

**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado.
Doctorado en Ciencias Aplicadas**

Doctoranda
Ing. Ana María Arismendy Pabón

Cascarilla de arroz : obtención de bioetanol a partir de la hidrólisis y fermentación simultánea

**Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de
“Doctor en Ciencias Aplicadas”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Directora
Dra. Ester Chamorro
Co-Directora
Dra. María Cristina Area

Posadas, Misiones 2021



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
Facultad de Ciencias Exactas
Químicas y Naturales



CASCARILLA DE ARROZ: OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA

Ing. Ana María Arismendy Pabón

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
de la Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de
DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS

Posadas, Misiones, República Argentina

2021

Directora:

Dra. Ester Chamorro UTN FRRe

Codirectora

Dra. María Cristina Area UNAM

TRIBUNAL EVALUADOR (Según Disposición 1306/20)

Dr. Gustavo Emilio Giussiano	Universidad Nacional del Nordeste
Dra. María Isabel Fonseca	Universidad Nacional de Misiones
Dra. María Alicia Martos	Universidad Nacional de Misiones

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA (Disposición N° 613/21)

Posadas, 28 de mayo de 2021

CASCARILLA DE ARROZ: OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA

Lugar de desarrollo del trabajo de tesis

Tesis realizada en el Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica QUIMOBIO UTN FRRe y Grupo de Investigación PROCYP UNAM, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales

Ing. Ana María Arismendy Pabón

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN (Según Resolución 208/15)

Dr. Gustavo Emilio Giussiano	Universidad Nacional de Nordeste
Dra. Laura Lidia Villalba	Universidad Nacional de Misiones
Dra. Olga Myriam Vasek	Universidad Nacional del Nordeste

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS

Proyecto de Carrera N° 10933/11

Con reconocimiento de la Comisión de Evaluación y Acreditación

Universitaria (CONEAU) N° 344/11

Posadas 28 mayo, 2021

AGRADECIMIENTOS

Principalmente doy gracias a Dios, por permitirme realizar este estudio de posgrado y terminarlo satisfactoriamente.

Doy gracias a mi familia, principalmente a mis padres, Gladys Pabón y Bladimir Arismendy, mi hermano Andrés, abuelos, tías y demás por su apoyo condicional tanto en los buenos y malos momentos que se presentaron en este proceso.

Al CONICET por concederme la beca de posgrado latinoamericana, para realizar este estudio, que contribuye a mi formación profesional.

A mis amigos Clara Alumnni, Norma Ramírez, Vanesa Viloría, Julieta Benítez, quienes también me apoyaron en diversas situaciones de la vida, y en el proceso de aprendizaje que implica el doctorado, también agradezco los momentos agradables que compartí con chicos del doctorado y del IMAM Julia, Nanci, Carolina, Támara y Marcela.

A directores de esta tesis Dra. Ester Chamorro, Dra. Cristina Area, Dr. Néstor Urbina, por servirme como dirección de esta tesis, por el asesoramiento y todas las actividades que implicaban el desarrollo de esta tesis.

Agradezco también la ayuda y colaboración del Dr. Fernando Felissia, por su asesoramiento en el trabajo realizado en el Grupo de Investigación PROCYP.

Agradezco el apoyo brindado por parte del Dr. Andrés Villa y todo su equipo en la pasantía realizada en su grupo de investigación, Coordinador del Grupo de Biotransformación, perteneciente a la Universidad de Antioquia, Medellín.

Agradezco la ayuda brindada por el Dr. Mario Arias Zabala y Juan Pablo, Director del Grupo de Bioconversiones, Universidad Nacional de Medellín, Colombia.

A los integrantes de la Comisión de Supervisión de esta tesis, Dr. Gustavo Giussiano, Dra. Olga Vasek, y la Dra. Laura Villalba, por sus continuos aportes para el mejoramiento del desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Eugenia Bosco del Cepario de Microbiología del Hospital Malbrán de la ciudad de Buenos Aires, por la donación de microorganismos.

A la Dra. Florencia Rojas y demás participantes del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Regional, Resistencia, por prepararme los microorganismos y cedérmelos para mi trabajo experimental.

A la Sra. Bruna Cordeiro, Gestora de Novozymes, por la generosa donación de enzimas, que fueron de gran contribución para el avance de la investigación.

A personal de la Universidad Tecnológica Nacional de Resistencia, como Alejandro Farias, Macarena, entre otros por facilitarme gestión de documentos relacionados con el doctorado.

A Pacú arrocero, por la donación de cascarilla de arroz, como materia prima fundamental para el desarrollo de la investigación.

RESUMEN

Debido al agotamiento de combustibles fósiles y la situación mundial frente a la problemática de producción de biocombustibles sostenibles y amigables con el medio ambiente, se han propuesto alternativas para el aprovechamiento de biomásas y la generación de productos de alto valor agregado.

