapter 1 - Basic Principles: Composition and Properties of Starch. In M. T. P. Silva Clerici & M. Schmiele (Eds.), *Starches for Food Application* (pp. 1–22). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809440-2.00001-0>
83. Shahab, R. L., Luterbacher, J. S., Brethauer, S., & Studer, M. H. (2018). Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass to lactic acid by a synthetic fungal-bacterial consortium. *Biotechnology and Bioengineering*, *115*(5), 1207–1215. <https://doi.org/10.1002/bit.26541>
84. Sharma, H. K., Xu, C., & Qin, W. (2017). Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0059-y>
85. Soundarrajan, C., Vennison, S. J., Saraswathi, K., & Emmanuel, E. S. C. (2016). Does Chip Size of the Lignocellulosic Bagasse Influence Lignin Degradation with NaOH treatment. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, *8*(2), 765–769.
86. Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). Chapter 1 - An introduction to fermentation processes. In *Principles of Fermentation Technology (Third Edition)* (pp. 1–20). Oxford: Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1.00001-6>
87. Sul'man, E. M., Sul'man, M. G., & Prutenskaya, E. A. (2011). Effect of ultrasonic pretreatment on the composition of lignocellulosic material in biotechnological processes. *Catalysis in Industry*, *3*(1), 28–33. <https://doi.org/10.1134/S2070050411010120>
88. Tyagi, S., Lee, K.-J., Mulla, S. I., Garg, N., & Chae, J.-C. (2019). Chapter 2 -

- Production of Bioethanol From Sugarcane Bagasse: Current Approaches and Perspectives. In P. Shukla (Ed.), *Applied Microbiology and Bioengineering* (pp. 21–42). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815407-6.00002-2>
89. U.S. Department of Energy. (2017). Alternative Fuels Data Center: Maps and Data - Global Ethanol Production. Retrieved January 20, 2019, from <https://afdc.energy.gov/data/>
90. Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
91. Verbelen, P. J., De Schutter, D. P., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., & Delvaux, F. R. (2006). Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, 28(19), 1515–1525. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9132-5>
92. Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>
93. Walker, G. M., & Walker, R. S. K. (2018). Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. In *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.003>
94. Wang, B., Shen, X.-J., Wen, J.-L., Xiao, L., & Sun, R.-C. (2017). Evaluation of organosolv pretreatment on the structural characteristics of lignin polymers and follow-up enzymatic hydrolysis of the substrates from Eucalyptus wood. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 447–459. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.069>
95. Williams, K. M., Liu, P., & Fay, J. C. (2015). Evolution of ecological dominance of yeast species in high-sugar environments. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 69(8), 2079–2093. <https://doi.org/10.1111/evo.12707>
96. World Fuel Ethanol production. (2017). Retrieved January 20, 2019, from <https://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>
97. Zhang, M., Wang, F., Su, R., Qi, W., & He, Z. (2010). Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and

- fermentation after combined pretreatment. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4959–4964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.010>
98. Zhao, X., Cheng, K., & Liu, D. (2009). Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*(5), 815–827. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1883-1>