



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y TECNOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS EXACTAS E INGENIERÍA



TESIS DE DOCTORADO

***Desarrollo de estrategias para la producción de bioetanol
utilizando hidrolizados de recursos lignocelulósicos***

Ing. Adriana Paola Manfredi
Tesista

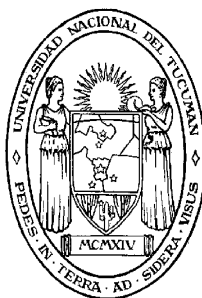
Ing. Nora I. Perotti
Directora

Dra. María A. Martínez
Directora Asociada

Agosto 2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y TECNOLOGÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS EXACTAS E INGENIERÍA



TESIS DE DOCTORADO

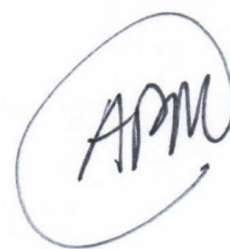
***Desarrollo de estrategias para la producción de
bioetanol utilizando hidrolizados de recursos
lignocelulósicos***

Ing. Adriana Paola Manfredi

Agosto 2018

Memoria presentada por Adriana Paola Manfredi para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Exactas e Ingeniería por la Universidad Nacional de Tucumán, bajo la dirección de la Ing. Nora I. Perotti y de la Dra. María A. Martínez.

San Miguel de Tucumán, agosto de 2018



Adriana Paola Manfredi



Ing. Nora I. Perotti

Directora



Dra. María A. Martínez

Directora Asociada

Trabajo de tesis realizado en

LABORATORIO DE BIOCONVERSIONES

PLANTA PILOTO DE PROCESOS INDUSTRIALES MICROBIOLÓGICOS

PROIMI-CONICET

PROIMI
BIOTECNOLOGIA



CONICET

LABORATORIO DE
BIOCONVERSIONES

A mi madre, padre y hermanos

Agradecimientos

A Dios, por concederme vida y salud durante este camino recorrido.

A mi familia. Sin su apoyo, contención y enseñanzas no hubiera llegado donde estoy hoy. Sobre todo a mis padres, que siempre me inculcaron el valor de “nutrir” mi mente y mi espíritu y de superarme día a día para ser una mejor persona, en lo personal y en lo profesional.

A la Ing. Nora Perotti, por confiar en mí dándome la oportunidad de hacer esta tesis y guiarme en este camino. Por recibirme en su grupo y proporcionarme los medios necesarios para realizar esta tesis.

A Ale, por su confianza en mí como profesional y como persona, por su dedicación incondicional y compromiso con este trabajo. Gracias por haberme enseñado todo lo que estuvo a tu alcance y apoyarme en cada decisión tomada. Gracias!!!

A mis compañeros del Lab 13, Pablo, Horacio, Johan, Enzo, Andrés, Johana y Claudia, por estar siempre presentes en estos años. Gracias por haberme ayudado con mi tesis y por los momentos compartidos.

A Daniel Etchegorry, porque estuvo a mi lado tratando de solucionar lo que se presentó, por enseñarme y tenerme paciencia.

A “los chicos de la Planta”, Martín, José y Víctor. Por su buena predisposición y apoyo.

A las Dras. María José Negro y Mercedes Ballesteros, por haberme dado la oportunidad de hacer una estancia de investigación en la Unidad de Biocarburantes. Agradezco a todo el grupo de CIEMAT que hicieron grata mi estadía allí y muy fructífera en lo profesional y personal: Ignacio Ballesteros, Paloma Manzanares, Felicia Sáez, José Miguel Oliva y José María Martínez; Belinda, Miguel, Miguel ATI, Javi, José Manuel, Aleta, Luis, Pili, Alberto, Isabel, Altagracia.

A mis queridos amigos y colegas, Pau y Dani, ¡por el “aguante” de siempre!

A Cintia y Katia, por los consejos que me ayudaron a seguir adelante cuando necesitaba “un empujón”.

A Lau, Julia, Turi y Andre. El día a día fue mucho más ameno con su presencia.

A todo el personal de PROIMI, investigadores, CPA y becarios que, de un modo u otro, contribuyeron a concretar este trabajo de tesis.

A Esteban y Adrián, por su compañía en este tiempo que hizo más grata la última etapa de esta tesis.

A CONICET, UNT y BECAR por el apoyo económico recibido, fundamental para el desarrollo de esta tesis.

A mis amigos de toda la vida, Noe, Gaby, Cele, Chechu, Adri y Clau. Gracias por ser incondicionales siempre, por haber festejado mis logros y acompañado en los momentos difíciles.

A las personas que de alguna forma han participado para que el trabajo que se expone en la presente Tesis Doctoral sea una realidad.



Índice



INDICE

RESUMEN	I
DIVULGACIÓN	V
INTRODUCCION	
1 Introducción	1
2 Los biocombustibles	1
3 Etanol de segunda generación	2
3.1. Las lignocelulosas: composición y estructura	3
3.2. Pretratamientos de biomasa lignocelulósicas	5
3.2.1 Pretratamientos físicos	6
3.2.1.1 Reducción mecánica	6
3.2.1.2 Extrusión	7
3.2.2 Pretratamientos químicos	7
3.2.2.1 Alcalinos	7
3.2.2.2 Ácidos	7
3.2.2.3 Organosolv	8
3.2.2.4 Líquidos iónicos (LI)	8
3.2.2.3 Oxidación húmeda	8
3.2.3 Pretratamientos físico-químicos	8
3.2.3.1 Explosión por vapor	9
3.2.3.2 Agua presurizada o “agua caliente”	9
3.2.3.3 Explosión por vapor con amoníaco	9
3.2.3.3 Explosión de CO ₂	9
3.2.4 Pretratamientos biológicos	10
3.2.5 Compuestos inhibidores derivados de los pretratamientos	10
3.3 Hidrólisis enzimática	11
3.4 Configuraciones del proceso de producción de etanol 2G	14
Referencias	16
OBJETIVOS	
Justificación de la tesis	23
Objetivo general	25

Objetivos específicos	25
Referencias	26
 CAPITULO 1	
1.1 Introducción	27
1.2 Materiales y métodos	28
1.2.1 Muestras para el aislamiento de bacterias	28
1.2.2 Medios de cultivo	28
1.2.3 Enriquecimiento y aislamiento de bacterias degradadoras de celulosa	29
1.2.4 Ensayos de actividad enzimática y perfil zimográfico	29
1.2.5 Aislamiento de ADN y amplificación y análisis del gen ribosomal 16S RNA	30
1.3 Resultados y discusión	31
1.3.1 Enriquecimiento y aislamiento de bacterias celulolíticas	31
1.3.2 Evaluación de la actividad celulolítica extracelular	32
1.3.3 Distribución taxonómica de los aislamientos bacterianos seleccionados	33
1.4 Conclusiones	39
Referencias	40
 CAPITULO 2	
2.1 Introducción	43
2.2 Materiales y métodos	44
2.2.1 Microorganismo y selección de componentes del medio de cultivo	44
2.2.2 Efecto de CMC y mono y disacáridos en la producción de endoglucanasas	45
2.2.3 Producción enzimática en un reactor tanque agitado de 1 L en sistema por lote	45
2.2.4 Actividad endoglucanasa estándar y análisis zimográfico	45
2.2.5 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad y estabilidad endoglucanasa	46
2.2.6 Efecto de iones y otros aditivos sobre la actividad endoglucanasa	46
2.2.7 Análisis estadístico	47
2.3 Resultados y discusión	47
2.3.1 <i>Bacillus</i> sp. AR03: Afiliación taxonómica y morfología	47
2.3.2 Evaluación de los componentes del medio de cultivo y curva de crecimiento	48
2.3.3 Efecto de CMC y mono y disacáridos en la producción de endoglucanasas	51
2.3.4 Producción enzimática en 1 L-RTA en operación por lote	54
2.3.5 Efecto de la temperatura y el pH en la actividad endoglucanasa y su estabilidad	55

2.3.6 Efecto de iones y otros aditivos en la actividad carboximetil-celulasa	56
2.3.7 Análisis de Nativo-PAGE y zimograma	58
2.4 Conclusiones	59
Referencias	60
CAPITULO 3	
3.1 Introducción	63
3.2 Materiales y métodos	66
3.2.1 Materias primas y pretratamiento	66
3.2.2 Diseño estadístico de experimentos	66
3.2.3 Caracterización de los pretratamientos	67
3.2.4 Producción y cuantificación de extractos crudos para sacarificación	68
3.2.5 Ensayos de sacarificación de las fracciones líquidas	69
3.2.6 Ensayos de sacarificación de las fracciones sólidas	69
3.2.7 Actividades enzimáticas	69
3.2.8 Métodos analíticos	70
3.3 Resultados y discusión	71
3.3.1 Caracterización de la biomasa	71
3.3.2 Explosión por vapor de bagazo y residuos post-cosecha de caña de azúcar	72
3.3.3 Análisis del efecto de los parámetros operacionales del pretratamiento de explosión por vapor	79
3.3.4 Caracterización de los puntos óptimos	85
3.3.5 Sacarificación de fracciones líquidas	90
3.3.6 Sacarificación de las fracciones sólidas	93
3.4 Conclusiones	96
Referencias	98
CAPITULO 4	
4.1 Introducción	102
4.2 Materiales y métodos	104
4.2.1 Materia prima y pretratamientos	104
4.2.2 Caracterización de los pretratamientos	104
4.2.3 Experimentos de hidrólisis enzimática	105
4.2.4 Ensayos SFS y PSFS	105

4.2.5 Métodos analíticos	106
4.3 Resultados y discusión	106
4.3.1 Caracterización de la biomasa	106
4.3.2 Evaluación de pretratamientos para residuos de cultivos agrícolas de caña de azúcar	107
4.3.3 Configuración de las condiciones de sacarificación a una consistencia del 20 % (p/v)	110
4.3.4 Ensayos SFS y PSFS	111
4.4 Conclusiones	114
Referencias	115
CONCLUSIONES	117



Resumen



Resumen

Frente a la necesidad de generar conocimiento y aportar al desarrollo de energías renovables, esta tesis se dirigió a la evaluación y diseño de estrategias para la producción de bioetanol a partir de materia prima lignocelulósica: bagazo y residuo agrícola de cosecha (RAC) de caña de azúcar. Como fuente de carbono renovable más abundante en la naturaleza y altamente energética, la biomasa lignocelulósica es ideal para el desarrollo de procesos sustentables. Su utilización eficiente requiere de pretratamientos para abrir su estructura y así facilitar el acceso de enzimas sacarificantes; los monosacáridos producidos son luego convertidos a bioetanol por fermentación. Para el desarrollo de procesos potencialmente viables, en este trabajo se evaluaron y optimizaron pretratamientos de bagazo y RAC, se desarrollaron formulaciones enzimáticas sacarificantes y se produjo etanol de segunda generación (2G) en diferentes configuraciones de proceso.

Como métodos químicos, se realizaron pretratamientos con NaOH y H₂SO₄ sobre RAC, mientras que el pretratamiento fisicoquímico por explosión de vapor (EV) se usó sobre bagazo y RAC aplicando la metodología de diseño de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo sobre la recuperación de azúcares fermentables. Los puntos óptimos obtenidos permitieron recuperar valores mayores al 76 % de glucosa y al 60 % de xilosa, y fueron usados en las siguientes etapas.

La sacarificación enzimática fue abordada con el uso de enzimas comerciales suplementadas con enzimas propias. A tal fin, se construyó una colección de cepas productoras de enzimas de interés, provenientes de nichos de la agroindustria local y de intestino de insectos xilófagos. De un total de 233 aislamientos bacterianos identificados de acuerdo a la secuencia del gen ribosomal 16S, fueron seleccionados *Bacillus* sp. AR03 y *Paenibacillus* sp. AR247. La producción enzimática se realizó usando reactor tanque agitado (1 L) y medios de cultivo diseñados mediante métodos estadísticos. Las celulasas producidas por la cepa AR03 presentaron características adecuadas para aplicaciones en biorrefinería, ya que no fueron afectadas por la presencia de diversos aditivos, y su actividad mejoró en presencia de varios metales. Sin embargo, su uso en la sacarificación resultó poco significativo. De manera diferente, la utilización de la mezcla enzimática producida por *Paenibacillus* sp. AR247 permitió incrementar el rendimiento de glucosa hasta un 37 %, con respecto a la mezcla comercial, luego de la sacarificación de las biomásas pretratadas por EV, lo que fue el resultado más prometedor en vista de la literatura existente a la fecha.

Finalmente, la producción de bioetanol fue realizada a partir de RAC pretratado por métodos químicos y fisicoquímico, y sacarificado con enzimas comerciales de última generación, utilizando dos configuraciones de proceso: sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) y presacarificación, sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS). Los ensayos de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red® se realizaron con alta carga de sólidos (20 %). El proceso pretratamiento-fermentación [NaOH-PSFS] produjo 4,8 % (p/p) de etanol y fue el más eficiente, aunque se logró un

resultado significativo con la combinación [EV-PSFS], debido a que no involucra el uso de reactivos contaminantes y resultó en la producción de 3,2 % (p/p) de etanol 2G.

Palabras claves: etanol de segunda generación, biomasa lignocelulósica, celulasas, xilanasas

Abstract

In order to meet the requirements for renewable energies development, this thesis is aimed at evaluating and designing strategies for bioethanol production from lignocellulosic materials, such as sugarcane bagasse and agricultural crop residue (ACR). As a highly energetic and abundant source of renewable carbon, lignocellulosic biomass is ideal for the development of sustainable processes. However, its efficient utilization frequently requires pre-treatments to open its compact structure, thus facilitating the access of saccharifying enzymes. The produced monosaccharides are then available for bioethanol generation through fermentation. Towards the development of potentially feasible processes, an integral evaluation and optimization of second generation (2G) ethanol production was performed. Different pre-treatments of bagasse and ACR were included, and enzymatic formulations for saccharification and hexoses fermentation were developed according to two process configurations.

Chemical pre-treatments using NaOH and H₂SO₄ were carried out on ACR, while a physico-chemical pre-treatment, steam explosion (SE), was assayed on bagasse and ACR. These last assays were based on the response surface methodology for a thorough evaluation of the effect of time and temperature conditions for fermentable sugars recovery. The optimum points, which allowed to recover more than 76 % of glucose and more than 60 % of xylose, were next utilized for saccharification assays.

Enzymatic hydrolysis was performed by complementing commercial enzyme preparations with enzymes from local strains for optimal saccharification. To that end, a collection of enzyme-producing bacteria from niches of the local agro-industry and xylophagous insect guts was built. From a total of 233 bacterial isolates that were identified according to the sequence of the 16S ribosomal gene, *Bacillus* sp. AR03 and *Paenibacillus* sp. AR247 were selected. The enzyme production was accomplished using a stirred tank reactor (1 L), with a culture media designed according to a statistical methodology. The produced cellulase by strain AR03 was not affected by the presence of several additives and was even improved in the presence of some few metals, properties that are desirable for biorefinery applications. However, its use in saccharification was not significant, whereas the xylanolytic preparation from *Paenibacillus* sp. AR247 produced an increment of 37 % of glucose available for fermentation when biomass pre-treated by SE was assayed. This was the most promising result according to the existing literature to date.

Finally, the process assessment was completed with bioethanol production from ACR pre-treated by chemical and physicochemical methods, and followed by saccharification with new-generation commercial enzymes. The process configurations used were simultaneous saccharification-fermentation (SSF), and simultaneous presaccharification-saccharification-fermentation (PSSF), in systems with high solids load (20 %) and *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red® as fermentation yeast.

The most efficient process assayed was the pretreatment-fermentation [NaOH-SSF], which produced 4.8 % (w/w) ethanol 2G, although a significant result was the production of 3.2 % (w/w) of 2G ethanol through the combination [SE-PSSF], which does not involve the use of contaminating reagents.

Key words: second generation ethanol, lignocelulosic biomass, cellulases, xylanases



Divulgación



Los resultados del trabajo realizado durante esta tesis se publicaron en los siguientes medios:

Revistas internacionales:

Manfredi A.P., Perotti N.I., Martínez M.A. (2015). Cellulose degrading bacteria isolated from industrial samples and the gut of native insects from Northwest of Argentina. *J Basic Microbiol.* 55(12), 1384-93.

Manfredi A.P., Pisa J.H., Valdeón D.H., Perotti N.I. *et al.* (2016). Synergistic effect of simple sugars and carboxymethyl cellulose on the production of a cellulolytic cocktail from *Bacillus* sp. AR03 and enzyme activity characterization. *Appl Biochem Biotechnol.* 179, 1384-93.

Pisa J.H., Manfredi A.P., Perotti N.I., Romero H.G. *et al.* (2017). Agrowastes as feedstock for the production of endo- β -Xylanase from *Cohnella* sp. strain AR92. *J Mol Microbiol Biotechnol* 27, 277-28.

Manfredi A.P., Ballesteros I., Saez F., Perotti N.I. *et al.* (2018). Integral process assessment of sugarcane agricultural crop residues conversion to ethanol. *Bioresource Technology* 260, 241-47.

Congresos:

Producción de etanol 2G a partir de residuos agrícola de cosecha mediante diferentes configuraciones de sacarificación y fermentación. Manfredi A.P., Negro M.J., Ballesteros I., Sáez F., Perotti N.I., Martínez M.A.. SAPROBIO. Buenos Aires, diciembre 2016.

Lignocelulosas de origen agroindustrial para la producción de celulasas por Cohnella sp. AR92. Pisa J.H., Hero J.S., Soraire P.M., Manfredi A.P., Perotti N.I., Martínez M.A. The fifth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering. Buenos Aires, julio 2016.

Stability assessment and improvement of enzymatic activity of the endoglucanases from Bacillus sp. Pisa J.H., Manfredi A.P., Perotti N.I., Martínez M.A. XI Congreso Argentino de Microbiología General-SAMIGE. Córdoba, agosto 2015.

Insect guts as source of efficient cellulases producing bacteria” Manfredi A.P., Etchegorry V.D., Martínez M.A., Perotti N.I. IX Congreso Argentino de Microbiología General-SAMIGE. Santa Fe, agosto 2013.

Evaluation of the effect of glucose and carboxymethylcellulose on the endoglucanase production by Bacillus spp. Martinez E.M., Guindan C.J, Manfredi A.P., Perotti N.I., Martínez M.A. IX Congreso Argentino de Microbiología General-SAMIGE. Santa Fe, agosto 2013.



Introducción



1. Introducción

La demanda global de energía continúa aumentando rápidamente y excede el crecimiento en el suministro total de energía [1]. A pesar de la gran diversificación del sector energético en los últimos años, los combustibles fósiles continúan siendo al día de hoy la principal fuente de obtención de energía. Esta dependencia, junto al incremento en la demanda energética, establece una situación delicada para el entorno en el que vivimos, dada la relación existente entre la utilización de estas fuentes de energía y diversos procesos perjudiciales para el medioambiente. Uno de los efectos claros derivados del uso masivo de estos recursos es el aumento en las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). Las concentraciones atmosféricas de GEIs se encuentran en niveles que no tienen precedentes en al menos 800.000 años. Las concentraciones de dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O) han mostrado grandes aumentos desde 1750 (40 %, 150 % y 20 %, respectivamente), y han contribuido al incremento en la temperatura media global, provocando el deshielo de los casquetes polares y el consiguiente aumento del nivel del mar [2]. Otro dato negativo a tener en cuenta es la imposibilidad de regeneración de los recursos fósiles, lo que limita su utilización a largo plazo y podría ocasionar una crisis energética a nivel mundial.

En la actualidad, el objetivo principal es la transformación de los métodos tradicionales de producción de energía a procesos más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente, en particular, la sustitución de ciertos combustibles derivados de los fósiles por recursos renovables [3, 4, 5, 6].

2. Los biocombustibles

Dentro del sector energético, el transporte presenta una dependencia del 98 % de los combustibles derivados del petróleo y supone el 30 % de las emisiones totales de GEI [7]. Con estos precedentes y atendiendo a criterios de sostenibilidad, diferentes organismos internacionales han establecido ciertos parámetros para la sustitución paulatina de estos carburantes de origen fósil por otros de naturaleza renovable.

Entre las principales alternativas disponibles actualmente, los biocombustibles líquidos como el bioetanol y el biodiesel representan una opción viable para el reemplazo de las energías tradicionales en un período medio-corto. Estos biocarburantes no sólo ayudan a combatir el cambio climático y a reducir la dependencia energética de los productos petrolíferos, sino que, al igual que el resto de energías renovables, también contribuyen a la generación de empleo y al desarrollo del medio rural.

Teniendo en cuenta la materia prima de partida, los biocombustibles obtenidos a partir de biomasa pueden clasificarse en primera, segunda, tercera y cuarta generación [8]. La primera generación utiliza biomasa con alto contenido en azúcares, almidón o aceites, como son la caña de azúcar, el grano de maíz o de trigo o las semillas de girasol. Las fuentes empleadas para la producción de biocombustibles de segunda generación pueden clasificarse en residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, paja de arroz, etc.), maderas duras (álamo, chopo, etc.), maderas blandas (pino, abeto, píceas,

etc.), residuos celulósicos (residuos de papel, residuos de la industria de la madera y el papel, etc.), biomasa herbácea (alfalfa, alpiste, etc.) y residuos sólidos urbanos [9]. La ventaja de estos biocombustibles con respecto a los de primera generación, es que satisfacen esta demanda de energía renovable sin afectar el sector alimentario, utilizando materias primas como los recursos lignocelulósicos [10, 11]. Además, la conversión de las mismas en diferentes tipos de productos químicos y materiales de acuerdo con un concepto de biorrefinería es también una cuestión relevante para el desarrollo sostenible de la industria química en un futuro escenario posterior al petróleo [12]. Por otro lado, la tercera generación representa una evolución de la segunda y utiliza materiales como cultivos bioenergéticos modificados de crecimiento rápido (árboles con menor contenido en lignina o lignina modificada) o las algas y las microalgas. Finalmente, la cuarta generación aún se encuentra en fase teórica y utiliza microorganismos genéticamente modificados para transformar directamente el CO₂ en el biocombustible deseado, principalmente etanol.

Entre las diferentes generaciones, la segunda presenta ciertas ventajas en relación a diferentes conflictos éticos como la utilización de alimentos para fines energéticos (primera generación) y en cuanto a su disponibilidad inmediata (tercera y cuarta generación). Además, los materiales utilizados en la producción de biocombustibles de segunda generación son abundantes y se consideran productos de desecho, por lo que no representan un coste adicional elevado y el potencial para abaratar el precio final del producto tiene un margen mayor.

3. Etanol de segunda generación

El bioetanol es definitivamente el biocombustible más consumido en todo el mundo, y se utiliza en forma pura o como un aditivo para la gasolina [13]; presenta alto índice de octano [14], bajo número de cetano y alto calor de vaporización [15].

Actualmente, la producción de bioetanol se basa en la conversión de materias primas almidonadas y azucaradas (etanol de primera generación) [16, 17]. En particular, los Estados Unidos y Brasil han ampliado el cultivo de maíz y caña de azúcar para la producción de etanol combustible [18, 19]. El crecimiento adicional de la producción tendrá que depender de la explotación de otra biomasa que no compita con cultivos alimentarios para el consumo humano y no relacionados con los animales [18, 20].

En la actualidad, las lignocelulosas se consideran la mejor opción de materia prima para la producción de bioetanol debido a su producción relativamente barata y abundante, lo que genera muchas ventajas económicas, medioambientales y de seguridad energética [21, 22, 5]. Muchos investigadores han estudiado la producción de bioetanol a partir de fuentes no alimentarias como bagazo de caña de azúcar, médula de bagazo, paja de caña de azúcar, eucalipto, rastrojo de maíz, paja de maíz, desechos de coco, cactus y sorgo dulce [23, 24, 25, 26, 5, 27, 28, 29, 30].

Muchos cultivos que producen grandes proporciones de material lignocelulósico son capaces de crecer en terrenos menos deseables y requieren menos mantenimiento [31]. Esto significa que los mismos pueden expandirse fácilmente con poco impacto. En conjunto, estos factores hacen que los biocombustibles de segunda generación sean un recurso de energía rentable, abundante y renovable.

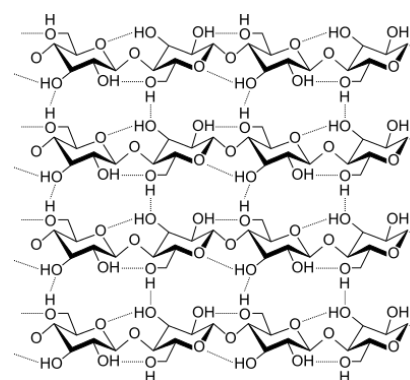
Sin embargo, hay una serie de desafíos que deben superarse para que la producción de bioetanol sea económicamente viable. Uno es la recalcitrancia de la celulosa en la degradación enzimática, que está relacionada con la composición química y la morfología de cualquier tipo de biomasa [32]. Otro es la necesidad de métodos mejorados para la sacarificación y fermentación de moléculas de azúcar en etanol; los métodos actuales son ineficientes y costosos, y podrían madurar y mejorar [33, 28].

3.1 Las lignocelulosas: composición y estructura

La lignocelulosa es el componente estructural de la pared celular de las plantas y, con una producción anual estimada de 10^9 toneladas, se considera la mayor fuente de energía y materia orgánica renovable de la biosfera [34]. Consiste principalmente en tres polímeros principales: celulosa, hemicelulosa y lignina, y sus cantidades varían de acuerdo al tipo de biomasa.

La celulosa representa hasta el 40 % de la biomasa vegetal y, en consecuencia, es el polímero natural más abundante en la tierra. Es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos β (1 $\rightarrow$ 4), formando celobiosa como la unidad repetida en sus cadenas. El grado de polimerización (GP) de la celulosa nativa está en el rango de 7.000-15.000 (GP = Masa molecular de la celulosa/Masa molecular de la glucosa). Por la formación de enlaces de puentes de hidrógeno intermoleculares y extramoleculares entre los grupos OH de una misma cadena y cadenas adyacentes, las cadenas de celulosa tienden a ordenarse en planos paralelos y formar una estructura cristalina supramolecular (Fig. 1). De esta forma, conjuntos de cadenas lineales en la dirección longitudinal,

Figura 1. Estructura química de la celulosa. Pueden observarse los enlaces de hidrógeno entre cadenas contiguas de celulosa.



tienden a formar microfibrillas, que se orientan en la estructura de la pared celular. Esta gran red de enlaces de hidrógeno, es la razón fundamental de la resistencia de la celulosa. Al asociarse las cadenas de celulosa, de forma paralela, le confieren una determinada cristalinidad [35]. Algunos autores, realizando un estudio a escala inferior, han determinado que la fibra de celulosa presenta regiones

desordenadas periódicas (cada 150 nm) a las que se conoce como celulosa amorfa [36]. La cristalinidad de la celulosa hace que la misma sea insoluble en agua, a pesar de su alto contenido de grupos OH⁻ y tiene implicaciones importantes en los procesos a los que son sometidos los materiales lignocelulósicos, ya que esta estructura cristalina limita el ataque de diferentes reactivos químicos y enzimas.

La hemicelulosa es un heteropolisacárido con organización ramificada. El grado de polimerización de la hemicelulosa es muy inferior al de la celulosa, y varía entre 70 y 200 unidades. Los componentes monoméricos que forman la hemicelulosa son varios y pueden clasificarse en hexosas (D-glucosa, D-galactosa y D-manosa), pentosas (D-xilosa, L-arabinosa), ácidos urónicos y grupos acetilo (Fengel y Wegener, 1989). La cantidad de cada uno de estos componentes varía dependiendo del material lignocelulósico y en función de la unidad mayoritaria se pueden establecer distintos tipos de hemicelulosas. Las hemicelulosas se clasifican básicamente de acuerdo con los azúcares que están presentes en la cadena principal del polímero: xilanos (Fig. 2), mananos, glucanos, galactanos, glucuronoxilanos, arabinoxilanos, glucomananos, galactoglucomananos, xiloglucanos, arabinogalactanos, etc, dependiendo si la cadena principal está constituida por un solo compuesto o presenta diferentes sustituciones [37].

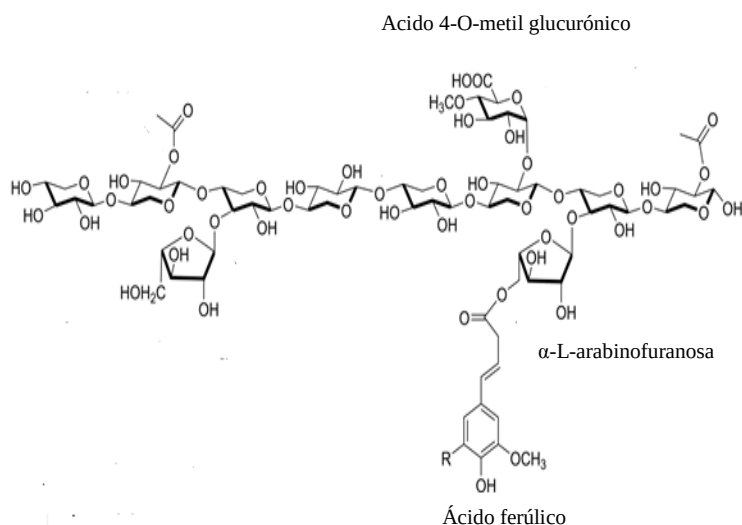


Figura 2. Estructura química del xilano típico de materias herbáceas.

La fracción de hemicelulosa de la lignocelulosa representa una fuente importante de azúcares de C₅ que son productos de valor agregado potencialmente importantes para la fermentación a biocombustibles. De hecho, hay un enfoque creciente en ingeniería de la utilización de pentosas, e incluso en la sacarificación de xilano y celulosa, mediante microorganismos etanológenos como la

levadura, permitiendo que estos organismos fermenten múltiples productos de monosacáridos [38, 39, 40].

Debido a que el polímero de hemicelulosa se encuentra íntimamente ligado a la celulosa y a la lignina, su función es la de actuar como nexo de unión entre ambos componentes.

La lignina es una macromolécula aromática compleja formada por unidades de *p*-hidroxifenilo (H), el guayacilo (G) y el siringilo (S), unidos por diferentes tipos de enlaces que a su vez derivan de los respectivos alcoholes *p*-cumárico, coniferílico y sinapílico [41]. Como se puede observar en la figura 3, la principal diferencia entre las tres unidades radica en las sustituciones de los grupos metoxilos presentes en el anillo aromático. El principal propósito de la lignina es dar soporte estructural a la planta, impermeabilidad y resistencia a ataques microbianos o a estrés oxidativo. Este polímero es insoluble en agua y ópticamente inactivo, en conjunto hace que la degradación de la lignina sea difícil [42]. Los

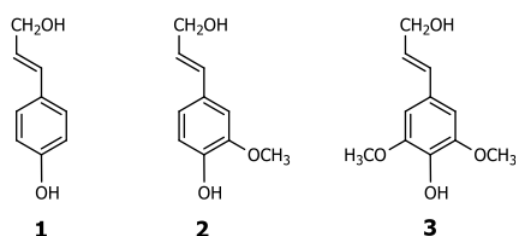


Figura 3. Tipos de monolignoles más comunes encontrados en los bloques de construcción de la lignina: 1: alcohol *p*-cumárico, 2: alcohol coniferílico, 3: alcohol sinapílico.

materiales herbáceos presentan un polímero de lignina que contiene las tres unidades en diferentes proporciones y, además, incorporan diferentes ácidos hidroxicinámicos (principalmente *p*-cumárico y ferúlico) que actúan como nexos de unión entre la lignina y la hemicelulosa.

Como compuestos adicionales a los ya mencionados, los materiales lignocelulósicos incluyen otros elementos en menores proporciones: las pectinas, los extractivos y las cenizas. Las pectinas tienen una función relacionada con la porosidad de la pared celular y son polisacáridos formados principalmente por unidades de ácido galacturónico y, en menores proporciones, ramnosa, arabinosa y galactosa [37]. Los extractivos son un grupo heterogéneo encargados del color, olor y/o la resistencia frente ataques microbianos e incluyen grasas, ceras, alcaloides, proteínas, mucílagos, gomas, resinas, etc. Por último, las cenizas representan el conjunto de compuestos inorgánicos, tales como las sales.

3.2 Pretratamientos de biomasas lignocelulósicas

Un paso clave en la producción de etanol de segunda generación es la hidrólisis de la celulosa, que puede catalizarse con ácidos o enzimas. Debido a su mayor rendimiento potencial de azúcar y su menor impacto ambiental, la hidrólisis enzimática es más atractiva que la hidrólisis ácida [43]. Sin embargo, la primera está restringida por varios factores, principalmente por la estructura cristalina de

las fibras de celulosa nativas y por la presencia de hemicelulosa y lignina en la superficie de la celulosa, que impide el acceso de las celulasas al sustrato [44, 45]. Por lo tanto, se debe implementar un pretratamiento antes de la hidrólisis enzimática [46]. Esta etapa de pretratamiento influye fuertemente en los costos posteriores al determinar la toxicidad en la fermentación, las tasas de hidrólisis enzimática, las cargas de enzimas, la necesidad de mezcla, las demandas de tratamiento de desechos y otras variables del proceso [47].

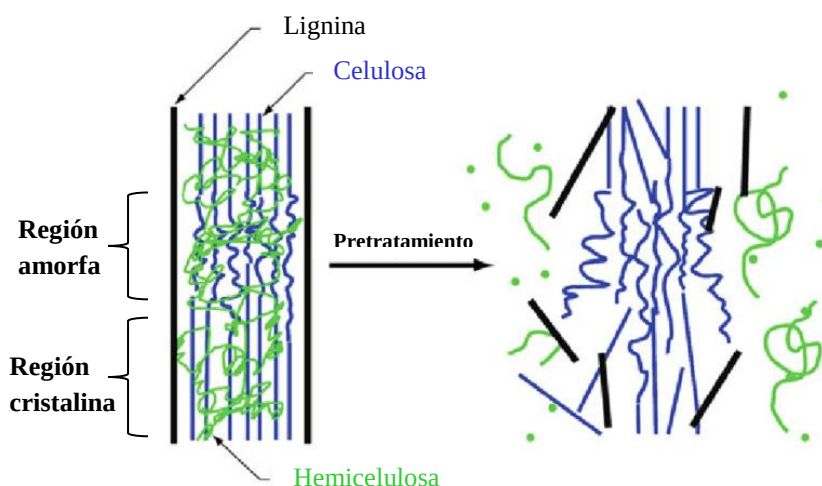


Figura 4. Representación esquemática del pretratamiento de biomasa lignocelulósica (adaptado de [48]). El tratamiento de la lignocelulosa mediante diferentes métodos elimina la hemicelulosa y la lignina de esta matriz de polímeros en la que se encuentra la celulosa.

Idealmente, el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica debería aumentar el área superficial accesible y descristalizar la celulosa, despolimerizar parcialmente la celulosa, solubilizar la hemicelulosa y/o la lignina, modificar la estructura de la lignina, maximizar la digestibilidad enzimática del material pretratado, minimizar la pérdida de azúcares, y minimizar los costos de capital y de operación [49, 50] (Fig. 4).

Varias tecnologías de pretratamiento (solos o en combinación) se han propuesto en la literatura. En términos generales, las tecnologías de pretratamiento pueden clasificarse en 4 tipos: físico (mecánico); fisicoquímico; químico; pretratamientos biológicos. Cada método tiene su propia especificidad en términos de la aplicación mecanística en los componentes de la pared celular con las condiciones aplicadas [51].

3.2.1 Pretratamientos físicos

3.2.1.1 Reducción mecánica

El objetivo del pretratamiento mecánico es una reducción del tamaño de partícula y la cristalinidad de la lignocelulosa para aumentar la superficie específica y reducir el grado de polimerización. Esto

puede producirse mediante una combinación de astillado, trituración o fresado según el tamaño de partícula final del material (10-30 mm después del astillado y 0,2-2 mm después de la molienda) [52]. Para mejorar la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos [53], se pueden utilizar diferentes procesos de molienda (molienda de bolas, fresado en dos rodillos, fresado de martillos, fresado de coloides y fresado vibroeléctrico). El requerimiento de potencia de este pretratamiento es relativamente alto dependiendo del tamaño de partícula final y las características de la biomasa, y es probable que este proceso no sea económicamente factible [46].

3.2.1.2 Extrusión

El proceso de extrusión es un novedoso y prometedor método de pretratamiento físico donde los materiales se someten a calentamiento, mezclado y cizallamiento, lo que produce modificaciones físicas y químicas durante el paso a través del extrusor. Se cree que la velocidad del tornillo y la temperatura del barril interrumpen la estructura lignocelulósica y causan defibrilación, fibrilación y acortamiento de las fibras y, al final, aumentan el acceso de los carbohidratos al ataque enzimático [54]. En estudios recientes, la aplicación de enzimas durante el proceso de extrusión se está considerando como una tecnología prometedora para la producción de etanol.

3.2.2 Pretratamientos químicos

El uso de compuestos ácidos (diluidos o concentrados), bases, solventes orgánicos, compuestos oxidantes o líquidos iónicos, provoca una modificación en la composición y estructura de los materiales, aumentando su digestibilidad.

3.2.2.1 Alcalinos

El uso de un álcali causa la degradación de las cadenas laterales de éster y glicosídicas, dando como resultado la alteración estructural de la lignina (principalmente su solubilización), la hinchazón de la celulosa, la descristalización parcial de la celulosa [55, 56, 57] y la solvatación parcial de la hemicelulosa [55, 58], causando menos degradación de la misma con respecto al uso de ácidos. Los hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio son adecuados para este uso. El NaOH causa hinchazón, aumentando la superficie interna de la celulosa y disminuyendo su grado de polimerización y cristalinidad, lo que provoca la alteración de la estructura de la lignina [53].

3.2.2.2 Ácidos

Implica el uso de ácidos concentrados y diluidos (0,2 % y 2,5 % p/p) para romper la estructura rígida del material lignocelulósico. El pretratamiento consta de la adición del ácido a la biomasa, seguido por mezcla constante a temperaturas entre 120 °C y 210 °C durante minutos a horas, dependiendo de las condiciones del pretratamiento. El pretratamiento con ácido diluido permite la deconstrucción de la estructura del material y la liberación de monómeros de azúcar derivados, principalmente de la

hemicelulosa. El ácido usado más comúnmente para pretratar una amplia variedad de tipos de biomasa es el ácido sulfúrico diluido.

Debido a la naturaleza corrosiva y la toxicidad de la mayoría de los ácidos, se requiere un material adecuado para el reactor a fin de resistir las condiciones experimentales requeridas y la corrosividad de los ácidos. Otro inconveniente es la producción de inhibidores de la fermentación, como furfural y 5-hidroxi-metil-furfural, que reducen la eficacia del método de pretratamiento y otros procesos.

3.2.2.3 Organosolv

El objetivo del proceso organosolv es tratar la biomasa con el fin de obtener una gran cantidad de celulosa adecuada para los procesos biológicos posteriores, a costos moderados y limitando la formación de inhibidores. Se usa una mezcla de disolventes orgánicos u orgánicos acuosos para descomponer y solubilizar la lignina y parte de la hemicelulosa; la celulosa reactiva permanece en la fase sólida. Entre los disolventes adecuados para este fin, los más relevantes son el metanol, el etanol, la acetona, el etileno, el glicol y el alcohol tetrahidrofurfurílico [59]. En general, un tema crucial para este pretratamiento es la fase de recuperación del solvente: el mismo debe ser drenado del reactor, evaporado, condensado y reciclado para reducir los costos operativos.

3.2.2.4 Líquidos iónicos (LI)

Los LI (cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, 1, 3-N-metilmorfolina-N-óxido, etc) son sales típicamente compuestas de grandes cationes orgánicos y aniones inorgánicos pequeños, que existen como líquidos a temperaturas relativamente bajas; a menudo a temperatura ambiente. Los carbohidratos y la lignina se pueden disolver simultáneamente en los LI debido a una irrupción de la intrincada red de interacciones no covalentes entre los polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina, al tiempo que se minimiza la formación de productos de degradación. La tecnología sigue siendo costosa y los métodos comerciales de recuperación de LI no se han desarrollado completamente. Además, es necesario desarrollar técnicas para recuperar la hemicelulosa y la lignina de las soluciones después de la extracción de celulosa. Los materiales celulósicos regenerados a partir de LI son esencialmente amorfos y porosos y mucho más propensos a la degradación por celulasas.

3.2.2.5 Oxidación húmeda

La oxidación húmeda utiliza oxígeno como oxidante para compuestos disueltos en agua. La oxidación húmeda fracciona el material lignocelulósico al solubilizar la hemicelulosa y eliminar la lignina [60, 61]. Este pretratamiento se considera costoso.

3.2.3 Pretratamientos físico-químicos

El efecto ocasionado por la combinación de la acción física (cambio de temperaturas, presiones, etc.) y química (empleo de ácidos, solventes, etc.), permite la modificación estructural de la biomasa lignocelulósica, facilitando la extracción de sus componentes.

3.2.3.1 Explosión por vapor

Este método es el más comúnmente utilizando, puede describirse como un proceso termoquímico donde el material lignocelulósico está expuesto al vapor. Este pretratamiento requiere un mínimo, o en algunos casos, ninguna adición química, por lo que es visto como una buena tecnología cuando se trata de problemáticas ambientales. En este proceso, una mezcla de biomasa y vapor se mantiene a alta temperatura en un reactor, promoviendo la hidrólisis de hemicelulosa seguida de una descompresión rápida que finaliza la reacción [62]. El tratamiento de explosión por vapor produce una alta solubilización de la hemicelulosa con baja solubilidad de la lignina [63]. Por lo general, se emplean temperaturas entre 160 y 240 °C y presiones entre 0,7 y 4,8 MPa [62]. Con el fin de aumentar la recuperación tanto de celulosa como de hemicelulosas, se puede agregar SO₂ al proceso de explosión por vapor.

3.2.3.2 Agua presurizada o “agua caliente”

Este método emplea agua caliente a alta presión que hidrata la celulosa y elimina una parte considerable de la fracción de hemicelulosa (en forma de oligosacáridos) [63]. Normalmente, en este proceso el agua caliente se mantiene en contacto con la biomasa durante aproximadamente 15 minutos a una temperatura de 200-230 °C, y como consecuencia se disuelve aproximadamente el 40-60 % de la biomasa total, se elimina toda la hemicelulosa y dependiendo de las condiciones del proceso, hay formación de los inhibidores furfural y HMF en un nivel ligeramente inferior a los encontrados en el tratamiento ácido. Una de las principales ventajas de este proceso es la no utilización de productos químicos y, en consecuencia, no es necesario utilizar materiales resistentes a la corrosión en el reactor de hidrólisis; tampoco se requiere la reducción del tamaño de la materia prima.

3.2.3.3 Explosión por vapor con amoníaco

El proceso AFEX (por sus siglas en inglés, Ammonia Fiber Explosion) consiste en aplicación de amoníaco líquido y explosión por vapor. Es un tratamiento térmico alcalino que expone el material lignocelulósico a alta temperatura y presión seguido de una rápida liberación de presión. Las principales ventajas de AFEX son la eliminación eficiente de lignina y la menor generación de inhibidores, reteniendo una cantidad apreciable de carbohidratos en los sustratos. Además, es un proceso simple y de corta duración [64]. Durante el AFEX, la estructura del material se cambia, lo que resulta en un aumento de la capacidad de retención de agua y de la digestibilidad de los sustratos (hemicelulosa y celulosa) por las enzimas, obteniendo así una alta recuperación de azúcares [65, 64]. El costo del proceso podría minimizarse si el amoníaco se recupera de la solución rica en lignina.

3.2.3.4 Explosión de CO₂

La explosión de CO₂ ocurre de manera similar a la explosión con amoníaco y se basa en la hipótesis de que el CO₂ formaría ácido carbónico, lo que aumentaría la velocidad de hidrólisis del material

pretratado [52]. Las moléculas de dióxido de carbono son comparables en tamaño al agua, penetrando en las superficies del material, mejorando la hidrólisis de la hemicelulosa y las fracciones de celulosa. Este pretratamiento presenta rendimientos de conversión más altos que el método de explosión por vapor, más económico que la explosión con amoníaco y no causa la formación de inhibidores porque se usa una temperatura suave durante el proceso, evitando cualquier descomposición apreciable de monosacáridos [65]. Este método no es tóxico, no inflamable y no daña el medio ambiente. Sin embargo, es un método de operación difícil y con complejidades de proceso [66].

3.2.4 Pretratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos emplean principalmente microorganismos, hongos pardos, blancos y de pudrición blanda, que degradan la lignina y la hemicelulosa y muy poco la celulosa [67]. La degradación de la lignina por los hongos de la pudrición blanca, la más eficaz para el pretratamiento biológico de las lignocelulosas, se produce por la acción de enzimas que degradan la lignina, como las peroxidasas y las lacasas [65].

En general, estos procesos ofrecen ventajas tales como bajo costo de capital, bajo consumo de energía, sin requisitos químicos y condiciones ambientales moderadas. Sin embargo, el principal inconveniente para desarrollar métodos biológicos es la baja tasa de hidrólisis obtenida en la mayoría de los materiales biológicos en comparación con otras tecnologías [52].

3.2.5 Compuestos inhibidores derivados de los pretratamientos

La generación de diferentes compuestos inhibidores durante el proceso, derivados principalmente de la solubilización parcial de la lignina y de la degradación de azúcares, supone la principal desventaja de pretratamientos que involucran medios ácidos a altas temperaturas. Estos compuestos se pueden clasificar, dependiendo de su naturaleza, en derivados del furano, ácidos alifáticos y derivados fenólicos. Los derivados del furano están constituidos principalmente por el 2-furaldehído (furfural) y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) que se generan por la degradación de las pentosas y las hexosas respectivamente. Por otro lado, los ácidos alifáticos que se generan son mayoritariamente el ácido acético, el ácido fórmico y el ácido levulínico. El ácido acético deriva de los grupos acetilos presentes en la hemicelulosa, mientras que el ácido levulínico y el ácido fórmico se originan a su vez de la degradación del 5-HMF y del furfural. Por último, dentro de los compuestos fenólicos se incluyen una gran variedad de sustancias derivadas de la lignina como el siringaldehído, la vainillina, el hidroxibenzaldehído, el ácido ferúlico, el ácido cumárico, etc.

La severidad del pretratamiento y el tipo de biomasa son factores que influyen directamente en la concentración de los distintos compuestos. Por otro lado, los efectos inhibidores derivados de estas sustancias pueden observarse tanto en la actividad de las enzimas hidrolíticas como en los microorganismos fermentativos. De esta manera, los ácidos alifáticos provocan la inhibición del crecimiento celular, reduciendo los rendimientos de etanol. Los derivados del furano pueden afectar a

diferentes enzimas intracelulares, descendiendo la productividad y los rendimientos de etanol mediante la inhibición del crecimiento o la prolongación de la fase de adaptación [68]. Por último, los compuestos fenólicos pueden inhibir o desactivar las enzimas hidrolíticas, afectando los rendimientos de hidrólisis enzimática [69, 70]. Además, estos compuestos alteran la integridad de las membranas biológicas, provocando una disminución en la velocidad del crecimiento del microorganismo y, consecuentemente, afectando negativamente la producción de etanol [71]. Algunos de los fenoles generados pueden ser metabolizados por la mayoría de los microorganismos fermentativos, lo que condiciona el crecimiento y prolonga a su vez la fase de latencia.