Actualmente los biocombustibles que han sido industrializados y explotados son los combustibles obtenidos principalmente de biomásas como la caña de azúcar y el maíz, en el caso del bioetanol. La problemática que presenta la producción de estos biocombustibles radica en la gran cantidad de hectáreas de estas materias primas (caña de azúcar, maíz) que tienen que ser cultivadas para suplir las necesidades alimenticias y energéticas de la sociedad, por esta razón son denominados combustibles de primera generación.

Debido a lo anterior, la utilización de biomásas producidas por actividades agro-industriales, como paja de arroz, cascarilla de arroz, paja de cebada, paja de trigo, entre otras, ha despertado interés. Estos residuos pueden ser utilizados para la obtención de biocombustibles, como el bioetanol.

Estas biomásas presentan gran cantidad de celulosa seguida por hemicelulosas y lignina. El aprovechamiento de la celulosa y hemicelulosas permitiría la obtención de azúcares fermentables, de los que se obtendría finalmente el bioetanol.

El objetivo general de esta tesis, se centra en la producción de bioetanol de cascarilla de arroz por hidrólisis y fermentación simultánea (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*, SSF), utilizando el proceso de hidrólisis seguida de fermentación (*Separated Hydrolysis and Fermentation*, SHF) como referencia. Se propuso el aprovechamiento de la cascarilla de arroz para producción de bioetanol, teniendo en cuenta que es un residuo que se produce en grandes proporciones en el NEA Argentino, debido a la actividad industrial de varias arroceras ubicadas en esta región donde se desarrolló este trabajo.

En este trabajo se realizaron ensayos preliminares de hidrólisis y fermentación simultánea (SSF), utilizando cascarilla de arroz pretratada en condiciones severas, para eliminar hemicelulosas y lignina. Inicialmente se llevó a cabo el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido a 150°C durante 30 minutos para remover las hemicelulosas, seguidamente se realizó un tratamiento con NaOH a 160°C durante 1 h para remover lignina. También se aplicó una secuencia con ácido diluido para remover hemicelulosas seguida por un pretratamiento organosolv, utilizando NaOH como catalizador y etanol como solvente a 170°C durante 1 h para remoción de lignina. Estos pretratamientos fueron optimizados

previamente en el Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica QUIMOBÍ, UTN Resistencia, Argentina.

La cascarilla pretratada con la secuencia ácido diluido-tratamiento alcalino, fue utilizada como sustrato en el proceso SSF. La hidrólisis enzimática se efectuó con las celulasas de *Trichoderma reesei* suplementada con celobiasa de *Aspergillus niger* de Sigma Aldrich, con un dosaje enzimático de 40 FPU/g glucano, y se evaluó la producción de etanol con diferentes microorganismos, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, donados por el cepario del Hospital Malbrán de la ciudad de Buenos Aires.

Las experiencias se realizaron a 35 °C y hasta 10 días. Los resultados de producción de bioetanol de este ensayo preliminar de SSF fueron 64,74% para *S. cerevisiae*, 75,98% para *K. marxianus*, 7,79% para *C. tropicalis* y 2,10% para *C. guilliermondii*. El ensayo se operó durante 10 días, pero la mayor producción de bioetanol por parte de los microorganismos se observó dentro de los primeros 4 días de proceso.

Sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar del proceso simultáneo y teniendo en cuenta que las enzimas celulasas hidrolizan a temperaturas entre 40°C - 50°C, pero los microorganismos fermentan hasta temperaturas de 37°C, máximo 40°C en el caso de *K. marxianus*, se optó por encontrar una temperatura intermedia en donde tanto los microorganismos como las enzimas trabajaran correctamente.

Se optimizó el proceso de hidrólisis enzimática con la utilización de las enzimas Cellic CTec2, que fueron donadas por Novozymes, Brasil. Se realizó este cambio en las enzimas utilizadas en el proceso debido a que las enzimas utilizadas anteriormente (de Sigma Aldrich), disminuían su actividad enzimática muy rápidamente.

También se utilizó otro tipo de pretratamiento de la cascarilla para llevar a cabo la optimización de la hidrólisis enzimática. Se optó por utilizar pretratamiento con NaOH, 10% (p/v) biomasa, 3% (p/v) de NaOH, durante 1 h a 121°C en autoclave, ya que este tipo de pretratamiento presenta condiciones menos severas y utiliza equipamiento más accesible, con la posibilidad de aprovechar los productos obtenidos en una biorrefinería.