Dada la estrecha relación que existe entre las condiciones a las que se realiza el pretratamiento y la formación de tóxicos, la optimización de las condiciones de pretratamiento es imprescindible en la mejora global del proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

3.3 Hidrólisis enzimática

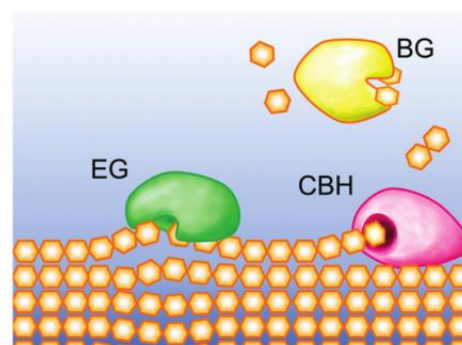
Después de los pretratamientos, la biomasa generalmente se somete a hidrólisis enzimática. En este proceso también llamado sacarificación, las enzimas se usan para promover la hidrólisis de la cadena de celulosa y hemicelulosa y liberar azúcares simples simultáneamente, que se convierten luego en biocombustibles durante el paso de fermentación.

Teniendo en cuenta la complejidad en la composición de los materiales lignocelulósicos, las enzimas involucradas en su hidrólisis deben proporcionar una óptima combinación de actividades que facilite su completa despolimerización. En este sentido, la utilización de complejos enzimáticos que engloben una mezcla de actividades adecuada y cuya preparación no suponga costes elevados, resulta esencial para poder incrementar la eficiencia del proceso, así como disminuir el precio del producto final [72].

La liberación enzimática de monosacáridos de celulosa y hemicelulosa está mediada por glicósido hidrolasas. Las glicósido hidrolasas (GHs) son una clase grande de enzimas que exhiben especificidades de sustrato tanto amplias como estrictas. Las enzimas GH catalizan selectivamente reacciones que producen unidades más pequeñas de carbohidratos (mono y oligosacáridos) a partir de polisacáridos naturales [73], acelerando la velocidad de hidrólisis de los enlaces glicosídicos en hasta 17 órdenes de magnitud sobre la hidrólisis no catalizada [74]. Las GH se clasifican en diferentes familias en función de sus secuencias de aminoácidos y pliegues tridimensionales [75]. En la actualidad, este sistema comprende 115 familias que se han organizado en 14 clanes diferentes (CAZy; <http://www.cazy.org/>).

Las enzimas que catalizan la despolimerización de la celulosa se clasifican ampliamente como celulasas. Sin embargo, la hidrólisis completa y eficiente de la celulosa requiere la acción cooperativa de al menos tres actividades de enzimas celulolíticas [76, 77, 78] (Fig. 6):

Figura 6. Papel de las celulasas en la hidrólisis de la celulosa. EG: endoglucanasa; CBH: celobiohidrolasa; BG: β -glucosidasa. Fuente: [79].



- endoglucanasa (1,4- β -D-glucano glucohidrolasa [EC 3.2.1.4]) que hidrolizan internamente el polímero de celulosa, exponiendo los extremos reductores y no reductores
- exoglucanasa (1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa [EC 3.2.1.91]) que actúan sobre los extremos reductores y no reductores, liberando celobiosa y celooligosacáridos
- β -glucosidasa (β D-glucosideglucohydrolase, [EC3.2.1.21]) que escinde la celobiosa, liberando dos moléculas de glucosa del producto final.

Junto a las enzimas descritas, existe una amplia gama de enzimas accesorias necesarias para la total degradación de los materiales lignocelulósicos. Estas enzimas son hemicelulasas, enzimas degradadoras de lignina o ligninasas y otras proteínas relacionadas sin actividad catalítica conocida [80].

La hidrólisis enzimática completa de la hemicelulosa requiere la acción de un repertorio mayor de enzimas debido a una diversidad más amplia en los enlaces químicos inherente en estos heteropolímeros (Fig. 7). Estas enzimas incluyen:

- endo - β -1,4-xilanasas ([EC 3.2.1.8]),
- β -1,4-xilosidasas ([EC 3.2.1.37]),
- α -L-arabinofuranosidasas ([EC 3.2.1.55]),
- α -glucuronidasas ([EC 3.2.1.139]),
- acetil xilano esterasas ([EC 3.1.1.72]),
- feruloil esterasas ([EC 3.1.1.73]),
- endo- β -1,4- mananasas ([EC 3.2. 1.78]),
- β -1,4-manosidasas ([EC 3.2.1.25])
- endo- α -1,5- L-arabinosidasas ([EC 3.2.1.99]).

Se ha reconocido ampliamente que los pasos de pretratamiento e hidrólisis enzimática contribuyen significativamente (70 %) a la economía y la energía del proceso general [81, 82, 83]. Esto se debe a que las estrategias efectivas de pretratamiento deben superar la naturaleza recalcitrante de la biomasa y proporcionar un sustrato susceptible para la hidrólisis enzimática. De forma similar, las estrategias efectivas para la hidrólisis enzimática de los materiales pretratados proporcionan un mejor rendimiento

de azúcar, lo que finalmente contribuye a una alta concentración de etanol luego de la fermentación [85, 86].

Entre los microorganismos productores de enzimas hidrolíticas, se han utilizado mayoritariamente especies de hongos y/o bacterias entre los que cabe destacar aquellas pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* o *Fusarium* en hongos; y *Thermobifida*, *Clostridium*, *Cellulomonas* o *Bacillus* en bacterias. Los esfuerzos actuales para mejorar la despolimerización de la lignocelulosa o la búsqueda de nuevos biocatalizadores (bioprospección) emplean un enfoque

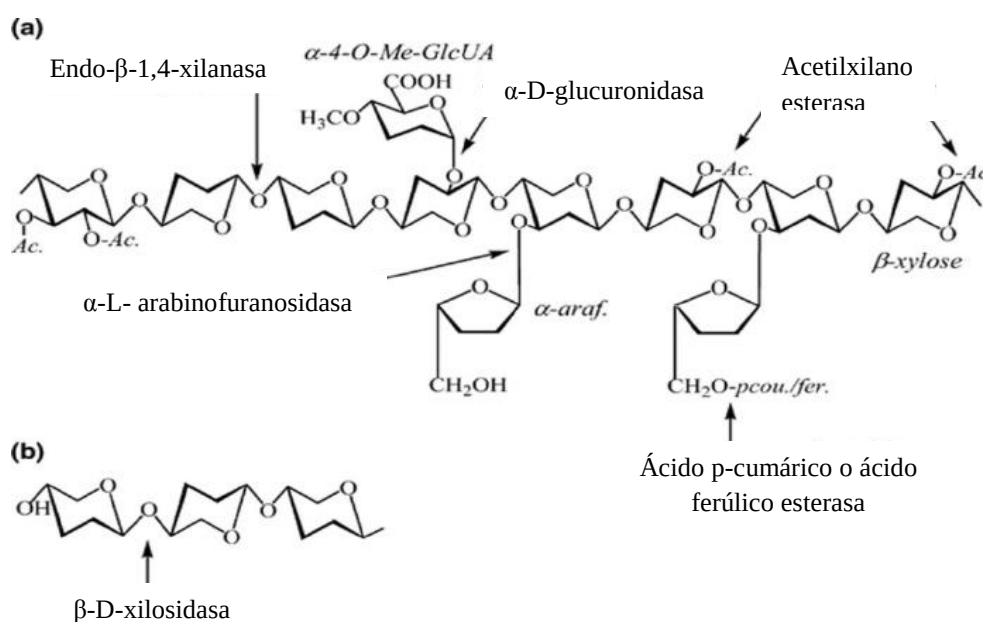


Figura 7 (a) Estructura del xilano y los sitios de ataque de enzimas xilanolíticas. La cadena principal del sustrato está compuesta por restos de xilosa unidos por β -1,4. Ac.: grupo acetilo; α -araf.: α -arabinofuranosa; α -4-O-Me-GlcUA, ácido α -4-O-metilglucurónico; pcou.: ácido *p*-cumárico; fer.: ácido ferúlico. **(b)** Hidrólisis de xilo-oligosacáridos por β -xilosidasa. (adaptado de [84])

multifacético. La estrategia incluye una búsqueda de nuevas enzimas con actividades específicas altas y niveles relativamente bajos de inhibición por producto final. Para ser útil a escala industrial, se está prestando atención a otras características, incluida la estabilidad térmica y la tolerancia de las soluciones que varían en pH, disolventes orgánicos, reactivos químicos y oxidativos y composición de detergente. El desarrollo de nuevas rutas tecnológicas y equipos más eficientes para la producción de estas enzimas es crucial para resolver este problema y hacer económicamente viable la producción de etanol lignocelulósico.

3.4 Configuraciones del proceso de producción de etanol 2G

Un problema con respecto al proceso de sacarificación es la inhibición de enzimas causada por los productos de sacarificación en sí (glucosa y celobiosa en altas concentraciones). Durante la hidrólisis y fermentación separadas (HFS), la fermentación se lleva a cabo después de la hidrólisis enzimática utilizando hidrolizados de sustrato que se filtraron para eliminar los sólidos en suspensión (Fig. 8). Las ventajas de HFS son que ambos pasos se pueden llevar a cabo en sus condiciones óptimas y el reciclado de levadura es perfectamente factible, pero el costo de capital es mayor y la hidrólisis enzimática está limitada por la inhibición por producto final.

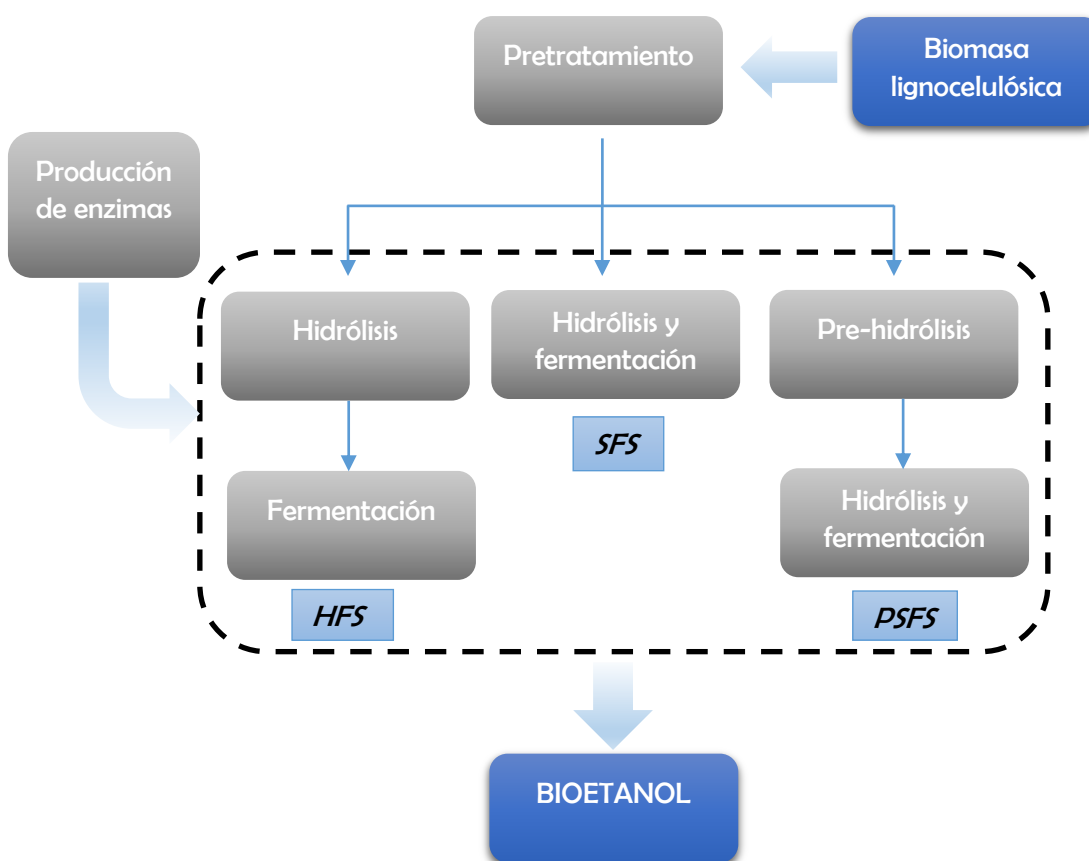


Figura 8. Diferentes configuraciones del proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

Para evitar esta inhibición, el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) para la producción de etanol se ha investigado como una sustitución de procesos con estas etapas tradicionalmente separadas [25, 27, 28]. Durante la SFS, las enzimas y la levadura se colocan en el mismo reactor y la glucosa se convierte en etanol tan pronto como se libera [1] (Fig. 8). Además de suprimir esta inhibición, SFS también resulta en una menor demanda de enzimas y una mayor productividad volumétrica de etanol, en comparación con HFS [25, 27]. Sin embargo, SFS no permite el reciclaje de levadura y la hidrólisis generalmente se lleva a cabo por debajo de su temperatura

óptima. En ambas configuraciones mencionadas anteriormente, los rendimientos de etanol pueden aumentar si el organismo en fermentación puede convertir pentosas y hexosas simultáneamente [87, 88].

Por lo general, las enzimas requieren temperaturas más altas que las que las levaduras pueden soportar [89]. Los investigadores han sugerido el uso de un paso de pre-sacarificación antes de la SFS (PSFS) para proporcionar glucosa en concentraciones lo suficientemente grandes como para iniciar la acción de la levadura al comienzo del proceso SFS (Fig. 8). Este proceso puede dar como resultado un aumento del rendimiento de etanol y un menor tiempo de procesamiento, así como una mayor conversión de celulosa en etanol que con SFS únicamente [25, 89, 27, 90].

De acuerdo con Wingren *et al.* [91], un aumento de sólidos totales de sustrato (ST) de 5 a 8 % en peso puede reducir el costo de producción de etanol celulósico en un 20 %. Por lo tanto, al realizar este paso a alto ST y bajas cargas de enzimas, es posible lograr mejoras significativas en la economía del proceso de producción de etanol celulósico global. Estas mejoras implican una mejor integración de las corrientes de proceso, el ahorro de energía y las reducciones en el costo de capital para la hidrólisis y la destilación, particularmente debido al hecho de que se producen altas concentraciones de azúcar para la fermentación [92, 93, 94, 95].

Referencias

- [1] Baeyens J., Kang Q., Appels L., Dewil R.L.Y. *et al.* (2015). Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Prog Energy Combust* 47, 60–88.
- [2] Intergovernmental Panel on Climate Change 2014, Summary for Policymakers and Technical Summary.
- [3] Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G. *et al.* (2006). The path towards for biofuels and biomaterials. *Science* 311, 484–89.
- [4] Balat M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Convers Manage* 52, 858–75.
- [5] Oliveira F.M.V., Pinheiro I.O., Souto-Maior A.M., Martin C. *et al.* (2013). Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. *Bioresour Technol* 130, 168–73.
- [6] Vincent M., Pometto A.L., van Leeuwen J.H. (2014). Ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation of sodium hydroxide treated corn stover using *Phanerochaete chrysosporium* and *Gloeophyllum trabeum*. *Bioresour Technol* 158, 1–6.
- [7] Gómez L.D., Steele-King C.G., McQueen-Mason S.J. (2008). Sustainable liquid biofuels from biomass: The writing's on the walls. *New Phytologist* 178, 473-85.
- [8] Álvarez-Maciel C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. En: *Transición energética: reorganización de las industrias, nuevas tecnologías y nuevos mercados*. Economía Informa – UNAM, 359.
- [9] Cardona C.A., Sánchez O.J. (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* 98, 2415-57.
- [10] Fischer C.R., Klein-Marcuschamer D.K., Stephanopoulos G. (2008). Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab. Eng.* 10, 295–304.
- [11] Chen Y., Stevens M.A., Zhu Y., Holmes J. *et al.* (2012). Reducing acid in dilute acid pretreatment and the impact on enzymatic saccharification. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 691–700.
- [12] Zhang Y.H.P. (2008). Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 367–75.
- [13] Dermibas A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Convers Manage* 49, 2106–16.
- [14] Hu G., Heitmann J. A. & Rojas O. J. (2008). Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark and forest residues. *BioResources*, 3(1), 270–94.
- [15] Jin Y., Fang Y., Zhang G., Zhou L., *et al.* (2012). Comparison of ethanol production performance in 10 varieties of sweet potato at different growth stages. *Acta Oecologica* 44, 33–37.

- [16] Fischer G., Prieler S., van Velthuisen H., Lensink S.M. et al. (2010). Biofuel production potentials in Europe: sustainable use of cultivated land and pastures. Part I: Land productivity potentials. *Biomass Bioenergy* 34, 159–72.
- [17] Ajanovic A. (2011). Biofuels versus food production: does biofuels production increase food prices. *Energy* 36, 2070–76.
- [18] Hoekman S.K. (2009). Biofuels in the U.S. – challenges and opportunities. *Renew. Energy* 34, 14–22.
- [19] Rathmann R., Szklo A., Schaeffe, R. (2010). Land use competition for production of food and liquid biofuels: an analysis of the arguments in the current debate. *Renew. Energy* 35, 14–22.
- [20] Uncu O.N., Cekmecelioglu D. (2011). Cost-effective approach to ethanol production and optimization by response surface methodology. *Waste Manage. (Oxford)* 31, 636–43.
- [21] Demirbas A. (2005). Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Source* 27, 327–37.
- [22] Dermibas M.F., Balat M., Balat H. (2011). Biowastes-to-biofuels. *Energy Convers Manage* 52, 1815–28.
- [23] Ballesteros M., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P. et al. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem* 39, 1843–48.
- [24] Öhgren K., Bura R., Lesnicki G., Saddler J. et al. (2007). Comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochem* 42, 834–39.
- [25] dos Santos J.R.A., Souto-Maior A.M., Gouveia E.R. (2010). Comparison of SHF and SFS process from sugarcane bagasse for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Quim Nova* 33(4), 904–08.
- [26] Santos J.R.A., Lucena M.S., Gusmão N.B., Gouveia E.R. (2012). Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. *Ind Crop Prod* 36, 584–88.
- [27] Gonçalves F.A., Ruiz H.A., Nogueira C.C., Santos E.S. et al. (2014). Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. *Fuel* 131, 66–76.
- [28] Petersen A.M., Melamu R., Knoetze J.H., Gorgens J.F. (2015). Comparison of second generation processes for the conversion of sugarcane bagasse to liquid biofuels in terms of energy efficiency, pinch point analysis and life cycle analysis. *Energy Convers Manage* 91, 292–301.
- [29] Wang G., Zhang S., Xu W., Qi W. et al. (2015). Efficient saccharification by pretreatment of bagasse pith with ionic liquid and acid solutions simultaneously. *Energy Convers Manage* 89, 120–26.
- [30] Yuan Z., Long J., Wang T., Shu R. (2015). Process intensification effect of ball milling on the hydrothermal pretreatment for corn straw enzymolysis. *Energy Convers Manage* 101, 481–88.
- [31] Tollefson J. (2008). Not your fathers biofuels. *Nature* 451, 880–83.

- [32] Foston M., Ragauskas A.J. (2012). Biomass characterization: recent progress in understanding biomass recalcitrance. *Ind. Biotechnol.* 8, 191–208.
- [33] Rubin E.M. (2008). Genomics of cellulose biofuels. *Nature* 454, 841–45.
- [34] Reddy N., Yang Y. (2005). Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends in Biotechnology* 23, 22–27.
- [35] Cowling E.B., Kirk T.K. (1976). Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion process. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6, 95–123.
- [36] Bhattacharya D., Germinario L.T., Winter W.T. (2008). Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibrils obtained from bagasse. *Carbohydrate Polymers* 73, 371–77.
- [37] Brett C.T., Waldron K.W. (1996). *Physiology and biochemistry of plant cell walls*, 2nd ed. London: Chapman and Hall.
- [38] Ryabova O.B., Chmil O.M., Sibirny, A.A. (2003). Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res.* 4, 157–64.
- [39] Pasha C., Kuhad R.C. and Rao L.V. (2007). Strain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS strain for better utilization of lignocellulosic substrates. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1480–89.
- [40] Voronovsky A.Y., Rohulya O. V., Abbas C. A., Sibirny A.A. (2009). Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan. *Metab. Eng.* 11, 234–42.
- [41] Martínez A.T., Ruiz-Dueñas F.J., Martínez M.J., del Río J.C. *et al.* (2009). Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 348–57.
- [42] Fengel D., Wegener G. (1989). *Wood: chemistry, ultrastructure and reactions*. Ed: Walter de Gruyter. Berlin-Nueva York, 613.
- [43] Taherzadeh M.J., Karimi K. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources* 2, 707–38.
- [44] Laureano-Pérez L., Teymouri F., Alizadeh H., Dale B.E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 124, 1081–99.
- [45] Himmel M.E., Ding S.Y., Johnson D.K., Adney W.S. *et al.* (2007). Biomass recalcitrance. engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315, 804–07.
- [46] Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18.
- [47] Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M. *et al.* (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 96, 1959–66.
- [48] Ji X.J., Huang H., Nie Z.K., Qu L. *et al.* (2012). Fuels and chemicals from hemicellulose sugars. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 128, 199–224.

- [49] Holtzapple M.T. and Humphrey A.E. (1984). The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. *Biotechnology and Bioengineering* 26(7), 670–76.
- [50] Margeot A., Hahn-Hagerdal B., Edlund M., Slade R. *et al.* (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology* 20(3), 372–80.
- [51] Chandel A.K., Chan E.C., Rudravaram R., Narasu M. L. *et al.* (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 2, 14– 32.
- [52] Sun Y., Cheng J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11.
- [53] Taherzadeh M.J., Karimi K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621–51.
- [54] Karunanithy C., Muthukumarappan K., Julson J.L. (2008). Influence of high shear bioreactor parameters on carbohydrate release from different biomasses. American Society of Agricultural and Biological Engineers Annual International Meeting 2008. ASABE 084114. ASABE, St. Joseph, Mich.
- [55] McIntosh S. and Vancov T. (2010). Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology* 101 (17), 6718–27.
- [56] Cheng Y.S., Zheng Y., Yu C.W., Dooley T.M. *et al.* (2010). Evaluation of high solids alkaline pretreatment of rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(6), 1768–84.
- [57] Ibrahim M.M., El-Zawawy W.K., Abdel-Fattah Y.R., Soliman N.A. *et al.* (2011). Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw. *Carbohydrate Polymers* 83(2), 720–26.
- [58] Sills D. L. and J. M. Gossett (2011). Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. *Bioresource Technology* 102(2), 1389–98.
- [59] Thring R.W., Chornet E., Overend R. (1990). Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ration, acid concentration and temperature. *Biomass* 23, 289-305.
- [60] Martin C., Klinke H.B., Thomsen A.B. (2007). Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology* 40(3), 426–32.
- [61] Banerjee S., Sen R., Pandey R.A. *et al.* (2009). Evaluation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioethanol production from rice husk and process optimization. *Biomass and Bioenergy* 33(12), 1680–86.
- [62] Agbor V.B., Cicek N., Sparling R., Berlin A. *et al.* (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances* 29, 675–85.
- [63] Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R. *et al.* (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96, 673–86.
- [64] Sarkar N., Ghosh S.K., Bannerjee S., Aikat K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy* 37(1), 19–27.

- [65] Kumar P., Barrett D. M., Delwiche M. J., Stroeve P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48(8), 3713–29.
- [66] Cardoso W.S., Santos F.A., Mota A.M., Tardin F.D. et al. (2012). Pre-Tratamentos de Biomassa para Producao de Etanol de Segunda Geracao. *Revista Analytica* 56, 64–76.
- [67] Sánchez C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* 27, 185–94.
- [68] Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanism of inhibition. *Bioresource Technology* 74, 25–33.
- [69] Ximenes E., Kim Y., Mosier N., Dien B. et al. (2010). Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 170–76.
- [70] Ximenes E., Kim Y., Mosier N., Dien B. et al. (2011). Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology* 48, 54–60.
- [71] Almeida J.R.M., Modig T., Petersson A., Hahn-Hägerdal B. et al. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82,340–49.
- [72] Banerjee G., Scott-Craig J.S., Walton J.D. (2010). Improving enzymes for biomass conversion: A basic research perspective. *Bioenergy research* 3,82–92.
- [73] Kobata A. (2001). The history of glycobiology in Japan. *Glycobiology* 11, 99–105.
- [74] Wolfenden R., Lu X. and Young G. (1998). Spontaneous hydrolysis of glycosides. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 6814–15.
- [75] Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T. et al. (2009). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37, D233–D238.
- [76] Gottschalk L.M.F., Oliveira R.A. & Bom E.P.S. (2010). Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal* 51,72–78.
- [77] Maeda R.N., Serpa V.I., Rocha V.A.L., Mesquita R.A.A. et al. (2011). Enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry* 46, 1196–1201.
- [78] Delabona P.S., Cota J., Hoffmam Z.B., Paixão D.A.A. et al. (2013). Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -L-arabinofuranosidase. *Bioresource Technology* 131,500–07.
- [79] Kobayashi H. and Fukuoka A. (2013). Synthesis and utilisation of sugar compounds derived from lignocellulosic biomass. *Green Chem.* 15, 1740–63.

- [80] Alvira P., Ballesteros M., Negro M.J. (2013). Progress on enzymatic saccharification technologies for biofuels production. En: *Biofuel Technologies*. Gupta VK, Tuohy MG (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [81] Larsen J., Haven M.Ø., Thirup L. (2012). Inbicon makes lignocellulosic ethanol a commercial reality. *Biomass Bioenerg* 46, 36–45.
- [82] Macrelli S., Mogensen J., Zacchi G. (2012). Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugarcane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. *Biotechnol Biofuels* 5, 22, doi.org/10.1186/1754-6834-5-22.
- [83] Klein-Marcuschamer D., Blanch H.W. (2015). Renewable fuels from biomass: technical hurdles and economic assessment of biological routes. *AIChE J* 61, 2689–2701.
- [84] Collins T., Gerday C., Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev* 29, 3–23.
- [85] Chundawat S.P.S., Beckham G.T., Himmel M.E., Dale B.E. (2011). Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2, 121–45.
- [86] Wyman C.E., Balan V., Dale B.E., Elander R.T. *et al.* (2011). Comparative data on effects of leading pretreatments and enzyme loadings and formulations on sugar yields from different switchgrass sources. *Bioresour Technol* 102, 11052–62.
- [87] Hoyer K., Galbe M., Zacchi G. (2013). Influence of fiber degradation and concentration of fermentable sugars on simultaneous saccharification and fermentation of high-solids spruce slurry to ethanol. *Biotechnol Biofuels* 6, 145, doi: 10.1186/1754-6834-6-145.
- [88] Neves P.V., Pitarelo A.P., Ramos L.P. (2016). Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. *Bioresour Technol* 208, 184–94.
- [89] de Souza C.J.A., Costa D.A., Rodrigues M.Q.R.B., dos Santos A.F. *et al.* (2012). The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 109, 63–69.
- [90] Cotana F., Cavalaglio G., Gelosia M., Coccia V. *et al.* (2015). A comparison between SHF and SFSS processes from cardoon for ethanol production. *Ind Crop Prod* 69, 424–32.
- [91] Wingren A., Galbe M., Zacchi G. (2003). Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SFS and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol Progress* 19(4), 1109–17.
- [92] Roche C.M., Dibble C.J., Knutsen J.S., Stickel J.J. *et al.* (2009). Particle concentration and yield stress of biomass slurries during enzymatic hydrolysis at high-solids loadings. *Biotechnol Bioeng* 104(2), 290–300.
- [93] Yang J., Zhang X., Yong Q., Yu S. (2011). Three-stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration. *Bioresour Technol* 102(7), 4905–08.

[94] Modenbach A.A., Nokes S.E. (2013). Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings—a review. *Biomass Bioenergy* 56, 526–44.

[95] Ramos L.P., Silva L., Ballem A.C., Pitarelo A.P. *et al.* (2015). Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. *Bioresour Technol* 175, 195–202.



Objetivos



Justificación de la tesis

La industria argentina de los biocombustibles ha realizado grandes avances en poco tiempo, ocupando un importante sitio a nivel mundial en relación a su producción y exportación. La evolución de esta actividad en la República Argentina ha tenido a su vez un correlato en la creación y evolución de un marco normativo específico sobre la materia. El 1° de enero de 2010 entró en vigencia la Ley 26.093, que constituye la piedra basal del marco regulatorio de los biocombustibles del país, resultando aplicable a las actividades de producción, mezcla, distribución, comercialización, consumo, y autoconsumo de biocombustibles. Su ámbito de aplicación comprende al bioetanol y biodiesel producidos a partir de materias primas de origen agropecuario o agroindustrial (producidos en Argentina principalmente a base de caña de azúcar y maíz, y de aceite de soja, respectivamente), y al biogás generado a partir de desechos orgánicos, debiendo cumplir con los requisitos de calidad que establezca la autoridad de aplicación. Esta ley establece el “corte obligatorio” o “mandatory blending”, consistente en la obligación de mezclado de combustibles fósiles (gasoil o nafta, según corresponda) con biocombustibles en un porcentaje del 5 % como mínimo sobre la cantidad total del producto final, en un principio. Este valor de corte se fue incrementando con los años, llegando al 12 % en abril de 2016 según Res. 37/2016 del Ministerio de Energía y Minería de La Nación, la cual estableció que el abastecimiento de bioetanol de corte obligatorio debe realizarse en forma equitativa, procurando alcanzar el 50 % para el sector elaborador en base a caña de azúcar y el otro 50 % para el correspondiente al de maíz (<http://www.energia.gob.ar>).

El bioetanol en Argentina se produce a partir de fermentación de melazas de caña de azúcar (10 plantas ubicadas en el NOA) y de almidón del maíz (5 plantas que funcionan en el centro del país). En 2016, la producción de bioetanol fue de 889.944 metros cúbicos, de los cuales sólo el 45 % de este etanol de primera generación fue producido a partir de caña de azúcar (<http://www.energia.gob.ar>), lo que demuestra la necesidad de expandirse para lograr competir con el etanol de maíz. La capacidad de extender en forma significativa el área sembrada con caña de azúcar y aumentar los volúmenes de producción de bioetanol a partir de dicha materia prima en el NOA se halla bastante limitada por distintos motivos. Se estima que el área en esa región podría crecer, aunque no significativamente, y que la producción de alcohol de caña también podría incrementarse a expensas de una reducción en la producción de azúcar para exportación. Por ello, es necesario buscar alternativas de aprovechamiento de esta biomasa.

Durante la zafra 2016, la caña de azúcar molida sumó 18.436.082 t (<https://centroazucarero.com.ar>). La industrialización de la caña de azúcar genera diversos subproductos, de los cuales los más importantes son el bagazo (representa el 30 % de los tallos verdes molidos y es el residuo fibroso de la molienda) y el residuo agrícola de cosecha (RAC, que comprende parte de las hojas, las puntas y los restos que quedan en el campo). El bagazo y el RAC de caña de azúcar son una materia prima lignocelulósica atractiva en los trópicos y subtrópicos para la producción de azúcares fermentables

porque: (i) las variedades comerciales de caña de azúcar generan altos rendimientos anuales medios de biomasa seca [1], (ii) el cultivo de caña de azúcar genera el mayor tonelaje anual de todos los cultivos comerciales, y (iii) el transporte de biomasa a una instalación central para el procesamiento a gran escala es una parte existente de todas las fábricas de caña de azúcar. Además, existe un claro beneficio económico al integrar la producción de azúcares fermentables del bagazo de la caña de azúcar en instalaciones convencionales de producción de azúcar y etanol [2].

Actualmente, la mayor parte del bagazo se utiliza como combustible sólido en ingenios azucareros y destilerías de etanol; sin embargo, se ha demostrado que la modernización de las calderas y la optimización de la racionalización del uso de vapor podrían satisfacer las necesidades energéticas de las plantas con alrededor del 50 % del bagazo producido. El exceso de bagazo podría utilizarse en diferentes aplicaciones, incluida la producción de etanol [3, 4]. En los últimos años, una parte del RAC se quema en las calderas de los ingenios junto al bagazo para generar energía eléctrica, otra es dejada en el suelo para favorecer los procesos de mineralización de la materia orgánica, retención de humedad edáfica, evitar erosión, etc, y el resto es destruido en los cañaverales mediante la quema. Esta última práctica, que está totalmente prohibida en la provincia de Tucumán por ley, produce contaminación ambiental por la emisión de gases como CO, NO_x, N₂O y CH₄, generando como consecuencia, efectos adversos en la salud y polución en las ciudades cercanas. Toda esta biomasa podría ser aprovechada para la generación de energía como una alternativa renovable, diversificando así la matriz energética de las provincias del NOA y reduciendo los problemas mencionados anteriormente. Así se conseguiría el aumento de la producción de etanol por hectárea de caña de azúcar sin necesidad de incrementar la superficie cultivada y sin afectar la sustentabilidad del sistema.

La disponibilidad y propiedades favorables de estos materiales lignocelulósicos ha motivado un gran interés en su uso para la producción de etanol celulósico y otros bloques de construcción importantes para la industria química, así como compuestos y materiales estructurales en escalas nano y de fibra [5, 6, 7]. Por lo expuesto anteriormente, estudios para el aprovechamiento integral del bagazo y de RAC de caña de azúcar representan una gran oportunidad para el desarrollo de biorrefinerías sostenibles en Argentina.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollo y evaluación de herramientas para la bioconversión de residuos de la agroindustria local en etanol de segunda generación en un contexto de biorrefinerías.

Objetivos específicos

- I- Aislamiento, selección y caracterización de bacterias productoras de enzimas que degraden la biomasa lignocelulósica. Evaluación de la producción de celulasas y caracterización bioquímica enzimática.
- II- Caracterización de las biomasas lignocelulósicas bagazo y residuo agrícola de cosecha de caña de azúcar y evaluación de pretratamientos de las mismas como etapa del proceso de producción de bioetanol.
- III- Desarrollo de formulaciones enzimáticas con enzimas comerciales suplementadas con extractos producidos localmente usando cepas propias, para la hidrólisis de las biomasas pretratadas.
- IV- Evaluación de la fermentación a partir de las biomasas pretratadas, a altas concentraciones de sustrato, mediante diferentes configuraciones de proceso para la producción de etanol.

Referencias

- [1] Waclawovsky A.J., Sato P.M., Lembke C.G., Moore P.H. *et al.* (2010). Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnol J* 8, 263–76.
- [2] O’Hara I.M. 2010. The potential for ethanol production from sugarcane in Australia. *Proc. Conf. Aust. Soc. Sugar Cane Technol* 600–09.
- [3] Cardona C.A., Quintero J.A., Paz I.C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresour Technol* 101, 4754.
- [4] Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Medeiros A.B.P., Karp S.G., Buckneridge M., *et al.* (2010). Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol* 101, 4820–25.
- [5] Bozell J. J., Petersen G. R. (2010). Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chem* 12(4), 539–54.
- [6] Clark J.H., Luque R., Matharu A.S. (2012) Green chemistry, biofuels, and biorefinery. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 3, 183–207.
- [7] Maity S.K. (2015). Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: part I. *Renew Sust Energ Rev* 43, 1427–45.



Capítulo 1



1.1 Introducción

La hidrólisis enzimática del material lignocelulósico es un cuello de botella importante hacia el desarrollo de procesos industriales viables para la producción de bioetanol a partir de recursos que no compiten con los cultivos alimentarios [1]. A pesar del gran número de esfuerzos realizados, la comprensión de la degradación del material lignocelulósico aún es limitada. Esto se debe en gran parte a que existe una extensa variedad de organismos en los ambientes en que la celulosa es sustrato, la mayoría de los cuales no son cultivables en condiciones de laboratorio. Más aún, los métodos para la secuenciación masiva de genomas y metagenomas han revelado una creciente diversidad de estrategias microbianas para degradar la biomasa vegetal [2, 3]. Por lo tanto, la descripción y caracterización de nuevos microorganismos y / o enzimas capaces de degradar de manera eficiente la biomasa vegetal es fundamental para contribuir al desarrollo y comprensión de procesos viables.

Las especies microbianas que actúan en la deconstrucción de pared celular de las plantas actúan de manera complementaria, produciendo un extenso repertorio de enzimas dirigidas a los numerosos enlaces químicos que la componen [2, 4]. Para su estudio se han utilizado diversos enfoques, tales como la selección de microorganismos novedosos y de consorcios microbianos [5, 6], el aislamiento de genes a través de la biología molecular clásica para desarrollar organismos recombinantes [1, 7], y a partir de proyectos de secuenciación masiva que aportan una creciente cantidad de información [8, 9] que, sin embargo, debe ser contrastada con resultados bioquímicos y tecnológicos. En este contexto y frente a las enzimas de origen fúngico, las bacterias producen un amplio repertorio de glicosil-hidrolasas y otras enzimas activas sobre carbohidratos, además de presentar una alta tasa de crecimiento [10-12].

Sobre la base del creciente conocimiento de la fisiología microbiana y del desarrollo de métodos novedosos para el aislamiento de cepas, se realizó la construcción y caracterización de aislamientos bacterianos de ambientes de la agroindustria local y de intestino de insectos xilófagos. En este marco, el objetivo de este capítulo es la evaluación de aislamientos seleccionados y de las condiciones culturales que favorezcan la producción de enzimas con potencial para el desarrollo de sistemas biocatalíticos adecuados en la generación de etanol 2G.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Muestras para el aislamiento de bacterias

Muestras de intestino de insectos xilófagos. Se disecaron intestinos de la larva pertenecientes a *Lepidoptera* (*Spodoptera frugiperda* y *Diatraea saccharalis*), a *Coleoptera* (*Cerambicidos*), a *Isoptera* (termitas adultas) (Fig. 1). Las larvas de *S. frugiperda*, que constituyen una importante plaga de maíz en Argentina, fueron amablemente provistas por el Dr. E. Virla (PROIMI-CONICET). *D. saccharalis*, también conocido como gusano barrenador de caña de azúcar, es responsable del daño económico en los campos de caña de azúcar en el noroeste de Argentina. Las larvas de *Cerambicidos* (escarabajo de alimentación de madera) y termitas se recolectaron de muestras de madera afectadas en Tucumán. Previo a la disección, los insectos adultos y las larvas se esterilizaron externamente con 70 % de etanol. Se combinaron un promedio de ocho muestras individuales, que se trituraron en un tubo estéril de 50 mL conteniendo 10 mL de cloruro sódico estéril al 0,9 % (p/v).

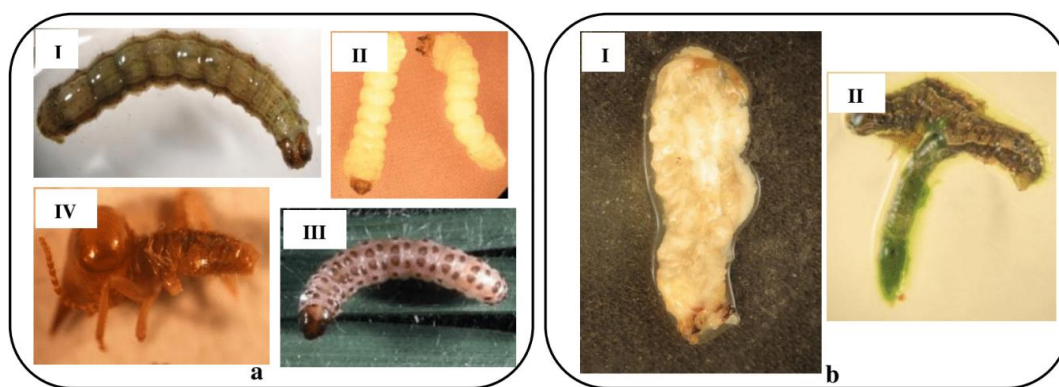


Figura 1. a Larvas de I- *Spodoptera frugiperda*, II- *Cerambicido* y III- *Diatraea saccharalis* y IV- termita adulta. b Aislamiento de intestinos de larvas I- *S. frugiperda* y II- *Cerambicido*; Magnificación 10X

Muestras de ambientes de la agroindustria. Se recogieron muestras de licores biológicos del procesamiento de bagazo de una fábrica de papel en Tucumán, Argentina. El tratamiento de las fibras de bagazo se realiza en pilas compactas de bagazo de caña de azúcar de 45 - 50 m de altura y una base de aproximadamente 150 - 200 m. Se tomaron muestras de licor de recirculación de los canales de drenaje en varios puntos en la base de las pilas.

1.2.2 Medios de cultivo

Fueron utilizados: (i) DTSB, compuesto en g/L por: triptona de soja 8,5, glucosa 1,25, NaCl 2,5 y K_2HPO_4 1,25; (ii) DNB que contiene en g/L: extracto de carne 1,5 y peptona de caseína 2,5; (iii) VL70 modificado - mVL70- [13], compuesto en g/L por: ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico 2,09, $MgSO_4$ 0,024, $CaCl_2$ 0,035, $(NH_4)_2HPO_4$ 0,052, KH_2PO_4 0,052 y extracto de levadura 0,1. El pH se ajustó a 7,0 con una solución de NaOH 200 mM y KOH 100 mM.

La carboximetilcelulosa (CMC de baja viscosidad, Sigma), el bagazo de caña de azúcar molido y la celulosa microcristalina o Avicel (Sigma-Aldrich), fueron las fuentes de carbono añadidas a una concentración final de 10 g/L. El bagazo de caña de azúcar (SCB) se recolectó de un molino de azúcar local (Tucumán, Argentina), se secó al aire y se molió para pasar a través de un tamiz de malla 20 mesh. También, se preparó SCB pretratado en autoclave a 121 °C durante 1 h con NaOH usando una solución de NaOH al 2 % (p/v) y una carga de sólido de 10 %. La fracción sólida se filtró (malla 500 mesh) y se lavó con agua caliente (~ 90 °C) hasta pH 6 - 7. Todos los sólidos se secaron a 85 °C antes de almacenar.

1.2.3 Enriquecimiento y aislamiento de bacterias degradadoras de celulosa

Un mililitro de cada muestra de intestino o 1 mL de licor del procesamiento de bagazo fueron inoculados en 20 mL de medio de aislamiento dentro de las 12 horas de la toma de muestra, en frascos de 125 mL que se incubaron con agitación orbital (150 rpm) a 30 °C. Los medios fueron suplementados con una tira de papel de filtro (Whatman N° 1) de 1 x 2 cm como sustrato suplementario. Se incubaron medios estériles como control de ruptura mecánica del papel de filtro. Alícuotas de los consorcios microbianos desarrollados se transfirieron semanalmente a medio fresco durante 6 semanas (inóculo al 10 %, v/v). Estos enriquecimientos fueron procesados para aislamiento a las 2, 4 y 6 semanas. Las muestras se diluyeron en serie (10^{-1} - 10^{-6}) utilizando solución salina esterilizada de NaCl al 0,9 % (p/v) y alícuotas de 100 µL se sembraron sobre agar Rojo Congo suplementado con carboxi-metil celulosa (CMC)[14], compuesto en g/L por: KH_2PO_4 0,5, MgSO_4 0,25, CMC 2, agar 15, Rojo Congo 0,2, gelatina 2, pH 6,8-7,2). Las placas se incubaron a 30 °C durante un lapso total de 96 h. Las colonias individuales que presentaron fenotipo celulolítico (*i.e.* halo de clarificación de Rojo Congo), fueron estriadas en repetidos ciclos sobre DTSB agar con el objeto de asegurar la pureza de los aislamientos. Esto fue confirmado, además, por observación microscópica (40 X) de la textura, el color, el brillo, los márgenes y la convexidad de las colonias desarrolladas (microscopio óptico Olympus CX31).

1.2.4 Ensayos de actividad enzimática y perfil zimográfico

Se realizó una evaluación semicuantitativa de las colonias que mostraron halo de hidrólisis significativo en Rojo Congo, estimado de acuerdo a la relación entre el diámetro total del halo y el diámetro de la colonia. La actividad enzimática sobre papel del filtro (PFasa) y sobre celulosa soluble o endoglucanasa (o CMCasa), se determinaron midiendo la cantidad de azúcares reductores liberados de papel de filtro y de celulosa amorfa, respectivamente, usando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) [15]. Para ello, los aislamientos se cultivaron a 30 °C y 150 rpm en 20 mL de DTSB modificado conteniendo 10 g/L de CMC. El período de incubación fue variable entre 2 a 5 días para los diferentes aislamientos, después del cual se separó el extracto crudo extracelular por centrifugación (10.000 x g, 10 min, 4 °C), el cual se utilizó como fuente de enzimas. Las células fueron mantenidas a

20 °C para una posterior extracción de ADN genómico e identificación taxonómica de cada aislamiento. La actividad endoglucanasa fue ensayada en mezclas de reacción conteniendo 0,05 mL de extracto crudo extracelular con 0,45 mL de CMC 2 % (p/v) en tampón de fosfato sódico 100 mM (pH 6,5). Después de 30 min de incubación a 50 °C, la reacción fue detenida por adición de 0,50 mL de reactivo de ácido 3, 5-dinitrosalicílico [14]. Se siguió un procedimiento idéntico para la determinación de la actividad xilanolítica, usando 1 % (p/v) de xilano (de abedul, Sigma) como sustrato.

La actividad cualitativa de papel de filtro de todos los aislamientos se evaluó como potencial celulolítico total en matraces de 100 mL conteniendo 20 mL de medio mVL70 y una tira de papel de filtro (PF) Whatman N° 1 (1 x 2 cm). Los cultivos se incubaron a 30 °C y 150 rpm durante un máximo de 7 días y se comprobaron a diario para detectar evidencias de degradación del papel de filtro. Las cepas capaces de degradar el papel de filtro se seleccionaron para un análisis cuantitativo, que se realizó por medio del uso del reactivo DNS como sigue: las mezclas de reacción contuvieron 0,05 mL de extracto crudo enzimático y el sustrato PF Whatman N° 1 (1 x 6 cm) en 0,45 mL de tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 6,5). Los ensayos se llevaron a cabo a 50 °C durante 60 min y la estimación de los azúcares reductores totales liberados se realizó con el reactivo DNS.

Una unidad internacional (UI) de actividad enzimática como PFasa, CMCase y xilanasas, se definió como la cantidad de enzima que libera 1 mmol de azúcares reductores (medidos como glucosa o xilosa) por mililitro de reacción y por minuto en las condiciones descritas. Todas las muestras se analizaron por triplicado y se calcularon los valores medios y la desviación estándar.

Para el análisis zimográfico, las muestras de enzimas crudas extracelulares se cargaron en un gel de poli(acrilamida) no desnaturalizante (ND-PAGE) al 12 %. Después de la electroforesis, los geles se incubaron a 30 °C durante 30 minutos en soluciones tampón de fosfato sódico 100 mM (pH 6,5), que contenían 1 % (p/v) de CMC y se tiñeron con solución de Rojo Congo al 0,1 % (p/v). Después de que se realizaron al menos dos lavados con NaCl 1M durante 15 minutos hasta la visualización de bandas claras de actividad enzimática, se estimó el peso molecular aparente usando un marcador adecuado (HMW-GE Healthcare, 669-66 kDa), que se reveló mediante el método de tinción de plata.