Para la optimización de la hidrólisis enzimática se utilizaron dos tipos de diseños experimentales. Inicialmente se desarrolló un diseño de cribado utilizando las variables FPU/g sustrato, pH, tiempo (h), temperatura (°C), agitación (rpm) y concentración de surfactante (g/L), en el cual todas las variables resultaron significativas, excepto la agitación. Para el segundo diseño se optó por las

variables FPU/g sustrato, pH, y tiempo (h), manteniendo fija la agitación (180 rpm), la temperatura (37°C) y la concentración de surfactante (0,3 g/L), se utilizó una concentración de sólidos del 2 % (p/v). Los resultados del diseño de optimización indicaron que el máximo rendimiento de azúcares obtenido fue de aproximadamente 62%, con 50 FPU/g glucanos, a las 13 h de reacción y pH ~ 4,9. Se realizaron ensayos posteriores con menor carga enzimática y aumentado el porcentaje de sólidos. En los ensayos se utilizaron 6%, 8% y 10% de celulosa hidrolizable, 30 FPU/g glucanos, pH 5,0 y un tiempo de reacción de 13 h, se obtuvieron rendimientos de hidrólisis de 51,11%, 29,92% y 11,07% respectivamente.

Posteriormente se utilizó 2% (p/v) de cascarilla molida y sin moler en los ensayos, pero se observó que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los dos tipos de cascarilla. Los resultados obtenidos de la hidrólisis enzimática fueron 41,16% de azúcares reductores y 36,60% de glucosa en el caso de cascarilla molida, 37,70% de azúcares reductores y 35,50% glucosa para la cascarilla sin moler.

Por último, se compararon los procesos fermentativos SSF y SHF, con la levadura *S. cerevisiae 1181*. El proceso SSF se realizó con un dosaje enzimático de 30 FPU/g glucanos de las enzimas Cellic CTec2, 2% (p/v) de cascarilla de arroz, 37°C, 130 rpm, durante 72 h, presentando un rendimiento de producción de bioetanol de 38%, con la mayor producción de bioetanol dentro de las primeras 49 h.

En el proceso SHF se utilizaron las mismas condiciones de trabajo que el proceso simultáneo, con 13 h de hidrólisis y 13 h de fermentación se obtuvo 35% de producción de bioetanol, totalizando 26 h de proceso. Comparando con el proceso SHF, en el proceso SSF se obtuvo un rendimiento superior, aunque en mayor tiempo.

Por otra parte, el proceso SSF ofrece menor grado de contaminación, se realiza en un solo reactor y presenta menos compuestos inhibitorios en el medio de fermentación. En el caso de SHF se produce una acumulación de compuestos que pueden llegar a inhibir la actividad fermentativa de los microorganismos.

Buscando mejorar el rendimiento, se realizó un proceso SSF con la levadura *S. cerevisiae 1507*, con una duración de 24 h, presentando un rendimiento de bioetanol de 44%. A diferencia de la levadura *S. cerevisiae 1181*, este microorganismo presentó mayor rendimiento de producción de bioetanol en menor tiempo.

Según los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis, se concluye que es posible obtener bioetanol a partir de cascarilla de arroz mediante el proceso SSF aplicando pretratamientos severos y

suaves, por lo que es motivador continuar el estudio de este proceso para mejorar la obtención de este biocombustible.

Palabras claves: Cascarilla de arroz, hidrólisis y fermentación simultánea, hidrólisis seguida de fermentación, celulosa, hemicelulosas, lignina, enzimas, dosaje enzimático.

ABSTRACT

Due to the depletion of fossil fuels and the world situation facing the problem of sustainable and environmentally friendly biofuel production, alternatives have been proposed for the use of biomass and the generation of high added-value products.

Currently, the biofuels that have been industrialized and exploited are fuels obtained mainly from biomass such as sugar cane and corn, in the case of bioethanol. The problem with the production of these biofuels lies in a large number of hectares of these raw materials (sugar cane, corn) that have to be cultivated to supply the food and energy needs of society, for this reason, they are called fuel first generation.

Due to the above, the use of biomass produced by agro-industrial activities, such as rice straw, rice husk, barley straw, wheat straw, among others, have aroused interest. These residues can be used to obtain biofuels, such as bioethanol.

These biomasses have a large amount of cellulose, followed by hemicelluloses and lignin. The use of cellulose and hemicelluloses would allow obtaining fermentable sugars, and finally bioethanol.

The general objective of this thesis focuses on the production of bioethanol from rice husk by hydrolysis and simultaneous fermentation (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF), using the hydrolysis followed by fermentation process (Separated Hydrolysis and Fermentation, SHF) as a reference. The use of rice husk for the production of bioethanol was proposed, taking into account that it is a waste produced in large proportions in the NEA region of Argentina, due to the industrial activity of several rice plants located where this work was developed.