1.2.5 Aislamiento de ADN y amplificación y análisis del gen ribosomal 16S RNA

El método del bromuro cetil-trimetilamonio (CTAB) [16] se utilizó para el aislamiento del ADN genómico de las cepas seleccionadas, a partir de los pellets celulares reservados (Ensayos enzimáticos). Se usaron las muestras genómicas para amplificar los genes 16S rRNA usando cebadores universales F27 y R1492 [17]. Además, se usaron R907 (5'-CCGTC AATTCCTTTGAGTTT-3') y R518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). La mezcla de reacción, en un volumen final de 25 µL, contuvo 5 µL de tampón polimerasa 5X, 0,5 µM de cada cebador, 250 µM de dNTPs y 1 U de ADN polimerasa Go-Taq (Promega, EE. UU.). La reacción se

realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf, Alemania), utilizando el siguiente ciclo: 94 °C 4 min, 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 55 °C y 90 s a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C. Los productos de amplificación se evaluaron para confirmar su tamaño y calidad mediante electroforesis sumergida en geles de agarosa al 0,8 % (p/v) teñidos con Gel Rojo TM (Biotio). Los amplicones fueron secuenciados por medio del servicio de Macrogen (Macrogen, Corea). Las lecturas obtenidas fueron editadas e ingresadas individualmente en el servidor taxonómico EZ [18] y a través de la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para determinar la identidad de las mismas por comparación con las secuencias depositadas en las bases de datos correspondientes. Todas las secuencias se registraron en bases de datos públicas bajo los números de acceso FJ976043.1 (GenBank), LN829557-LN829597 y LN832405-LN832407 (European Nucleotide Archive).

1.3 Resultados y discusión

1.3.1 Enriquecimiento y aislamiento de bacterias celulolíticas

En este trabajo se realizó el aislamiento de bacterias capaces de utilizar los carbohidratos de la biomasa vegetal por medio de un proceso de enriquecimiento [13, 19], con el fin de incrementar la disponibilidad de enzimas microbianas con potencial para su aplicación en la agroindustria local dentro de un concepto biorrefinería.

La actividad industrial en el noroeste de Argentina está principalmente basada en la caña de azúcar, de la que se produce bioetanol a partir de melaza. El residuo agrícola de cosecha de este y de otros cultivos implica la disponibilidad de un potencial biomásico que puede contribuir al desarrollo de economías de base biológica. Sin embargo, el uso integral de la biomasa lignocelulósica requiere de sistemas biocatalíticos adecuados para el desarrollo de procesos viables [20].

Los enriquecimientos microbianos fueron desarrollados a pH neutro y en condiciones aerobias, teniendo en cuenta que en intestino de insectos y en los ambientes muestreados se desarrollan microorganismos aerobios y anaerobios facultativos [21]. A pesar de que se llevaron a cabo ensayos de cultivo a 45 °C, la mayoría de los aislamientos se obtuvieron de cultivos incubados a 30 °C. Los aislamientos obtenidos en las condiciones empleadas fueron casi exclusivamente de bacterias, ya que sólo se recuperaron escasas colonias de levadura y sólo una de hongo filamentoso. Se observó crecimiento bacteriano ($DO_{600nm} > 0,9$) en medio nutritivo diluido suplementado con SCB, Avicel y CMC, mientras que en el medio de base mineral mVL70 conteniendo SCB se observó crecimiento escaso ($DO_{600nm} < 0,5$). La evaluación de los enriquecimientos utilizando placas de celulosa con Rojo Congo fue utilizada como una prueba de detección rápida y sensible para evaluar el potencial celulolítico de las bacterias. Este colorante se une a polisacáridos, por lo que tiñe la celulosa de manera que, si esta es degradada se producen áreas claras o halos. Después de 72 - 96 h de incubación a 30 °C,

se aislaron colonias que mostraron halos de hidrólisis significativos, para los que la relación entre el diámetro del halo más el diámetro de la colonia y el diámetro de la colonia fue considerado $\geq 2,5$ (Fig. 2).

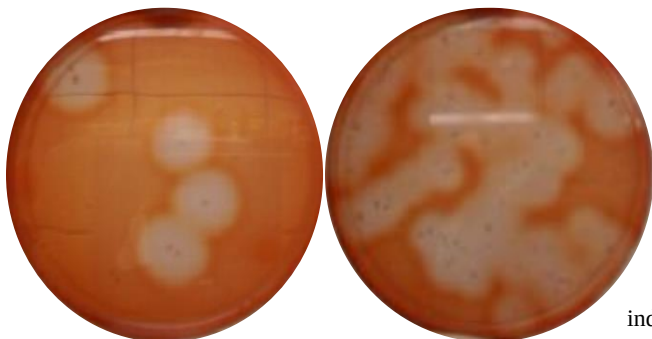


Figura 2. Zona de clarificación de celulosa teñida con Rojo Congo, obtenidas después de 48 h de incubación de los cultivos de enriquecimiento. La formación de una zona clara alrededor de las colonias o halo, fue indicativa de la producción de celulasas extracelulares.

La morfología de la colonia de cada aislamiento se verificó cuidadosamente para garantizar la recuperación de los cultivos puros. Fue evidente que varias colonias que producían halo de hidrólisis contenían bacterias asociadas en lugar de cepas únicas. Por lo tanto, los esfuerzos para recuperar cultivos puros requirieron de la realización de sucesivos sub-cultivos lo que finalmente permitió obtener un total de 233 aislamientos bacterianos puros. Las cepas aisladas se recuperaron mayoritariamente de los enriquecimientos microbianos desarrollados en mVL70, a pesar de que estos presentaron un desarrollo bacteriano escaso, como se mencionó. El uso de mVL70 con SCB como fuente de carbono produjo el 42,1 % de todos los aislamientos celulolíticos, mientras que mVL70 con CMC permitió el aislamiento de sólo el 6,4 % de ellos (Fig. 3A). Estos resultados son consistentes con resultados de otros autores, quienes demostraron la utilidad del medio VL para el aislamiento de bacterias de diversas fuentes [13].

1.3.2 Evaluación de la actividad celulolítica extracelular

Los aislamientos se cultivaron en DTSB suplementado con CMC 10 g/L para maximizar el crecimiento de biomasa y por lo tanto la producción enzimática. Luego de 2 – 5 días de desarrollo, la mayor parte de los 233 aislamientos mostraron escasa actividad β -1,4-endoglucanasa extracelular. El 13,3 % de todas las cepas mostraron actividades enzimáticas (AE) que van desde 0,10 a 1,30 UI/mL; el 4,3 % de los aislamientos totales presentaron evidencia de degradación leve de papel de filtro, mientras que sólo el 1,7 % mostró AE ($> 0,1$ UI/mL) y evidencia visual clara de degradación de PF (Fig. 3B).

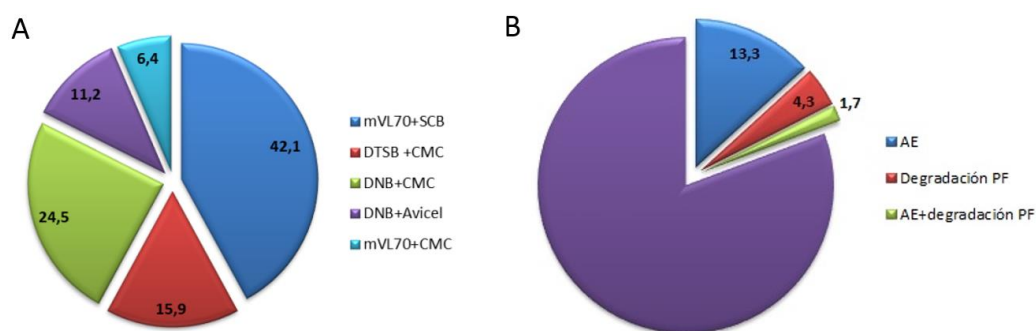
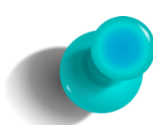


Figura 3. Distribución porcentual de los 233 aislamientos puros que presentan capacidad de degradar celulosa (A) de acuerdo con los diferentes medios de enriquecimiento utilizados y (B) de acuerdo con la actividad celulolítica que presentaron. AE, actividad enzimática (endoglucanasa); PF, papel de filtro.

Como resultado, se seleccionaron 45 aislamientos con capacidad de producir glicósido hidrolasas, sobre la base de la diferente morfología de las colonias, de evidencia de degradación de PF y/o de actividad endoglucanasa $\geq 0,10$ UI/mL (Tabla 1). Es importante destacar que la actividad PFasa no fue cuantificable mediante el método DNS. De manera similar, fue reportado que cepas productoras de celulasa no presentaron actividad enzimática sobre papel de filtro [22]. Sin embargo, se observó clarificación de SCB pretratado con NaOH por *Bacillus* sp. AR03 y *Bacillus* sp. AR491 (datos no mostrados).

 De un total de 233 aislamientos bacterianos puros con capacidad de degradar celulosa, los que fueron mayoritariamente desarrollados en medio de base mineral modificado en este trabajo (mVL70), se seleccionaron 45 aislamientos con capacidad de producir glicósido hidrolasas activas sobre celulosa soluble o papel de filtro. Este cepario fue el punto de partida para identificar cepas capaces de producir de manera eficiente glucanasas extracelulares en el marco de esta tesis.

1.3.3 Distribución taxonómica de los aislamientos bacterianos seleccionados

Las cepas aisladas fueron identificadas de acuerdo al análisis de la secuencia del gen codificante de la subunidad menor ribosomal 16S (Tabla 1). La distribución taxonómica observada está restringida a aislamientos cultivables, y se muestra en la Figura 4. Los grupos bacterianos identificados se describen a continuación.

Firmicutes. La mayoría de los 45 aislamientos seleccionados fueron bacilos con frecuente motilidad y presencia de endosporas. De acuerdo con la identificación taxonómica sobre la base de la secuencia

16S rRNA, el filo prevalente fue *Firmicutes*, el que representó el 62,2 % de todas las bacterias seleccionadas con *Bacillus* spp. y *Paenibacillus* spp. como los géneros más frecuentes (Fig. 4). Cabe destacar que varios aislamientos identificados como *Bacillus* spp. del grupo subtilis no son distinguibles por la secuencia del gen ARNr 16S. Sin embargo, estos aislamientos se analizaron individualmente ya que presentaron diferente comportamiento, como por ejemplo *Bacillus* sp. AR03 y *Bacillus* sp. AR408, provenientes de muestras de licor de bagazo y de intestino de las larvas nativas, respectivamente. A pesar de su similitud en términos de su secuencia ARNr 16S, ambas cepas mostraron los valores más altos de actividad de CMCasa en este estudio, pero sólo *Bacillus* sp. AR03 fue capaz de degradar de manera leve PF después de 48 horas de cultivo en DTSB (Tabla 1).

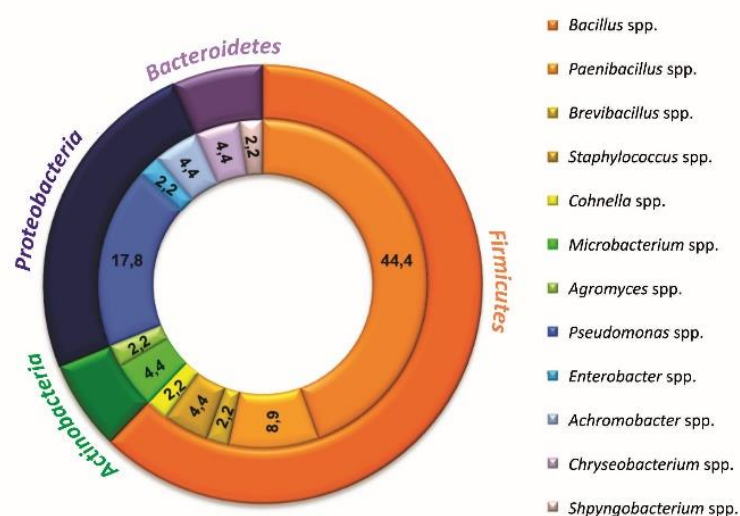


Figura 4. Distribución taxonómica de los 45 aislamientos seleccionados sobre la base de su capacidad para producir celulasas y/o xilanasas (extracelulares).

De manera similar, otros estudios basados en métodos dependientes del cultivo informaron el dominio de *Firmicutes* y una distribución taxonómica comparable a las obtenidas en este trabajo para muestras de suelo [23], de intestino de insectos xilófagos [10, 24] y de compost [25]. Entre los géneros más frecuentes, *Bacillus* spp. incluye bacterias aerobias o anaeróbicas facultativas, con forma de bastones con una gran diversidad con respecto a la utilización de la fuente de carbono y las condiciones de crecimiento. La prevalencia de este género puede ser un signo de su abundancia numérica; sin embargo, se debe considerar el sesgo debido a los procedimientos y medios de cultivo utilizados.

La familia *Paenibacillaceae* (13,3 %) fue representada por miembros de los géneros *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Cohnella* (Fig. 4). Además de su potencial celulolítico, se observó actividad xilanasas en todos los aislamientos seleccionados de esta familia. Por ejemplo, *Paenibacillus* sp. AR247 y *Cohnella* sp. AR92 produjeron $5,30 \pm 0,15$ UI/mL y $15,10 \pm 0,21$ UI/mL de actividad endo- β -1,4-

endoxilanasas después de 96 y 120 h de cultivo, respectivamente. La actividad CMCasa de los aislamientos de este grupo presentó valores por debajo de 0,3 UI/mL cuando el caldo de cultivo evaluado se obtuvo del medio DTSB-CMC (Tabla 1). Sin embargo, fue notable observar que el análisis zimográfico de *Cohnella* sp. AR92 mostró que se visualizaron al menos cuatro bandas con actividad CMCasa cuando se cultivaron en DTSB suplementado con SCB pretratado con NaOH (Fig. 5). También pertenecientes a *Firmicutes*, los miembros de la familia *Paenibacillaceae* se han descrito a menudo como fuertes bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas, informes que están de acuerdo con nuestras observaciones [26-30]. Sin embargo, para nuestro conocimiento no hay informes previos de un perfil zimográfico revelado con CMC como sustrato para especies de *Cohnella*.

Otros aislamientos de cocos Gram-positivos, no móviles, designados como AR230 y AR362, se agruparon taxonómicamente con *Staphylococcus warneri* independientemente de tener un origen diferente (Tabla 1), y representaron el 4,4 % de las cepas seleccionadas (Fig. 4). La actividad celulasa no es una propiedad comúnmente encontrada entre estafilococos; sin embargo, las cepas celulolíticas relacionadas con este género se han descrito en el intestino de las termitas xilófagas [10].

Otras bacterias Gram positivas. Se asignaron dos aislamientos al género *Microbacterium*: AR18 y AR462-2, que fueron recuperados de cultivos de enriquecimiento inoculados con licor biológico y con intestinos de larvas de escarabajos, respectivamente. Además, el aislamiento AR488 obtenido de los intestinos de termitas se relacionó con *Agromyces* spp. (Tabla 1). A pesar de que las Actinobacterias aisladas mostraron una baja actividad de CMCasa (aproximadamente 0,02 UI/mL) y una leve degradación de PF, los resultados preliminares con respecto a *Microbacterium* spp. evidenciaron actividad xilanolítica cuando se desarrollaron en medios de cultivo basados en minerales que contenían lactosa [31]. Varias actinobacterias implicadas en la degradación de la celulosa y el xilano se describieron a partir de una variedad de muestras ambientales [5, 32]; recientemente este grupo bacteriano fue asociado a la digestión de celulosa en intestino de termitas [26, 33].

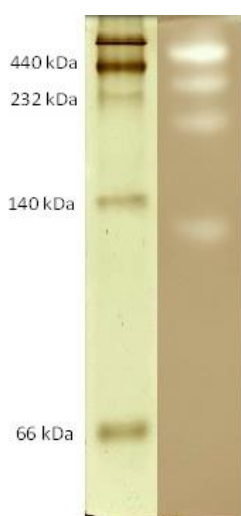
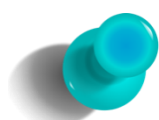


Figura 5. Perfil zimográfico de *Cohnella* sp. AR92 desarrollado en ND-PAGE 12%. Columna 1, Marcador de peso molecular. Columna 2, actividad CMCasa, que muestra cuatro bandas con peso molecular aparente de 500, 306, 206 y 122 kDa.

Tabla 1. Descripción de la filiación taxonómica, actividad celulolítica y fuente de aislamiento de los 45 aislados bacterianos seleccionados. AE = actividad enzimática (endoglucanasa). PF = degradación del papel de filtro.

Aislamiento	Especie taxonómicamente más cercana	Nº acceso del ARNr 16S	AE	PF	AE + PF	AE [UI/mL]	Origen	Medio de aislamiento
AR03	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622(T)	LN829557			x	1,30 ± 0,15	Licor biológico	DNB+CMC
AR17	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Subtilis</i> NCIB 3610(T)	LN829558	x			0,16 ± 0,03	Licor biológico	DNB+CMC
AR40-1	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	LN829559	x			0,22 ± 0,03	Licor biológico	DNB+CMC
AR98	<i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234(T)	LN829560	x			0,46 ± 0,05	Licor biológico	DNB+CMC
AR138	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622(T)	LN829561	x			0,18 ± 0,03	Licor biológico	DNB+CMC
AR141	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	LN829562	x			0,17 ± 0,03	Licor biológico	DNB+CMC
AR349-1	<i>Bacillus firmus</i> NCIMB 9366(T)	LN829563	x			0,34 ± 0,04	<i>S. frugiperda</i> larva	DNB+Avicel
AR349-2	<i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234(T)	LN829564	x			0,29 ± 0,04	<i>S. frugiperda</i> larva	DNB+Avicel
AR352	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622(T)	LN829565	x			0,42 ± 0,05	<i>S. frugiperda</i> larva	DNB+Avicel
AR384	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613(T)	LN829566	x			0,44 ± 0,05	<i>D. saccharalis</i> larva	DNB+CMC
AR391	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	LN829567	x			0,27 ± 0,02	<i>D. saccharalis</i> larva	mVL70+SCB
AR398	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42(T)	LN829568	x			0,43 ± 0,05	<i>D. saccharalis</i> larva	DNB+CMC
AR401	<i>Bacillus safensis</i> FO-36b(T)	LN829569	x			0,50 ± 0,05	<i>D. saccharalis</i> larva	mVL70+CMC
AR408	<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622(T)	LN829570	x			0,80 ± 0,12	<i>D. saccharalis</i> larva	mVL70+SCB
AR409	<i>Bacillus safensis</i> FO-36b(T)	LN829571		x		-	<i>D. saccharalis</i> larva	mVL70+SCB
AR426	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	LN829572	x			0,36 ± 0,04	<i>Cerambicido</i> larva	mVL70+SCB
AR434-1	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578(T)	LN829573		x		-	<i>Cerambicido</i> larva	mVL70+SCB
AR463	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613(T)	LN829574	x			0,20 ± 0,03	<i>Cerambicido</i> larva	mVL70+SCB
AR491	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613(T)	LN829575	x			0,32 ± 0,04	<i>Isoptera</i>	mVL70+SCB
AR493	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> FZB42(T)	LN829576	x			0,38 ± 0,04	<i>Isoptera</i>	mVL70+SCB
AR247	<i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439(T)	LN829577	x			0,14 ± 0,02	Licor biológico	DNB+CMC
AR460-1	<i>Paenibacillus lautus</i> NRRL NRS-666(T)	LN829578	x			0,25 ± 0,03	<i>D. saccharalis</i> larva	DTSB+CMC

AR485	<i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439(T)	LN829579			x	0,15 ± 0,02	<i>Isoptera</i>	mVL70+SCB
AR489	<i>Paenibacillus cineris</i> LMG 18439(T)	LN829580				0,18 ± 0,02	<i>Isoptera</i>	mVL70+SCB
AR92	<i>Cohnella formosensis</i> CC-Alfalfa-35(T)	FJ976043.1	x			0,15 ± 0,03	Licor biológico	DNB+CMC
AR460-2	<i>Brevibacillus parabrevis</i> IFO 12334(T)	LN829581	x			0,12 ± 0,03	<i>D. saccharalis</i> larva	DTSB+CMC
AR230	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836(T)	LN829582	x			0,10 ± 0,03	Licor biológico	DNB+CMC
AR362	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836(T)	LN829583	x			0,15 ± 0,03	<i>S. frugiperda</i> larva	DNB+Avicel
AR18	<i>MicrobacterUIm paraoxydans</i> CF36(T)	LN832405		x		-	Licor biológico	DNB+CMC
AR462-2	<i>MicrobacterUIm paraoxydans</i> CF36(T)	LN829584		x		-	<i>Cerambicido</i> larva	mVL70+SCB
AR488	<i>Agromyces mediolanus</i> DSM 20152(T)	LN829585		x		-	<i>Isoptera</i>	mVL70+SCB
AR422	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962(T)	LN832407	x			0,11 ± 0,03	<i>Cerambicido</i> larva	mVL70+SCB
AR429	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962(T)	LN829586	x			0,38 ± 0,05	<i>Cerambicido</i> larva	mVL70+SCB
AR447	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> ATCC 19867(T)	LN829587		x		-	<i>Cerambicido</i> larva	mVL70+SCB
AR462-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588(T)	LN829588		x		-	<i>Cerambicido</i> larva	mVL70+SCB
AR470	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> PFC951(T)	LN829589		x		-	<i>Cerambicido</i> larva	mVL70+SCB
AR471	<i>Pseudomonas guguanensis</i> CC-G9A(T)	LN829590		x		-	<i>Cerambicido</i> larva	mVL70+SCB
AR490	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962(T)	LN829591	x			0,37 ± 0,04	<i>Isoptera</i>	mVL70+SCB
AR492-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962(T)	LN829592			x	0,30 ± 0,04	<i>Isoptera</i>	mVL70+SCB
AR451	<i>Enterobacter cloacae subsp. dissolvens</i> LMG 2683(T)	LN829595		x		-	<i>Cerambicido</i> larva	mVL70+SCB
AR476-1	<i>Achromobacter insolitus</i> LMG 6003(T)	LN829593	x			0,12 ± 0,03	<i>D. saccharalis</i> larva	DTSB+CMC
AR476-2	<i>Achromobacter insolitus</i> LMG 6003(T)	LN829594	x			0,23 ± 0,06	<i>D. saccharalis</i> larva	DTSB+CMC
AR11	<i>ChryseobacterUIm contaminans</i> C26(T)	LN829596	x			0,13 ± 0,03	Licor biológico	DNB+CMC
AR13	<i>ChryseobacterUIm contaminans</i> C26(T)	LN832406	x			0,17 ± 0,02	Licor biológico	DNB+CMC
AR126	<i>SphingobacterUIm multivorum</i> IAM14316(T)	LN829597	x			0,10 ± 0,03	Licor biológico	DNB+CMC



El filo prevalente entre los aislamientos seleccionados fue Firmicutes (62,2 %), representado principalmente por miembros de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*. Las cepas seleccionadas para la generación de hidrolizados de lignocelulosas en este trabajo de tesis pertenecieron a estos géneros, caracterizados por su capacidad de producir múltiples glicósido hidrolasas y secretarlas al medio extracelular, por lo que son microorganismos clave en los ecosistemas en que se recicla la materia orgánica vegetal [25, 33].

Proteobacteria y Bacteroidetes. *Pseudomonas* spp. es el segundo género más frecuente aislado en este trabajo, donde representó el 17,8 % de todas las bacterias seleccionadas (Fig. 4). Varias *Pseudomonas* spp. mostraron una capacidad leve de degradar PF. Como se mencionó, este comportamiento no fue constante y se perdió frecuentemente después de sub-cultivos, a pesar de lo que fue considerada evidencia del potencial celulolítico de *Pseudomonas* spp. y de otros aislamientos en este trabajo (Tabla 1). Otros aislamientos pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron aisladas de intestino de insectos y mostraron potencial para degradar biomasa lignocelulósica [10, 34, 30].

Dentro del filo *Proteobacteria*, una de las cepas fue identificada como *Enterobacter* sp. AR451 (Tabla 1), un género inusualmente relacionado a la utilización de lignocelulosa. Los miembros de *Enterobacter* spp. no se han considerado relevantes con respecto a la degradación de las lignocelulosas hasta informes recientes basados en cultivos, que describieron cepas de este género con alto potencial lignocelulolítico [11, 35]. El aislamiento identificado como *Achromobacter* sp. AR 476-2 mostró sutiles halos de hidrólisis en medio agarizado CMC-Rojo Congo. La literatura relacionada con celulosas y hemicelulasas y especies de *Achromobacter*, describe la presencia de este género como parte de consorcios microbianos [36]. Más aún, Ghio *et al.* [37] proponen que *Achromobacter* spp. carece de las enzimas clave para la degradación de sustratos lignocelulósicos. Considerando estos hechos, este trabajo puede contribuir a detectar si las especies de *Achromobacter* aisladas son capaces de producir enzimas celulolíticas o xilanolíticas, o si las mismas utilizan los azúcares liberados por la degradación a expensas de otros socios en cultivos complejos.

Finalmente, los representantes del filo *Bacteroidetes* se aislaron de muestras de licor industrial. Los aislamientos AR11, AR13 y AR126 mostraron baja actividad de endoglucanasa (Tabla 1), y actividad xilanolítica que alcanzó 1,2 UI/mL (datos no mostrados). Existen escasos reportes de la capacidad para producir celulasa en géneros como *Chryseobacterium* spp. y *Sphingobacterium* spp., a pesar de que con frecuencia se han descrito en comunidades capaces de crecer en sustratos lignocelulósicos [34, 38, 39].

1.4 Conclusiones

Las cepas aisladas en este trabajo tienen capacidad para degradar celulosas y hemicelulosas, y por lo tanto contribuyen a la extensión de la colección de microorganismos potencialmente útiles para aplicaciones en biorrefinerías. Sin embargo, los principales cuellos de botella en las estrategias de selección microbiana de este tipo son: (i) la necesidad de optimizar la composición de los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento para cada aislamiento para una mejor evaluación de la actividad enzimática, y (ii) el hecho de que los métodos para las enzimas seleccionadas que catalizan la reacción deseada están frecuentemente sub-desarrollados. Como también se mencionó anteriormente [32], las cepas bacterianas relacionadas taxonómicamente con las evaluadas aquí pueden producir enzimas de forma diferente: algunas pueden secretar enzimas en el caldo de cultivo, mientras que otras pueden albergar enzimas en la superficie celular o internamente, y aún más, algunas células pueden terminar en solución por lisis celular. Sin embargo, a pesar de esas limitaciones y el sesgo asociado con el cultivo, las cepas puras pueden proporcionar información sobre el comportamiento fisiológico que el análisis molecular por sí solo no puede. Se observó que varios aislamientos no fueron capaces de crecer de manera eficiente ($DO_{600nm} < 0,2$) ni de producir actividad CMCasa significativa en medios minerales, y que algunos de ellos mostraron evidencia de degradación leve de PF en las condiciones generales de detección utilizadas (Tabla 1). Esto es frecuentemente atribuido a que la capacidad de crecimiento de cepas salvajes es muy variable en condiciones de laboratorio, dificultando la evaluación de su potencial enzimático real. Es por ello, que se hace necesario apelar a una apropiada evaluación de las características fisiológicas de nuevos aislamientos y a la ingeniería de medios de cultivo por medio de una multiplicidad de herramientas.

En este contexto, las cepas prometedoras seleccionadas aquí fueron posteriormente ensayadas para estudiar su crecimiento y mejorar la producción de enzimas, así como estudios moleculares para obtener información sobre los mecanismos microbianos para la deconstrucción de la biomasa. Estos resultados forman parte de este trabajo y de trabajos realizados en colaboración dentro del grupo en que se desarrolló esta tesis, de manera que constituyen un aporte al desarrollo de biocatalizadores para aplicaciones tecnológicas en biocombustibles y en la producción de oligosacáridos prebióticos [40, 41].

Referencias

- [1] Lambertz C., Garvey M., Klinger J., Heesel D. et al. (2014). Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. *Biotechnol. Biofuels* 7, 135.
- [2] Wilson D.B., 2008. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1125, 289–297.
- [3] Bornscheuer U., Buchholz K., Seibel J. (2014). Enzymatic degradation of (ligno) cellulose. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53, 10876–10893.
- [4] DeBoy R.T., Mongodin E.F., Fouts D.E., Tailford L.E. et al. (2008). Insights into plant cell wall degradation from the genome sequence of the soil bacterium *Cellvibrio japonicus*. *J. Bacteriol.* 190, 5455–63.
- [5] Okeke B.C., Lu J., 2011. Characterization of a defined cellulolytic and xylanolytic bacterial consortium for bioprocessing of cellulose and hemicelluloses. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163, 869–81.
- [6] Wongwilaiwalin S., Laathanachareon T., Mhuanon, W. et al. (2013). Comparative metagenomic analysis of microcosm structures and lignocellulolytic enzyme systems of symbiotic biomass-degrading consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8941–54.
- [7] Gronenberg L.S., Marcheschi R.J., Liao J.C. (2013). Next generation biofuel engineering in prokaryotes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17, 462–71.
- [8] Wang M., Li Z., Fang X., Wang L. et al. (2012). Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 128, 1–24.
- [9] Do T.H., Nguyen T.T., Nguyen T.N., Le Q.G. et al. (2014). Mining biomass-degrading genes through Illumina based de novo sequencing and metagenomic analysis of free-living bacteria in the gut of the lower termite *Coptotermes gestroi* harvested in Vietnam. *J. Biosci. Bioeng.* 118, 665–71.
- [10] Pourramezan Z., Ghezelbash G.R., Romani B., Ziaei S. et al. (2012). Screening and identification of newly isolated cellulose-degrading bacteria from the gut of xylophagous termite *Microcerotermes diversus* (Silvestri). *Mikrobiologiia* 81, 736–42.
- [11] DeAngelis K.M., Sharma D., Varney R., BlakeSimmons B. et al. (2013). Evidence supporting dissimilatory and assimilatory lignin degradation in *Enterobacter lignolyticus* SCF1. *Front. Microbiol.* 4, 1–14.
- [12] Gardner J.G., Crouch L., Labourel A., Forsberg Z. et al. (2014). Systems biology defines the biological significance of Redox-active proteins during cellulose degradation in an aerobic bacterium. *Mol Microbiol.* 94, 1121–33.
- [13] Schoenborn L., Yates P.S., Grinton B.E., Hugenholtz P. et al. (2004). Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the filo-level diversity of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4363–66.
- [14] Gupta P., Samant K., Sahu A. (2012). Isolation of cellulose degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *Int. J. Microbiol.*, Article ID 578925, 1–5. doi: 10.1155/2012/578925
- [15] Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of Reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–28.
- [16] Bailey M.J. (1995). Extraction of DNA from the phyllosphere. In: *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications* (Trevors, J.T. and van Elsas, J.D., eds.), Springer-Verlag, Berlin, 89–109.
- [17] Martinez M.A., Delgado O.D., Breccia J.D., Baigori M.D. et al. (2002). Revision of the taxonomic position of the xylanolytic *Bacillus* sp. MIR32 reidentified as *Bacillus halodurans* and plasmid-mediated transformation of *B. halodurans*. *Extremophiles* 6, 391–95.
- [18] Kim O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H. et al. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 716–21.
- [19] Janssen P.H., Yates P.S., Grinton B.E., Taylor P.M. et al. (2002). Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2391–96.
- [20] Banerjee G., Scott-Craig J.S., Walton J.D. (2010): Improving enzymes for biomass conversion: A basic research perspective. *Bioenergy research* 3, 82-92.

- [21] Koroiva R., Souza C.W., Toyama D., Henrique-Silva F. *et al.* (2013). Lignocellulolytic enzymes and bacteria associated with the digestive tracts of *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) larvae. *Genet. Mol. Res.* 12, 3421–34.
- [22] Romano N., Gioffre A., Sede S.M., Campos E. *et al.* (2013). Characterization of cellulolytic activities of environmental bacterial consortia from an Argentinian native forest. *Curr. Microbiol.* 67, 138–47.
- [23] Rastogi G., Muppidi G.L., Gurram R.N., Adhikari A. *et al.* (2009). Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 585–98.
- [24] Tarayre C., Brognaux A., Bauwens J., Brasseur C. *et al.* (2013). Isolation of amylolytic, xylanolytic, and cellulolytic microorganisms extracted from the gut of the termite *Reticulitermes santonenensis* by means of a micro-aerobic atmosphere. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1655–60.
- [25] Wang W., Ya, L., Cui Z., Gao Y. *et al.* (2011). Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 102, 9321–24.
- [26] Wenzel M., Schöning I., Berchtold M., Kämpfer P. *et al.* (2002). Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *J. Appl. Microbiol.* 92, 32–40.
- [27] Waeonukul R., Kyu K.L., Sakka K., Ratanakhanokchai K. (2009). Isolation and characterization of a multienzyme complex (cellulosome) of the *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 grown on Avicel under aerobic conditions. *J. Biosci. Bioeng.* 107, 610–14.
- [28] St John F.J., Preston J.F., Pozharski E. (2012). Novel structural features of xylanase A1 from *Paenibacillus* sp. JDR-2. *J. Struct. Biol.* 180, 303–11.
- [29] Hameed A., Hung M.H., Lin S.Y., Hsu Y.H. *et al.* (2013). *Cohnella formosensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the rhizosphere of *Medicago sativa* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2806–12.
- [30] Fukuda M., Watanabe S., Yoshida S., Itoh H. *et al.* (2010). Cell surface xylanases of the glycoside hydrolase family 10 are essential for xylan utilization by *Paenibacillus* sp. W-61 as generators of xylo-oligosaccharide inducers for the xylanase genes. *J. Bacteriol.* 192, 2210–19.
- [31] Di Marco E., Soraire P.M., Romero C.M., Villegas L.B. *et al.* (2017). Raw sugarcane bagasse as carbon source for xylanase production by *Paenibacillus* species: a potential degrader of agricultural wastes. *Environ Sci Pollut Res Int.* 24(23), 19057–67.
- [32] Maki M.L., Broere M., Leung K.T., Qin W. (2011). Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2, 146–154.
- [33] Berlemont R., Martiny A.C. (2013). Phylogenetic distribution of potential cellulases in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1545–54.
- [34] Maki M.L., Idrees A., Leung K.T., Qin W. (2012). Newly isolated and characterized bacteria with great application potential for decomposition of lignocellulosic biomass. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 22, 156–66.
- [35] Jimenez D.J., Korenblum E., van Elsas J.D. (2014). Novel multispecies microbial consortia involved in lignocellulose and 5-hydroxymethylfurfural bioconversion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2789–03.
- [36] Yang H., Wu H., Wang X., Cui Z. *et al.* (2011). Selection and characteristics of a switchgrass-colonizing microbial community to produce extracellular cellulases and xylanases. *Bioresour. Technol.* 102, 3546–50.
- [37] Ghio S., Lorenzo G.S., Lia V., Talia P. *et al.* (2012). Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3, 352–64.
- [38] Cho M.J., Kim Y.H., Shin K., Kim Y.K. *et al.* (2010). Symbiotic adaptation of bacteria in the gut of *Reticulitermes speratus*: low endo-beta-1,4-glucanase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395, 432–35.
- [39] Kabisch A., Otto A., König S., Becher D. *et al.* (2014). Functional characterization of polysaccharide utilization loci in the marine Bacteroidetes ‘*Gramella forsetii*’ KT0803. *ISME J.* 8, 1492–02.
- [40] Pisa J.H., Manfredi A.P., Perotti N.I., Romero H.G. *et al.* (2017). Agrowastes as feedstock for the production of endo- β -Xylanase from *Cohnella* sp. strain AR92. *J Mol Microbiol Biotechnol* 27, 277–28.

[41] Manfredi A.P., Pisa J.H., Valdeón D.H., Perotti N.I. et al. (2016). Synergistic effect of simple sugars and carboxymethyl cellulose on the production of a cellulolytic cocktail from *Bacillus* sp. AR03 and enzyme activity characterization. Appl Biochem Biotechnol. 179, 1384-93.



Capítulo 2



2.1 Introducción

Los microorganismos producen enzimas para usar la biomasa de su hábitat, por lo que son la fuente principal de biocatalizadores para aplicaciones tecnológicas. La degradación de la celulosa requiere de la acción cooperativa de al menos tres tipos de enzimas: exoglucanasas, endoglucanasas y β -glucosidasas, que son agrupadas como celulasas [1]. Aunque estas enzimas producidas comercialmente son de naturaleza fúngica, existe una creciente demanda de bacterias como fuente de nuevas celulasas como catalizadores efectivos debido a su diversidad, a la producción de complejos de múltiples enzimas que proporcionan sinergia y a una alta tasa de crecimiento y estabilidad en condiciones extremas [2]. Como ya se mencionó en el Capítulo 1, dentro de las bacterias capaces de degradar celulosa, se ha reportado la dominancia de aislamientos pertenecientes a *Firmicutes*, los cuales desempeñan un papel clave en la deconstrucción de la biomasa en una variedad de ambientes, como el compost, el suelo y el intestino de los insectos xilófagos [3-5]. Dentro de este filo, los miembros del género *Bacillus* pueden producir y secretar grandes cantidades de enzimas extracelulares con ventajas tales como altas tasas de crecimiento y ciclos cortos de fermentación. Por lo tanto, se consideran uno de los productores de enzimas más versátiles y robustos para fermentaciones microbianas [6-8].

Aunque relacionados taxonómicamente, muchos aislamientos bacterianos provenientes de diversos ambientes con frecuencia presentan diferente capacidad de crecimiento y requerimientos culturales. Esto ha desafiado la evaluación de las condiciones de cultivo apropiadas para la producción de enzimas, lo que ha llevado a utilizar métodos de evaluación sistemática para definir los medios de crecimiento y producción enzimática apropiados. En este contexto, el uso de medios basados en peptona para mejorar el crecimiento bacteriano y la producción de enzimas ha demostrado ser un recurso eficiente [9, 10]. Además, se ha informado la utilidad de diferentes fuentes de carbono de naturaleza agroindustrial para promover eficientemente la producción de celulosa y hemicelulosa [6, 11-13].

En este capítulo se examinó el potencial de *Bacillus* sp. AR03, aislada a partir de muestras de la industria papelera en Tucumán [14], como productor de celulosa para tecnologías de biorrefinería. Para ello, se evaluaron los componentes del medio de cultivo que afectan tanto al crecimiento como a la producción del cóctel celulolítico de la cepa AR03 para mejorar, simplificar e incluso economizar en el proceso de fermentación. También, se llevó a cabo la caracterización de las propiedades tecnológicas de las enzimas producidas.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Microorganismo y selección de componentes del medio de cultivo

La bacteria productora de endoglucanasa, *Bacillus* sp. AR03, se aisló del licor biológico del procesamiento de bagazo de una fábrica de papel en Tucumán, Argentina (Tabla 1, Capítulo 1). La secuencia del gen ribosomal 16S (rARN) se depositó en el European Nucleotide Archive (ENA) con el número de acceso LN829557 [14]. El crecimiento de la cepa fue analizado por medio de una curva de crecimiento en medio DTSB+CMC 1 % (p/v) a 30 °C y 200 rpm, mediante la medición de densidad óptica (D.O.) a 600 nm.

El medio de cultivo para la producción enzimática fue evaluado por medio de un diseño factorial completo en dos niveles, tomando como base la composición del caldo de triptena y soja con carboximetilcelulosa (DTSB-CMC), que contenía el caldo diluido 1:2, y modificado con carboximetilcelulosa (sección 1.2.2, Capítulo 1). Los componentes K_2HPO_4 y NaCl se mantuvieron sin cambios, mientras que los componentes glucosa, CMC, peptona de soja y peptona de caseína se evaluaron como cuatro variables independientes. Cada una de estas variables se representó en dos niveles, alto y bajo, que fueron denotados por (+1) y (-1), respectivamente. Los niveles bajos (-1) se definieron como la ausencia de los componentes evaluados. El nivel codificado de cada variable y el diseño factorial experimental con 16 ensayos, se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente. Los cultivos se desarrollaron a 30 °C con agitación orbital a 200 rpm durante 48 h. La respuesta a medir fue la actividad endoglucanasa del extracto crudo de cada cultivo. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Tabla 1. Niveles codificados y experimentales (en g/L) de las variables independientes para el diseño factorial. Los componentes K_2HPO_4 y NaCl del medio se mantuvieron a concentraciones constantes.

Variable independiente	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (+1)
Peptona de soja (A)	0	1,5
Peptona de caseína (B)	0	8,5
Glucosa (C)	0	1,25
CMC (D)	0	10

El análisis de los efectos de cada variable independiente se realizó utilizando el *software* estadístico Minitab® 17 (PA, EE. UU., Minitab Inc.). El ajuste del modelo fue estimado de acuerdo al coeficiente de determinación, R^2 . Se analizaron las variables significativas sobre la base de la prueba F y el valor de p en un nivel de significación del 95 %.

2.2.2 Efecto de CMC y mono y disacáridos en la producción de endoglucanasas

Para la producción de enzimas, se cultivó *Bacillus* sp. AR03 en matraces de 125 mL que contenían 20 mL de medio de cultivo DTSB modificado, compuesto por (en g/L): peptona de caseína 8,5, peptona de soja 1,5, NaCl 2,5 y K_2HPO_4 1,25. El medio se suplementó con diferentes concentraciones de CMC (5, 10, 20, 30, 40 y 60 g/L) y con 1,25 g/L de glucosa. Para preparar el inóculo, los cultivos se desarrollaron en medio DTSB a 30 °C durante 24 h; luego, las células se lavaron dos veces con solución salina (NaCl al 0,9 % p/v) y se resuspendieron ajustando una concentración de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. Dos mL de esta suspensión fue inoculada en los medios de cultivo a evaluar, y las fermentaciones se realizaron en agitadores orbitales a 200 rpm a 30 °C. Las muestras se tomaron cada 48 h durante períodos de hasta 144 h, a menos que se indique lo contrario. Los sobrenadantes de cultivo se recuperaron mediante centrifugación a 4 °C y 8.000 rpm durante 10 minutos, y luego se usaron como fuente de enzimas (cócteles celulolíticos) para las mediciones de actividad.

El efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción enzimática por *Bacillus* sp. AR03 fue ensayado con la suplementación del medio DTSB modificado con los carbohidratos simples: glucosa, sacarosa, maltosa, fructosa y lactosa, en dos concentraciones finales, 2 y 10 g/L, y con 10 g/L de CMC según se indique en cada caso. Los inóculos y las condiciones de cultivo fueron los mismos que se describieron anteriormente. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. El crecimiento se evaluó a través de recuentos de UFC/mL en placas de agar DTSB.

2.2.3 Producción enzimática en un reactor tanque agitado de 1 L en sistema por lote

La producción de enzimas por *Bacillus* sp. AR03 se llevó a cabo en un reactor tanque agitado de 1 L (RTA) en modo de operación por lote (New Brunswick Scientific, Discovery, Serie 100, Reino Unido), utilizando el siguiente medio de cultivo (en g/L): sacarosa 10, CMC 10, peptona de caseína 8,5, peptona de soja 1,5, NaCl 2,5 y K_2HPO_4 1,25. El reactor se inoculó con 10 % (v/v) de un inóculo de 10^6 UFC/mL, crecido como se indicó en 2.2.2. Las condiciones de fermentación fueron 30 °C, 200 rpm y 1 vvm (volumen de aire/volumen de medio de cultivo/ minuto) durante 72 h. El crecimiento y la producción de enzimas se midieron diariamente. Las células bacterianas se recogieron después de la fermentación por centrifugación a 8.000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante libre de células (cóctel celulolítico) se almacenó con azida sódica 3 mM a 4 °C para ensayos posteriores.

2.2.4 Actividad endoglucanasa estándar y análisis zimográfico

La actividad de endoglucanasa (CMC_{asa}) se ensayó con carboximetilcelulosa como sustrato y se cuantificó midiendo la liberación de azúcares reductores en la mezcla de reacción. Brevemente, la mezcla de reacción contenía 0,05 mL de una dilución adecuada del cóctel celulolítico y 0,45 mL de solución de CMC al 2,0 % (p/v) en tampón de fosfato sódico 100 mM (pH 6,0). Después de 30 minutos de incubación a 50 °C, los azúcares reductores se cuantificaron usando el método del ácido

dinitrosalicílico (DNS) [15]. Se agregaron 500 μ L del reactivo DNS a la mezcla de reacción y se incubaron a 100 °C durante 10 min; se dejó enfriar y se midió la absorbancia a 540 nm.

Una unidad internacional (UI) de actividad endoglucanasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de azúcares reductores (medidos como glucosa) por mililitro por minuto en las condiciones descritas. Los controles correspondientes (blancos) de la enzima sin sustrato y sustrato sin enzima se realizaron simultáneamente con todos los ensayos enzimáticos; los valores de las muestras se corrigieron con los blancos. Todas las muestras se analizaron por triplicado y se calcularon los valores medios y las desviaciones estándar.

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (ND-PAGE) se realizó en geles al 10 % de acuerdo con Laemmli [16], a voltaje constante (75 V) durante 3 h. Las proteínas se tiñeron con Coomassie Blue, y el peso molecular aparente se estimó usando el marcador HMW-669-66 kDa- (GE Healthcare Life Sciences). Para los perfiles zimográficos, los geles primero se sumergieron en tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 6,0), que contenía CMC al 1 % (p/v), a 30 °C durante 30 min. Luego, se tiñeron con solución Rojo Congo al 0,1 % (p/v). Después de la tinción, los geles se enjuagaron dos o tres veces con NaCl 1 M durante 15 minutos hasta la visualización de bandas claras de actividad enzimática [17].

2.2.5 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad y estabilidad endoglucanasa

La actividad endoglucanasa del extracto crudo de la cepa AR03 se examinó a temperaturas entre 20 y 80 °C utilizando un tampón sustrato como se describe en las condiciones de ensayo estándar (sección 2.2.4). La evaluación del pH óptimo se realizó dentro de un intervalo de pH de 2,2-10,0, empleando los siguientes sistemas de tamponamiento, a concentración final de 100 mM y con el sustrato CMC: glicina-HCl 2,0 % (p/v) (pH 2,2-3,0), Na₂HPO₄- ácido cítrico (pH 4,0-6,0), fosfato de sodio (pH 6,0-7,5), Tris-HCl (pH 7,5-8,8) y glicina-NaOH (pH 8,8-10,6). Las reacciones se realizaron por triplicado a 60 °C.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima se determinó preincubando la enzima (en ausencia de sustrato) a temperaturas entre 20 y 80 °C durante 1 h. La actividad residual se estimó con respecto a las reacciones de control procesadas simultáneamente sin preincubación y tomadas como valor de referencia (100 %). Con el fin de determinar el perfil de estabilidad del pH, se trataron alícuotas de un volumen del cóctel celulolítico con dos volúmenes de acetona y se mantuvieron a -20 °C durante 1 h. Después de centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos, los pellets se resuspendieron usando diferentes tampones y luego se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 h. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo por triplicado a 60 °C y las actividades residuales se refirieron al 100 %, valor de referencia obtenido de una muestra resuspendida en fosfato pH 6,0, ensayada sin preincubación.

2.2.6 Efecto de iones y otros aditivos sobre la actividad endoglucanasa

Se ensayó el efecto de los siguientes iones metálicos sobre la actividad enzimática, a una concentración final de 5 mM en la mezcla de reacción: NaCl, KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 y $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (reactivos para análisis, sin tratamiento adicional). Los ensayos se realizaron bajo las condiciones determinadas como óptimas, 60 °C y pH 6,0. El efecto de Mn^{2+} se evaluó adicionalmente a concentraciones finales de 2, 5 y 10 mM. De manera similar, el efecto de EDTA, dodecil sulfato de sodio (SDS) y Tween 80 se evaluó a una concentración final de 5 mM en la mezcla de reacción, mientras que polietilenglicol (PEG) 4000 se examinó a una concentración final de 0,25 g/L. Se ensayó la tolerancia a sales al aumentar las concentraciones de NaCl en condiciones de ensayo estándar: las concentraciones finales de NaCl fueron de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 M.

Los controles se realizaron simultáneamente con muestras en condiciones idénticas, pero sin las adiciones. Estos últimos se consideraron como valores de referencia del 100 % de la actividad enzimática.

2.2.7 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el *software* Minitab® 17 (PA, EE. UU., Minitab Inc.) mediante análisis de varianza (ANOVA). Todos los resultados se presentan como la media de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar. Las diferencias fueron significativas cuando $p < 0,05$. Las asociaciones entre variables se evaluaron mediante la prueba HSD de Tukey ($p < 0,05$).

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 *Bacillus* sp. AR03: Afiliación taxonómica y morfología

La cepa AR03, aislada de la pila de bagazo de una fábrica de papel en Argentina, se seleccionó por su capacidad de producir CMCasa y por su rápida tasa de crecimiento en comparación con otros *Bacillus* spp. aislados en este trabajo [14]. AR03 es un bacilo móvil formador de esporas, identificado como *Bacillus* sp. AR03 mediante el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, que indicó similitudes aparentes $\geq 99,71$ % con *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* KCTC 13429 (T) (número de acceso AMXN01000021), *Bacillus tequilensis* KCTC 13622 (T) (número de acceso AYT001000043) y *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 (T) (número de acceso ABQL01000001). Esto coloca la cepa AR03 inequívocamente dentro del grupo “subtilis”. Además, *Bacillus* sp. AR03 presentó un patrón de crecimiento de colonias característico que evidencia motilidad, impulsado por flagelos o *swarming*, propiedad distintiva de muchas cepas “salvajes” de *Bacillus* spp. [18] (Fig. 1).

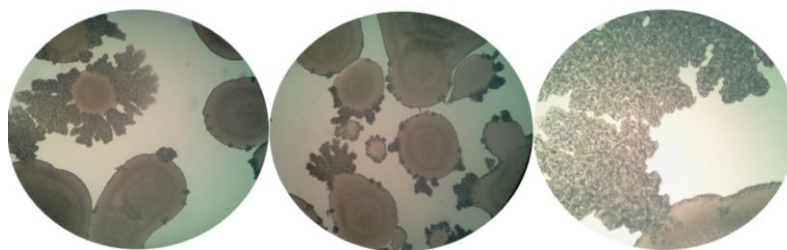


Figura 1. Morfología de colonias de *Bacillus* sp. AR03 en medio sólido (aumentos de 20X y 40X). Puede observarse el característico *swarming* en la periferia de las colonias.

2.3.2 Evaluación de los componentes del medio de cultivo y curva de crecimiento

Debido a que muchos aislamientos bacterianos se originan en una amplia gama de hábitats, pueden variar en la capacidad de crecimiento y en los requerimientos de nutrientes, aún si están muy relacionados taxonómicamente. Para evaluar las condiciones culturales de producción de endoglucanasas por *Bacillus* sp. AR03, se realizó un ensayo basado en el diseño factorial completo que se muestra en Tabla 2, con cuatro variables: peptona de soja, peptona de caseína, glucosa y CMC.

Tabla 2. Matriz del diseño factorial y la respuesta evaluada del estudio de los factores que afectan la producción de endoglucanasas por *Bacillus* sp. AR03.

Corrida	Variables codificadas				Actividad Endoglucanasa [UI/mL]
	A	B	C	D	
1	+1	-1	-1	+1	0,104
2	+1	-1	+1	+1	0,215
3	-1	+1	-1	+1	0,054
4	+1	+1	+1	-1	0,451
5	-1	+1	+1	+1	0,520
6	-1	-1	+1	+1	0,000
7	-1	+1	+1	-1	0,349
8	+1	-1	+1	-1	0,200
9	+1	+1	-1	+1	0,334
10	-1	-1	+1	-1	0,000
11	+1	-1	-1	-1	0,073
12	-1	+1	-1	+1	0,237
13	+1	+1	+1	+1	0,680
14	-1	-1	+1	-1	0,000
15	+1	+1	-1	-1	0,173
16	-1	-1	-1	+1	0,000

La concentración cero de cada variable se utilizó en experimentos preliminares de un factor a la vez (datos no presentados). La producción enzimática registrada varió de 0,00 a 0,68 UI/mL en medios con diferentes composiciones. Su análisis estadístico revela en el Diagrama de Pareto cuáles son los componentes del medio con un efecto significativo en la producción de enzimas (Fig. 2). Se observó que cuatro efectos principales y tres efectos de interacción fueron los términos significativos del modelo, con un 95 % de nivel de confianza con valores $p \leq 0,05$ (Tabla 3). En consecuencia, los componentes del medio que influyeron de manera altamente significativa en la producción enzimática fueron (i) peptona de caseína y (ii) glucosa, seguidos por (iii) peptona de soja, (iv) la interacción entre la peptona de caseína y la glucosa, (v) CMC, y (vi) la interacción entre la peptona de caseína y la CMC.

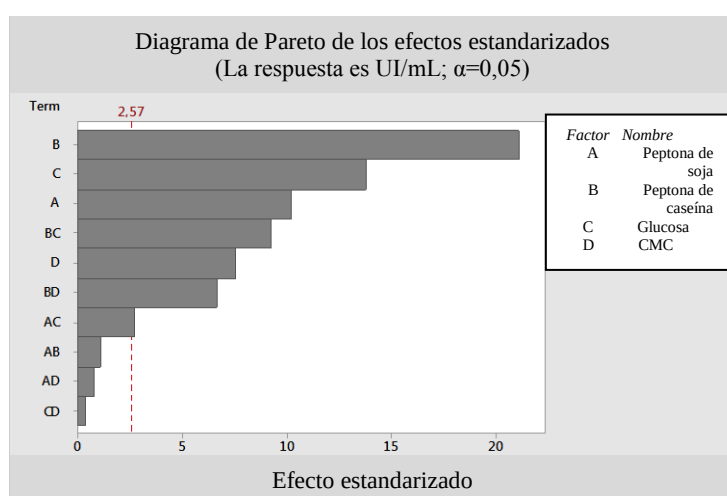


Figura 2. Diagrama de Pareto con los valores de los principales efectos de los componentes del medio que afectaron la producción de CMCasa por *Bacillus* sp. AR03.

El valor de R^2 , que proporciona una estimación de la variabilidad en los valores de respuesta observada de acuerdo a los factores experimentales y sus interacciones, fue de 0,995, lo cual indicó que el modelo podría explicar el 99,5 % de la variabilidad en la respuesta. El valor F de 93,67 % y el valor p del modelo de 0,000 obtenidos indicaron que el modelo de prueba es estadísticamente significativo en el nivel de significación del 95 % para la producción de enzimas (Tabla 3).

Bacillus sp. AR03 fue capaz de utilizar tanto las fuentes de nitrógeno inorgánico como orgánicas para la producción de celulasas; sin embargo, su desarrollo mejoró en medios basados en peptonas (datos no mostrados). Como fue demostrado por otros autores, la peptona es un recurso eficiente para mejorar el crecimiento bacteriano y la producción de enzimas [9, 10]. Además, se consideró que un medio basado en peptonas podría apoyar la producción de endoglucanasa por la cepa AR03 en ausencia de carbohidratos en el medio (Tabla 2, ensayos 11 y 15), lo que podría resultar en una mejora en el crecimiento bacteriano. En relación a estas consideraciones, fue demostrado que la peptona de caseína favoreció la producción de endoglucanasas por *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 [19] y que *Bacillus* sp. BCCS A3 alcanzó la producción máxima de celulasas en un medio que incluye tripteína [8]. También, considerando los beneficios del uso de peptonas, se sugirió que el crecimiento y la

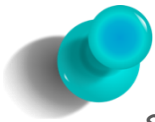
producción de enzimas de algunas especies de *Bacillus* podrían verse afectadas negativamente por la acidificación del medio cuando se usa una fuente de nitrógeno inorgánico, mientras que las peptonas otorgan capacidad bufferante al medio de cultivo [20].

Tabla 3. Resultados del análisis estadístico del diseño factorial en la producción de endoglucanasas por *Bacillus* sp. AR03

Fuente	Efecto	Coefficientes *	Valor <i>F</i>	Valor <i>p</i>
Constante		0,21183		0,000
Peptona de soja	0,13366	0,06683	104,72	0,000
Peptona de caseína	0,27573	0,13786	445,62	0,000
Glucosa	0,18004	0,09002	189,99	0,000
CMC	0,09867	0,04934	57,07	0,001
Peptona de soja * Peptona de caseína	-0,01427	-0,00713	1,19	0,325
Peptona de soja *Glucosa	0,03557	0,01779	7,42	0,042
Peptona de soja *CMC	0,01024	0,00512	0,62	0,468
Peptona de caseína *Glucose	0,12064	0,06032	85,3	0,000
Peptona de caseína *CMC	0,08723	0,04362	44,6	0,001
Glucosa*CMC	0,0051	0,00255	0,15	0,712
Modelo			93,67	0,000

* para variables codificadas

Nota: $R^2 = 99,47 \%$ $R^2(\text{adj}) = 98,41 \%$

 Como punto de partida para evaluar y mejorar la producción de enzimas por *Bacillus* sp. ARO3, se utilizó la composición del medio DTSB suplementado con CMC para estudiar los componentes del medio de cultivo aplicando un diseño factorial. Entre éstos, la mayor influencia sobre la producción enzimática fue ejercida por peptona (de soja y de caseína) y glucosa.

La curva de crecimiento de la cepa AR03 en el medio de producción DTS+CMC 1 % se muestra en la Figura 3. Entre las 7 y 11 h de cultivo se observó una diauxia en la curva de crecimiento, probablemente debido al cambio del consumo de la fuente de carbono, de glucosa a CMC. Esta fase de retardo diáuxico observada en las condiciones ensayadas, determinó dos fases de crecimiento exponencial con las velocidades específicas de crecimiento $\mu_1 = 2,06$ [1/h], para el intervalo de consumo de glucosa (de 4 a 7 h), y $\mu_2 = 1,19$ [1/h] correspondiente al consumo de CMC (entre las 11 y 15 h de cultivo). Puede observarse que el estado estacionario se alcanza a partir de las 15 h de incubación, con valores de D.O._{600nm} de 5,0 unidades.

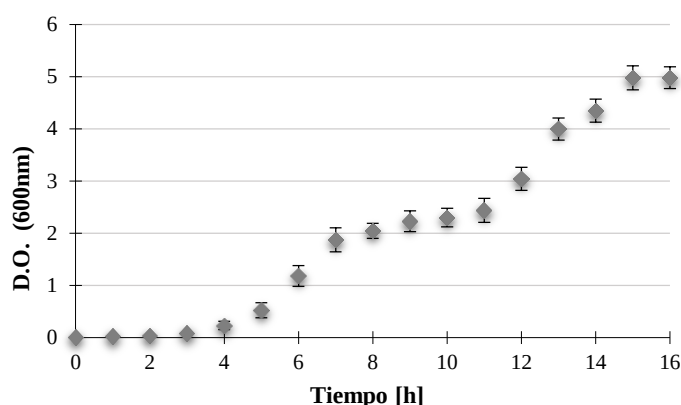


Figura 3. Curva de crecimiento de *Bacillus* sp. AR03 en medio DTSB+CMC 1 %, a 30 °C y 200 rpm.

2.3.3 Efecto de CMC y mono y disacáridos en la producción de endoglucanasas

La presencia del sustrato CMC en el medio de cultivo promueve la producción de celulasas y aunque la mayoría de las investigaciones han analizado el uso de concentraciones de CMC cercanas al 1 % (p/v) [2, 8], algunos autores examinaron el efecto de concentraciones elevadas de CMC. *Bacillus* sp. MTCC 10046 alcanzó una producción óptima de celulasa con 8 % (p/v) CMC [13], mientras que *Microbacterium* sp. Z5 la obtuvo con 3 % (p/v) de CMC a los 10 días de cultivo [6].

El presente estudio evaluó concentraciones de CMC entre 0,0 y 6,0 % (p/v), extendiendo el período de fermentación a 144 h para compensar un posible crecimiento lento debido a la alta viscosidad del medio. Se observó que la viscosidad inicial disminuyó fuertemente después de 24 h de cultivo, y no impidió el crecimiento bacteriano ni la producción de enzimas. Los cultivos alcanzaron una $DO_{600nm} \approx 2,0$ unidades a una concentración de CMC entre 0,0 y 1,0 %, mientras que la formación de biomasa (DO_{600nm}) alcanzó 4 y 6 unidades cuando se utilizó CMC en concentraciones de 2,0 a 6,0 % (datos no mostrados). Todas las condiciones ensayadas alcanzaron la producción máxima de enzimas a las 144 h de cultivo, con la excepción de los medios que contenían CMC al 3,0 %, que lograron esta condición a las 48 h. Sin embargo, los títulos de enzimas obtenidos para cada concentración de CMC mostraron diferencias significativas a 48 y 144 h en el caso de los medios que contenían 2,0 a 6,0 % de CMC (Fig. 4). Cuando se consideró la producción máxima de enzimas para todas las concentraciones de CMC evaluadas, no se observaron diferencias significativas entre las condiciones de cultivo correspondientes a 0,0 y 0,5 % de CMC, ni entre los cultivos con 3,0 y 4,0 % de CMC, según la prueba de Tukey. Además, la adición del 6,0 % de CMC presentó una producción máxima de endoglucanasas que fue 3,17 veces la actividad enzimática del medio sin CMC y suplementado solo con 1,25 g/L de glucosa como carbohidrato (Fig. 4). Este valor fue de 1,30 UI/mL después de 144 h de cultivo. Teniendo en cuenta la relación entre la concentración de sustrato y el período de fermentación, el uso de CMC adicionado al medio DTSB en concentración de 3,0 % (p/v), condujo a la producción de 1,01 UI/mL de celulasas después de 48 h de cultivo, por lo que se consideró el más favorable en estos ensayos (Fig. 4).

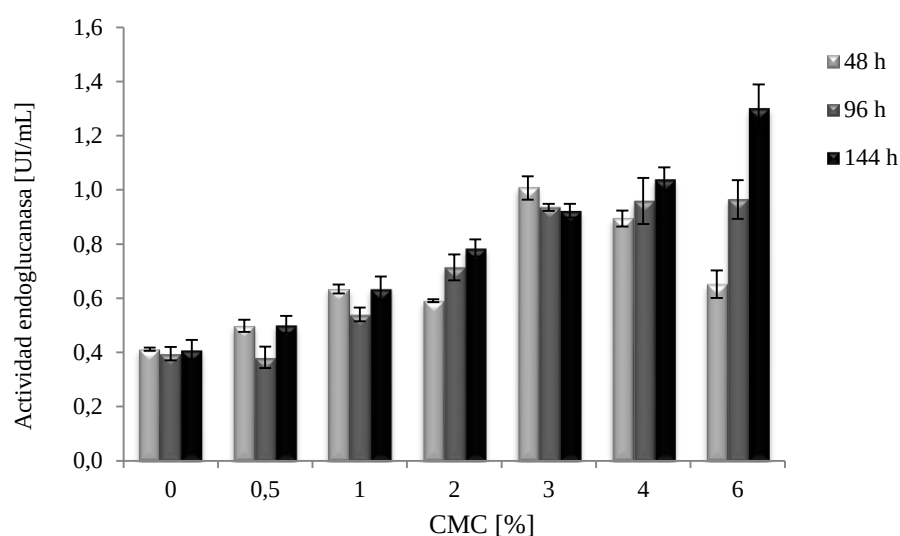


Figura 4. La actividad endoglucanasa del cóctel enzimático producido por *Bacillus* sp. AR03 en presencia de concentraciones crecientes de CMC. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de tres ensayos independientes.

A continuación, se realizó un estudio de fuentes de carbono simples, mono y disacáridos, para evaluar su influencia en la producción de endoglucanasa por *Bacillus* sp. AR03. Se observó que la cepa AR03 fue capaz de crecer y de mejorar significativamente la producción de endoglucanasas en todas las condiciones examinadas, particularmente mediante el uso de sacarosa, fructosa y glucosa. La Fig. 5 muestra que la adición de 10 g/L de sacarosa + 10 g/L de CMC al caldo a base de peptona produjo un título de enzima máximo de $2,93 \pm 0,01$ UI/mL, lo que lleva a un aumento de 21,6 veces de la producción de celulasas con respecto al medio base con peptona como nutriente principal y un aumento de 1,6 veces con respecto a la adición sólo de sacarosa. La presencia de 10 g/L de fructosa + 10 g/L de CMC proporcionó un título de endoglucanasa de $2,41 \pm 0,06$ UI/mL, 17,7 veces sobre el medio base de peptona. El medio que solo contenía 10 g/L de glucosa produjo $2,32 \pm 0,03$ UI/mL, lo que significa un aumento de 17,1 veces con respecto al medio basado en peptonas, mientras que 10 g/L de glucosa + CMC alcanzó $2,1 \pm 0,02$ UI/mL de actividad enzimática, traducido en un incremento de 15,4 veces. En la mayoría de las condiciones analizadas, la CMC produjo un efecto sinérgico cuando se combinó con azúcares simples. La producción de endoglucanasas por la cepa AR03 se mejoró 1,1 y 2,9 veces con 10 g/L de maltosa + 10 g/L de CMC y 2 g/L de fructosa + 10 g/L de CMC, respectivamente. Sin embargo, el efecto potenciador de la producción enzimática por CMC no se observó en los medios complementados con glucosa de 2 y 10 g/L, 2 g/L de sacarosa y 10 g/L de maltosa.

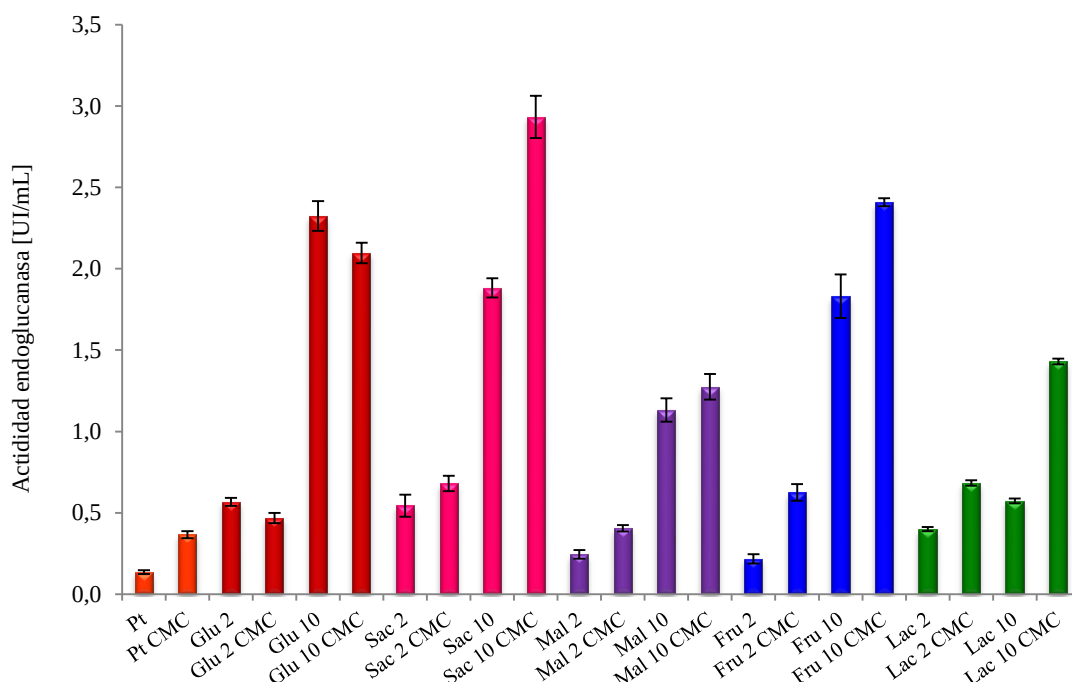


Figura 5. Efecto en la producción de endoglucanasa por *Bacillus* sp. AR03 de diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo. Los datos se obtuvieron después de 96 h de incubación a 30 °C y 200 rpm. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de tres experimentos independientes. Pt: peptona de caseína. Glu: glucosa. Sac: sacarosa. Mal: maltosa. Fru: fructosa Lac: lactosa

Estas observaciones confirman que la presencia de diferentes carbohidratos en combinación con peptona afecta fuertemente la producción del cóctel celulolítico por *Bacillus* sp. AR03. El uso de azúcares simples para la producción de CMCase fue reportado por Bano y colaboradores [10], quienes describieron que la producción de endoglucanasa por *B. subtilis* KIBGE HAS resultó favorecida cuando el bagazo de caña de azúcar se complementó con lactosa, xilosa, maltosa y sacarosa, mientras que la celobiosa y la fructosa restringieron la producción de enzimas. Asimismo, la lactosa como única fuente de carbono promovió la producción de celulasa en *Bacillus* sp. K1 [20] y en *Microbacterium* sp. Z5. En el último caso, también se observó un efecto sinérgico en la producción de celulasas en presencia de lactosa y CMC en el medio de cultivo, aunque la evaluación individual de componentes lactosa, D-galactosa y D-glucosa, no produjo efecto significativo sobre la producción de CMCase por la cepa Z5 [6]. La utilización de lactosa como subproducto de la industria láctea puede ser explorada como sustrato potencialmente rentable. El efecto de los azúcares simples en la producción de celulasas ha sido observado en bacterias y hongos, y se ha planteado la hipótesis de que la captación de lactosa y el efecto sobre la producción de CMCase podrían explicarse por mecanismos descritos en hongos [6, 20, 21].

Es importante tener en cuenta que el sustrato puede ser dependiente de la cepa productora y estar relacionado con el nicho original de un aislamiento en particular. Por lo tanto, los sustratos siempre

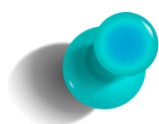
deben ser examinados, incluso para aislamientos estrechamente relacionados. Debido a que *Bacillus* sp. AR03 se aisló de los procesos industriales asociados a la caña de azúcar, no es sorprendente que la sacarosa, la glucosa y la fructosa fueran sustratos adecuados para esta cepa. Por otro lado, se deben realizar análisis más profundos para explicar la inducción y la regulación genética.



Los resultados obtenidos indican que los azúcares simples son una fuente de carbono viable para simplificar e incluso economizar en los procesos de fermentación para la producción de celulasas. Aunque los jarabes azucarados son relativamente costosos, el uso de sustratos solubles en sistemas de reactor tanque agitado favorece tanto las condiciones operativas de cultivo como la posterior separación del producto.

2.3.4 Producción enzimática en 1 L-RTA en operación por lote

Todos los ensayos para mejorar la producción de enzimas por *Bacillus* sp. AR03 se realizaron en frasco agitado y en períodos de fermentación que oscilaron entre 48 y 144 h. Se obtuvieron valores máximos de celulasas combinando 10 g/L de sacarosa + 10 g/L de CMC en el caldo a base de peptona después de 96 h de cultivo (Fig. 5). La utilización de un RTA de 1 L en operación por lotes permitió reducir significativamente el período de producción enzimática de la cepa AR03, probablemente debido a una mejor transferencia de nutrientes ofrecida por el sistema de fermentación sumergido. El inóculo, 10 % del volumen del reactor, estaba compuesto por una suspensión celular de $\sim 10^6$ UFC/mL. Las condiciones operacionales fueron temperatura controlada a 30 °C, pH libre y aireación de 1 vvm. La cepa alcanzó una producción enzimática de $3,12 \pm 0,04$ UI/mL y una concentración celular de 10^9 UFC/mL después de 48 h de incubación, resultados que no se modificaron significativamente después de 72 h. En términos de productividad, estos resultados implicaron un incremento de 30,2 mUI/mL.h a las 96 h en frasco agitado a alcanzar 66,7 mUI/mL.h a las 48 h en 1 L-RTA, lo cual puede tener un impacto significativo en los costos potenciales [22].



*La utilización de diferentes fuentes de carbono en forma individual y combinada permitió incrementar la producción de celulasas por *Bacillus* sp. AR03 entre 17 y 21 veces con respecto a las condiciones de cultivo de partida. Adicionalmente, la realización de la producción enzimática en 1 L-RTA en operación por lote permitió reducir significativamente (30 %) los tiempos de fermentación.*

2.3.5 Efecto de la temperatura y el pH en la actividad endoglucanasa y su estabilidad

Se ensayó la actividad del cóctel celulolítico de *Bacillus* sp. AR03 en un rango de temperaturas entre 0 y 80 °C. La temperatura óptima de las endoglucanasas fue de 60 °C y la actividad disminuyó a temperaturas superiores (Fig. 6a). Más del 61 % de la actividad enzimática máxima se mantuvo entre 40 y 70 °C. El valor de temperatura óptima del cóctel celulolítico de *Bacillus* sp. AR03 fue comparable a los observados para *Bacillus* sp.M-9 [23], *Bacillus pumilus* S124A [2] y *Bacillus* sp. C1 [13]. Además, la actividad máxima de endoglucanasa se encontró a pH 6,0, y la enzima retuvo casi el 60 % de su actividad dentro de un rango de pH de 5,0-7,0 (Fig. 6b). Este óptimo de pH fue similar al encontrado en *Bacillus* sp. BG-CS10 [24], en *B. pumilus* S124A, y en *Bacillus* sp. K1 [20].

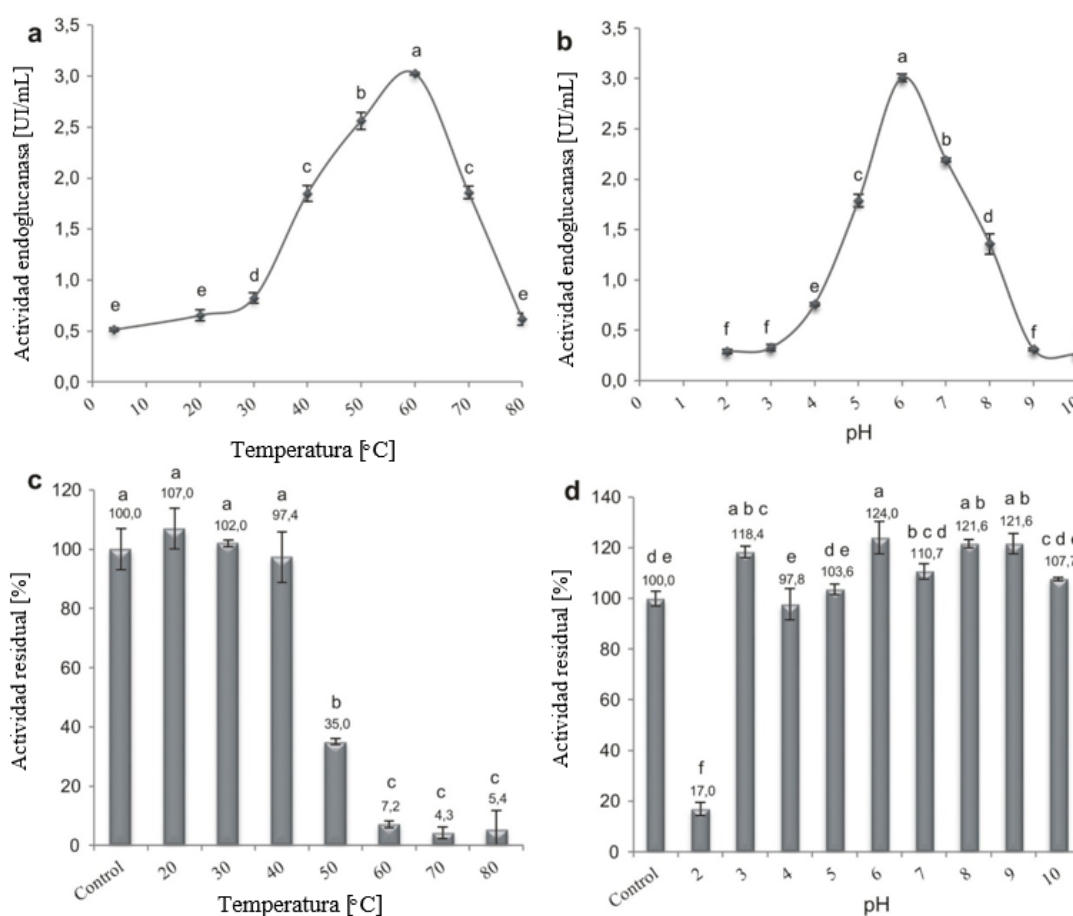


Figura 6. Efecto de (a) la temperatura y (b) del pH sobre la actividad enzimática del cóctel celulolítico de *Bacillus* sp. AR03. Se muestra la estabilidad enzimática a (c) diferentes temperaturas y a (d) diferentes valores de pH. La actividad residual para los ensayos de estabilidad se estimó utilizando como control una reacción sin preincubación (60 °C y pH 6), que se analizó simultáneamente y se tomó como 100 %. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de tres experimentos independientes. Letras similares no son significativamente diferentes entre sí (prueba de Tukey, $p < 0,05$)

El perfil de estabilidad térmica del cóctel celulolítico de *Bacillus* sp. AR03 mostró una preservación total de la actividad cuando las muestras se mantuvieron a 20, 30 y 40 °C durante una hora antes de los

ensayos enzimáticos. La actividad enzimática disminuyó considerablemente a temperaturas de preincubación más altas, y se perdió casi por completo después de pretratamientos entre 60 y 80 °C (Fig. 6c). Sin embargo, el cóctel enzimático fue notablemente estable a pH entre 3,0 y 10,0 (Figura 6d). Muchas endoglucanasas de especies de *Bacillus* son, con frecuencia, estables en un amplio rango de pH como se observó para el cóctel celulolítico de la cepa AR03. Una carboximetilcelulasa purificada a partir de *B. pumilus* S124A mostró ser estable dentro de un rango de pH entre 4,0 y 8,0 [2], mientras que la actividad endoglucanasa producida por *B. subtilis* KIBGE HA conservó casi el 70 % de su actividad máxima en un intervalo de pH entre 3,0 y 8,0 [10].

2.3.6 Efecto de iones y otros aditivos en la actividad endoglucanasa

La adición de los iones metálicos Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} a la mezcla de reacción no mostró un efecto sustancial sobre la actividad celulolítica del extracto enzimático de *Bacillus* sp. AR03, mientras que Mg^{2+} mejoró ligeramente la misma. La presencia de Cu^{2+} tuvo un efecto inhibitorio, reteniendo una actividad relativa de $70,5 \pm 7,5$ %. La actividad endoglucanasa fue fuertemente estimulada por Mn^{2+} y Co^{2+} , alcanzando actividades relativas de $229,4 \pm 6,4$ % y $183,7 \pm 7,2$ %, respectivamente (Fig. 7a). La sal de manganeso se examinó más detalladamente en concentraciones finales de 2, 5 y 10 mM. Los resultados que se muestran en la Fig. 7b indican que los aumentos de la concentración de Mn^{2+} elevaron la actividad enzimática relativa hasta $246,7 \pm 11,5$ % con respecto al control, donde el manganeso estaba ausente. Resultados similares se han descrito para endoglucanasas de *Streptomyces misionensis* PESB-25 que alcanzó actividades relativas de 161,2 y 201,5 % en presencia de Co^{2+} y Mn^{2+} (2 mM), respectivamente [29]. Además, se observó un efecto positivo sobre carboximetilcelulasas de *Bacillus mycoides* S122C y *B. pumilus* S124A con Mn^{2+} y Co^{2+} ; sin embargo, las actividades enzimáticas informadas fueron similares a sus respectivos controles [2, 30]. La actividad celulolítica de un *Bacillus* spp. se mejoró (124 %) en presencia de Mn^{2+} 5 mM [31]. De

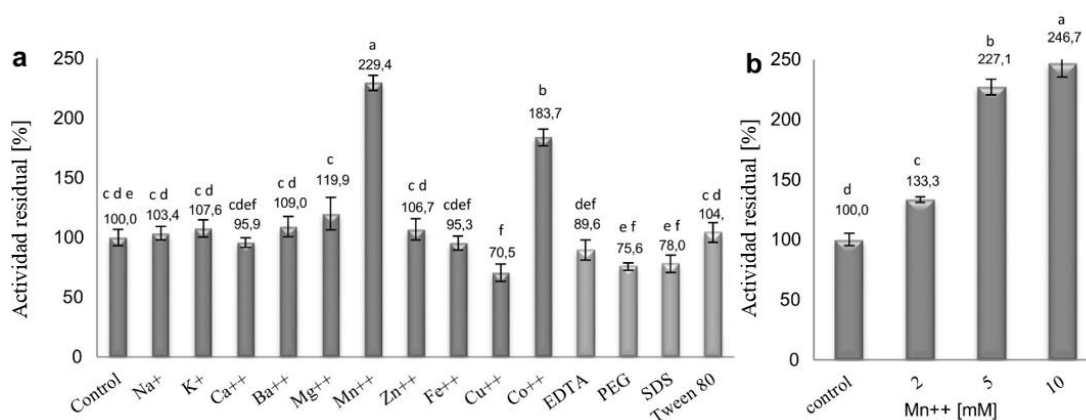


Figura 7. (a) Efecto de diferentes iones metálicos, inhibidores y tensioactivos en el cóctel celulolítico. La actividad enzimática se midió a 60 °C y pH 6 en presencia de iones metálicos, EDTA, SDS y Tween 80 a una concentración final de 5 mM, y de PEG 4000 a 0,25 g/L. **(b)** Efecto de concentraciones crecientes de Mn^{2+} en la actividad endoglucanasa. El control,

considerado como 100 % de actividad enzimática, se ejecutó simultáneamente bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de suplementos. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de tres experimentos independientes. Letras similares no son significativamente diferentes entre sí (prueba de Tukey, $p < 0,05$).

manera similar, Gaur y Tiwari [28] informaron la activación enzimática después de la adición de Ca^{2+} y Mg^{2+} (10 mM) a la mezcla de reacción de una celulasa termoestable purificada de *Bacillus vallismortis* RG-07. Sin embargo, el manganeso produjo una reducción en esta actividad enzimática de 76,9 y 61,9 % en presencia de Mn^{2+} 5 y 10 mM, respectivamente, mientras que no se evaluó el cobalto. En contraste, Zn^{2+} y Mn^{2+} (10 mM) redujeron fuertemente la actividad de CMCasa de *Bacillus* sp. C1 [13], mientras que el manganeso también produjo un efecto negativo en las celulasas producidas por *B. amyloliquefaciens* DL-3 [19] y en las xilanasas de *Bacillus halodurans* S7 [32].

Los iones metálicos pueden requerirse como cofactores para la actividad enzimática o como componentes del complejo enzimático. También se ha informado que aumentan la unión del sustrato y la estabilidad del sitio catalítico [13, 28]. Es importante señalar que los residuos agroindustriales contienen numerosas impurezas, como iones metálicos, que pueden inhibir la actividad enzimática. Por lo tanto, la tolerancia del cóctel enzimático de *Bacillus* sp. AR03 a diferentes iones metálicos es una característica de interés para aplicaciones de biorefinería.

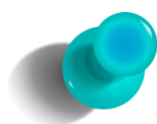
La estructura y función de la proteína podrían verse afectadas negativamente por altas concentraciones de NaCl, lo que es particularmente importante para las proteínas provenientes de microorganismos no tolerantes a sales [33]. La evaluación de concentraciones crecientes de NaCl sobre las endoglucanasas de AR03 mostró que la actividad enzimática no fue afectada en presencia de NaCl 0,1 M y retuvo más del 60 % de la actividad en ensayos que contenían NaCl hasta 2 M (Tabla 5).

NaCl [M]	Actividad
0	100,0 $\pm$ 1,1
0,1	100,2 $\pm$ 4,8
0,5	81,5 $\pm$ 2,9
1	70,2 $\pm$ 1,3
1,5	62,2 $\pm$ 1,7
2	61,6 $\pm$ 2,8

Tabla 5. Efecto del aumento de la concentración de NaCl en el cóctel celulolítico de *Bacillus* sp. AR03. Las reacciones enzimáticas se realizaron a 60 °C durante 30 min. El valor de referencia, sin NaCl, representa el 100%. Los resultados se representan mediante los valores medios $\pm$ desviación estándar de tres ensayos independientes.

Finalmente, las enzimas celulolíticas de *Bacillus* sp. AR03 no fueron afectados por la adición de Tween 80, mientras que se observaron efectos moderados sobre las mismas después de la adición de EDTA (89,6 $\pm$ 8,5 %), SDS (78,0 $\pm$ 7,3 %) y PEG 4000 (75,6 $\pm$ 3,1 %) (Fig. 7a). Todas estas

propiedades son indicativas del potencial tecnológico de las enzimas producidas por *Bacillus* sp. AR03, y constituyen el punto de partida para su evaluación sobre sustratos de origen agroindustrial.



Las enzimas extracelulares producidas por *Bacillus* sp. AR03 mostraron actividad hidrolítica sobre carbohidratos complejos presentes en la biomasa vegetal, con valores óptimos de actividad y estabilidad en rangos de temperatura moderados y de pH ligeramente ácido.

2.3.7 Análisis de Nativo-PAGE y zimograma

El extracto celulolítico de la cepa AR03 se sometió a PAGE nativa, y la tinción con Coomassie Blue reveló múltiples bandas en un rango de 50 a 500 kDa para el sistema electroforético usado. Por otro lado, el análisis zimográfico reveló tres bandas con actividad de celulasa con una masa molecular de alrededor de 286, 208 y 157 kDa (Fig. 8). El perfil zimográfico de otros *Bacillus* spp. celulolíticos presentó proteínas de alto PM. Singh y colaboradores [25] informaron una carboximetilcelulasa de *Bacillus sphaericus* JS1 con un peso molecular (PM) de 181 kDa, mientras que Shoseyyov y Doi [26] aislaron una celulasa con un PM ≥ 272 kDa de *Clostridium cellulovorans*. En contraste, se describieron diez bandas que oscilaban entre 80 y 216 (PM) con actividad de CMCasa para el sobrenadante del cultivo de *Paenibacillus curdlanolyticus* cepa B-6 después de un análisis zimográfico de PAGE nativa [27].

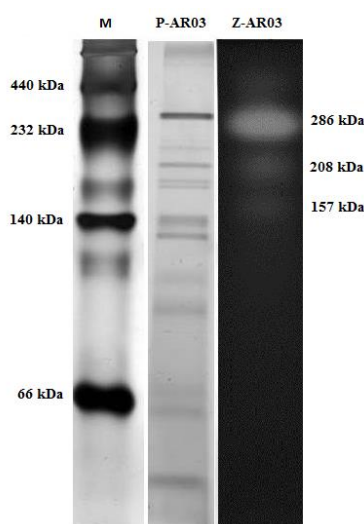


Figura 8. Perfil proteico y zimográfico del cóctel celulolítico de *Bacillus* sp. AR03 desarrollado en 10 % ND-PAGE. Línea M, marcadores de peso molecular; línea P-AR03, proteínas visualizadas mediante tinción con Coomassie Blue; línea Z-AR03; tinción con Rojo Congo para revelar celulasas.

2.4 Conclusiones

En este trabajo se estudió la producción de endoglucanasas por *Bacillus* sp. AR03 mediante un diseño estadístico de los componentes del medio de cultivo. Se demostró que el uso de CMC en concentraciones del 3 % y del 1 % combinado con azúcares simples, permitieron obtener los mayores valores de producción enzimática. La utilización de sustratos solubles puede compensar parte de su costo ya que facilitan las condiciones operativas de cultivo y el *downstream* del bioproceso.

Se realizó la evaluación del cóctel celulolítico de *Bacillus* sp. AR03 en condiciones de proceso aplicables al desarrollo de sistemas biocatalíticos potencialmente eficientes en biotransformaciones, mediante la evaluación de las condiciones de reacción y las propiedades de estabilidad de la actividad de endoglucanasa, demostrando que esta cepa es capaz de producir biocatalizadores potencialmente robustos para aplicaciones de biorrefinería.

Referencias

- [1] Linares-Pastén J. A., Andersson M. & Karlsson E. N. (2014). Thermostable glycoside hydrolases in biorefinery technologies. *Current Biotechnol* 3, 26–44.
- [2] Balasubramanian N. & Simões N. (2014). *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermostable enzyme with a wide substrate spectrum utility. *Int J Biologic Macro* 67, 132–39.
- [3] Rastogi G., Bhalla A., Adhikari A., Bischoff K. M., *et al.* (2010). Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresour Technol* 101, 8798–06.
- [4] Wang W., Yan L., Cui Z., Gao Y., *et al.* (2011). Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresour Technol* 102, 9321–24.
- [5] Tarayre C., Brognaux A., Bauwens J., Brasseur *et al.* (2014). Isolation of amylolytic, xylanolytic, and cellulolytic microorganisms extracted from the gut of the termite *Reticulitermes santonensis* by means of a micro-aerobic atmosphere. *World J Microbiol Biotechnol* 30, 1655–60.
- [6] Sadhu S., Saha P., Mayilraj S. & Maiti T. K. (2011). Lactose-enhanced cellulase production by *Microbacterium* sp. isolated from fecal matter of zebra (*Equus zebra*). *Current Microbiol* 62, 1050–55.
- [7] Sharma, A., & Satyanarayana, T. (2013). Comparative genomics of *Bacillus* species and its relevance in industrial microbiology. *Genomics Insights* 6, 25–36. doi:[10.4137/GI.S12732](https://doi.org/10.4137/GI.S12732).
- [8] Kazemi A., Rasoul-Amini S., Shahbazi M., Safari A., *et al.* (2014). Isolation, identification, and media optimization of high-level cellulase production by *Bacillus* sp. BCCS A3, in a fermentation system using response surface methodology. *Prep Biochem Biotechnol* 44, 107–18.
- [9] Maki M. L., Idrees A., Leung K. T. & Qin W. (2012). Newly isolated and characterized bacteria with great application potential for decomposition of lignocellulosic biomass. *J Molec Microbiol Biotechnol* 22, 156–66.
- [10] Bano S., Qader S. A. U., Aman A., Syed M. N. *et al.* (2013). High production of cellulose degrading endo-1,4-β-d-glucanase using bagasse as a substrate from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Carbohydr Polym* 91, 300–04.
- [11] Nagar S., Gupta V. K., Kumar D., Kumar L. *et al.* (2010). Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37, 71–83.
- [12] Lee E.J., Lee B.H., Kim B.K. & Lee J.W. (2013). Enhanced production of carboxymethyl cellulase of a marine microorganism, *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A-53 in a pilot-scaled bioreactor by a recombinant *Escherichia coli* JM109/A-53 from rice bran. *Mol Biol Rep* 40, 3609–21.
- [13] Sadhu S., Saha P., Sen S. K., Mayilraj S. *et al.* (2013). Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. *Springerplus* 2, 10. doi:[10.1186/2193-1801-2-10](https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-10).
- [14] Manfredi A. P., Perotti N. I., & Martínez M. A. (2015). Cellulose degrading bacteria isolated from industrial samples and the gut of native insects from Northwest of Argentina. *J Basic Microbiol* 55(12), 1384-93.
- [15] Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426–28.
- [16] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–85.

- [17] Teather R. M. & Wood P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *App Environ Microbiol* 43, 777–80.
- [18] Patrick J. E., & Kearns D. B. (2009). Laboratory strains of *Bacillus subtilis* do not exhibit swarming motility. *J Bacteriol* 191(22), 7129–33.
- [19] Lee Y.J., Kim B.-K., Lee B.H., Jo K.I. *et al.* (2008). Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloqueliciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresour Technol* 99, 378–86.
- [20] Paudel Y. P. & Qin W. (2015). Characterization of novel cellulase-producing bacteria isolated from rotting wood samples. *Appl Bioch Biotechnol*, doi:[10.1007/s12010-015-1806-9](https://doi.org/10.1007/s12010-015-1806-9).
- [21] Karaffa L., Fekete E., Gamauf C., Szentirmai A., *et al.* (2006). D-galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. *Microbiol* 152, 1507–14.
- [22] Gautam S. P., Bundela P. S., Pandey A. K., Khan J. *et al.* (2011). Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnol Res Int* 2011, doi:[10.4061/2011/810425](https://doi.org/10.4061/2011/810425).
- [23] Bajaj B. K., Pangotra H., Wani M. A., Sharma P. *et al.* (2009). Partial purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus* strain M-9. *Indian J Chem Technol* 16, 382–87.
- [24] Zhang G., Li S., Xue Y., Mao L. *et al.* (2012). Effects of salts on activity of halophilic cellulase with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus* sp. BG-CS10. *Extremophiles* 16, 35–43.
- [25] Singh J., Batra N. & Sobti R. C. (2004). Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31, 51–56.
- [26] Shoseyov O., & Doi R. H. (1990). Essential 170-kDa subunit for degradation of crystalline cellulose by *Clostridium cellulovorans* cellulase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 2192–95.
- [27] Waeonukul R., Kyu K. L., Sakka K. & Ratanakhanokchai, K. (2009). Isolation and characterization of a multienzyme complex (cellulosome) of the *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 grown on Avicel under aerobic conditions. *J Biosci Bioeng* 107, 610–14.
- [28] Gaur R. & Tiwari, S. (2015). Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnol* 15, doi:[10.1186/s12896-015-0129-9](https://doi.org/10.1186/s12896-015-0129-9).
- [29] Franco-Cirigliano M. N., Rezende Carvalho R., Pires Gravina-Oliveira M., Freitas Pereira P. H., *et al.* (2013). *Streptomyces misionensis* PESB-25 produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates. *BioMed Res Int* 2013, 1–9.
- [30] Balasubramanian N., Toubarro D., Teixeira M., Simões N. (2012). Purification and biochemical characterization of a novel thermo-stable carboxymethyl cellulase from Azorean isolate *Bacillus mycoides* S122C. *Appl Bioch Biotechnol* 168, 2191–2204.
- [31] Vijayaraghavan P. & Vincent S. G. P. (2012). Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Bacillus* sp. isolated from a paddy field. *Pol J Microbiol*, 61, 51–55.
- [32] Mamo G., Hatti-Kaul R. & Mattiasson B. (2006). A thermostable alkaline active endo- β -1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: purification and characterization. *Enzyme Microb Technol* 39, 1492–98.

[33] Sinha R. & Khare S. K. (2014). Protective role of salt in catalysis and maintaining structure of halophilic proteins against denaturation. *Front Microbiol* 5, 1–6.



Capítulo 3



3.1 Introducción

El etanol celulósico como bioproducto presenta un alto balance energético neto positivo, además de que su ciclo de vida es complementario y no competitivo con las cadenas mundiales de producción de alimentos y piensos. Por ello, es un combustible renovable con potencial de reemplazar los combustibles fósiles. Más importante, puede producirse a partir de residuos agroindustriales y de residuos sólidos municipales, serrín y astillas de madera, materias primas que contienen celulosa, hemicelulosas, lignina y cantidades menores de componentes extractivos de baja masa molar y ceniza [1-4]. Los polisacáridos de la biomasa lignocelulósica pueden hidrolizarse en azúcares para ser convertidos en combustibles, productos químicos y materiales. En este contexto, la producción de etanol celulósico contribuye a generar beneficios sociales a partir de la intensificación de prácticas agroindustriales sostenibles, factor clave en el fortalecimiento de las bases de una nueva economía basada en bioprocesos o bioeconomías [3, 5].

Debido a la alta asociación que existe entre sus tres principales componentes macromoleculares, son necesarios pretratamientos para deconstruir la organización de la pared celular de la lignocelulosa, con el objeto de exponer los polisacáridos a la hidrólisis enzimática [6]. Entre los métodos de pretratamiento disponibles, la explosión por vapor ha sido uno de los más utilizados porque puede ajustarse a diferentes tipos de biomasa, es capaz de producir sustratos con bajo contenido de hemicelulosa, disminuye el grado de polimerización de los glucanos, puede ser operado en alta carga de sólidos y produce sustratos lignificados que son susceptibles a la hidrólisis y la fermentación [7, 8, 6]. En comparación con los métodos de pretratamiento alternativos, las ventajas de la explosión por vapor (EV) incluyen un impacto ambiental significativamente menor, una inversión de capital menor y menos sustancias químicas de proceso peligrosas [9]. Este pretratamiento consiste en calentar la biomasa con vapor saturado, seguido de una descompresión repentina del sistema presurizado; el vapor penetra en el material lignocelulósico y se condensa para formar agua líquida dentro de las fibras. Después de la descompresión repentina, el agua se evapora rápidamente generando literalmente una explosión dentro de las fibras [10, 11]. Por otro lado, la alta temperatura conduce a la hidrólisis de los grupos acetilo y el ácido acético liberado cataliza la hidrólisis de polisacáridos, principalmente hemicelulosas, en un proceso conocido como autohidrólisis [12]. Además, también ocurre una degradación parcial o transformación de lignina [13].

Con el fin de obtener un material accesible a la hidrólisis enzimática y que permita una recuperación adecuada de los componentes de la lignocelulosa, es esencial la realización de un estudio detallado de las condiciones de pretratamiento para diseñar un proceso de explosión por vapor eficiente para cada tipo de material lignocelulósico. Entre los diseños para la optimización de pretratamientos de bagazo y de RAC de caña de azúcar, se han descrito la extracción alcalina fría, la licuefacción hidrotérmica, la extrusión y los pretratamientos ácido y con alcoholatos [14-18]. Se ha demostrado que la utilización de explosión por vapor de bagazo de caña de azúcar ha sido extensamente descrita como un método

eficiente [19-23]. Sin embargo, el pretratamiento y utilización de los residuos de cosecha han sido menos desarrollados, y la literatura está principalmente limitada a ensayos en condiciones de temperatura y tiempo discretos, sin indagar sobre lo que sucede a nivel estructural y molecular y sin optimización de las mismas [2, 24]. Por ello, y considerando la relevancia regional de los residuos de cosecha de la caña de azúcar, este trabajo enfoca el necesario estudio y optimización simultánea de los factores que afectan el pretratamiento, mediante el uso de diseños experimentales estadísticos.

Una vez pretratada, la biomasa es hidrolizada para convertir los carbohidratos en azúcares monoméricos, que pueden ser fermentados por microorganismos, principalmente levaduras. Hacia el desarrollo de un proceso potencialmente rentable, la producción de enzimas y posterior hidrólisis enzimática (HE) son etapas críticas. La hidrólisis requiere de celulasas y actividades enzimáticas complementarias para degradar completamente la estructura compleja de la lignocelulosa, tales como xilanasas y beta-xilosidasas. Es necesario considerar que después del pretratamiento con EV, el sustrato contiene una proporción significativa de hemicelulosa insoluble y xilo-oligómeros solubles, los cuales han mostrado tener un efecto inhibitorio sobre la hidrólisis de celulosa [25]. Es importante tener en cuenta también el efecto de barrera física de la hemicelulosa, lo que limita la accesibilidad de las enzimas a la celulosa [26]. Por lo tanto, el uso de las xilanasas como enzimas accesorias ha mostrado mejorar significativamente la hidrólisis de xilano y de la celulosa, contribuyendo de esta manera a la reducción de las dosis enzimáticas necesarias en la operación [27, 28]. El desarrollo de nuevas formulaciones de cócteles enzimáticos incluye la búsqueda de nuevas enzimas y /o mezclas que permitan reducir la carga enzimática en la conversión de biomasa. Esto ha reeditado la importancia biotecnológica de las xilanasas, e impulsado la necesidad de identificar nuevas y eficientes especies enzimáticas.

El presente capítulo desarrolla aspectos incluidos en los objetivos específicos II y III. El trabajo realizado abarca la optimización de pretratamiento de explosión por vapor de bagazo y de RAC de caña de azúcar por medio de la metodología de Superficie de Respuesta, lo que permitió definir las condiciones requeridas para generar sustratos hidrolizables y fermentables. El material pretratado de acuerdo a condiciones optimizadas, fue posteriormente hidrolizado (sacarificación) utilizando mezclas enzimáticas comerciales con extractos enzimáticos producidos por las cepas *Bacillus* sp. AR03, *Bacillus* sp. AR17 y *Paenibacillus* sp. AR247. El flujo de trabajo que se muestra en la Figura 1, condujo a generar los datos para seleccionar una opción prometedora desde una perspectiva técnica.

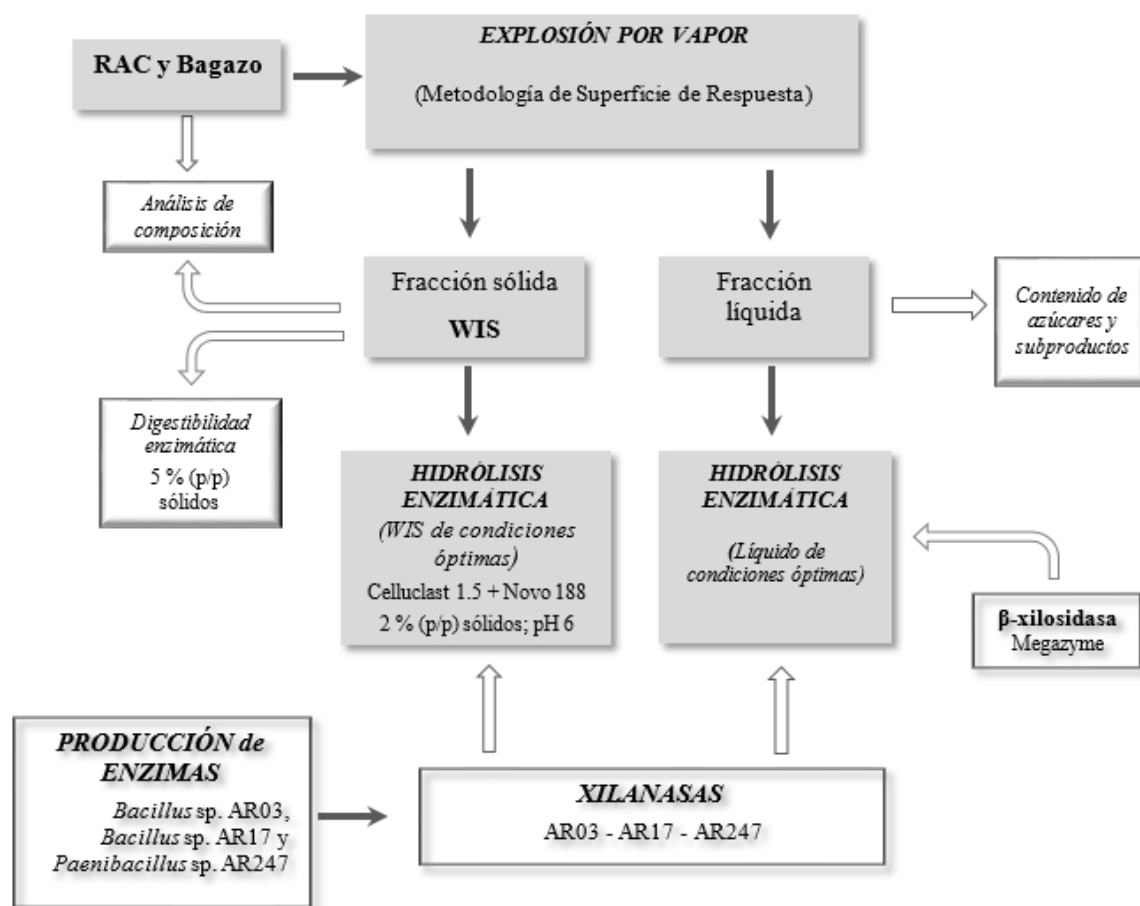


Figura 1. Flujo de trabajo desarrollado para optimizar el pretratamiento de explosión por vapor de material lignocelulósico de relevancia regional y su posterior sacarificación, la cual fue realizada con mezclas enzimáticas definidas con extractos producidos a partir de cepas bacterianas aisladas en este trabajo de Tesis.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materias primas y pretratamiento

Las muestras de bagazo y de residuo agrícola de cosecha (RAC) de caña de azúcar fueron amablemente suministradas por EEAOC (Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres). Ambos materiales se lavaron con agua, se secaron a 40 °C hasta un contenido de humedad próximo al 10 % y se almacenaron en un lugar seco hasta su uso. Para los pretratamientos, el RAC se cortó a un tamaño de partícula de 10-12 cm y el bagazo se utilizó sin modificar.

La explosión por vapor (EV) se llevó a cabo en una unidad de lote equipada con un reactor de 2 L. Se realizó una impregnación con agua remojando 125 g (en base seca) de biomasa en 1,5 L de agua durante la noche. Luego, el líquido en exceso se eliminó por filtración y el contenido de humedad resultante de la materia prima impregnada fue ~ 60 %. El reactor de presión se precalentó a la temperatura establecida de pretratamiento con vapor saturado, y se necesitaron menos de 60 segundos para que el material alcanzara la misma; luego, se inició el conteo de tiempo. El material explotado se recuperó en un ciclón conectado a la salida del reactor, se enfrió a aproximadamente 40 °C y se filtró para recuperar tanto la fracción líquida como la sólida. Las fracciones sólidas (sólidos insolubles en agua, WIS por sus siglas en inglés) se lavaron con 5 L de agua destilada para eliminar el prehidrolizado restante y se almacenaron húmedas en bolsas de plástico a 4 °C hasta su posterior procesamiento. Se analizaron la composición de los WIS y se utilizaron como sustratos en las pruebas de digestibilidad enzimática. Las fracciones líquidas se analizaron para determinar azúcares, ácido acético, compuestos fenólicos y productos de degradación de azúcares como ácido fórmico, furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF).

La severidad de los pretratamientos se expresó en términos del factor de severidad (FS), que permite una interpretación generalizada de los efectos causados por la temperatura y el tiempo. Se define de acuerdo a Lavoie *et al.* [29]:

$$FS = \log [t * \exp(\frac{T-T_{ref}}{14,75})] \quad \text{Ec. (1)}$$

donde T representa la temperatura en °C, T_{ref} es la temperatura de referencia, usualmente 100 °C, y t es el tiempo en min.

3.2.2 Diseño estadístico de experimentos

Las biomasas lignocelulósicas fueron pretratadas en diferentes condiciones operacionales de acuerdo con un diseño central compuesto (DCC) rotatable ($\alpha = 1,6818$), que incluyó tres repeticiones en el centro del dominio seleccionado para cada factor en estudio. Esto implicó un total de 11 ensayos para cada materia prima, que fueron realizados en orden aleatorio. Las condiciones de temperatura y tiempo ensayadas (variables independientes o factores), fueron 185-215 °C y 5-15 min para el caso del bagazo y 180-200 °C y 10-20 min para el RAC. Los datos experimentales se analizaron mediante metodología

de superficie de respuesta mediante el *software* estadístico Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc.), para describir el efecto de la temperatura y del tiempo de los pretratamientos sobre la composición y digestibilidad enzimática de las biomásas lignocelulósicas. Los resultados generados fueron analizados aplicando el método con el mismo *software*, y se optimizaron las condiciones de temperatura y tiempo del pretratamiento de cada biomasa para obtener simultáneamente un máximo de rendimiento global de glucosa y xilosa. Finalmente, se realizaron los ensayos en las condiciones optimizadas y las fracciones líquida y sólida fueron procesadas como se describe a continuación.

3.2.3 Caracterización de los pretratamientos

Después de los pretratamientos, las fracciones WIS lavadas se secaron a 45 °C y se molieron a un tamaño de partícula de 1 mm para el análisis de la composición. El contenido de humedad y la composición química se analizaron según los métodos que se describen en la sección 3.2.8. Los valores de recuperación de sólidos (RS) se estimaron como el peso seco de WIS restante después del pretratamiento referido a 100 g de materia prima (b.s.). La recuperación de celulosa, hemicelulosa y lignina en el WIS se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Recuperación de componente (\%)} = \frac{\text{g del componente en 100 g de WIS}}{\text{g del componente en 100 g de materia prima}} \times RS \times 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

El contenido de azúcares (xilosa, glucosa, arabinosa, manosa y galactosa) de las fracciones líquidas se determinó mediante HPLC antes y después de una hidrólisis ácida realizada con ácido sulfúrico (3 %, p/p) a 121 ° C durante 30 min. La recuperación de azúcares en las fracciones líquidas se estimó de acuerdo a:

$$\text{Recuperación de azúcar en líquido (\%)} = \frac{\text{g de azúcar en fracción líquida}}{\text{g de azúcar en materia prima}} \times 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

Los ensayos de hidrólisis enzimática estándar se llevaron a cabo usando WIS húmedo al 5 % (p/p) de carga sólida total y una mezcla de la siguiente preparación enzimática: 15 UPF/g sustrato de celulasas (Celluclast 1.5 L, Sigma-Aldrich) y 15 UI/g sustrato de β -D-glucosidasa (Novozym 188, Sigma-Aldrich). La hidrólisis enzimática (HE) se realizó en tampón de citrato sódico 0,05 M (pH 4,8), a 50 °C y 150 rpm en un volumen de 20 mL, usando matraces Erlenmeyer de 100 mL. A las 72 h, las enzimas se inactivaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y los sobrenadantes se recuperaron por centrifugación a 10.000 g para determinar el contenido de azúcares por HPLC. Los blancos de las mezclas enzimáticas se procesaron simultáneamente. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se utilizaron como controles las hidrólisis de las materias primas no tratadas.

El rendimiento de hidrólisis enzimática (YHE) se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$YHE (\%) = \frac{\text{contenido de glucosa (o xilosa) liberado durante la hidrólisis enzimática}}{\text{contenido potencial de glucosa (o xilosa) en WIS}} \times 100 \quad \text{Ec. (4)}$$

donde el potencial de glucosa en el WIS se consideró como contenido total de glucosa en el sólido pretratado.

Se define rendimiento global (OY, por sus siglas en inglés, *overall yield*) de glucosa (xilosa) como la cantidad de glucosa (xilosa) liberada tanto en el pretratamiento (en la fracción líquida) como en la hidrólisis enzimática estándar, referida a la cantidad de azúcar en la materia prima, expresada en porcentaje. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento global glucosa (\%)} = \frac{\frac{\text{g glu en HE}}{\text{g WIS (b.s.)}} \times RS + \frac{\text{g glu en fracción líquida}}{\text{g materia prima (b.s.)}}}{\text{g glu en 100 g materia prima}} \times 100 \quad \text{Ec. (5)}$$

Los sólidos obtenidos de los pretratamientos en las condiciones óptimas se secaron al vacío y se revistieron con partículas de oro usando un revestidor por pulverización catódica para observación por microscopía electrónica de barrido (MEB) usando un ZEISS Supra 40VP (CIME, Argentina).

3.2.4 Producción y cuantificación de extractos crudos para sacarificación

Se utilizaron los extractos crudos de *Bacillus* sp. AR03, *Bacillus* sp. AR17 y *Paenibacillus* sp. AR247 para hidrolizar las biomásas pretratadas. Para ello, la producción enzimática de cada cepa se llevó a cabo en un reactor tanque agitado de 1 L operado en lote (Biostat B plus, Sartorius, Alemania), con un inóculo del 10 % (v/v) a 30 °C, 200 rpm y 1 vvm de aire. La producción de *Bacillus* sp. AR03 se realizó durante 72 h en el medio de cultivo compuesto por (en g/L): sacarosa 10, CMC 10, peptona de caseína 8,5, peptona de soja 1,5, NaCl 2,5 y K₂HPO₄ 1,25. Los extractos enzimáticos de *Bacillus* sp. AR17 y *Paenibacillus* sp. AR247 se cosecharon luego de 5 días de fermentación en el siguiente medio (en g/L): Na₂HPO₄ 0,35, KH₂PO₄ 0,10, (NH₄)₂SO₄ 0,50, MgCl₂·6H₂O 0,5, NaNO₃ 0,10, CaCl₂ 0,30, extracto de levadura 0,10, xilano de abedul 5 [30]. El crecimiento y la producción de enzimas se evaluaron diariamente. El caldo conteniendo las enzimas extracelulares (extracto crudo) fue separado por centrifugación a 8.000 rpm durante 30 min a 4 °C; las proteínas se precipitaron con solventes orgánicos (etanol 2:1; acetona 1:1), y posteriormente resuspendidas en solución tampón fosfato pH 6 (100 mM) para ser finalmente liofilizadas. Este procedimiento permitió conservar las proteínas y también facilitó la concentración de las mismas, ya que se resuspendieron en tampón fosfato pH 6 (100 mM) en volumen final para obtener una concentración de 5 o de 10 veces. Se cuantificaron la actividad endoglucanasa, xilanolítica y el contenido de proteínas de cada extracto crudo concentrado. Estos extractos concentrados fueron utilizados para la sacarificación de las biomásas pretratadas, como se describe en las próximas secciones. La actividad xilanolítica se determinó siguiendo el método descrito en la sección 1.2.4. La determinación de proteínas se realizó siguiendo el método del ácido bicinconínico (BCA), usando el reactivo BCATM Protein Assay Kit (Pierce) y como estándar albúmina de suero bovino (0,125-2,000 mg/mL). Todas las muestras se analizaron por triplicado y se calcularon los valores medios y la desviación estándar.

3.2.5 Ensayos de sacarificación de las fracciones líquidas

Las fracciones líquidas obtenidas en condiciones de pretratamiento óptimas fueron llevadas a pH 6 con NaOH 5 N. El líquido resultante se mezcló con una solución tampón fosfato-citrato 10X (1M) en una relación 9:1, para obtener muestras tamponadas a pH 6 (100 mM). En tales condiciones se realizaron las reacciones de hidrólisis enzimática para liberar monómeros con los extractos crudos concentrados de *Bacillus* sp. AR03, *Bacillus* sp. AR17 y *Paenibacillus* sp. AR247.

Las reacciones de sacarificación se llevaron a cabo durante 30, 60, 90 min y 6 h. Para ello, 800 μ L de reacción en microtubos de 2 mL se agitaron en termomixer a 800 rpm a 50 °C. La mezcla de reacción contenía (por mL de reacción) 3, 6, 9 UI xilanasas (AR03, AR17 y AR247) (X), y β -D-xilosidasas E-BXSR (Megazyme, EEUU) (BX) en relaciones X: BX 1:1, 2:1, 6:1, 1:2. Una vez finalizado el tiempo de reacción, las enzimas se inactivaron en baño de agua hirviendo durante 5 minutos y los sobrenadantes recuperados por centrifugación (10.000 x g) se usaron para determinar los azúcares liberados por HPLC. Se procesaron en simultáneo los blancos de las enzimas y de las fracciones líquidas. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.2.6 Ensayos de sacarificación de las fracciones sólidas

Se realizó utilizando cócteles de las enzimas comerciales Celluclast 1.5 y Novo188 (Sigma-Aldrich), suplementadas con extracto crudo enzimático de *Bacillus* sp. AR03, *Bacillus* sp. AR17 y de *Paenibacillus* sp. AR247. Los ensayos de hidrólisis enzimática se realizaron en 1 mL utilizando microtubos de 2 mL conteniendo 20 mg de WIS; 5 UPF/ g sustrato de Celluclast 1.5; 5-30 UI/g sustrato de Novo 188 y 25-100 UI de xilanasas (AR03, AR17 y AR247) / g sustrato en tampón fosfato pH 6,0 (100 mM) y azida sódica (3 mM). Las reacciones se realizaron a 40 y 50 °C bajo agitación constante en *termomixer* (800 rpm), durante 3 y 24 h. Una vez finalizado el tiempo de reacción, las enzimas se inactivaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y los sobrenadantes recuperados después de centrifugación (10.000 x g) se usaron para determinar los azúcares liberados por HPLC. Los controles fueron las reacciones enzimáticas sólo con las enzimas comerciales. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.2.7 Actividades enzimáticas

Actividad sobre papel de filtro (UPF): Se determinó de acuerdo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), utilizando como sustrato una tira de papel de filtro (PF) Whatman N° 1 (1x6 cm) en tampón citrato 50 mM a pH 4,8 y 50 °C. Se incubaron 0,5 mL de enzima convenientemente diluída, con 1 mL de tampón citrato y PF enrollado en un tubo de vidrio de 15 mL, durante 60 min. Luego se añadieron 3 mL del reactivo de DNS, se agitó y se dejó en baño de agua hirviendo durante 5 min. Los tubos se enfriaron con agua fría, se tomaron 200 μ L de la reacción y se mezclaron con 2,5 mL de agua. Se agitó por inversión hasta obtener una mezcla homogénea, y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 540 nm frente al blanco (reacción con agua en lugar de enzima). La

curva patrón se realizó con glucosa (2; 3,35; 5 y 6,7 mg/mL) repitiendo los pasos anteriores sin la incubación a 50 °C, y agregando glucosa en lugar de enzima.

Actividad β -glucosidasa: se midió a 50 °C durante 30 min usando una solución de celobiosa (Sigma-Aldrich) 15 mM en tampón citrato 50 mM a pH 4,8 como sustrato. Se mezclaron 1 mL de al menos 3 diluciones de la muestra conteniendo enzima con 1 mL de la solución sustrato en tubos de vidrio. La reacción se detuvo introduciendo las muestras en agua hirviendo durante 5 min; se enfriaron los tubos, y se cuantificó la glucosa con un método enzimático, utilizando el kit Glucose (HK) Assay Kit (Sigma-Aldrich). Se realizaron los blancos de sustratos y de enzima.

Actividad β -xilosidasa: se valoró a 50 °C usando *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosido PNPX 10 mM en tampón citrato 50 mM pH 5, en una microplaca donde se mezclaron 0,04 mL de sustrato y 0,04 mL de enzima diluida y se incubaron durante 30 min. La reacción se detuvo añadiendo 200 μ L de carbonato sódico 2 % y se midió la absorbancia a 400 nm. La curva patrón se realizó con *p*-nitrofenol (0-10 μ g/mL).

Actividad endoglucanasa y xilanolítica (endoxilanasas): se determinaron de acuerdo a técnica descrita en sección 1.2.4 (Capítulo 1).

Proteínas: Se llevó a cabo con el kit comercial BCATM Protein Assay Kit (Pierce).

3.2.8 Métodos analíticos

La composición de la materia prima y de la biomasa pretratada se determinaron de acuerdo con Sluiter *et al.* [31], siguiendo los protocolos determinados por la *National Renewable Energy Laboratory* (NREL). Los extractivos se determinaron como el material solubilizado después de una extracción con etanol y agua en un sistema de extracción por solvente acelerado Dionex (ASE 200). Las cenizas se determinaron a partir de la calcinación del material a 575 °C durante 8 h. Los azúcares se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando un cromatógrafo de líquidos Waters 2695 (Milfors, MA) equipado con detector de índice de refracción y una columna de análisis de hidratos de carbono Carbosep CHO-782 (Transgenomic, Omaha, NE), que funcionaba a 70 °C. Como fase móvil se utilizó agua desionizada con un caudal de 0,6 mL / min.

Furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), 4-hidroxi-benzaldehído, ácido cumárico, ácido ferúlico y vainillin se analizaron por HPLC equipado con un detector de arreglo de diodos A1050 (Agilent, Waldbronn, Alemania), usando una columna de intercambio catiónico HPX-87H de exclusión de iones Aminex (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) a 65 °C. Como fase móvil, 89 % de H₂SO₄ 5 mmol/L y 11% de acetonitrilo a una velocidad de flujo de 0,7 mL/min. El ácido acético y el ácido fórmico también se cuantificaron por HPLC (Waters, Milfors, MA) usando un detector de índice de refracción 2414 (Waters, Milfors, MA) y una columna Bio-Rad Aminex HPX-87H (Bio-Rad Labs, Hercules, CA) mantenida a 65 °C con una fase móvil de H₂SO₄ 5 mmol/L a una velocidad de flujo de 0,6 mL / min.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1. Caracterización de las biomásas

La determinación de la composición química del material lignocelulósico es un requerimiento fundamental, ya que la conversión de la biomasa vegetal en biocombustible depende del contenido en carbohidratos y de la estructura característica del material lignocelulósico utilizado (Fig. 1). Los resultados de la composición del bagazo y RAC de caña de azúcar sin pretratar fueron referidos como porcentajes de celulosa, hemicelulosa, lignina y ceniza con respecto al peso seco (Tabla 1). El bagazo presentó un mayor contenido de carbohidratos con respecto al RAC, 68,9 % y 54,3 % respectivamente, tendencia también observada por Ferreira-Leitao *et al.* [2] para estas biomásas.

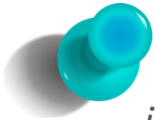
Tabla 1. Principales constituyentes del bagazo y del RAC de caña de azúcar. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándares calculados a partir de tres ensayos independientes.

Componentes % (b.s.)	BAGAZO	RAC
Celulosa	42,7 ± 1,8	32,5 ± 1,3
Hemicelulosa	26,2 ± 1,1	21,8 ± 0,6
<i>xilano</i>	23,6 ± 1,1	19,5 ± 0,5
<i>arabinano</i>	2,6 ± 0,0	2,7 ± 0,1
Lignina ácido insoluble (LAI)	19,2 ± 1,0	14,8 ± 0,3
Lignina ácido soluble (LAS)	4,4 ± 0,1	0,8 ± 0,0
Cenizas	3,9 ± 0,2	13,8 ± 0,1
Extractivos	2,8 ± 0,3	15,4 ± 0,8
Grupos acetilo	2,6 ± 0,1	1,4 ± 0,0

El contenido de celulosa y hemicelulosa de RAC de caña de azúcar fue reportado en un rango entre el 31,7 y el 43,0 % y del 18,4 a 30,6 %, respectivamente [32, 33, 18]. En el caso del bagazo, se ha descrito un contenido de celulosa de 32,0 – 45,0 % y de hemicelulosa de 27,0 - 32,0 % [34, 35, 36, 32]. Con respecto a la lignina de bagazo, la proporción observada (23,6 %) se encuentra dentro de rangos típicos, como los informados por Soccol *et al.* [34] y Canilha *et al.* [32], 20,0 – 24,0 % y 19,1 - 32,4 %, respectivamente. Por otro lado, los valores de lignina encontrados en nuestras muestras de RAC fueron relativamente bajos comparado con la mayor parte de los reportes bibliográficos, superiores al 20 % [32, 24, 37, 18], aunque fueron similares a los descritos por Carvalho *et al.* [38].

El RAC presentó valores de cenizas y extractivos más altos que el bagazo (13,8 %), lo cual puede deberse a los compuestos inorgánicos endógenos en esta biomasa, así como al polvo, suelo y otros desechos acumulados en la caña de azúcar de la que se deriva el RAC y de su almacenamiento al aire libre. Autores como Pratto *et al.* [37] y Canilha *et al.* [32] también encontraron valores altos para componentes inorgánicos, reportando 8,7 - 11,7 % de cenizas en RAC de caña de azúcar. En cambio,

el valor de cenizas aquí reportado para el bagazo (3,9 %) se encuentra dentro de los porcentajes publicados por otros autores [34, 32]. En este sentido, Kuster Moro *et al.* [18] informan un mayor contenido de cenizas y extractivos en bagazo con respecto a los residuos de cosecha analizados. La variación de la composición relativa de los componentes de biomásas similares no es un hecho aislado, ya que las principales fracciones de materiales lignocelulósicos dependen de muchos factores, tales como la genética vegetal, el entorno de crecimiento y las condiciones de procesamiento, además de los métodos empleados para el análisis de la composición [39].

 Teniendo en cuenta los objetivos planteados, el contenido en carbohidratos de bagazo y de residuo postcosecha de caña de azúcar indica que las materias primas analizadas presentan un potencial apropiado para la producción de azúcares fermentables y, en consecuencia, para sustentar el desarrollo de una plataforma de producción de biocombustibles y otros químicos.

3.3.2. Explosión por vapor de bagazo y residuos post-cosecha de caña de azúcar

Las condiciones operacionales de pretratamiento de explosión por vapor se investigaron utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta. Para ello, se realizó un Diseño Central Compuesto (DCC) rotatable, con 3 puntos centrales, que generó 11 ensayos para cada biomasa. Las Figuras 2 y 3 muestran el aspecto físico de las biomásas luego del pretratamiento.

El rendimiento de la recuperación de sólidos basado en el peso inicial de la biomasa (% RS), varió entre 51 y 55 % a las temperaturas más altas (ensayos 4' y 10), y entre 77 y 88 %, en las condiciones más suaves (ensayos 5 y 7') para el RAC y el bagazo (Tabla 2). Oliveira *et al.* [24] observaron una recuperación del 56 % de RAC de caña de azúcar procesado a 200 °C y 15 min; mientras que para bagazo pretratado con explosión por vapor en condiciones suaves (~ 190 °C), se reportaron valores de RS entre 62 y 68 % RS, inferiores a los obtenidos en este trabajo [20, 40, 41, 23].

El análisis de la composición de los **sólidos insolubles o WIS** antes y después de los pretratamientos, reveló diferencias significativas en el contenido de celulosa y hemicelulosa del material biomásico antes y después del pretratamiento (Tablas 1 y 2, respectivamente). Estas diferencias indican una solubilización de la hemicelulosa después del pretratamiento y, como consecuencia, una reducción de la masa total de material insoluble (bajos % RS). Estos resultados concuerdan con la tendencia reportada en la literatura [20, 42, 43, 23]. Por lo tanto, el pretratamiento de estas biomásas por EV condujo a un enriquecimiento relativo de celulosa y lignina en el WIS debido a la eliminación de HC y

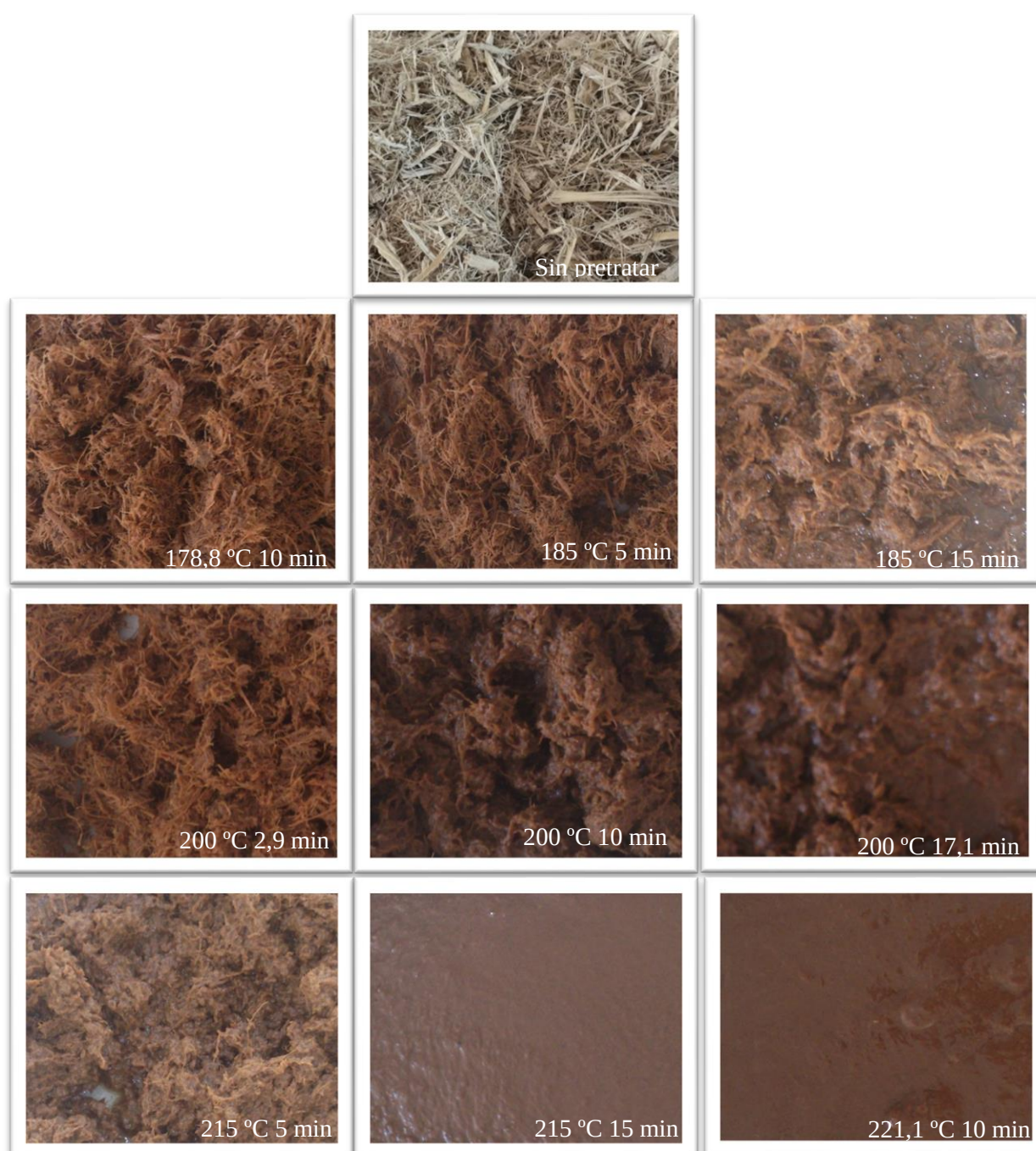


Figura 2. Fotografías del bagazo de caña de azúcar sin pretratar y después de someterse a diferentes condiciones de explosión por vapor.

de los extractivos del sólido (Tabla 2). En condiciones temperaturas entre 200 °C y 221 °C (ensayos 6, 8 y 10), se obtuvieron fracciones WIS de bagazo con el máximo contenido de celulosa, aproximadamente 61 %, ya que en esas condiciones se alcanzó una alta solubilización de azúcares hemicelulósicos que llegaron a valores ≤ 11 % en WIS (Tabla 2). En el caso del RAC, se generaron

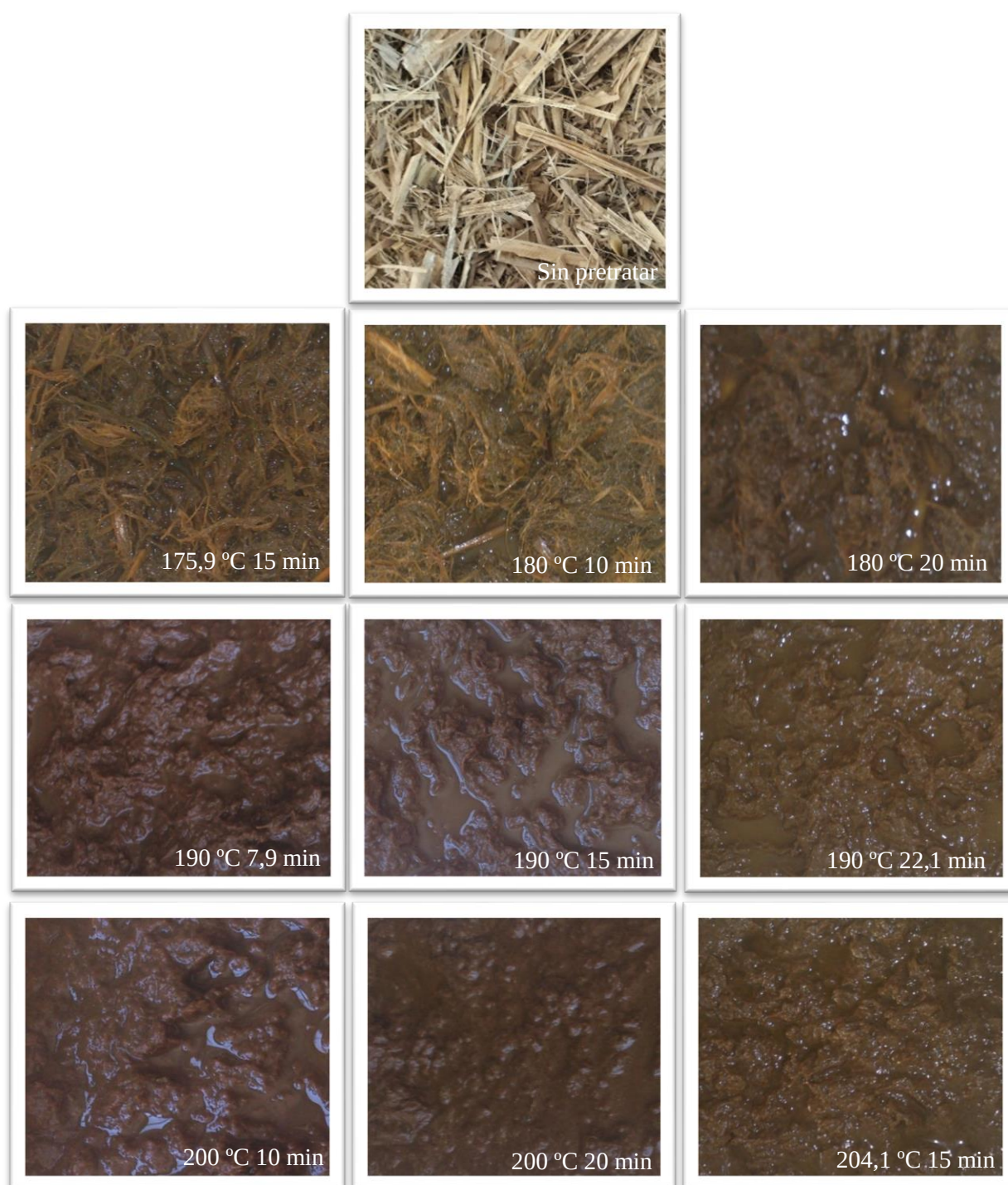


Figura 3. Fotografías del RAC de caña de azúcar sin pretratar y después de someterse a diferentes condiciones de explosión por vapor.

sólidos conteniendo 53 % de celulosa en las condiciones de mayor severidad de los factores ensayados (FS) (experimentos 4' y 10', tabla 2), lo cual también coincidió con una alta solubilización de HC (~ 91 %, Tabla 3).

Tabla 2. Valores experimentales de las variables temperatura y tiempo, con los factores de severidad (FS) de cada ensayo, del diseño central compuesto para el bagazo y el RAC de caña de azúcar, y sus respectivas respuestas evaluadas: recuperación de sólidos (% RS) y composición del WIS.

	Ensayo	Temperatura [°C]	Tiempo [min]	FS	RS [%]	Composición de WIS [%]		
						Celulosa	HC	Lignina
Bagazo	1	185,0	5,0	3,2	85,2	48,6	23,4	23,8
	2	200,0	10,0	3,9	69,3	59,4	6,7	27,2
	3	200,0	10,0	3,9	67,9	60,7	8,2	26,2
	4	200,0	10,0	3,9	68,0	60,6	8,2	27,1
	5	178,8	10,0	3,3	88,1	48,2	21,9	24,5
	6	215,0	15,0	4,6	61,0	61,0	1,6	30,5
	7	185,0	15,0	3,7	71,9	53,5	13,7	25,4
	8	200,0	17,1	4,2	65,6	61,7	4,1	30,5
	9	215,0	5,0	4,1	66,1	60,4	3,7	29,8
	10	221,2	10,0	4,6	55,4	61,7	1,7	30,9
	11	200,0	2,9	3,4	79,4	52,1	16,1	26,2
RAC	1'	190,0	7,9	3,5	60,6	44,0	13,9	22,3
	2'	180,0	20,0	3,7	64,4	45,6	14,8	23,5
	3'	190,0	15,0	3,8	63,4	46,5	9,6	24,4
	4'	200,0	20,0	4,2	51,0	53,6	3,1	27,1
	5'	200,0	10,0	3,9	56,2	47,7	5,0	27,6
	6'	175,9	15,0	3,4	72,8	40,5	20,6	21,9
	7'	180,0	10,0	3,4	77,5	41,5	19,8	23,0
	8'	190,0	15,0	3,8	61,4	46,8	9,5	24,9
	9'	190,0	15,0	3,8	63,0	46,1	9,4	25,3
	10'	204,1	15,0	4,2	54,6	52,4	3,0	26,9
	11'	190,0	22,1	4,0	54,5	49,6	6,0	23,6

Bajo condiciones de pretratamiento menos severas (ensayos 1, 5, 7, 11 y 1', 2', 6', 7'), el contenido de celulosa en sólidos fue de 48 y 53 % y de 40 y 45 % para bagazo y RAC, respectivamente. Estos datos se correspondieron con una mayor recuperación de HC en sólidos con respecto a las condiciones más severas (Tablas 2 y 3). Esto podría significar un inconveniente para la posterior hidrólisis enzimática al dificultar el acceso enzimático a la celulosa [44].

Para ambas materias primas evaluadas, todas las condiciones de pretratamiento ensayadas significaron valores de recuperación de celulosa en sólido mayores al 80 %, de manera similar a lo reportado por otros autores (70 % y 100 %). La recuperación en sólidos de HC bajo las condiciones ensayadas aquí, fue menor al 30 % en la mayoría de los casos, mientras que este valor fue de alrededor un 40 % para la mayoría de los reportes previos consultados [19, 20, 22, 21, 23, 45].

Tabla 3. Recuperación en las fracciones de sólidos y líquidos de los componentes de la lignocelulosa. Rendimiento de hidrólisis enzimática (YHE) y recuperación global de los azúcares (OY) del bagazo y RAC pretratados por EV según el DCC.

	Recuperación %					YHE [%]		OY [%]	
	Celulosa		Hemicelulosa		Lignina	Glucosa	Xilosa	Glucosa	Xilosa
Ensayo	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos	Sólidos				
1	97,0	1,9	81,0	18,0	86,1	31,1	27,1	32,1	40,0
2	96,5	2,7	19,2	53,3	79,9	68,7	59,3	69,0	64,7
3	96,5	2,4	22,9	48,1	75,4	66,4	48,5	66,4	59,2
4	96,6	2,9	22,7	53,6	78,2	65,5	50,5	66,2	65,0
5	99,5	2,3	78,3	21,4	91,5	33,0	27,7	35,2	43,1
6	92,1	4,5	4,7	25,5	79,0	83,3	78,7	81,6	29,2
7	90,0	2,8	39,9	48,2	77,5	47,4	41,5	45,4	64,7
8	94,8	3,6	11,3	51,1	84,8	75,5	65,3	75,1	58,5
9	93,5	3,5	10,4	53,6	83,5	80,3	63,0	78,5	60,1
10	80,1	5,0	4,0	25,3	72,6	85,7	76,5	73,7	28,3
11	96,9	2,4	51,5	37,8	88,2	45,5	44,2	46,4	60,5
1'	81,9	3,1	41,7	28,3	86,8	54,0	45,3	47,3	47,1
2'	90,4	3,8	46,9	35,6	97,3	46,2	37,6	45,6	53,3
3'	90,6	4,4	29,5	45,7	99,3	59,2	48,3	58,0	59,9
4'	84,0	4,4	8,4	34,8	88,8	82,7	82,9	73,8	41,8
5'	82,4	4,1	14,3	45,6	99,4	78,9	67,0	69,1	55,2
6'	90,6	3,4	73,0	22,3	102,2	40,0	27,8	39,6	42,6
7'	98,8	3,4	76,1	22,8	114,2	39,1	29,6	42,1	45,4
8'	88,4	4,5	28,5	45,3	98,0	62,4	50,2	59,7	59,6
9'	89,1	3,8	29,2	45,3	102,4	62,8	52,7	59,8	60,7
10'	90,7	4,6	8,9	35,4	94,4	87,5	79,2	84,0	42,4
11'	83,0	3,9	16,8	44,4	82,6	71,6	64,8	63,4	55,3

Después del pretratamiento de ambas biomásas, la recuperación de lignina alcanzó valores de 72,6 - 91,5 % para bagazo y de 82,6 - 114,2 % para RAC, lo cual indicó una pérdida moderada de este componente como resultado del pretratamiento (Tabla 3). Otros autores informaron valores de recuperación en sólidos de lignina entre 84 y 92,1 % para bagazo explosionado [20, 21, 22], y entre 83 y 100 % para paja de caña de azúcar [24]. En este estudio, la recuperación de lignina a partir del RAC pretratado fue mayor que 100 % en algunas condiciones (Tabla 3), lo cual también fue observado por Neves *et al.* [23], informando valores de recuperación de este componente de 108,1 % para bagazo pretratado por EV. Se sabe que bajo las condiciones ácidas que producen autohidrólisis como fue descrito durante procesos como la explosión por vapor, ocurre la despolimerización de lignina y posterior condensación de fragmentos disueltos. De esta manera, el material condensado precipita y es recuperado en las fibras del WIS, por lo que aumenta la proporción de lignina residual [46]. En cuanto

a la ocurrencia de reacciones de condensación de lignina entre sus grupos fenólicos y fragmentos de otros compuestos aromáticos contenidos en los extractivos también es posible [12, 13]. Por lo tanto, el resultado obtenido puede ser debido a la reorganización en la estructura de la lignina con consecuencias incluso en aumento de su peso molecular. Es importante considerar que los compuestos fenólicos originados por degradación de lignina pueden crear inhibición significativa en la conversión enzimática de azúcares de la biomasa a productos químicos útiles [47].

Tabla 4. Concentración de los componentes no-carbohidrato de las fracciones líquidas de los ensayos del diseño de experimentos del pretratamiento de explosión por vapor del Bagazo (ensayos 1-11) y del RAC (ensayos 1'-11') de caña de azúcar.

Ensayo	Temperatura [°C]	Tiempo [min]	Concentración en líquidos [g/L]							
			Furfural	HMF	Ácido Acético	Acido Fórmico	Vainillina	Ácido Cumárico	Ácido Ferúlico	4-Hidroxibenzaldehído
1	185,0	5,0	0,02	0,00	0,51	0,07	0,01	0,14	0,01	0,03
2	200,0	10,0	0,33	0,03	0,56	1,21	0,02	0,08	0,02	0,03
3	200,0	10,0	0,36	0,02	1,17	0,23	0,02	0,13	0,03	0,03
4	200,0	10,0	0,35	0,03	1,21	0,25	0,03	0,14	0,03	0,04
5	178,8	10,0	0,03	0,00	0,56	0,56	0,01	0,01	0,01	0,02
6	215,0	15,0	1,45	0,22	2,18	0,46	0,03	0,06	0,00	0,04
7	185,0	15,0	0,15	0,01	0,79	0,15	0,02	0,08	0,02	0,03
8	200,0	17,1	0,74	0,06	1,59	0,32	0,03	0,10	0,00	0,03
9	215,0	5,0	0,71	0,05	1,69	0,39	0,03	0,14	0,00	0,04
10	221,2	10,0	1,39	0,20	1,99	0,44	0,04	0,07	0,00	0,04
11	200,0	2,9	0,08	0,01	0,87	0,16	0,02	0,02	0,01	0,03
1'	190,0	7,9	0,03	0,01	0,25	0,09	0,01	0,00	0,01	0,01
2'	180,0	20,0	0,09	0,04	0,46	0,15	0,01	0,00	0,00	0,01
3'	190,0	15,0	0,16	0,03	0,49	0,17	0,02	0,01	0,00	0,01
4'	200,0	20,0	0,59	0,10	0,71	0,25	0,02	0,04	0,00	0,01
5'	200,0	10,0	0,31	0,07	0,69	0,26	0,03	0,06	0,00	0,02
6'	175,9	15,0	0,02	0,01	0,21	0,06	0,01	0,00	0,00	0,01
7'	180,0	10,0	0,03	0,01	0,25	0,09	0,01	0,00	0,01	0,01
8'	190,0	15,0	0,18	0,04	0,55	0,19	0,02	0,01	0,00	0,01
9'	190,0	15,0	0,21	0,04	0,57	0,20	0,02	0,06	0,00	0,02
10'	204,1	15,0	0,64	0,11	0,87	0,28	0,02	0,03	0,00	0,02
11'	190,0	22,1	0,26	0,05	0,59	0,21	0,02	0,00	0,00	0,02

Con el objetivo de realizar los balances totales de materia, se llevó a cabo el análisis de las **fracciones líquidas** de cada pretratamiento ensayado. Los resultados revelaron entre el 50 % y 90 % de los azúcares estuvieron presentes en forma oligomérica, de modo que se realizó una etapa de post-hidrólisis para determinar la cantidad total de azúcares. Como puede observarse en la Tabla 3, los porcentajes de recuperación total (en sólidos y líquidos) de azúcares hemicelulósicos no alcanzan el

100 %, lo cual es indicativo de una pronunciada degradación de los mismos en las condiciones ensayadas, lo que en algunos casos fue de hasta 70 %. La explosión por vapor generalmente degrada la hemicelulosa, lo que lleva a la formación de productos tales como ácidos alifáticos (principalmente ácido acético y ácido fórmico) y aldehídos de furano (5-hidroximetilfurfural y furfural); el HMF también puede generarse a partir de la degradación de celulosa [48]. De manera similar a la hemicelulosa, la lignina también se degrada parcialmente a los compuestos fenólicos, que pueden crear inhibición significativa en la conversión enzimática de azúcares de la biomasa a productos químicos útiles [47]. Se observó que las fracciones líquidas contenían también compuestos no azucarados (furfural, HMF, ácidos acético y fórmico, etc) (Tabla 4). Las gráficas de la Fig. 4 muestran que existe una correlación ($R^2 \geq 0,93$) entre la pérdida de HC y el factor de severidad (FS) del pretratamiento, y entre la suma de las concentraciones de subproductos (compuestos no azucarados) y el FS. En general, la degradación de azúcares hemicelulósicos y la concentración de inhibidores aumentaron con la severidad del pretratamiento.

Los compuestos inhibidores más abundantes detectados en los líquidos fueron ácido acético, ácido fórmico y furfural (Tabla 4). El ácido acético presentó las mayores concentraciones, lo que puede atribuirse al alto contenido de grupos acetilo en el bagazo (2,6 %), mayor que en RAC (1,4 %). Las concentraciones más altas de este ácido en bagazo, superiores a 1,2 g/L (Tabla 4), se generaron durante pretratamientos con elevado FS, entre 3,9 y 4,6 (experimentos 3, 4, 6, 8, 9 y 10, tabla 2), coincidiendo con la mayor solubilización de HC (WIS con contenido de HC entre 1,6 y 8,2 %). Este comportamiento concuerda con lo expuesto por Fengel y Wegener [12], quienes concluyen que la explosión por vapor a alta temperatura conduce a la hidrólisis de los grupos acetilo, liberando ácido acético que cataliza la hidrólisis principalmente de hemicelulosas.

El furfural y el HMF se generaron en concentraciones bajas, menores a 1,4 y 0,2 g/L, respectivamente, mientras que la presencia de ácido fórmico llegó a concentraciones de 1,2 g/L (Tabla 4). Los valores de pH de las fracciones líquidas variaron entre 3,2 y 4,5 en las diferentes condiciones ensayadas, correspondiendo los valores más bajos a las condiciones más severas (datos no mostrados). Las concentraciones de furfural encontradas podrían explicar en parte la pérdida de azúcares hemicelulósicos durante el pretratamiento, ya que este compuesto se forma por la deshidratación de las pentosas en condiciones térmicas y ácidas [49] (ensayos 6, 10, 4', 5' y 10', Tablas 3 y 4). Los mayores valores de estos compuestos se registraron en los líquidos del bagazo pretratado bajo las condiciones más severas ensayadas. Si bien este comportamiento está en concordancia con lo observado por otros autores, las cantidades generadas de estos subproductos son bajas en comparación con los reportados [50, 22, 45].

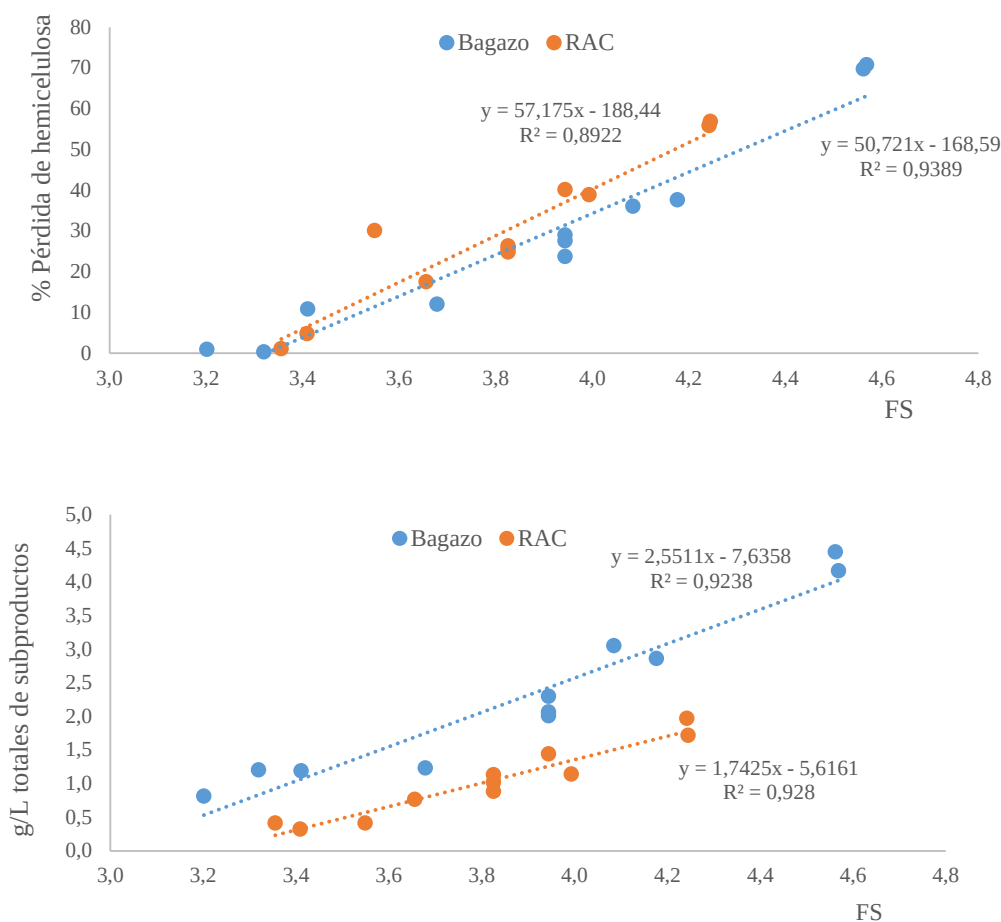
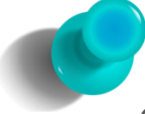


Figura 4. Gráficas de correlación entre el % de pérdida de hemicelulosa y el factor de severidad (FS) y los g/L totales de subproductos y el FS para bagazo y RAC de caña de azúcar pretratados por explosión por vapor a diferentes condiciones de temperatura y tiempo, según el diseño de experimentos. Se muestran las líneas de tendencia con sus respectivas ecuaciones y valores de R^2 .

 Luego del pretratamiento EV, los subproductos furfural, HMF y ácido fórmico fueron detectados en concentraciones inferiores a las reportadas en la literatura para bagazo de caña de azúcar procesado en similares condiciones, aunque no existen estos datos para RAC. Esto puede tener consecuencias favorables ya que tales niveles de subproductos podrían no tener un efecto inhibitorio en la sacarificación y en la fermentación alcohólica posteriores [50].

3.3.3. Análisis del efecto de los parámetros operacionales del pretratamiento de explosión por vapor

Los resultados del Diseño Central Compuesto (DCC) fueron utilizados para analizar los efectos de las condiciones de pretratamiento EV en la recuperación de sólidos (% RS), rendimiento de hidrólisis enzimática de glucosa (% YHE_{Glu}), rendimiento global de glucosa (% OY_{Glu}) y de xilosa (% OY_{Xil})

para ambas biomásas (Tablas 2 y 3). Los valores experimentales de las respuestas se sometieron a un análisis de regresión múltiple usando el *software* Statgraphics Centurion XVI. Si bien no todas las variables o interacciones dobles de las mismas tuvieron efecto en todas las respuestas analizadas, con la finalidad de conservar el ajuste del modelo, durante la regresión se incluyeron todos los factores y sus interacciones. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para cada respuesta ($p < 0,05$) y la falta de ajuste ($p > 0,05$) sugirieron que los modelos encontrados se ajustan de manera significativa. La relación matemática entre las respuestas y las variables independientes (temperatura y tiempo) puede presentarse mediante las siguientes ecuaciones polinómicas cuadráticas de segundo grado, donde T es la temperatura en °C, y t es el tiempo en min:

BAGAZO:

$$\% RS = 516,75 - 3,41 * T - 7,84 * t + 0,01 * T^2 + 0,03 * T * t + 0,07 * t^2$$

$$(R^2 = 96,27 \% \quad R^2 \text{ (ajustado)} = 92,53 \%) \quad \text{Ec. (6)}$$

$$\% YHE_{Glu} = -956,90 + 8,19 * T + 12,84 * t - 0,02 * T^2 - 0,04 * T * t + 0,07 * t^2$$

$$(R^2 = 97,80 \% \quad R^2 \text{ (ajustado)} = 95,53 \%) \quad \text{Ec. (7)}$$

$$\% OY_{Glu} = -1307,91 + 12,01 * T + 10,44 * t - 0,03 * T^2 - 0,03 * T * t - 0,11 * t^2$$

$$(R^2 = 94,21 \% \quad R^2 \text{ (ajustado)} = 88,41 \%) \quad \text{Ec. (8)}$$

$$\% OY_{Xil} = -2634,66 + 25,39 * T + 38,05 * t - 0,06 * T^2 - 0,18 * T * t - 0,06 * t^2$$

$$(R^2 = 98,61 \% \quad R^2 \text{ (ajustado)} = 97,22 \%) \quad \text{Ec. (9)}$$

RAC:

$$\% RS = 658,09 - 5,01 * T - 5,64 * t + 0,01 * T^2 + 0,04 * T * t - 0,08 * t^2$$

$$(R^2 = 95,37 \% \quad R^2 \text{ (ajustado)} = 90,74 \%) \quad \text{Ec. (6')}$$

$$\% YHE_{Glu} = -91,26 - 0,60 * T + 4,24 * t + 0,01 * T^2 - 0,02 * T * t + 0,01 * t^2$$

$$(R^2 = 98,29 \% \quad R^2 \text{ (ajustado)} = 95,58 \%) \quad \text{Ec. (7')}$$

$$\% OY_{Glu} = 148,48 - 2,64 * T + 2,16 * t + 0,01 * T^2 + 0,01 * T * t - 0,09 * t^2$$

$$(R^2 = 98,10 \% \quad R^2 \text{ (ajustado)} = 96,20 \%) \quad \text{Ec. (8')}$$

$$\% OY_{Xil} = -3263,67 + 33,02 * T + 25,12 * t - 0,08 * T^2 - 0,11 * T * t - 0,16 * t^2$$

$$(R^2 = 91,95 \% \quad R^2 \text{ (ajustado)} = 83,90 \%) \quad \text{Ec. (9')}$$

Los valores de R^2 ajustado en cada ecuación muestran que se logró una buena concordancia entre los datos experimentales y los pronosticados. A partir de los diagramas de Pareto de cada respuesta (Figs. 5 y 6), se puede concluir que el efecto de la temperatura fue más importante que el efecto del tiempo de pretratamiento en la mayoría de las respuestas analizadas.

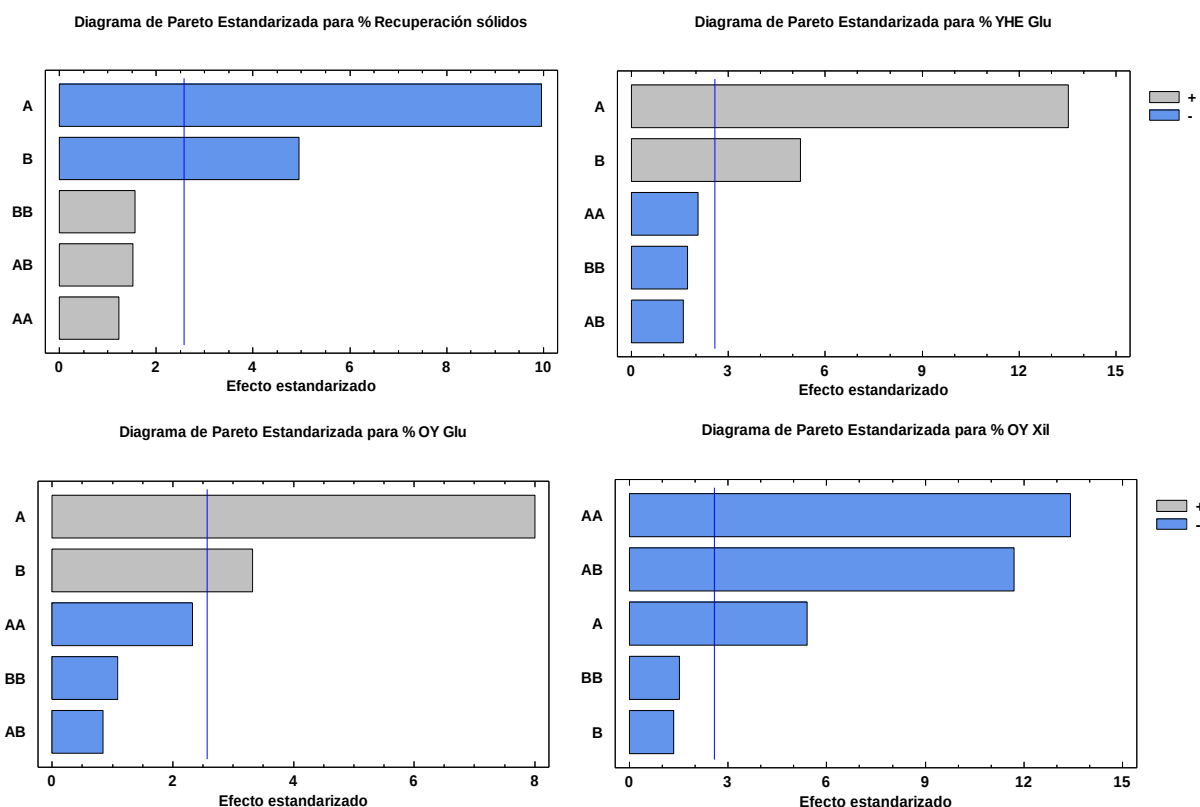


Figura 5. Diagramas de Pareto del DCC del pretratamiento de explosión por vapor del bagazo de caña de azúcar, para las diferentes respuestas analizadas. A representa la Temperatura [°C] y B el Tiempo [min]. Se consideró un nivel de confianza del 95 %

 Mediante el uso de la metodología de Superficie de Respuesta se encontraron modelos ajustados a los datos experimentales y que representan los efectos de las condiciones de pretratamiento EV en la recuperación de sólidos, en el rendimiento de hidrólisis enzimática de glucosa y en el rendimiento global de glucosa y xilosa para bagazo y RAC de caña de azúcar.

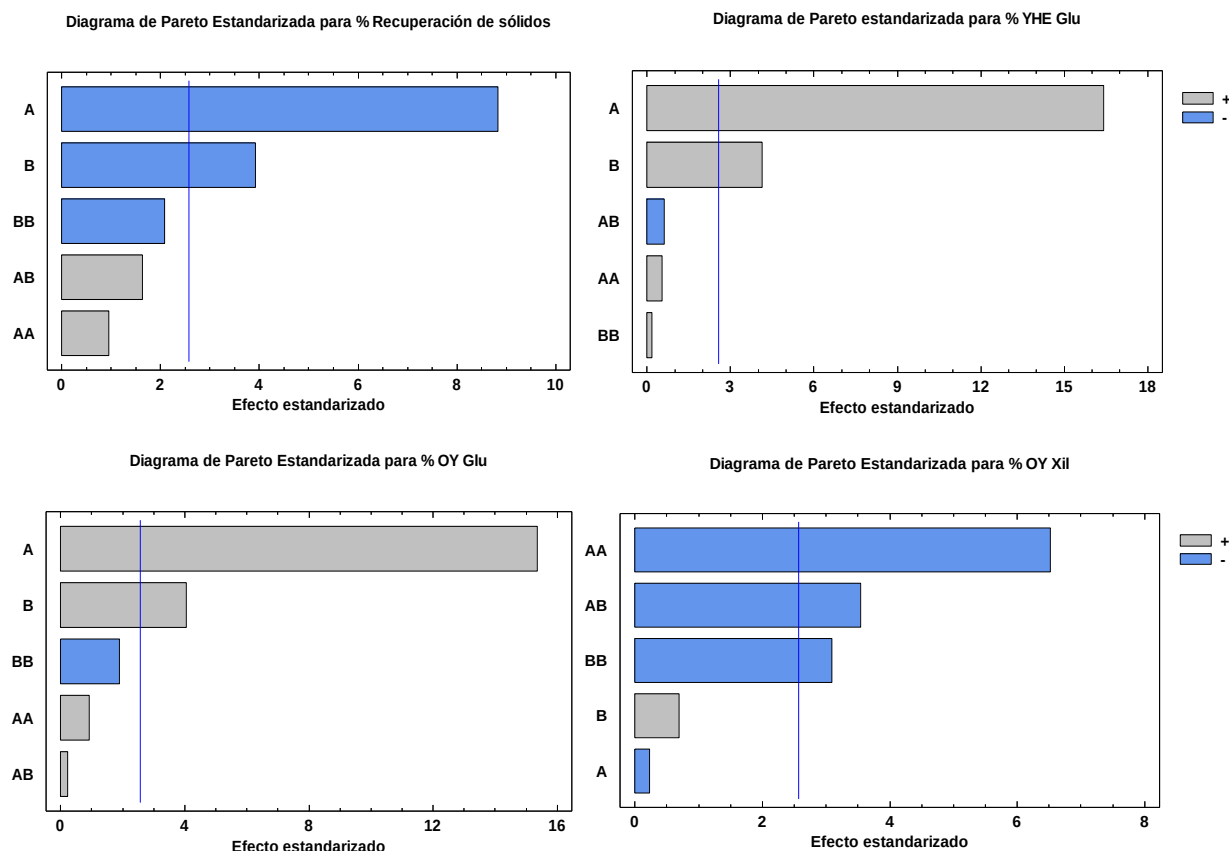


Figura 6. Diagramas de Pareto del DCC del pretratamiento de explosión por vapor del RAC de caña de azúcar, para las diferentes respuestas analizadas. A representa la Temperatura [°C] y B el Tiempo [min]. Se consideró un nivel de confianza del 95 %.

La Fig. 7 ilustra la influencia de la temperatura y el tiempo de proceso en el % RS para ambas biomásas. Se puede observar que cuando la temperatura ensayada toma los valores más elevados, los % RS disminuyen. Este hecho puede ser atribuido a la solubilización de otros componentes de la lignocelulosa a condiciones severas de pretratamiento. Para esta respuesta, las gráficas 3D y de contorno muestran que los comportamientos para el bagazo y el RAC fueron diferentes, pero en ambos casos el aumento de la temperatura limitó más significativamente la recuperación de sólidos que el tiempo.

Con respecto al % YHE de glucosa, tanto la temperatura como el tiempo tuvieron un efecto positivo significativo en estas respuestas (Ecs. 7 y 7', Figs 5 y 6). Las gráficas de superficie de respuesta correspondientes (Figura 8) muestran que un aumento en la temperatura implica un aumento sustancial en los % YHE, tanto en el caso del bagazo como del RAC; el tiempo de proceso afectó de manera menos significativa el proceso de hidrólisis (Fig. 2, 5 y 6). En la Fig. 8a, una ligera curvatura indica que hay un punto a partir del cual el % YHE_{Glu} no aumenta debido a la temperatura. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Oliveira *et al.* [24], quienes demostraron que la conversión

enzimática aumentó proporcionalmente con el aumento de la temperatura de pretratamiento de explosión por vapor de RAC de caña de azúcar.

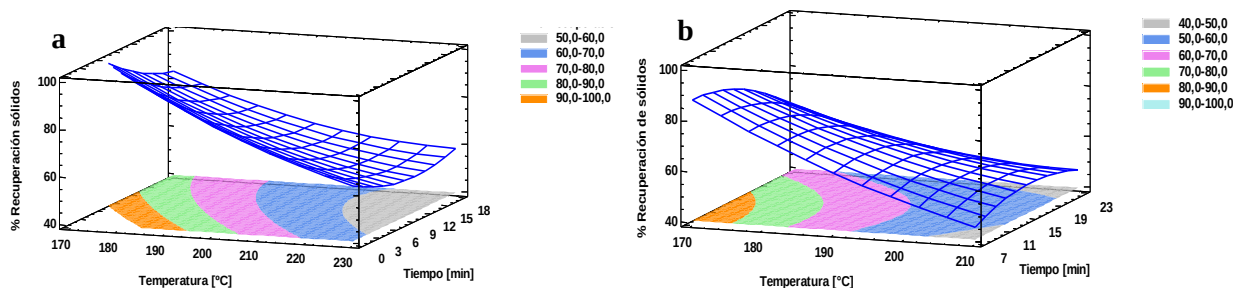


Figura 7. Superficie de respuesta estimada en gráfica 3D y de contorno del % RS a) para el bagazo y b) para el RAC de caña de azúcar pretratados con explosión por vapor.

A las temperaturas más bajas ensayadas, 178,8 °C y 185 °C en el pretratamiento de bagazo y 175,9 °C y 180 °C en RAC, independientemente del tiempo de proceso, los YHE variaron entre 30 y 46 % aproximadamente. Oliveira *et al.* [24] obtuvo rendimientos mayores, del 60 %, cuando el RAC de caña de azúcar fue explosionado a 180 °C y 15 min. Estas temperaturas, aunque produjeron sólidos pretratados con recuperaciones de glucosa superiores al 95 % (Tabla 3), no lograron alterar la estructura lignocelulósica lo suficiente como para el ataque enzimático más fácil.

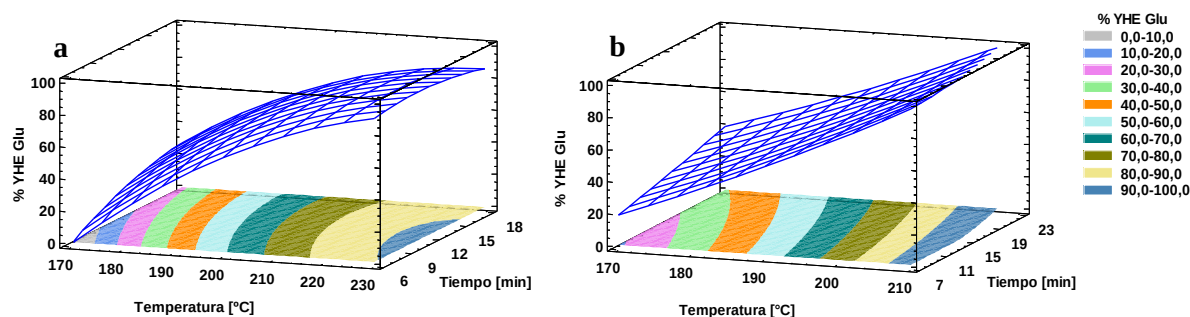


Figura 8. Superficie de respuesta estimada en gráfica 3D y de contorno del % YHE Glu a) para el bagazo y b) para el RAC de caña de azúcar pretratados con explosión por vapor.

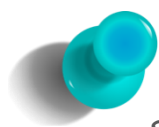
Si bien el aumento de la temperatura de pretratamiento da como resultado un aumento de los rendimientos de HE, indicando un sustrato pretratado altamente digerible, es importante tener en cuenta que en esta condición el rendimiento de la recuperación sólida disminuye en comparación con las condiciones de menor severidad, lo que afectará el rendimiento de la liberación de azúcar por hidrólisis enzimática cuando este se refiera a la materia prima. Además, la severidad del pretratamiento tiene un efecto negativo importante en la pérdida de azúcares, sobre todo los hemicelulósicos (Fig. 4). Estos carbohidratos son productos de potencial valor para la co-fermentación

a biocombustibles y, por ende, su recuperación tiene importancia como objetivo del proceso. Por lo tanto, se debe establecer un equilibrio entre la digestibilidad enzimática y la recuperación de sólidos y de carbohidratos en el líquido en la evaluación de pretratamiento para asegurar altos rendimientos en la producción de azúcares fermentables partir de la materia prima. Para evaluar esto, se calculó el rendimiento global (OY) de glucosa y xilosa (Ec. 5), que tiene en cuenta la cantidad de azúcar liberada por hidrólisis enzimática y recuperada en la fracción líquida referida al contenido de azúcar en la materia prima, para las diferentes condiciones operacionales (Tabla 2). Este es un parámetro importante ya que integra la eficiencia de ambos pasos: pretratamiento e hidrólisis enzimática, para liberar azúcares para la fermentación.

En cuanto al $\% \text{OY}_{\text{Glu}}$, en el caso de ambas biomásas la temperatura y el tiempo influenciaron significativamente esta respuesta, presentando la temperatura un efecto mucho mayor (Figs. 5 y 6). El máximo valor alcanzado de este parámetro para el bagazo fue de 81,6 % a 215 °C y 15 min, coincidiendo con la condición más severa ensayada; así, el mínimo $\% \text{OY}_{\text{Glu}}$ se obtuvo a partir del pretratamiento a 185 °C - 5 min (correspondiente al menor FS) y fue de 32,1 % (Tabla 2). Sendelius [51] encontró también que el $\% \text{OY}_{\text{Glu}}$ aumenta a medida que aumenta la severidad del pretratamiento para bagazo de caña de azúcar; aun así, bajo las condiciones más severas ensayadas por este autor (205 °C y 10 min), obtuvo valores de rendimiento global (55 %) inferiores a las encontradas aquí. Sin embargo, bajos estas condiciones, se reportaron OY mayores al 80 % cuando pretrataron bagazo y RAC mediante explosión por vapor impregnado con CO_2 [51, 2].

Cabe destacar que bajo las condiciones de proceso 215 °C - 15 min y 185 °C - 5 min, las recuperaciones de glucosa en el líquido fueron similares y bajas, mientras que hubo diferencias significativas en el rendimiento de HE (Tabla 4, ensayos 6 y 1). Por definición, el $\% \text{OY}$ (Ec. 5) está influenciado por la suma de dos términos: la recuperación del azúcar en el líquido y el azúcar liberado durante la HE, ambos referidos a la cantidad de azúcar en la materia prima. En el caso de la glucosa para ambas materias primas, los valores de recuperación en el líquido fueron bajos y dentro de un rango acotado (1,9 y 5,0 %), presentando un aporte escaso a este parámetro. En consecuencia, el valor del $\% \text{OY}$ viene dado prácticamente por el rendimiento de hidrólisis enzimática.

Por otro lado, el RAC explosionado alcanzó valores de OY_{Glu} entre 84,0 y 39,6 % (Tabla 3), que fueron resultado de las condiciones extremas ensayadas de la explosión por vapor (204,1 °C - 15 min y 175,9 °C - 15 min, respectivamente). En ambas condiciones, los % de recuperación de glucosa en el líquido fueron muy similares (4,6 y 3,4 %, respectivamente; Tabla 4), y hubo diferencias significativas entre los $\% \text{YHE}_{\text{Glu}}$ correspondientes (87,5 % y 40,0 %, Tabla 3). Estos valores fueron cercanos a los reportados para los mismos tipos de biomásas en condiciones operativas similares, para los que fue utilizada impregnación con CO_2 [2].



En este trabajo se obtuvieron % OY_{Glu} mayores al 80% en las condiciones de máxima severidad ensayadas, sin el agregado de aditivos químicos y sin previa molienda de las materias primas.

Es importante mencionar que, bajo las condiciones operacionales ensayadas, sólo el valor máximo de % OY_{Glu} para el bagazo pretratado coincidió con el óptimo, ya que se obtienen mantas con una cima definida y círculos concéntricos de contorno en las gráficas 3D y de contorno de las superficies de respuesta (Fig. 9). De manera diferente, el % RS y el % YHE para ambas materias primas, no alcanzaron sus óptimos dentro de los rangos de temperatura y tiempo evaluados.

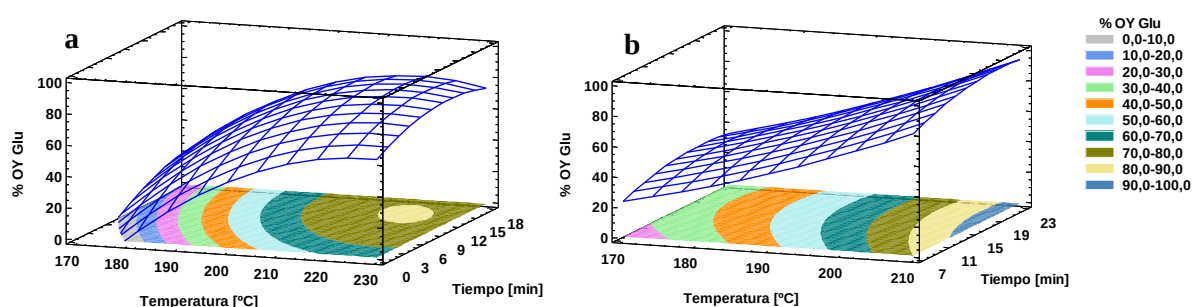


Figura 9. Superficie de respuesta estimada en gráfica 3D y de contorno del % OY_{Glu} **a)** para el bagazo y **b)** para el RAC de caña de azúcar pretratados con explosión por vapor.

Por último, el % OY_{Xil} se vio afectado sólo por las interacciones dobles de los factores temperatura y tiempo de manera negativa; y en el caso del bagazo también por la temperatura (Fig. 5 y 6). Los valores máximos que se obtuvieron de este parámetro fueron 65 % para bagazo y 60,7 % para RAC (Tabla 3, experimentos 4 y 9'), ambos coincidiendo con las mayores recuperaciones de xilosa en los líquidos (Tabla 4). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, en este caso el rendimiento global de xilosa estuvo más influenciado por la recuperación de xilosa en el líquido que por el rendimiento de hidrólisis enzimática de este azúcar. A partir de las gráficas de superficie de respuesta estimada (Fig. 10), se puede observar que sólo para el RAC pretratado bajo las condiciones operacionales ensayadas se encontró el óptimo valor de % OY_{Xil}.

3.3.4. Caracterización de los puntos óptimos

El pretratamiento juega un papel clave en el éxito del proceso porque influye de manera crítica en las etapas posteriores de la producción de bioetanol, por lo tanto, su optimización es una herramienta fundamental. Entre las premisas del pretratamiento ideal, se encuentran garantizar valores máximos de susceptibilidad enzimática y de recuperación de azúcares de hemicelulosa (principalmente xilosa) [52].

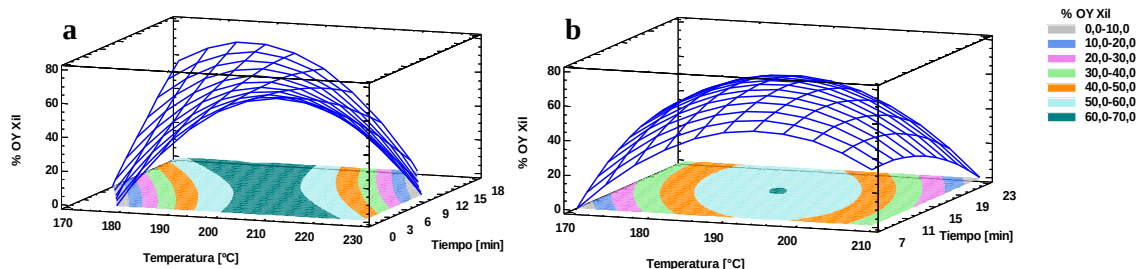


Figura 10. Superficie de respuesta estimada en gráfica 3D y de contorno del % OY_{Xil} **a)** para el bagazo y **b)** para el RAC de caña de azúcar pretratados con explosión por vapor.

La hemicelulosa primaria presente en caña de azúcar es el xilano, y su cadena principal está formada exclusivamente por unidades de xilosa [53]. Las hemicelulosas crean una barrera natural alrededor de la celulosa en la pared celular, por ello se busca la eliminación de la misma que promueve cambios sustanciales en la accesibilidad a la celulosa y que puede favorecer la hidrólisis enzimática [54]. Sin embargo, las pentosas, como la xilosa, son también una fuente de hidratos de carbono cuya conversión eficiente en etanol, junto con la glucosa derivada de la celulosa, genera mayores rendimientos de combustible y un mayor retorno de la inversión [55]. Esto ha conducido al desarrollo de la ingeniería de *Saccharomyces cerevisiae* para la co-utilización eficiente de xilosa mediante la introducción de una ruta metabólica adecuada [56]. En este contexto, el presente trabajo buscó optimizar simultáneamente las condiciones de pretratamiento para recuperar el máximo posible de cada azúcar, es decir, maximizar simultáneamente el OY de glucosa y xilosa. De este modo, se obtuvieron biomásas pretratadas que podrán ser usadas para fermentar su contenido tanto de hexosas como de pentosas.

La herramienta “optimización de múltiples respuestas” ayuda a determinar la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas, maximizando la función de “deseabilidad”. A partir del DCC, y con la ayuda de esta herramienta, se determinaron los puntos óptimos mediante la función deseabilidad, con el objetivo de maximizar el rendimiento global de glucosa y de xilosa. La Figura 11 muestra las gráficas 3D de la superficie de respuesta de la función deseabilidad de ambas materias primas. El punto óptimo para el caso del bagazo se obtuvo a 197,7 °C y 15,2 min, alcanzándose una deseabilidad del 84,1 % y cuyos valores de OY de glucosa y xilosa fueron 70,5 % y 61,7 %, respectivamente. Las condiciones determinadas para el RAC fueron 199,8 °C y 13,4 min, con una deseabilidad del 72,4 % correspondiente a un OY de glucosa de 67,3 % y de 57,6 % para xilosa. Para validar los modelos, se ensayaron estos puntos y se analizaron las materias primas pretratadas (Tabla 5).

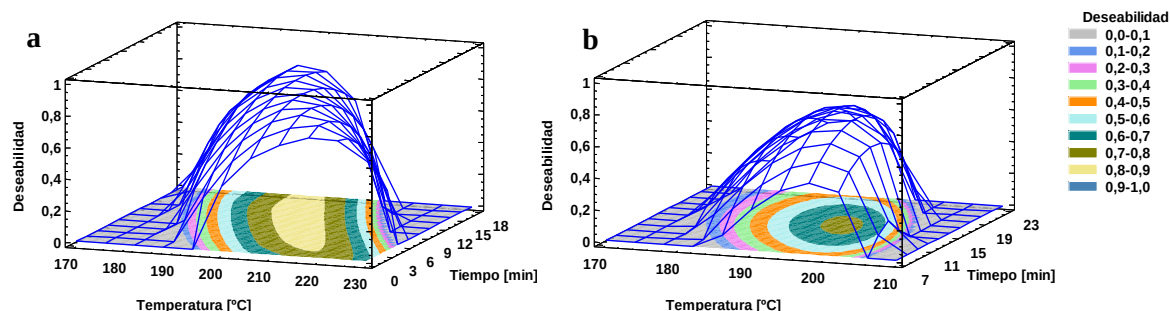


Figura 11. Superficie de respuesta estimada para la función deseabilidad con sus respectivas gráficas de contorno para a) bagazo y b) RAC de caña de azúcar pretratados con explosión por vapor.

Los valores observados de rendimientos globales de azúcares asemejan a los predichos por los modelos en ambos casos y se encuentran dentro del error determinado por los mismos (datos no mostrados). Se lograron rendimientos del 76,5 % de glucosa y del 60,1 % de xilosa cuando el bagazo fue pretratado por EV en las condiciones óptimas, y en el caso del RAC se recuperaron 74,8 % y 61,0% de glucosa y xilosa respectivamente (Tabla 5). Ferreira Leitao *et al.* [2] encontraron un rendimiento global de glucosa de 79,7 % y 91,9 % a 190 °C y 5 min para bagazo y hojas de caña de azúcar, respectivamente. Los mayores rendimientos reportados probablemente se deban al uso del impregnante SO₂ que aumenta la recuperación tanto de celulosa como de hemicelulosas.

Rocha *et al.* [57] obtuvo bagazo de caña pretratado con 58,0, 4,5 y 33,0 % de contenido de glucano, hemicelulosa y lignina total, respectivamente, cuando las condiciones de explosión por vapor fueron 190 °C durante 15 min. Ferreira-Leitao *et al.* [2] pretrataron hojas de caña de azúcar mediante explosión por vapor impregnado con CO₂ a 210 °C durante 5 min, obteniendo sólidos con composiciones similares a las obtenidas aquí a partir de RAC. Estos valores son ligeramente diferentes de los obtenidos en este estudio (Tabla 5) porque la severidad del pretratamiento fue diferente, como así también la composición inicial de las biomásas.

Tabla 5. Composición de la fracción sólida (WIS), % recuperación de sólidos (RS), rendimiento de hidrólisis enzimática (% YHE) y rendimiento global (% OY) de bagazo y RAC de caña de azúcar pretratados con explosión por vapor a las condiciones óptimas.

	Temperatura [°C]	Tiempo [min]	RS [%]	Composición de WIS [%]			YHE [%]		OY [%]	
				Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Glucosa	Xilosa	Glucosa	Xilosa
Bagazo	199,8	13,4	67,2	56,0	5,6	28,0	83,4	62,6	76,5	60,1
RAC	195,2	15,1	63,5	50,8	6,7	26,0	70,6	61,5	74,8	61,0

En la Figura 12 se pueden observar los valores de recuperación de los componentes del bagazo y del RAC pretratados en las condiciones óptimas. La celulosa se recuperó mayoritariamente en el sólido, con valores mayores al 88 %, mientras que casi el 50 % de la hemicelulosa se disolvió, resultando sólidos con alta digestibilidad enzimática ($YHE > 70 \%$). De manera similar, Rocha *et al.* [20] reportaron valores cercanos de recuperación de carbohidratos durante la explosión por vapor de bagazo a $190 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, mientras que un rendimiento de hidrólisis enzimática de glucosa del 80 % fue obtenido por Amores *et al.* [22] para bagazo explosionado a $215 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5 min.

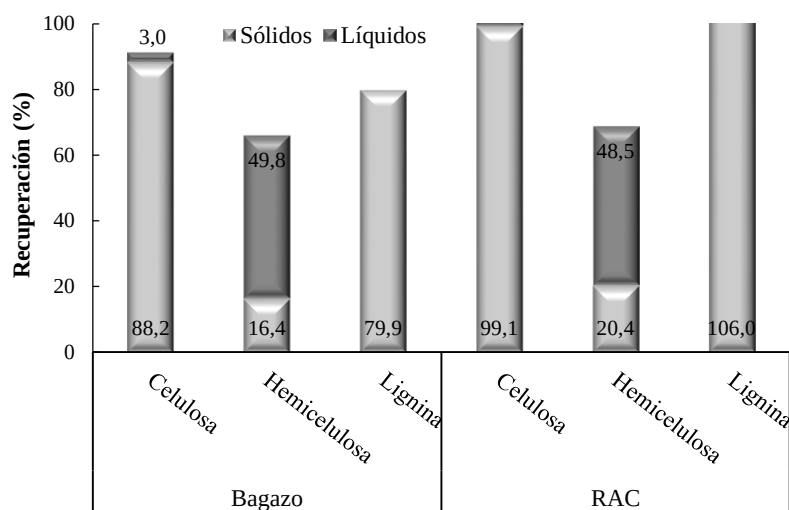
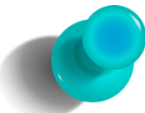


Figura 12. Recuperación de los componentes estructurales principales de bagazo y RAC de la caña de azúcar en WIS y fracciones líquidas después de los pretratamientos, estimados con respecto a la materia prima. El contenido de lignina sólo se determinó en las fracciones sólidas (WIS).

 La optimización del pretratamiento EV permitió definir condiciones operativas que resultaron en rendimientos globales de los azúcares dentro de los valores predichos por los modelos. Se obtuvieron sólidos con un contenido de celulosa superior al 50 % y altamente susceptibles a la hidrólisis enzimática, y la HC se recuperó en un 70 %.

Los cambios estructurales en las biomásas pretratadas fueron analizados mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Se observaron diferencias notables en ambas biomásas antes y después de pretratar (Fig. 13). El pretratamiento alteró la biomasa nativa a nivel de la estructura de la pared celular, cuya disposición de los componentes macromoleculares estuvo estrechamente relacionada al grado de eliminación de hemicelulosa. Como se muestra en las Figs. 13 b y d, la superficie de las biomásas sin tratar presentó un aspecto acristalado y uniforme. Luego de la

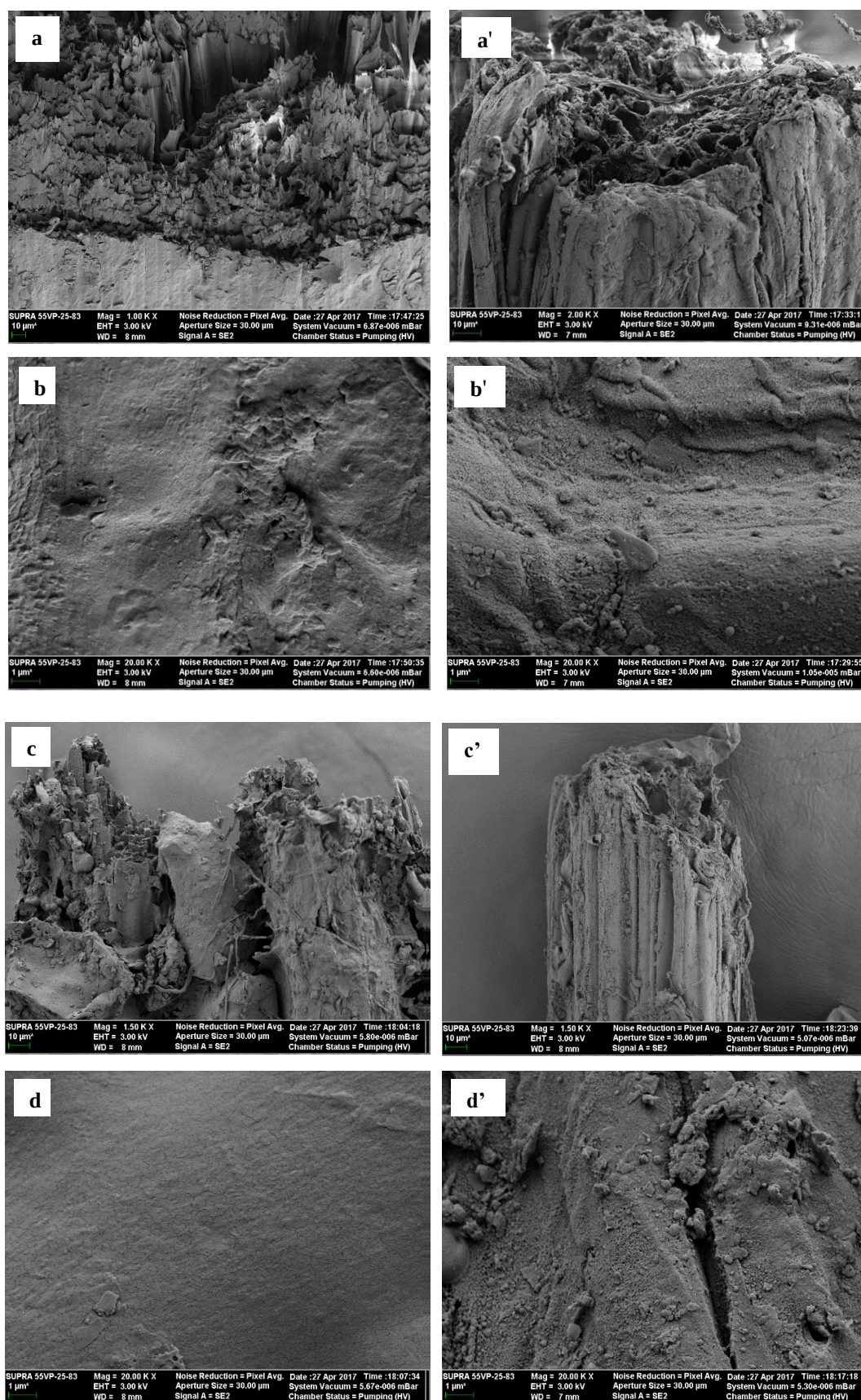


Figura 13. Fotografías captadas mediante MEB, donde **a** y **b** corresponden a bagazo sin pretratar, mientras que **c** y **d** son de RAC sin pretratar. Las biomásas pretratadas se pueden observar respectivamente en las imágenes **a'**, **b'**, **c'** y **d'**. Las figs. 13 **a** y **c** representan la disposición típica de fibras de bagazo y RAC, organizadas como haces. Luego del pretratamiento, se

puede observar un alto grado de desorganización, ruptura de las paredes celulares y disminución de la adhesión de estas fibras (a' y c') que dan como resultado fibrillas de celulosa expuestas.

EV, las estructuras fueron laxas, con superficies rugosas y presencia de microagujeros (Figs. 13 b' y d'). Esto indica que la estructura interna y externa de las biomásas se modificaron mediante el tratamiento EV, lo cual se correlacionó con aumentos significativos de la accesibilidad enzimática al componente celulosa (Tabla 5).

3.3.5. Sacarificación de fracciones líquidas

Las fracciones líquidas obtenidas a partir de los pretratamientos EV de bagazo y RAC en las condiciones óptimas, presentaron altas concentraciones de xilooligómeros, por lo que fueron tratadas con las xilanasas producidas por *Bacillus* sp. AR 03, *Bacillus* sp. AR 17 y *Paenibacillus* sp. AR 247, con el objeto de obtener xilosa y determinar el potencial de este azúcar que podría ser aprovechado en procesos de fermentación o de bioconversión de pentosas. En la Tabla 6 puede verse la caracterización de estos extractos enzimáticos.

Tabla 6. Caracterización de actividades enzimáticas y proteínas de los extractos crudos. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándares calculados a partir de tres ensayos independientes.

Extracto enzimático	<i>Bacillus</i> sp. AR 03	<i>Bacillus</i> sp. AR 17	<i>Paenibacillus</i> sp. AR 247
Xilanasas (UI/mL)	9,9 ± 0,4	29,2 ± 1,1	17,2 ± 0,7
Endoglucanasas (UI/mL)	3,8 ± 0,3	0,2 ± 0,0	1,1 ± 0,1
β-xilosidasa (UI/mL)	ND	ND	ND
Proteínas (mg/mL)	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,3 ± 0,0

* ND: no detectada

Las condiciones de reacciones enzimáticas iniciales fueron pH 6; 50 °C y una dosis de 3 U xilanasas/mL de reacción. Se estimó el aumento de xilosa como el porcentaje de xilosa libre luego de la hidrólisis con respecto a la xilosa libre inicial de la fracción líquida. Las muestras analizadas luego de

Tabla 7. Porcentajes de aumento de azúcares durante la evaluación de hidrólisis de los líquidos de bagazo y RAC de caña de azúcar pretratados bajo las condiciones óptimas, mediante los extractos crudos de *Bacillus* sp. AR 03, *Bacillus* sp. AR 17 y *Paenibacillus* sp. AR 247. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo dosificando 3 U xilanasas/mL, a 50 °C y pH 6 durante 60 min. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándares calculados a partir de dos ensayos independientes.

Enzima	Bagazo				RAC			
	% Glucosa	% Xilosa	% Xilobiosa	% Xilotriosa	% Glucosa	% Xilosa	% Xilobiosa	% Xilotriosa
AR03	34,1 ± 3,0	5,0 ± 1,5	7,6 ± 1,4	37,8 ± 4,4	19,3 ± 0,2	1,0 ± 0,6	8,2 ± 0,2	71,7 ± 3,3
AR17	32,3 ± 5,6	4,0 ± 1,5	16,5 ± 2,1	52,3 ± 3,9	31,3 ± 2,5	3,3 ± 1,4	26,4 ± 0,4	110,4 ± 4,0
AR247	24,3 ± 1,5	7,0 ± 1,2	16,0 ± 0,8	42,3 ± 3,1	21,8 ± 4,6	4,0 ± 2,0	22,7 ± 3,1	92,0 ± 4,0

60 min de reacción mostraron valores de liberación de xilosa inferiores al 4 %, aunque se observaron aumentos importantes (hasta 110 %) en los valores de liberación de xilobiosa y xilotriosa (Tabla 7).

Los cromatogramas de los hidrolizados mostraron que los mismos contenían oligómeros de grado de polimerización (GP) mayor de 3. Los cromatogramas superpuestos de la fracción líquida del bagazo pretratado antes y después del tratamiento enzimático (Fig. 14) muestran que los picos de mayor GP disminuyen con la adición de las enzimas, mientras que los de xilotriosa y xilobiosa aumentan. Se concluyó que era necesaria la adición de una β -xilosidasa, ya que ninguna de las mezclas enzimáticas contenía esta enzima.

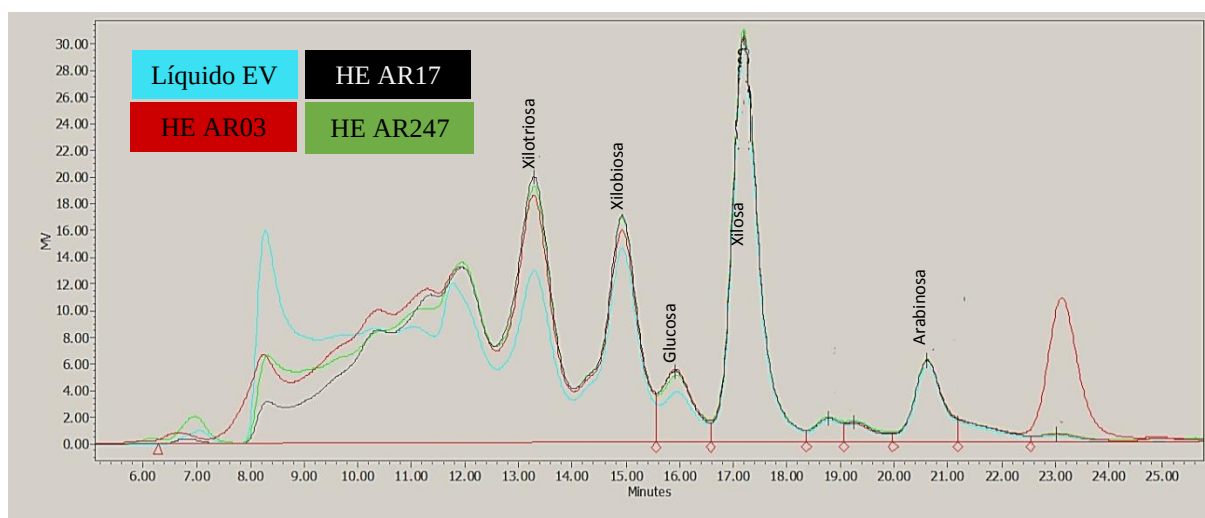


Figura 14. Cromatogramas del líquido del bagazo pretratado por explosión por vapor en las condiciones óptimas (líquido EV), y de los líquidos hidrolizados con los extractos enzimáticos de *Bacillus* sp. AR 03 (HE AR03), *Bacillus* sp. AR 17 (HE AR17) y *Paenibacillus* sp. AR 247 (HE AR247).

Se ensayaron las mismas reacciones con la adición de una β -xilosidasa comercial (β -D-xilosidasas E-BXSR, Megazyme), en una relación xilanasas: β -xilosidasa (X: BX) 1:2, y se tomaron muestras a los 90 min. Se puede observar en la Tabla 8 que en todos los casos donde estuvo presente la β -xilosidasa, se produjo la hidrólisis completa de xilobiosa y xilotriosa. El resultado más promisorio se obtuvo con las xilanasas de la cepa AR 17, ya que ésta resultó en los aumentos más significativos de xilosa para las fracciones líquidas provenientes de ambas materias primas. Si bien los aumentos en la liberación de glucosa fueron significativos (hasta 48,5 %), la cantidad presente de este azúcar fue muy pequeño (aproximadamente 1,3 g/L). Cabe destacar que la liberación de xilosa fue mayor en el caso del líquido del RAC pretratado en comparación con el del bagazo, posiblemente debido a la utilización de una dosificación sub-óptima de enzimas en la fracción líquida de bagazo, donde la xilosa estuvo presente en mayor cantidad (11,6 g/L) y en forma oligomérica casi en su totalidad (96,8 %). En el caso del RAC la concentración de xilosa fue menor (8,5 g/L) y sólo el 81,2 % estaba como oligómero (datos no mostrados).

Tabla 8. Porcentajes de aumento en la liberación enzimática de azúcares durante la evaluación de hidrólisis de los líquidos de bagazo y RAC de caña de azúcar pretratados bajo las condiciones óptimas, utilizando los extractos de *Bacillus* sp. AR 03, *Bacillus* sp. AR 17 y *Paenibacillus* sp. AR 247. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo dosificando 3 U xilanasas (X) /mL y β -xilosidasa comercial (BX) en una proporción 1:2, a 50 °C y pH 6 durante 90 min. Se muestran los valores medios y las desviaciones estándares calculados a partir de dos ensayos independientes.

Enzima	Bagazo				RAC			
	% Glucosa	% Xilosa	% Xilobiosa	% Xilotriosa	% Glucosa	% Xilosa	% Xilobiosa	% Xilotriosa
AR03+BX	43,0 $\pm$ 1,1	108,6 $\pm$ 1,6	-100,0 $\pm$ 0,0	-100,0 $\pm$ 0,0	44,6 $\pm$ 15,6	288,1 $\pm$ 6,5	-100,0 $\pm$ 0,0	-100,0 $\pm$ 0,0
AR17+BX	47,1 $\pm$ 8,9	111,0 $\pm$ 0,7	-100,0 $\pm$ 0,0	-100,0 $\pm$ 0,0	48,5 $\pm$ 1,5	292,5 $\pm$ 5,8	-100,0 $\pm$ 0,0	-100,0 $\pm$ 0,0
AR247+BX	40,3 $\pm$ 1,4	107,1 $\pm$ 0,8	-100,0 $\pm$ 0,0	-100,0 $\pm$ 0,0	39,4 $\pm$ 0,8	286,5 $\pm$ 4,0	-100,0 $\pm$ 0,0	-100,0 $\pm$ 0,0
AR03	39,5 $\pm$ 4,3	2,5 $\pm$ 1,9	5,5 $\pm$ 2,4	42,5 $\pm$ 1,2	25,0 $\pm$ 3,0	1,2 $\pm$ 0,3	12,0 $\pm$ 2,3	83,2 $\pm$ 1,0
AR17	40,1 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,7	14,0 $\pm$ 1,2	56,3 $\pm$ 0,6	40,7 $\pm$ 4,5	1,6 $\pm$ 0,8	34,4 $\pm$ 2,3	119,7 $\pm$ 1,0
AR247	23,3 $\pm$ 3,6	0,1 $\pm$ 0,0	7,7 $\pm$ 5,4	37,9 $\pm$ 7,7	27,7 $\pm$ 4,8	1,7 $\pm$ 0,6	27,2 $\pm$ 3,4	101,5 $\pm$ 4,1
BX	16,4 $\pm$ 3,4	96,8 $\pm$ 3,6	-100,0 $\pm$ 0,0	-100,0 $\pm$ 0,0	6,9 $\pm$ 4,5	253,9 $\pm$ 9,9	-100,0 $\pm$ 0,0	-100,0 $\pm$ 0,0

El extracto enzimático AR 17 fue utilizado para continuar con el estudio del efecto de la proporción X: BX en la recuperación de xilosa. Las reacciones con diferentes proporciones de estas enzimas, se llevaron a cabo a 50 °C, pH 6 y durante 1,5 h y hasta 6 h. Para ambas biomásas, los valores máximos de liberación de xilosa se registraron a las 6 h de reacción enzimática (Fig. 15). Sin embargo, los valores de xilosa obtenidos por hidrólisis de la fracción líquida de bagazo no presentaron diferencias significativas entre los tiempos de reacción ensayados, para todas las proporciones X: BX, mientras que la liberación de xilosa de la fracción líquida de RAC mostró aumentos significativos con el incremento en el tiempo de reacción para todas las proporciones X: BX evaluadas. Las concentraciones de xilobiosa y xilotriosa finales fueron siempre cero.

Se obtuvieron 8,2 g/L de xilosa a partir del líquido de bagazo explosionado luego de 6 h de hidrólisis con una dosificación de 3 U xilanasas/mL y β -xilosidasa en una relación 1:1, lo que significó una liberación del 70,7 % de la xilosa potencial presente. De manera similar, el uso de X: BX 1:2 en el caso del RAC produjo un 71,7 % de xilosa libre con respecto al potencial total de este monómero (8,5 g/L) en el líquido pretratado. No obstante el contenido en xilosa de las fracciones líquidas obtenidas, éste resulta insuficiente para una fermentación viable [58], por lo que deberían ser evaluados métodos de concentración.

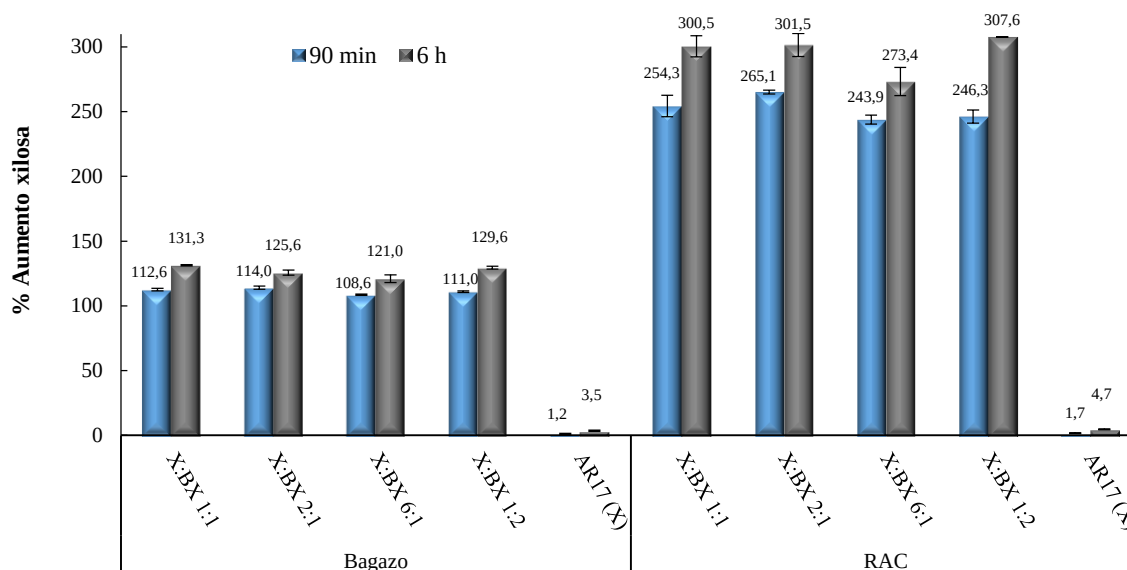
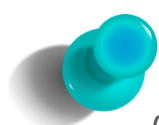


Figura 15. Porcentajes de aumento de la disponibilidad de xilosa por hidrólisis con extractos enzimáticos de *Bacillus* sp. AR 17, a partir de los líquidos de bagazo y RAC de caña de azúcar pretratados bajo las condiciones óptimas. Las reacciones se llevaron a cabo con 3 U xilanasas(X)/mL y β -xilosidasa comercial (BX) en las proporciones X: BX indicadas, a 50 °C, pH 6 y a diferentes tiempos. Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de dos ensayos independientes.



El extracto xilanolítico producido por *Bacillus* sp. AR17 fue eficiente en la generación de xilosa por hidrólisis de los xilooligómeros presentes en las fracciones líquidas originadas por EV de bagazo y RAC de caña de azúcar. Esto permitió estimar la cantidad de xilosa disponible en dichas fracciones para su posterior conversión a etanol u otros químicos.

3.3.6. Sacarificación de las fracciones sólidas

Las fracciones sólidas (WIS) del material pretratado bajo condiciones óptimas se utilizaron para evaluar la formulación de cócteles enzimáticos por suplementación de celulasas comerciales (Celluclast 1.5 y Novo188, Sigma-Aldrich) con enzimas xilanolíticas producidas por las cepas *Bacillus* sp. AR 03, *Bacillus* sp. AR 17 y *Paenibacillus* sp. AR 247. Para ello, el rendimiento de hidrólisis fue analizado para diferentes condiciones de temperatura y dosis de enzimas. Es importante destacar que se utilizó pH 6 en las reacciones enzimáticas, valor óptimo de las xilanasas de los extractos crudos, a pesar que el pH óptimo para las celulasas de *T. reesei* (Celluclast 1.5) es de 5. Considerando que las enzimas de diferentes microorganismos pueden actuar de forma sinérgica, el

ajuste del pH ofrece la posibilidad de desarrollar mezclas de enzimas con mayor actividad que cada enzima analizada por separado.

Las reacciones de hidrólisis llevadas a cabo a pH 6 y 40 °C con 5 UPF/ g sustrato de Celluclast 1.5, 5 UI/g sustrato de Novo 188 y 100 UI de xilanasas (AR03, AR17 y AR247) /g sustrato no mostraron un incremento significativo de glucosa y se acumuló celobiosa (datos no mostrados). Este hecho pudo deberse a que las β -glucosidasas comerciales (Novo 188) no fueron ensayadas en condiciones óptimas (pH 4,8 y 50 °C). En todos los casos, los controles fueron las reacciones enzimáticas bajo las mismas condiciones, en ausencia de las xilanasas y el incremento de azúcares se midió con respecto a estos controles. Por ello, se evaluó la dosificación de esta enzima en condiciones de pH 6 y 40 °C para obtener una actividad equivalente a la de 5 UI en sus condiciones óptimas. Así, se definió 30 UI/g sustrato como dosis de Novo 188 para los ensayos posteriores. Como resultado, la liberación de glucosa en las reacciones de hidrólisis con Celluclast 1.5 + Novo 188 (controles) aumentó un 39,5 % para bagazo y un 32,7 % para RAC con respecto a la dosificación de 5 UI/g sustrato de β -glucosidasas, además de una notoria disminución de la concentración de celobiosa.

En el caso de las dos biomasas en estudio, la adición de 100 U de xilanasas de los extractos enzimáticos de las cepas AR03, AR17 y AR247 a la hidrólisis de los WIS a 40 °C, produjo incrementos poco significativos de glucosa (menores al 7 %) a las 24 h de reacción, con respecto a los ensayos sólo con las enzimas comerciales (Tabla 9). En cambio, se confirmó la actividad xilanasa debido a que se registraron incrementos de aproximadamente 20 % en la liberación de xilosa, aunque sólo para los extractos de las cepas AR17 y AR247.

Tabla 9. Liberación de glucosa y xilosa durante la hidrólisis enzimática de los WIS provenientes de bagazo y de RAC de caña de azúcar pretratados en las condiciones óptimas. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 6 durante 24 h, con el cóctel enzimático comercial (5 UPF de Celluclast 1.5 y 30 UI de Novo 188 por g sustrato) y el agregado de los extractos crudos de *Bacillus* sp. AR 03, *Bacillus* sp. AR 17 y *Paenibacillus* sp. AR 247, dosificado a 100 UI de xilanasas /g sustrato.

		% Incremento/reducción			
		Bagazo		RAC	
		Glucosa	xilosa	Glucosa	xilosa
AR03	40 °C	-11,6 $\pm$ 1,1	0,0 $\pm$ 0,0	-8,9 $\pm$ 3,1	0,0 $\pm$ 0,0
	50 °C	-11,1 $\pm$ 3,5	6,4 $\pm$ 3,0	-12,2 $\pm$ 4,3	1,5 $\pm$ 0,3
AR17	40 °C	4,6 $\pm$ 0,6	14,0 $\pm$ 3,0	7,1 $\pm$ 1,5	16,7 $\pm$ 1,0
	50 °C	7,1 $\pm$ 1,1	32,0 $\pm$ 4,3	6,4 $\pm$ 2,8	14,4 $\pm$ 5,4
AR247	40 °C	5,3 $\pm$ 0,7	19,3 $\pm$ 2,9	3,6 $\pm$ 0,6	12,5 $\pm$ 0,6
	50 °C	16,8 $\pm$ 3,5	20,8 $\pm$ 4,3	17,6 $\pm$ 4,6	20,5 $\pm$ 6,1

Al incrementarse la temperatura de reacción a 50 °C, se observaron mejoras en la liberación tanto de glucosa como de xilosa con la adición de extractos de las cepas AR17 y AR247. El efecto más

significativo se observó en la liberación de xilosa por la adición de las enzimas AR17, que alcanzó incrementos del 32 % en el caso de la fracción sólida de bagazo.

Por otro lado, el incremento de glucosa fue máximo a partir de la hidrólisis de los WIS con la mezcla de enzimas comerciales y xilanasas de *Paenibacillus* sp. AR247, los cuales alcanzaron valores de 16,8 % y 17,6 % para bagazo y RAC, respectivamente. El extracto xilanolítico de esta cepa produjo aumentos en la liberación de xilosa de aproximadamente 20 % para ambas materias primas (Tabla 9). Finalmente, la utilización de xilanasas en forma individual no resultó en la liberación de azúcares para todos los casos analizados (datos no mostrados).

Llamativamente, la suplementación de enzimas comerciales con el extracto de la cepa AR03 produjo una caída significativa en la liberación de azúcares con respecto a los resultados obtenidos con enzimas comerciales (control) (Tabla 9). Este efecto inhibitorio podría deberse al aumento de la fuerza iónica registrado en la mezcla enzimática por agregado de xilanasas AR03, ya que mediante la medición de conductividad se verificó un aumento de 35 veces de este parámetro con respecto al control.

Dado que la liberación de glucosa creció significativamente (aproximadamente 17 %) con la mezcla enzimática que incluyó xilanasas AR247 (Tabla 9), se decidió estudiar el efecto de las mismas en las concentraciones de 25, 50 y 100 UI/ g sustrato, a 50 °C y durante 24 h (Fig. 16). Con la adición de 25 UI de xilanasas AR247/g sustrato, la HE de glucosa no presentó cambios con respecto al control con enzimas comerciales, aunque se obtuvieron aumentos entre 12 y 18 % de xilosa. Por otro lado, los incrementos en la liberación de monómeros con el uso de mayores dosis de xilanasas AR247, 100 UI/g sustrato, no superaron el 17 % y el 25 % para glucosa y xilosa, respectivamente y con respecto a los controles (Fig. 16). Se ha sugerido anteriormente que, a altas concentraciones de enzimas, el número relativo de sitios de unión a enzimas se reduce y las enzimas en el cóctel compiten por los mismos sitios de unión, lo que lleva a una reducción en la tasa global de actividad [58, 59].

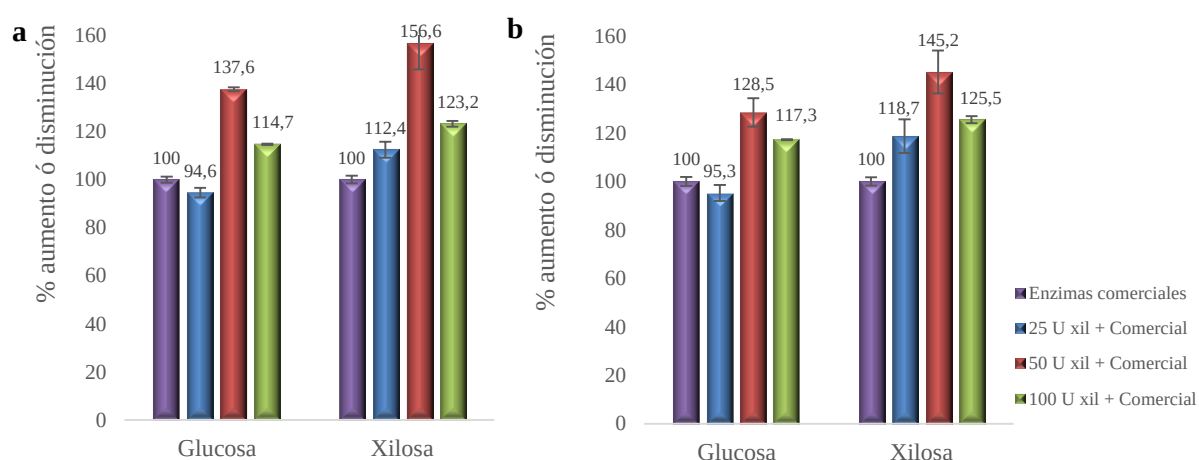
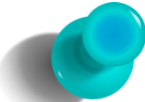


Figura 16. Porcentajes de liberación de glucosa y xilosa durante las reacciones de hidrólisis enzimática de los WIS de **a)** bagazo y **b)** RAC de caña de azúcar pretratados en las condiciones óptimas. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 6 y 50 °C

durante 24 h, mediante el agregado al coctel enzimático comercial (5 UPF de Celluclast 1.5 y 30 UI de Novo 188 por g sustrato) de diferentes dosis de xilanasas de *Paenibacillus* sp. AR 247.

El máximo incremento de glucosa y de xilosa fue registrado con la adición de 50 UI de xilanasas AR247/g sustrato, para ambas materias primas. La liberación de glucosa de WIS de bagazo aumentó un 37,6 %, mientras que este incremento fue ligeramente menor, 28,5 %, en el caso del RAC. Esto puede deberse a que la cantidad de hemicelulosa en la fracción sólida del bagazo fue menor que en el RAC pretratado (Tabla 9), ya que las interacciones entre xilano y celulosa en la biomasa pretratada reducen el acceso de celulasas a la celulosa [60, 61]. Los incrementos de xilosa fueron de 56,6 y 45,2 % para bagazo y RAC explosionados, respectivamente.

En todos los casos analizados, la adición de xilanasas a las celulasas comerciales incrementaron los valores de rendimiento de HE, en concordancia con lo publicado hasta ahora. El efecto sinérgico entre las enzimas accesorias y la celulasa se puede explicar ya que la eliminación de polisacáridos no celulósicos crea más sitios de unión para la celulasa [62]. Berlin *et al.* [63] también señalaron que la eliminación del recubrimiento de celulosa mediante enzimas accesorias como la xilanasas y la pectinasa estimularon la digestibilidad de la celulosa. Además, diversos autores concluyeron que la acción de las xilanasas depende en gran medida de la naturaleza del sustrato, el origen de los microorganismos productores de enzimas y las condiciones de resistencia enzimática [27, 28, 64].

 Se desarrolló una formulación enzimática con una nueva fuente de enzimas a partir de aislamientos bacterianos de origen local, la cual mostró ser adecuada para mejorar la performance de las preparaciones comerciales en la producción de azúcares y para la sacarificación de residuos lignocelulósicos.

3.4 Conclusiones

Este es el primer trabajo en el que se aplica la metodología de superficie de respuesta para optimizar las condiciones del pretratamiento explosión por vapor del bagazo y del RAC de caña de azúcar. Como resultado, se obtuvieron rendimientos globales de glucosa y xilosa adecuados para procesos viables, donde la materia prima no fue tratada por molienda previa ni fue sometida a impregnación con químicos para la explosión por vapor. Al no haber agregado un catalizador externo, el pretratamiento aquí desarrollado evita los costos del uso de químicos adicionales y los problemas asociados derivados de la corrosión del equipo [65]. La alternativa no catalizada utilizada implica un impacto ambiental significativamente menor que las que requieren de catálisis química adicional.

Un aspecto de relevancia a considerar en este trabajo es el desarrollo de un proceso que combina una liberación potencialmente eficiente de glucosa junto a bajas concentraciones de compuestos inhibidores de la fermentación. Además, la optimización de EV resultó en condiciones de pretratamiento muy similares para ambas materias primas, lo cual es un resultado muy promisorio para realizar el pretratamiento combinando ambas materias primas.

Finalmente, la suplementación del cóctel celulolítico comercial con xilanasas producidas por *Paenibacillus* sp. AR 247 produjo un aumento del 37 % y del 28 % en el rendimiento en glucosa por hidrólisis enzimática de los sólidos pretratados de bagazo y RAC, respectivamente. Cabe destacar que estos incrementos fueron logrados mediante el agregado directo del extracto enzimático sin etapa de purificación de las enzimas, lo cual es una muy importante ventaja técnica y económica para el proceso.

Referencias

- [1] Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 100, 10-18.
- [2] Ferreira-Leitão V., Gottschalk L.M.F., Ferrara M.A., Nepomuceno A.L. *et al.* (2010). Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. *Waste Biomass Valorization* 1, 65-76.
- [3] Balat M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers. Manage.* 52, 858-75.
- [4] Szczerbowski D., Pitarelo A.P., Zandoná Filho A., Ramos L.P. (2014). Sugarcane biomass for biorefineries, comparative composition of carbohydrate and noncarbohydrate components of bagasse and straw. *Carbohydr. Polym.* 114, 95–101.
- [5] Mood S.H., Hossein Golfeshan A., Tabatabaei M., Salehi Jouzani G. *et al.* (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renew Sust Energ Rev* 27, 77-93.
- [6] Silveira M.H.L., Morais A.R.C., Lopes A.M.C., Oleksyszzen D.N. *et al.* (2015). Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *Chem Sus Chem.* 8, 3366-90.
- [7] Wanderley M.C.A., Martín C., Rocha G.J.M., Gouveia E.R. (2013). Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed- batch enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol* 128, 448-53.
- [8] Jacquet N., Maniet G., Vanderghem C., Delvigne F. *et al.* (2015). Application of steam explosion as pretreatment on lignocellulosic material: A review. *Ind. Eng. Chem. Res.* 54, 2593-98.
- [9] Li J., Lennholm H., Henriksson G., Gellerstedt G. (2001). Bio-refinery of lignocellulosic materials for ethanol production. II. Fundaments and strategic design of steam explosion. In: Kyritsis S, Beenackers AACM, Helm P, Grassi A, Chiaramonti D, editors. *Proceedings of the first world conference on biomass for energy and industry* 1, 767–70.
- [10] Allen S.G., Schulman D., Lichwa J., Antal M.J. *et al.* (2001). A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. *Ind. Eng. Chem. Res.* 40, 2934–41.
- [11] Hu F., Ragauskas A. (2012). Pretreatment and lignocellulosic chemistry. *Bioenerg. Res.* <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-012-9208-0>, online version.
- [12] Fengel D., Wegener G. (1989). *Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter, Berlin.
- [13] Chen H., Han Y., Xu J. (2008). Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. *Process Biochem.* 43, 1462–66.
- [14] Carvalho D.M., Sevastyanova O., de Queiroz J.H., Colodette J.L (2016). Cold alkaline extraction as a pretreatment for bioethanol production from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw. *Energy Convers Manage* 124, 315-24.
- [15] Lachos-Pérez D., Tompsett G.A., Guerra P., Timko M.T. *et al.* (2017). Sugars and char formation on subcritical water hydrolysis of sugarcane straw. *Bioresour Technol* 243, 1069–77.
- [16] Mesa L., Martínez Y., Barrio E, González E. (2017). Desirability function for optimization of diluted acid pretreatment of sugarcane straw for ethanol production and preliminary economic analysis based in three fermentation configurations. *Appl. Energ.* 198, 299–311.
- [17] Huang Q., Yan Q., Fu J., Lv X. *et al.* (2016). Comparative study of different alcoholate pretreatments for enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 211, 464-71.

- [18] Kuster-Moro M., Teixeira R.S.S., Sant'Ana da Silva A., Duarte Fujimoto M. *et al.* (2017). Continuous pretreatment of sugarcane biomass using a twin-screw extruder. *Ind Crop Prod* 97, 509–17.
- [19] Laser M., Schulman D., Allen S.G., Lichwa J. *et al.* (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresour Technol* 81 (1), 33–44.
- [20] Rocha G.J.M., Gonçalves A.R., Oliveira B.R., Olivares E.G. *et al.* (2012). Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Ind Crops Prod* 35, 274–279.
- [21] Aguiar R.S., Silveira M.H.L., Pitarelo A.P., Corazza M.L. *et al.* (2013). Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 147, 416–423.
- [22] Amores I., Ballesteros I., Manzanares P., Sáez F. *et al.* (2013). Ethanol production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. *Electronic Journal of Energy & Environment*, 25-36. <https://doi.org/10.7770/ejee-V1N1-art486>.
- [23] Neves P.V., Pitarelo A.P., Ramos L.P. (2016). Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. *Bioresour Technol* 208, 184–194.
- [24] Oliveira F.M.V., Pinheiro I.O., Soto-Maior A.M., Nartin C. *et al.* (2013). Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added product. *Bioresour Technol* 130, 168–73.
- [25] Qing Q., Yang B., Wyman C.E. (2010). Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour Technol.* 101, 9624–30.
- [26] Zhang J., Tang M., Viikari L. (2012). Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. *Bioresour Technol* 121, 8–12.
- [27] Hu J., Arantes V., Saddler J.N. (2011). The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnol Bioeng* 36, 1–13.
- [28] Hu J., Arantes V., Pribowo A., Saddler J.N. (2013). The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. *Biotechnol Biofuels* 6, 112.
- [29] Lavoie J.M., Capek-Menard E., Gauvin H., Chornet E. (2010). Production of pulp from *Salix viminalis* energy crops using the FIRST process. *Bioresour Technol* 101, 4940–46.
- [30] Di Marco E., Soraire P.M., Romero C.M., Villegas L.B. *et al.* (2017). Raw sugarcane bagasse as carbon source for xylanase production by *Paenibacillus* species: a potential degrader of agricultural wastes. *Environ Sci Pollut Res Int* 24(23), 19057-67.
- [31] Sluiter J.B., Ruiz R.O., Scarlata C.J., Sluiter A.D. *et al.* (2010). Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *J Agr Food Chem* 58, 9043–53.
- [32] Canilha L., Chandel A.K., Milessi T.S.D.S., Antunes F.A.F. *et al.* (2012). Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Biomed Biotechnol* <http://dx.doi.org/10.1155/2012/989572>.
- [33] Hernández-Pérez A.F., Costa I.A., Silva D.D., Dussán K.J. *et al.* (2016). Biochemical conversion of sugarcane straw hemicellulosic hydrolyzate supplemented with co-substrates for xylitol production. *Bioresour Technol.* 200, 1085-88.

- [34] Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Medeiros A.B.P., Karp S.G. *et al.* (2010). Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol* 101, 4820–25.
- [35] Rocha G.J.M., Martin C., Soares I.B., Maior A.M.S. *et al.* (2011). Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass Bioenerg* 35, 663–670.
- [36] Mesa L., González E., Cara C., González M. *et al.* (2011). The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Chem Eng J* 168, 1157–1162.
- [37] Pratto B., de Souza R.B.A., Sousa R., da Cruz A.J.G. (2015). Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Straw: Kinetic Study and Semi-Mechanistic Modeling. *Appl. Biochem Biotechnol* 1–15.
- [38] Carvalho D., Sevastyanova O., Souza Penna L., Pereira da Silva B. *et al.* (2015). Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid and alkaline pretreatments. *Ind Crop Prod* 73, 118–26.
- [39] Hatfield R., Fukushima R. S. (2005). Can lignin be accurately measured? *Crop Science* 45 (3), 832–39.
- [40] Ramos L.P., da Silva L., Ballem A. C., Pitarelo A.P. (2015). Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. *Bioresour Technol* 175, 195–202.
- [41] Chiarello L.M., Ramos C.E.A., Neves P.V. *et al.* (2016). Production of cellulosic ethanol from steam-exploded *Eucalyptus urograndis* and sugarcane bagasse at high total solids and low enzyme loadings. *Sustain Chem Process* 4, <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0059-4>.
- [42] Harrison M.D., Zhang Z., Shand K., O'Hara I.M. *et al.* (2013). Effect of pretreatment on saccharification of sugarcane bagasse by complex and simple enzyme mixtures. *Bioresour Technol* 148, 105–113.
- [43] Biswas R., Uellendahl H., Ahring B.K. (2014). Wet explosion pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced enzymatic hydrolysis. *Biomass Bioenergy* 61, 104–113.
- [44] Ballesteros I., Negro M.J., Oliva J.M., Cabañas A. *et al.* (2006). Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 130, 496–508.
- [45] Pires-Andrade L.P., Crespim E., Oliveira N.D., Campos R.C. *et al.* (2017). Influence of sugarcane bagasse variability on sugar recovery for cellulosic ethanol production. *Bioresour Technol* 241, 75–81.
- [46] Bobleter O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog Polym Sci* 19, 797–841.
- [47] Tejirian A., Xu F. (2011). Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme Microb Technol* 48, 239–247.
- [48] Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol* 74, 25–33.
- [49] Kholkin Y.L. (1989). Mechanism of conversion of the main wood components during hydrolysis. In: Kholkin, Y.L. ed. *Technology of Hydrolytic Production*. Lesnaja Promyshlennost, Moscow, p. 48–96.
- [50] Teodoro J.C., Tomé J.A.T.R., Andrade L.P., Galvão C.M.A. (2013). Avaliação do efeito dos inibidores presentes no caldo hidrolisado na fermentação utilizando a cepa SA1. In: *Sinaferm*. pp. 1–4.
- [51] Sendelius J. (2005). Steam pretreatment optimization for sugarcane bagasse in bioethanol production. Master of Science Thesis. Department of Chemical Engineering, Lund University, Sweden.
- [52] Banerji A., Balakrishnan M., Kishore V.V.N. (2013). Low severity dilute-acid hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Appl Energy* 104, 197–206.
- [53] Ebringerová A., Hromádková Z., Heinze T. (2005). Hemicellulose. *Adv Polym Sci* 186, 1–67.

- [54] Chandra R.P., Bura R., Mabee W.E., Berlin A. *et al.* (2007). Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv Biochem Eng Biotechnol* 108, 67–93.
- [55] Sassner P., Galbe M., Zacchi G. (2007). Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy* 10, 014.
- [56] Zha J., Shen M.H., Hu M.L., Song H. *et al.* (2013). Enhanced expression of genes involved in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41, 27–39
- [57] Rocha G.J.M., Gonçalves A.R., Nakanishi S.C., Nascimento V.M. *et al.* (2015). Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. *Ind Crops Prod* 74, 810–816.
- [58] Banerjee G., Car S., Scott-Craig J. S., Borrusch M. S. *et al.* (2010). Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 101, 9097–105.
- [59] Lima EA, Machado CB, Zanthorlin LM, Ward RJ *et al.* (2016). GH53 Endo-Beta-1,4-Galactanase from a newly isolated *Bacillus licheniformis* CBMAI 1609 as an enzymatic cocktail supplement for biomass saccharification. *Appl Biochem Biotechnol* 179(3), 415-26.
- Crops Prod. 74, 810–816.
- [60] Zhang J, Viikari L. (2014). Impact of xylan on synergistic effects of xylanases and cellulases in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Appl Biochem Biotechnol* 174, 1393–402.
- [61] Ewanick, S., & Bura, R. (2011). The effect of biomass moisture content on bioethanol yields from steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 102, 2651–58.
- [62] Alvira P., Negro M.J., Ballesteros M. (2011). Effect of endoxylanase and α -L-arabinofuranosidase supplementation on the enzymatic hydrolysis of steam exploded wheat straw. *Bioresour Technol* 102, 4552–4558.
- [63] Berlin, A., Maximenko, V., Gilkes, N., Saddler, J. (2007). Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* 97, 287–296.
- [64] Gonçalves G.A.L., Takasugi Y., Jia L., Mori Y. *et al.* (2015). Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. *Enzyme Microb Technol* 72, 16-24.
- [65] Romání, A., Garrote, G., Ballesteros, I., Ballesteros, M. (2013). Second generation bioethanol from steam exploded *Eucalyptus globulus*. *Fuel* 111, 66–74.



Capítulo 4



4.1 Introducción

Hacia una sustitución progresiva de los combustibles fósiles por energías renovables, el uso de biomasa vegetal no alimentaria para la producción de etanol de segunda generación (2G) carece incluso ahora de suficiente viabilidad económica. En consecuencia, los residuos lignocelulósicos agrícolas y forestales son objeto de amplios estudios de investigación y viabilidad, ya que se los considera una gran fuente de carbohidratos para combustibles químicos [1]. Entre ellos, los residuos post-cosecha de la caña de azúcar que comprenden parte de las hojas, las puntas y la basura se describen como paja de caña de azúcar o residuos agrícolas de cosecha (RAC), excluyendo el bagazo de la caña de azúcar. Este residuo es una fuente lignocelulósica abundante en el noroeste de Argentina, donde la industria basada en la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es el principal motor de la economía. Esta actividad alcanzó 18,436,082 t de caña de azúcar cultivada en 2016 [2], generando grandes cantidades de residuos que quedan parcialmente en el campo para mantener la calidad del suelo, prevenir la erosión y mejorar la retención de agua. Pero la mayoría de ellos podría proporcionar una fuente económica y fácilmente disponible de biomasa lignocelulósica [3].

Para una liberación enzimática adecuada de azúcares fermentables a partir de lignocelulosa, el pretratamiento representa un paso crucial. El uso de diferentes métodos de pretratamiento tiene un impacto notable en el proceso global de producción de etanol ya que afectan sustancialmente las tasas de hidrólisis enzimática, la carga de enzimas, las variables de fermentación e incluso los procedimientos posteriores. Por lo tanto, sus condiciones deben considerarse cuidadosamente para cada tipo de biomasa [4,5]. Para la biomasa de RAC de caña de azúcar, los pretratamientos evaluados hasta el momento incluyen molienda [6], ácido diluido [7], álcali [8], microondas [9], explosión de vapor no catalizado [10], extrusión [11], pretratamiento secuencial con cloruro férrico asistido con glicerol [12] y combinación de molienda en disco húmedo y pretratamientos de ozonólisis [13]. Entre ellos, la explosión de vapor es uno de los métodos más exitosos y ampliamente utilizados para fraccionar y mejorar la digestibilidad enzimática de la lignocelulosa [14]. Además, se ha destacado la utilidad del ácido diluido porque permite una alta recuperación de pentosas [15], mientras que los pretratamientos basados en álcalis son ventajosos dado que se llevan a cabo en condiciones relativamente suaves produciendo altos rendimientos de glucosa, baja formación de inhibidores y más bajos costos de capital [16].

Una vez que se abre la estructura recalcitrante de lignocelulosa, la producción de etanol 2G se puede lograr mediante la sacarificación y fermentación simultánea (SFS) o la pre-sacarificación y las configuraciones de sacarificación y fermentación simultáneas (PSFS). El enfoque SFS permite el consumo de azúcar por la levadura, que se va produciendo por hidrólisis enzimática, lo que minimiza la acumulación de glucosa y la inhibición por celobiosa [17]. Alternativamente, la utilización de un esquema de PSFS implica la incubación del sustrato con enzimas hidrolíticas durante un período de tiempo relativamente corto (8 - 24 h); luego, la SFS procede cuando el microorganismo es inoculado.

Este procedimiento permite superar las limitaciones enzimáticas de la hidrólisis debido a las diferentes temperaturas óptimas entre las enzimas (50-55 °C) y la mayoría de las levaduras industriales (30 °C). Además, PSFS ha demostrado ser adecuado para cargas elevadas de sólidos ya que reduce la viscosidad inicial del sistema, facilitando así el paso posterior de fermentación [18].

En los residuos post-cosecha de la caña de azúcar, la mayoría de los informes disponibles se han centrado por separado en las etapas individuales de los procesos, sin tener en cuenta su efecto integrado en el producto final. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue realizar una evaluación general de la producción de etanol 2G a partir de residuos de cultivos agrícolas de caña de azúcar (RAC). Este trabajo abarcó la evaluación de diferentes pretratamientos de RAC mediante el análisis de la composición química y la digestibilidad enzimática de las fracciones sólidas obtenidas. A continuación, las condiciones de sacarificación se ajustaron combinando celulasas y hemicelulasas de última generación, y la producción de etanol 2G se llevó a cabo con alta carga de sólidos (20 %, p/v) según dos estrategias, SFS y PSFS (Figura 1).

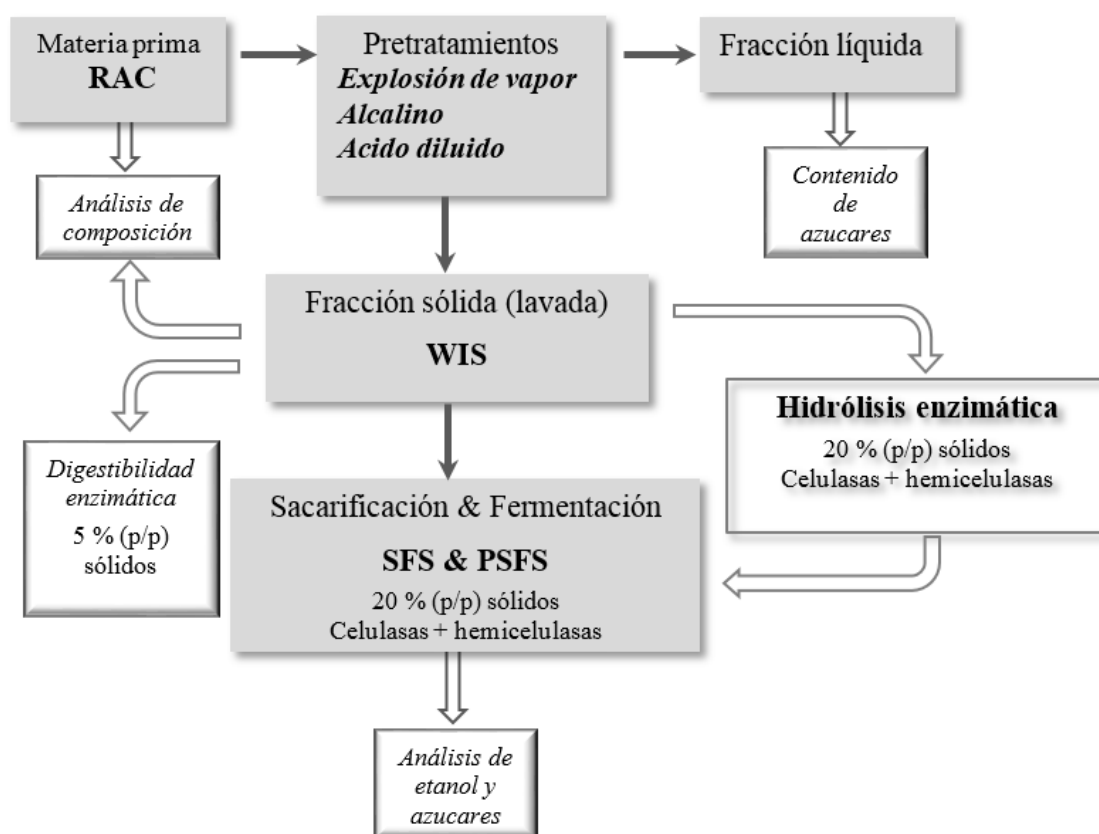


Figura 1. Diagrama de flujo esquemático de los procesos de producción de etanol 2G analizados y análisis complementarios realizados.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Materia prima y pretratamientos

Las muestras de residuo agrícola de cosecha (RAC) de caña de azúcar fueron amablemente suministradas por EEAOC (Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres). El material se cortó a un tamaño de partícula de 10-12 cm, se lavó con agua, se secó al aire a 40 °C hasta un contenido de humedad próximo al 10 % y se almacenó en un lugar seco hasta su uso. Para el análisis de la composición de biomasa, una parte de la RAC se molió a un tamaño de partícula de 1-2 mm.

La explosión de RAC se llevó a cabo a 204 °C y 20 min en una unidad de lote equipada con un reactor de 2 L, como se describió en la sección 3.2.1 (Capítulo 3). Las condiciones de trabajo se seleccionaron de acuerdo con los ensayos de optimización previos mediante metodología de superficie de respuesta (Capítulo 3), con el objetivo de maximizar el rendimiento total de glucosa a partir de este sustrato.

Los pretratamientos ácido y alcalino se llevaron a cabo en frascos de 2 L con 10 % (p/v) de materia prima de la siguiente manera: alícuotas de RAC con 100 g (base seca, b.s.) con NaOH al 2 % (p/v) o H₂SO₄ en autoclave a 121 °C durante 60 min. La suspensión se filtró y las fracciones de WIS se procesaron como se describió en la sección 3.2.1. Estas condiciones de trabajo se seleccionaron en base a datos bibliográficos [19].

4.2.2 Caracterización de los pretratamientos

Después de los pretratamientos, las fracciones WIS lavadas se secaron a 45 °C y se molieron a un tamaño de partícula de 1 mm para el análisis de la composición. El contenido de humedad y la composición química se analizaron según los métodos que se describen sección 3.2.2. Los valores de recuperación de sólidos (RS) se estimaron como el peso seco de WIS restante después del pretratamiento referido a 100 g de materia prima (b.s.). La recuperación de celulosa, hemicelulosa y lignina en el WIS se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Recuperación de componente (\%)} = \frac{\text{g del componente en 100 g de WIS}}{\text{g del componente en 100 g de materia prima}} \times RS \times 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

El contenido de azúcares (xilosa, glucosa, arabinosa, manosa y galactosa) de las fracciones líquidas se determinó mediante HPLC antes y después de una hidrólisis ácida (sección 3.2.3). La recuperación de azúcares en las fracciones líquidas se estimó de acuerdo con:

$$\text{Recuperación de azúcar en líquido (\%)} = \frac{\text{g de azúcar en fracción líquida}}{\text{g de azúcar en materia prima}} \times 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

Además, la digestibilidad de las fracciones WIS lavadas se evaluó mediante ensayos de hidrólisis enzimática estándar al 5 % (p/p) de sólidos, usando una mezcla de celulasas (Celluclast 1.5, Sigma Aldrich) y β -glucosidasa (Novo 188, Sigma Aldrich), según sección 3.2.3.

4.2.3 Experimentos de hidrólisis enzimática

Para determinar una combinación adecuada de enzimas para una liberación eficiente de azúcares del WIS para usar en ensayos de SFS y PSFS, se llevaron a cabo cuatro experimentos de sacarificación. Estas pruebas combinaron celulasas y hemicelulasas, Cellic CTec2 (C) y Cellic HTec2 (H), que amablemente fueron proporcionadas por Novozymes. Las siguientes proporciones se probaron: (i) 100% C (40 mg proteínas/g de glucano); (ii) 75% de C (30 mg proteínas/g de glucano) más 25% de H (10 mg proteínas/g de glucano); (iii) 25% de C (10 mg proteínas/g de glucano) más 75% de H (30 mg proteínas/g de glucano); y (iv) 100% de H (40 mg proteínas/g de glucano). Se realizaron hidrólisis enzimáticas al 20 % (p/v) de sólidos pretratados lavados (WIS) en tampón de citrato sódico 50 mM (pH 4,8) a 50 °C durante 72 h. Las enzimas se inactivaron luego en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y los sobrenadantes recuperados después de la centrifugación (10.000 g) se usaron para determinar los azúcares liberados por HPLC. Los blancos de las mezclas enzimáticas se procesaron simultáneamente y todos los experimentos se realizaron por duplicado.

El rendimiento de hidrólisis enzimática (YHE) se estimó de acuerdo con la ecuación 3, donde el potencial de glucosa (xilosa) en el WIS se consideró como contenido total de glucosa (xilosa) en el sólido pretratado.

$$YHE (\%) = \frac{\text{contenido de glucosa (o xilosa) liberado durante la hidrólisis enzimática}}{\text{contenido potencial de glucosa (o xilosa) en WIS}} \times 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

4.2.4 Ensayos SFS y PSFS

Se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red® (Fermentis, Francia) para los ensayos de fermentación. Para la preparación de inóculos, las levaduras se cultivaron a 30 °C y 150 rpm durante 16 h en el medio que contenía, en g/L: extracto de levadura, 5; NH₄Cl, 2; KH₂PO₄, 1; MgSO₄·7H₂O, 0,3 y en los ensayos de glucosa, 30. SFS y PSFS se llevaron a cabo a altas cargas sólidas (20 % p/v), en un volumen final de 30 mL utilizando matraces Erlenmeyer de 100 mL. El medio fue como se describe para los inóculos, reemplazando la glucosa por el sustrato pretratado (fracción WIS). Los experimentos de SFS se iniciaron con la inoculación de levadura (1 g/L) y las mezclas de enzimas seleccionadas (sección 4.2.3), en un agitador rotatorio a 150 rpm a 35 °C durante 72 h. Los experimentos de PSFS implicaron una etapa de prehidrólisis del WIS durante 24 h usando la mezcla de enzimas seleccionada a 50 °C y 150 rpm, y seguida por SFS iniciada por la inoculación de levadura (1 g/L), sin la adición de enzimas. Se tomaron muestras cada 24 h y se analizaron la concentración de etanol y los azúcares residuales. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. El rendimiento de etanol (%) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento de etanol (\%)} = \frac{\text{g de etanol producido}}{\text{g de glucosa potencial en WIS}} \times 100 \quad \text{Ec. (4)}$$

La eficiencia del etanol se estimó como el porcentaje del rendimiento teórico a partir de 0,51 g de etanol/g de glucosa.

4.2.5. Métodos analíticos

La composición de la materia prima y la biomasa pretratada se determinaron de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.2.8.

El etanol producido se analizó mediante cromatografía de gases en un equipo HP 5890 Series II equipado con un inyector Agilent serie 7693B, y con detector de ionización de llama y una columna Carbowax 20 M que funcionaba a 85 °C. El inyector y el detector se mantuvieron a una temperatura de 150 °C.

Los productos furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético y ácido fórmico se determinaron por HPLC según técnica detallada en Capítulo 3 (sección 3.2.8).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1. Caracterización de la biomasa

Los principales componentes del RAC de la caña de azúcar mostraron valores promedio de $29,7 \pm 0,8$ % para la celulosa, $22,8 \pm 0,5$ % para hemicelulosa y $26,8 \pm 0,4$ % de lignina. El contenido de celulosa fue bajo en comparación con otros informes sobre RAC de caña de azúcar [20], pero el valor de hemicelulosa fue similar al descrito por Moretti *et al.* [9]. La fracción de xilano fue del $19,1 \pm 0,4$ % de la RAC, que mostró un bajo grado de sustitución para los grupos acetilo ($0,3 \pm 0,0$ %), y representó el 84% de la hemicelulosa. Además, arabinanos $2,5 \pm 0,1$ %; galactanos $0,9 \pm 0,0$ %, y mananos $0,3 \pm 0,0$ % fueron determinados. Con respecto al contenido de lignina, el contenido de lignina soluble en ácido (LAS) fue de $3,8 \pm 0,1$ %, mientras que la lignina insoluble en ácido (LAI) fue de $23,0 \pm 0,3$ %, valor que se informó de manera similar por otros autores [21,22]. Por extracción con agua, el 4,7 % de la materia prima se disolvió, mientras que la posterior extracción con etanol disolvió una fracción adicional de 1,6 % de extractivos resultantes para un total de $6,3 \pm 0,5$ %, valor que se describió similarmente para muestras de paja de caña de azúcar [12]. El alto contenido de cenizas encontrado ($14,6 \pm 0,1$ %) con respecto a otros datos [13,23], podría deberse a la contaminación del suelo durante la cosecha de RAC. De forma correspondiente, se detectaron cenizas insolubles en ácido cercanas al 7,7 % (sílice, etc.), que correspondían a ~ 53 % del total de cenizas.

Debe notarse que las diferencias en la composición de las materias primas frecuentemente dependen de las variedades de cultivo, condiciones de almacenamiento (temperatura, período), en los tipos de cultivo y cosecha e incluso en los tipos de tejido vegetal analizados [22]. Tales variaciones potenciales en el rendimiento de la materia seca del cultivo y las condiciones de cosecha pueden producir un contenido subóptimo de carbohidratos [8, 11]. Al considerar las variedades cultivadas de caña de azúcar en Argentina, se estimó que aproximadamente 151 kg de RAC por tonelada de caña de azúcar cosechada estarían potencialmente disponibles para la biorrefinería. Esto implicó aproximadamente 2,7 millones de toneladas de RAC vacante como materia prima para la producción de etanol en 2016.



El potencial para la producción de combustibles o químicos a partir del material biomásico analizado compuesto por residuos post-cosecha de la caña de azúcar, está dado por un contenido total de carbohidratos superior al 50 % sobre base seca, valor significativo para dicho objetivo.

4.3.2. Evaluación de pretratamientos para residuos de cultivos agrícolas de caña de azúcar

Las tecnologías de pretratamiento tienen como objetivo mejorar la digestibilidad de la lignocelulosa y producir cambios estructurales y de composición de las materias primas. Por lo tanto, una evaluación exhaustiva de los pretratamientos ensayados implica no sólo la recuperación de hidratos de carbono sino también los rendimientos de azúcar por hidrólisis enzimática como indicadores clave de la efectividad. La biomasa RAC recortada a un tamaño promedio de 10-12 cm, se sometió a diferentes pretratamientos: (i) explosión de vapor (EV; 204,1 °C; 20 min), (ii) ácido diluido (H₂SO₄ al 2 % p/v; 121 °C; 60 min) y (iii) alcalino (NaOH al 2% p/v; 121 °C; 60 min). Como se indicó, las fracciones WIS lavadas se utilizaron para los siguientes ensayos; las mismas mostraron una pérdida insignificante de azúcar en los líquidos de los lavados.

Tabla 1. Recuperación de sólidos insolubles (RS), composiciones de WIS y de fracción líquida y rendimientos de hidrólisis enzimática (YHE) de RAC después de los diferentes pretratamientos ensayados.

Pretratamiento	RS (%)	Composición WIS (% b.s.)			Componentes de la fracción líquida (*) (g/100 g materia prima)		YHE _{Glu} (%)	YHE _{Xil} (%) (**)
		Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Glucosa	Azúcares hemicelulósicos		
EV-RAC	67,6	38,8 ± 0,2	4,3 ± 0,1	32,6 ± 5,3	1,7	7,1	77,6 ± 1,2	72,0 ± 0,4
NaOH-RAC	52,5	52,3 ± 0,1	26,3 ± 0,2	10,4 ± 0,8	0,9	10,3	80,0 ± 4,5	65,0 ± 3,4
H ₂ SO ₄ -RAC	64,8	41,0 ± 0,5	7,1 ± 0,3	37,2 ± 1,1	1,5	17,9	36,3 ± 0,4	36,9 ± 0,2

(*) Las fracciones líquidas fueron analizadas solo para carbohidratos

(**) Susceptibilidad enzimática del WIS medida de acuerdo a la sección 4.2.3

Se obtuvieron recuperaciones sólidas (RS) de 67,6 % y 64,8 % para la explosión de vapor y pretratamiento a base de ácido, respectivamente, mientras que se determinó una RS de 52,5 % para el pretratamiento basado en álcali (Tabla 1). Valores de RS similares, de 56 % y 51,1 %, se informaron después de un pretratamiento EV a escala industrial realizado en condiciones ligeramente menos severas (200 °C y 15 min, [10]) y de bagazo de caña de azúcar pretratado con hidróxido de calcio [24],

respectivamente. Por otro lado, Carvalho y colaboradores [8] informaron valores de RS de 37,3 % y 55,8 % para pretratamientos alcalino y ácido, respectivamente. Las diferencias con los valores encontrados aquí pueden deberse a la mayor temperatura (175 °C) utilizada por estos autores.

Con respecto a las fracciones WIS, se observaron variaciones considerables en la composición después de los diferentes pretratamientos probados. Los contenidos de celulosa fueron del 38,8 %, 52,3 % y 41,0 % después de los pretratamientos de EV, álcali y ácido diluido, respectivamente. El principal constituyente eliminado del WIS después de los pretratamientos EV-RAC y H₂SO₄-RAC fue la hemicelulosa, ya que su contenido fue de $4,3 \pm 0,1$ % y $7,1 \pm 0,3$ %, respectivamente, y lignina para NaOH-RAC ($10,4 \pm 0,8$ %) (Tabla 1).

El análisis de las fracciones líquidas reveló que la xilosa fue el azúcar más abundante detectado. Aproximadamente, 76 % y 100 % de los azúcares derivados de hemicelulosas estaban presentes como oligosacáridos en las fracciones líquidas después de EV y pretratamiento alcalino, respectivamente, mientras que sólo se identificaron azúcares monoméricos en las muestras recuperadas del pretratamiento ácido diluido de RAC (datos no mostrados).

Al referir los valores totales de recuperación de carbohidratos a la materia prima (en las fracciones sólida y líquida), la recuperación de celulosa fue > 93 % con respecto al RAC no tratado en todos los casos, ya que este compuesto es el menos solubilizado en las condiciones de pretratamiento evaluadas (Figura 2). La hemicelulosa se recuperó casi por completo (99,8 %) después del pretratamiento a base de álcali, que concentró este compuesto en la fracción sólida. Mientras que el tratamiento ácido produjo una recuperación de hemicelulosa de 88,3 %, distribuido 68,8 % en la fracción líquida y 19,6 % en el WIS, un comportamiento diferente resultó con el pretratamiento EV donde solo se recuperó 39,7 % de hemicelulosa, principalmente en la fracción líquida (27,2 %) (Fig. 2). En relación con la pérdida de hemicelulosa, se ha atribuido la misma a una hidrólisis parcial de este componente en las condiciones ácidas debido a la adición de ácido sulfúrico en el pretratamiento ácido y al ácido acético y otros ácidos orgánicos liberados de la biomasa durante la explosión de vapor [14]. Además, la reducción pronunciada (~ 60 %) de hemicelulosa que se verificó después del ensayo EV, se tradujo en la detección de los compuestos de degradación furfural (0,35 g/L), HMF (0,07 g/L), ácido acético (0,45 g/L) y ácido fórmico (0,52 g/L) en la fracción líquida resultante. Dado que se observó una pérdida mínima de azúcares después de los pretratamientos a base de álcali y ácido, los compuestos de degradación no se investigaron en estos casos.

Finalmente, la recuperación de lignina en el WIS alcanzó 82,2 % y 89,8 % para EV y pretratamiento ácido diluido, respectivamente. Como se esperaba, el pretratamiento del RAC basado en álcali produjo la mayor deslignificación observada, 79,7 % (Fig. 2), valor que fue similar a los obtenidos en puntas de caña de azúcar en condiciones similares [25].

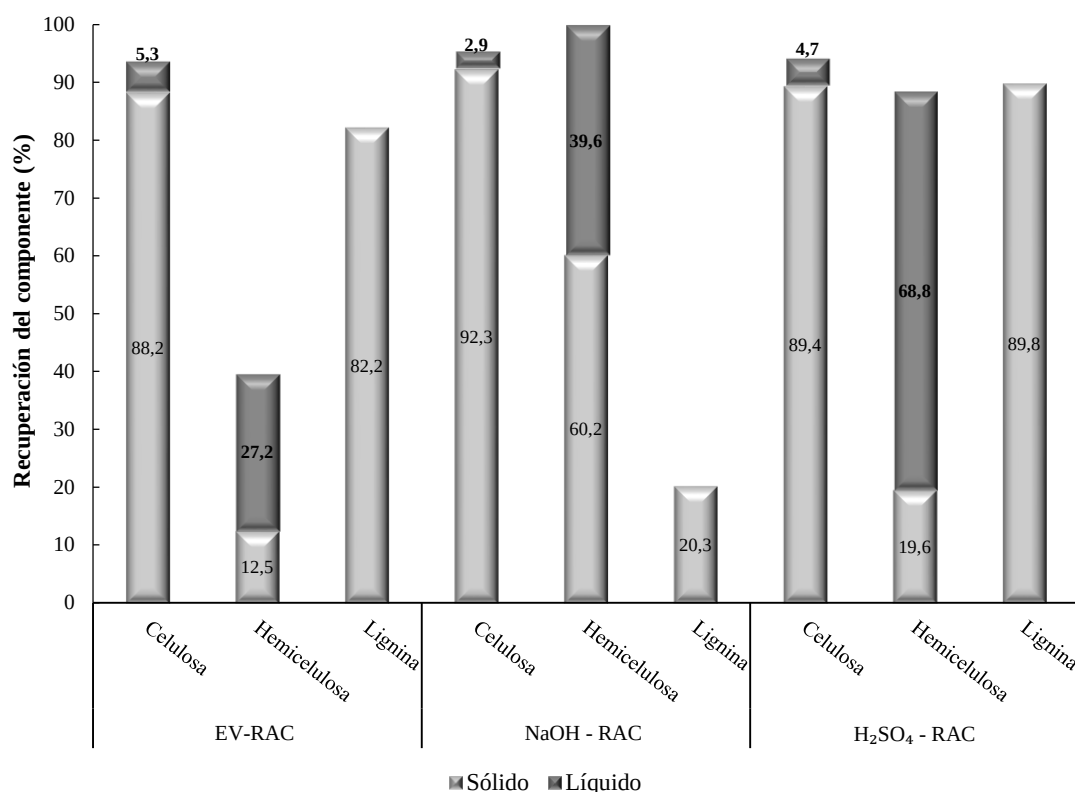
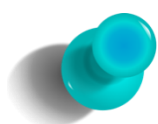


Figura 2. Recuperación de compuestos estructurales principales del RAC de la caña de azúcar en WIS y fracciones líquidas después de los pretratamientos, con respecto a la materia prima. El contenido de lignina solo se midió en las fracciones sólidas.

La susceptibilidad al ataque enzimático a carbohidratos, una característica clave del material pretratado, se analizó adicionalmente en todas las fracciones RAC-WIS mediante ensayos enzimáticos estándar con Celluclast 1.5 y Novo 188. Los valores de conversión de glucosa resultantes YHE_{Glu} fueron de $77,6 \pm 1,2$ % y $80,0 \pm 4,5$ % para EV-RAC y NaOH-RAC, respectivamente (Tabla 1). En el caso de los pretratamientos alcalinos, la efectividad de la hidrólisis enzimática se ha atribuido principalmente a una alta deslignificación (contenido de lignina del 10,4 %, Tabla 1) y a un efecto de “hinchado” que aumenta el acceso a la celulosa, disminuyendo su grado de polimerización y cristalinidad [16]. Se observó una baja liberación enzimática de azúcares para H₂SO₄-RAC, incluso cuando su contenido de celulosa fue similar al de EV-RAC, lo que revela una baja digestibilidad enzimática del sólido obtenido.



La composición general de los principales componentes del material lignocelulósico ensayado se modificó de manera diferente después de cada pretratamiento realizado:

(i) La EV produjo una pérdida significativa de hemicelulosa, mientras que la celulosa y la lignina se recuperaron principalmente en las fracciones WIS;

- (ii) El pretratamiento a base de álcali condujo a una solubilización casi completa de lignina;
- (iii) El pretratamiento con ácido diluido permitió la recuperación casi total de todos los componentes, con valores de recuperación de celulosa del 94 %, hemicelulosa > 88 % (principalmente en la fracción líquida) y ~ 90 % de lignina.

4.3.3. Configuración de las condiciones de sacarificación a una consistencia del 20 % (p/v)

Una concentración de etanol del 4 % (p/p) se considera el punto de referencia para una destilación eficiente [26]. Tal resultado implica la disponibilidad de concentraciones de azúcar ≥ 8 % (p/p) para la fermentación, lo que implica el uso de altas cargas sólidas para la mayoría de los tipos de material lignocelulósico [27]. Sin embargo, esas cargas de sustrato implican desventajas significativas en la sacarificación, como la inhibición por producto final de enzimas celulolíticas, limitaciones de transferencia de masa e inhibidores de alta concentración en el sistema, entre otros [18]. Con el objetivo de definir las mezclas sacarificantes que se utilizarán luego para RAC-WIS a 20 % (p/v) de cargas de sustrato, se evaluaron Cellic CTec2 (C) y Cellic HTec2 (H) ya que estas enzimas se desarrollaron para abordar algunas de los problemas derivados de la alta concentración de sólidos. Los rendimientos de hidrólisis enzimática obtenidos no mejoraron significativamente mediante la adición de diferentes proporciones de hemicelulasa (H) a celulasa (C) cuando se probaron biomásas pretratadas con EV y con ácido, aunque alrededor del 10 % de azúcares se liberaron adicionalmente a partir de H₂SO₄-RAC con la ayuda del 25 % (H) (Fig. 3).

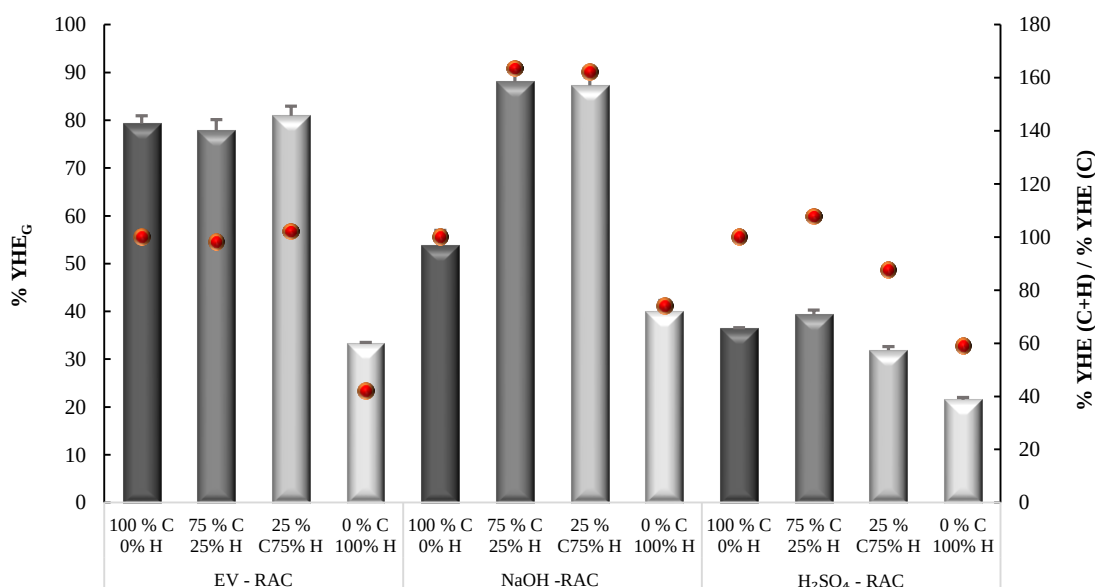


Figura 3. Ensayos de sacarificación de WIS al 20 % (p/v) durante 72 h usando diferentes combinaciones de Cellic CTec2 (C) and Cellic HTec2 (H). Las barras representan los porcentajes de rendimiento de hidrólisis enzimática de glucosa (YHE_{Glu}) obtenida y los puntos rojos representan la relación entre YHE_{Glu} para cada mezcla de enzima (C + H) y YHE_{Glu} de la sacarificación producida sólo con (C), como porcentaje.

Por el contrario, se observó una mejora significativa (60 %) en el rendimiento de glucosa de NaOH-RAC cuando la celulosa (C) se combinó con 25 % o con 75 % de hemicelulosa (H). Este resultado podría explicarse por el alto contenido hemicelulósico de la biomasa de NaOH-RAC (26,3 %) con respecto a EV-RAC y H₂SO₄-RAC (Tabla 1). En este sentido, la adición de xilanasa y/o β -xilosidasa a la etapa de sacarificación ha demostrado que reduce la necesidad de altas dosis de celulasas para una hidrólisis efectiva de la celulosa, ya que disminuye el impedimento físico que representa la hemicelulosa para el ataque enzimático [28]. Es importante señalar que los ensayos para la sacarificación establecidos en EV-RAC y H₂SO₄-RAC, con un contenido de celulosa similar, produjeron en promedio 79,3 % y 36,4 % de glucosa, respectivamente. Este resultado respalda aún más nuestra observación sobre la fuerte influencia que los cambios estructurales que surgen de los pretratamientos presentan en su digestibilidad enzimática.

4.3.4. Ensayos SFS y PSFS

Para ambas configuraciones, la sacarificación se resolvió sobre la base de los resultados que se muestran en la Figura 3: las biomásas EV-RAC y H₂SO₄-RAC se trataron con 100 % de Cellic CTec2 (C), mientras que la combinación 75 % (C) + 25 % (H) se aplicó para NaOH-RAC. Desde una perspectiva general, los ensayos de SFS dieron como resultado menores rendimientos y eficiencias de etanol en comparación con los procesos de PSFS correspondientes, principalmente para [H₂SO₄-SFS] en los que no se detectó etanol (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con los informes que indican que una hidrólisis anterior a la etapa de SFS de subproductos agrícolas con altos niveles de sólidos, mejoró el proceso al facilitar la transferencia de masa debido a la reducción de la viscosidad [29]. Además, durante SFS la sacarificación se produce en condiciones enzimáticas sub-óptimas (35 °C), hecho que afecta negativamente a los rendimientos de HE al reducir la liberación de azúcares [18].

Las concentraciones máximas de etanol obtenidas fueron de 4,8 % (p/p) para [NaOH-PSFS] y de 4,5 % (p/p) para [NaOH-SFS], lo que implica eficiencias de etanol superiores al 75 %, sin diferencias significativas entre ambas configuraciones (Tabla 2). Cabe destacar que estos valores excedieron con éxito la concentración mínima de etanol señalada como necesaria para una destilación económicamente viable [27]. Las eficiencias de etanol encontradas de la biomasa explotada por vapor decrecieron significativamente en SFS, pasando de 72,1 % (PSFS) a 50,1 % (SFS) (Tabla 2). Es importante tener en cuenta que tales reducciones podrían ser significativas para estudios de viabilidad y escalamiento de los procesos de producción de etanol 2G. Finalmente, [H₂SO₄-PSFS] fue el proceso menos eficaz ensayado ya que alcanzó el 1,4 % (p/p) de producción de etanol, mientras que [H₂SO₄-SFS] produjo cantidades insignificantes de etanol (Tabla 2).

La glucosa residual se determinó como indicador de un consumo eficiente de azúcar a lo largo de la producción de etanol. En la mayoría de los casos, se observó un consumo eficiente de glucosa. Concentraciones residuales $\leq 0,7$ g/L de glucosa se obtuvieron mediante los procesos de SFS (Fig. 4a),

mientras que a las 24 horas de [EV-PSFS] y [NaOH-PSFS] se obtuvieron los valores residuales de 0,5 g/L a 1,2 g/L, que se alcanzaron desde las concentraciones de glucosa inicial de 48 g/L y 66 g/L,

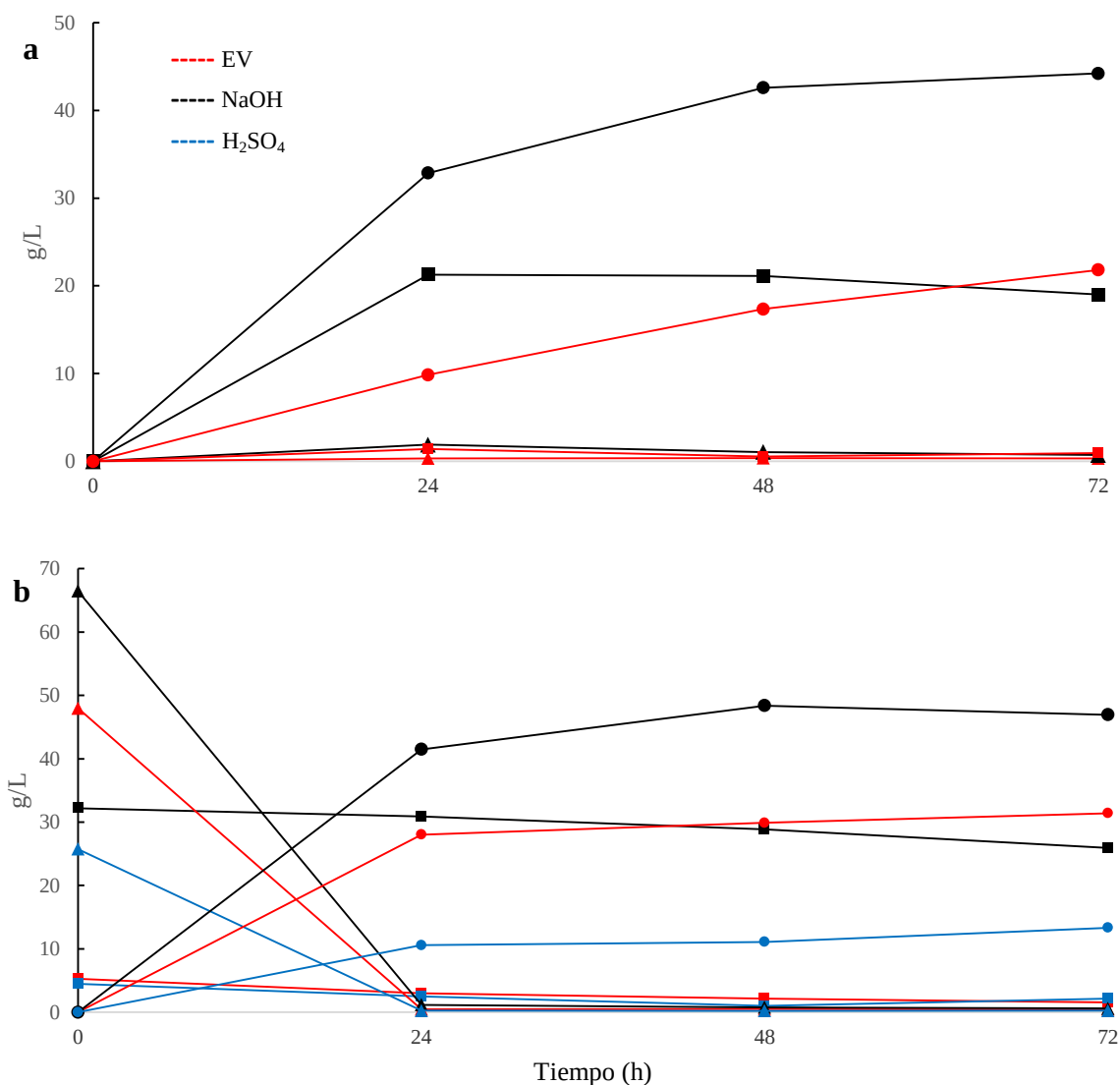


Figura 4. Curva temporal de producción de etanol (g/L) y azúcares residuales a partir de 20 % (p/v) de RAC pretratado mediante dos configuraciones de proceso: **a)** SFS y **b)** PSFS. ---●--- etanol, ---▲--- glucosa, ---■--- xilosa.

respectivamente. No se detectaron variaciones significativas de azúcar residual a las 48 h y 72 h (Fig. 4 b). El proceso [H₂SO₄-PSFS] también mostró concentraciones de glucosa residual similares, aunque la liberación de azúcar fue baja debido a la susceptibilidad enzimática reducida (es decir, YHE baja) observada para esta biomasa pretratada (Tabla 1).

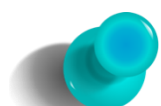
Cabe mencionar que el consumo efectivo de glucosa observado demostró que la capacidad fermentativa del microorganismo utilizado, *S. cerevisiae* Ethanol Red®, no se vio afectada en los procesos realizados. Cerca de 9 g/L de xilitol, un subproducto metabólico de la levadura, se detectaron a las 48 h de fermentación durante [NaOH-PSFS] (datos no mostrados). La cantidad significativa de

xilosa liberada en este proceso (32,2 g/L, Fig. 4b) podría sustentar el desarrollo de estrategias hacia una explotación integral del RAC de caña de azúcar pretratado con álcali para producir una variedad de bioproductos [30].

Tabla 2. Concentraciones de etanol, rendimientos y eficiencias obtenidas después de 72 h de procesos de fermentación.

Proceso		Etanol			
		% (p/p)	Rendimiento (%)	L / ton RAC	Eficiencia (%)
PSFS	[EV - PSFS]	3,2 ± 0,1	36,8 ± 1,4	134,5	72,1 ± 2,7
	[NaOH - PSFS]	4,8 ± 0,2	40,8 ± 1,5	156,4	79,9 ± 2,9
	[H ₂ SO ₄ - PSFS]	1,4 ± 0,1	14,8 ± 0,6	54,6	28,9 ± 1,1
SFS	[EV - SFS]	2,2 ± 0,3	25,6 ± 3,0	93,4	50,1 ± 5,9
	[NaOH - SFS]	4,5 ± 0,1	38,4 ± 0,5	147,1	75,2 ± 1,0
	[H ₂ SO ₄ - SFS]	nd	-	-	-

*nd: no detectado



El proceso más favorable ensayado fue [NaOH-PSFS], que produjo 47,0 g/L de etanol. Esto correspondió a un rendimiento global del proceso de 12,3 g de etanol/100 g de RAC, o de 156,4 L de etanol/tonelada de RAC. Los resultados implican la utilización del 79,9 % de glucosa potencialmente disponible en la materia prima (Tabla 2).

Mesa *et al.* [7] informaron la producción de 14,8 g de etanol/100 g de RAC después de un proceso de PSFS con una consistencia de sólidos del 8 % (p/v) de paja de caña de azúcar pretratada con ácido. Sin embargo, la concentración de etanol obtenida por estos autores (14,47 g/L) representó la utilización del 72,4 % de la glucosa disponible a partir de la biomasa de partida. En comparación, en este trabajo se produjo 3 veces más concentración de etanol (47,0 g/L) a una carga sólidos 2,5 veces mayor (20 %, p/v) por medio de un proceso [NaOH-PSFS].

Se puede resaltar que el proceso [EV-PSFS] produjo 134,5 L de etanol/ton RAC como resultado de una utilización del 72,1 % de la glucosa disponible (Tabla 2). Aunque la concentración de etanol alcanzada del 3,2 % (p/p) fue inferior al 4 % (p/p) considerado el objetivo de un producto de

destilación viable, las ventajas medioambientales y técnicas de la explosión por vapor deberían considerarse para promover un aumento de la eficiencia del proceso hacia una producción realista de etanol de RAC.

4.4 Conclusiones

Un proceso integrado para la producción de etanol 2G se evaluó exhaustivamente mediante el examen de diferentes pretratamientos de residuos post-cosecha de caña de azúcar, y la realización de la sacarificación y fermentación de acuerdo con dos configuraciones de proceso, SFS y PSFS (Fig. 1). El proceso más eficiente ensayado se basó en el uso de biomasa pretratada con álcali, que liberó aproximadamente el 88 % de su contenido de glucosa mediante la adición de hemicelulasas a celulasas de última generación. Tal disponibilidad de glucosa para la fermentación se considera como una referencia para una destilación económicamente viable. Como resultado, por medio de un proceso [NaOH-PSFS] a una consistencia del 20 % (p/v), el proceso global produjo 156,4 L de etanol/ton RAC.

Referencias

- [1] Sánchez O.J., Cardona C, A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99, 5270–95.
- [2] Reportes estadísticos de cultivos de caña de azúcar en Argentina, <http://centrozucarero.com.ar/oldsite/zafras/zafra2016.html> [consultado 29 enero 2018].
- [3] Sindhu R., Gnansounou E., Binod P., Pandey A. (2016). Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products. An overview. *Renew. Energ* 98, 203–215
- [4] Tomás-Pejó E., Alvira P., Ballesteros M., Negro M.J. (2011). Pretreatment technologies for lignocellulose-bioethanol conversion. In: Pandey A., Larroche C., Ricke S.C., Dussap C.G., Gnansounou, E., editors. *Biofuels, Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, Academic Press. p.149–176.
- [5] Bermúdez Alcántara M.A., Dobruchowska J., Azadi P., Díez García, B. *et al.* (2016). Recalcitrant carbohydrates after enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Biofuels* 9:207. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0629-4>.
- [6] da Silva A.S. A, Inoue H., Endo T., Yano S. *et al.* (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresour. Technol.* 101, 7402–09.
- [7] Mesa L., Martínez Y., Barrio E., González E. (2017). Desirability function for optimization of diluted acid pretreatment of sugarcane straw for ethanol production and preliminary economic analysis based in three fermentation configurations. *Appl. Energ.* 198, 299–311.
- [8] Carvalho M., Sevastyanova O., Souza Penna L., Pereira da Silva B. *et al.* (2015). Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid and alkaline pretreatments. *Ind. Crop Prod.* 73, 118–26.
- [9] Moretti M.M.S., Perrone O.M., Nunes C.C.C., Taboga S., *et al.* (2016). Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis on the physical-chemical composition and morphologic structure of sugarcane bagasse and sugarcane straw. *Bioresour. Technol.* 219, 773–77.
- [10] Oliveira F.M.V., Pinheiro I.O., Soto-Maior A.M., Nartin C., *et al.* (2013). Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added product. *Bioresour. Technol.* 130, 168–73.
- [11] Kuster-Moro M., Teixeira R.S.S., Sant’Ana da Silva A., Duarte Fujimoto M., *et al.* (2017). Continuous pretreatment of sugarcane biomass using a twin-screw extruder. *Ind. Crop Prod.* 97, 509–17.
- [12] Raghavi S., Sindhu R., Binod P., Gnansounou E., *et al.* (2016). Development of a novel sequential pretreatment strategy for the production of bioethanol from sugarcane trash. *Bioresour. Technol.* 199, 202–10.
- [13] Barros R.R., Paredes R.S., Endo T., Bon E.P. *et al.* (2013). Association of wet disk milling and ozonolysis as pretreatment for enzymatic saccharification of sugarcane bagasse and straw. *Bioresour. Technol.* 136, 288–94.
- [14] Duque A., Manzanares P., Ballesteros I., Ballesteros M. (2016). Steam explosion as lignocellulosic biomass pretreatment. In, Mussato SI, editor. *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, Elsevier, p. 349–368.
- [15] Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis, a review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–61.
- [16] Kim J.S., Lee Y.Y., Kim T.H. (2016). A review on alkaline pretreatment technology for conversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 199, 42–48.

- [17] Moreno A.D., Alvira P., Ibarra D., Tomás-Pejó E. (2017). Production of Ethanol from Lignocellulosic Biomass. In, Fang Z., Smith, Jr. R., Qi X., editors. *Production of Platform Chemicals from Sustainable Resources*, Singapore, Springer, p. 375–410.
- [18] Jørgensen H, Vibe-Pedersen J., Larsen J., Felby C. (2007). Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 96 (5), 862–70.
- [19] Li J., Zhou P., Liu H., Xiong C. *et al.* (2014). Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 155, 258–65.
- [20] Rueda-Ordóñez Y.J., Tannous K. (2015). Isoconversional kinetic study of the thermal decomposition of sugarcane straw for thermal conversion processes. *Bioresour. Technol.* 196, 136–44.
- [21] Szczerbowski D, Pitarelo A.P., Zandoná Filho A., Ramos L.P. (2014). Sugarcane biomass for biorefineries, comparative composition of carbohydrate and noncarbohydrate components of bagasse and straw. *Carbohydr. Polym.* 114, 95–101.
- [22] Lachos-Pérez D., Tompsett G.A., Guerra P., Timko M.T. *et al.* (2017). Sugars and char formation on subcritical water hydrolysis of sugarcane straw. *Bioresour. Technol.* 243, 1069–77.
- [23] Oliveira L.R.M., Nascimento V.M, Gonçalves R.A., Rocha G.J.M. (2014). Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. *Ind Crops Prod.* 58, 1–7.
- [24] Grimaldi M., Marques M., Lalue C., Cilli E.M. *et al.* (2015). Evaluation of lime and hydrothermal pretreatments for efficient enzymatic hydrolysis of raw sugarcane bagasse. *Biotechnol. Biofuels* 8:205. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0384-y>
- [25] Shindu R., Kuttiraja M., Binod P., Sukumanan R.K. *et al.* (2014). Physicochemical characterization of alkali pretreated sugarcane tops and optimization of enzymatic saccharification using response surface methodology. *Renew. Energ.* 62, 362–68.
- [26] Wingren A., Galbe M., Zacchi G. (2003). Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood, comparison of SFS and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Progr.* 19, 1109–17.
- [27] Koppram R., Tomás-Pejo E., Xiros C., Olsson L. (2014). Lignocellulosic ethanol production at high-gravity, challenges and perspectives. *Trends Biotechnol.* 32, 46–53.
- [28] Romaní A., Ruíz H.A., Pereira J.A., Teixeir, J.A. *et al.* (2014). Integrated approach for effective bioethanol production using whole slurry from autohydrolyzed Eucalyptus globulus wood at high-solid loadings. *Fuel* 135, 282–91.
- [29] Rosgaard L., Andric P., Dam-Johansen K., Pedersen S., *et al.* (2007). Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Appl Biochem. Biotechnol.* 143, 27–40.
- [30] Kwak S., Jin Y.S. (2017). Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*, a review and perspective *Microb Cell Fact.* 16, 82.



Conclusiones



Conclusiones

El presente trabajo se enfocó en la evaluación de todas las etapas para el desarrollo de un proceso integrado de producción de etanol de segunda generación a partir de recursos lignocelulósicos de relevancia regional.

Fueron realizados y evaluados diferentes tipos de pretratamientos que permitan obtener biomasa adecuada para las etapas de sacarificación enzimática y posterior fermentación. También, se construyó una colección de cepas productoras de enzimas activas sobre carbohidratos, a partir de las cuales fueron desarrolladas formulaciones enzimáticas para la liberación de azúcares fermentables tanto de fracciones líquidas como sólidas de la biomasa pretratada, con el objetivo de definir herramientas apropiadas para la gestión integral del recurso biomásico. Finalmente, se completó la producción de etanol 2G utilizando el material generado, de acuerdo a diferentes configuraciones de proceso.

El material lignocelulósico utilizado fue bagazo y residuo agrícola de cosecha de caña de azúcar, los cuales fueron caracterizados de acuerdo a metodologías y normativa internacional. Se evaluaron tres tipos de pretratamientos (químicos y fisicoquímico) sobre los mismos, uno de los cuales fue optimizado con la asistencia de herramientas estadísticas para el diseño experimental. Este trabajo constituye el primer reporte aplicando este tipo de metodologías a bagazo y RAC de caña de azúcar pretratados con explosión por vapor (Manfredi *et al.*, manuscrito). Se obtuvieron materiales con altas recuperaciones de sus carbohidratos y susceptibles a la hidrólisis enzimática.

Posteriormente, la etapa de sacarificación sobre el material pretratado fue ensayada con el uso de enzimas comerciales utilizando la normativa internacional (NREL), para comparar de manera adecuada los resultados obtenidos con la literatura especializada.

De manera adicional, esta etapa del proceso fue abordada en este trabajo de tesis con la producción y evaluación de enzimas capaces de aportar al desarrollo de mezclas o cócteles enzimáticos potencialmente eficientes en la deconstrucción de los carbohidratos de la biomasa vegetal. Para ello, se realizó el aislamiento y caracterización de bacterias provenientes de ambientes de la agroindustria local y de intestino de insectos xilófagos, contribuyendo a la descripción y extensión de biocatalizadores disponibles en biorrefinerías (Capítulo 1, [1]). De un total de 233 aislamientos bacterianos puros, se seleccionaron 45 aislamientos con capacidad de producir glicósido hidrolasas extracelulares activas sobre celulosa soluble o microcristalina y sobre xilano. El filo prevalente entre estos fue Firmicutes (62,2 %), representado principalmente por miembros de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*. También se identificó un 24,4 % de bacterias del filo Proteobacteria y un 6,6 % de Actinobacterias y 6,6 % de Bacteroidetes. Entre estos aislamientos, se destacan los seleccionados para la producción enzimática, y otros que resultaron novedosos en ambientes especializados en la degradación de biomasa vegetal, como es el caso de *Agromyces* sp. AR488 (Actinobacteria), cuya

descripción como integrante de consorcios microbianos de intestino de insecto fue citada recientemente por Evtushenko *et al.* [2], en Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.

Con el objeto de mejorar la producción enzimática, se aplicó la herramienta de diseño factorial para estudiar los componentes del medio de cultivo que afectan tanto al crecimiento como a la producción de celulasas de *Bacillus* sp. AR03. Aunque la evaluación de la suplementación de cócteles enzimáticos resultó eficiente con la cepa *Paenibacillus* sp. AR247, las celulasas producidas por AR03 en este trabajo de tesis fue promovida por el uso de glucosa y otros carbohidratos solubles, lo cual constituye un resultado relevante tanto en términos fisiológicos como tecnológicos, ya que la utilización de sustratos solubles favoreció la fermentación sumergida y la posterior recuperación de las enzimas de interés en el caldo de cultivo (Capítulo 2, [3]).

En cuanto a la producción de etanol 2G, se destaca en este trabajo la suplementación eficiente de los cócteles comerciales con enzimas de producción propia, provenientes de la cepa *Paenibacillus* sp. AR247 (Capítulo 1; [1, 4]). Esto condujo a la definición de sistemas optimizados para la biomasa de origen local que fueron desarrollados para los pretratamientos realizados y los dos tipos de biomásas utilizadas (Capítulo 3). Se destaca el incremento de hasta un 37 % de glucosa generada por hidrólisis enzimática obtenido con la mezcla Celluclast 1.5 + Novo188 cuando esta fue suplementada con el extracto crudo producido por fermentación sumergida de la cepa AR247, siendo éste el resultado más prometedor en vista de la literatura existente a la fecha (Capítulo 3, Manfredi *et al.*, manuscrito).

Los ensayos de fermentación se llevaron a cabo utilizando alta carga de sólidos (20 % p/v), de acuerdo a dos configuraciones de proceso: sacarificación y fermentación simultaneas (SFS) y presacarificación, sacarificación y fermentación simultaneas (PSFS). La utilización de sólidos en altas cargas es crítica para la factibilidad del proceso. Es clave considerar que mucha de la literatura informa cargas de sólidos inferiores al 10 %, con frecuencia del 2 al 5 %. Los resultados obtenidos permitieron la conversión a etanol de un 80 % de la glucosa disponible en el RAC pretratado con NaOH (Capítulo 4, [5]).

De todas las condiciones evaluadas, el proceso más eficiente resultó de la aplicación del pretratamiento químico con NaOH y PSFS, el cual produjo 47 g/L de etanol (Capítulo 4). Sin embargo, el resultado más significativo en términos de eficiencia y sustentabilidad fue logrado con la combinación del tratamiento fisicoquímico (explosión por vapor) con PSFS, el que condujo a eficiencias de 72,1 % en un proceso que no utiliza químicos corrosivos.

Los resultados obtenidos en esta tesis constituyen un paso significativo hacia el fortalecimiento de biorrefinerías en el contexto de la agroindustria del noroeste argentino.

Referencias

- [1] Manfredi A.P., Perotti N.I., Martínez M.A. (2015). Cellulose degrading bacteria isolated from industrial samples and the gut of native insects from Northwest of Argentina. *J Basic Microbiol* 55(12), 1384-93.
- [2] Evtushenko L.I., Ariskina E.V., Prisyazhnaya N.V., Starodumova I.P. (2017). *Agromyces*. In John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, p. 1-49.
- [3] Manfredi A.P., Pisa J.H., Valdeón D.H., Perotti N.I. *et al.* (2016). Synergistic effect of simple sugars and carboxymethyl cellulose on the production of a cellulolytic cocktail from *Bacillus* sp. AR03 and enzyme activity characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 179, 1384-93.
- [4] Di Marco E., Soraire P.M., Romero C.M., Villegas L.B. *et al.* (2017). Raw sugarcane bagasse as carbon source for xylanase production by *Paenibacillus* species: a potential degrader of agricultural wastes. *Environ Sci Pollut Res Int* 24(23), 19057-67.
- [5] Manfredi A.P., Ballesteros I., Saez F., Perotti N.I. *et al.* (2018). Integral process assessment of sugarcane agricultural crop residues conversion to ethanol. *Bioresour Technol* 260, 241-47.