In this work, preliminary tests of hydrolysis and simultaneous fermentation (SSF) were carried out with pretreatments under severe conditions to eliminate hemicelluloses and lignin. Initially, pretreatment was carried out with dilute sulfuric acid at 150°C for 30 minutes to remove the

hemicelluloses, followed by treatment with NaOH at 160°C for 1 hour to remove lignin. A dilute acid sequence was also applied to remove hemicelluloses followed by an organosolv pretreatment, using NaOH as catalyst and ethanol as solvent at 170°C for 1 h to remove lignin. These pretreatments were previously optimized at the QUIMOBIO Biological Organic Chemistry Research Center, UTN Resistencia, Argentina.

The scale pretreated with the dilute acid-alkaline treatment sequence was used as a substrate in the SSF process. Enzymatic hydrolysis was carried out with *Trichoderma reesei* cellulases supplemented with *Aspergillus niger* cellobiase from Sigma Aldrich, with an enzymatic dosage of 40 FPU/ g glucan, and ethanol production was evaluated with different microorganisms, such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, donated by the hospital Malbrán Hospital in the city of Buenos Aires.

The experiments were carried out at 35 °C and up to 10 days. The bioethanol production results from this preliminary SSF trial were 64,74% for *S. cerevisiae*, 75,98% for *K. marxianus*, 7,79% for *C. tropicalis*, and 2,10% for *C. guilliermondii*. The test lasted for 10 days, but the highest production of bioethanol by microorganisms was observed within the first 4 days of the process.

Based on the results obtained in the preliminary test of the simultaneous process and taking into account that cellulase enzymes hydrolyze at temperatures between 40°C - 50°C, but the microorganisms ferment up to temperatures of 37 ° C, maximum 40 ° C in the case of *K. marxianus*, it was decided to find an intermediate temperature where both microorganisms and the enzymes worked correctly.

The enzymatic hydrolysis process was optimized with the use of Cellic CTec2 enzymes, which were donated by Novozymes, Brazil. This change was made in the enzymes used in the process because the enzymes used previously (from Sigma Aldrich), decreased their enzymatic activity very quickly.

Another type of scale pretreatment was also used to carry out the optimization of the enzymatic hydrolysis. It was decided to use pretreatment with NaOH, 10% (w/v) biomass, 3% (w/v) NaOH, for 1 h at 121 °C in an autoclave, since this type of pretreatment presents less severe conditions and uses equipment more accessible, with the possibility of taking advantage of the products obtained in a biorefinery.

For the optimization of enzymatic hydrolysis, two types of experimental designs were used. Initially, a screening design was developed using the variables FPU / g substrate, pH, time (h), temperature (°C), agitation (rpm) and surfactant concentration (g/L), in which all the variables were significant except

agitation. For the second design, the variables FPU/g substrate, pH, and time (h) were chosen, keeping constant the stirring (180 rpm), temperature (37 °C) and surfactant concentration (0,3 g / L), solids concentration of 2% (w/v) was used.

The results of the optimization design indicated that the maximum sugar yield obtained was approximately 62%, with 50 FPU/g glucan, at 13 h of reaction and pH ~ 4.9. Subsequent tests were carried out with a lower enzyme load and an increased percentage of solids. The trials used 6%, 8% and 10% of hydrolyzable cellulose, 30 FPU/g glucan, pH 5,0 and reaction time of 13 h, hydrolysis yields of 51,11%, 29,92% and 11,07% respectively, were obtained.

Subsequently, 2% (w/v) of ground and unmilled husk was used in the tests, but it was observed that there are not significant differences between the results obtained with the two types of husk. The results obtained from the enzymatic hydrolysis were 41,16% reducing sugars and 36,60% glucose in the case of ground husk, 37,70% reducing sugars and 35,50% glucose for the raw husk.

Finally, the fermentative processes SSF and SHF were compared with the yeast *S. cerevisiae* 1181. The SSF process was carried out with an enzymatic dosage of 30 FPU/g glucan of the Cellic CTec2 enzymes, 2% (w/v) of husk of rice, 37 °C, 130 rpm, for 72 h, presenting a bioethanol production yield of 38%, with the highest bioethanol production within the first 49 h.

In the SHF process the same working conditions were used as the simultaneous process, with 13 h of hydrolysis and 13 h of fermentation, 35% of bioethanol production was obtained, totaling 26 h of process. Comparing with the SHF process, in the SSF process a higher performance was obtained, although in a longer time.

On the other hand, the SSF process offers a lower degree of contamination, is carried out in a single reactor and has fewer inhibitory compounds in the fermentation medium. In the case of SHF, there is an accumulation of compounds that can inhibit the fermentative activity of microorganisms.

Seeking to improve the yield, an SSF process was carried out with the yeast *S. cerevisiae* 1507, with a duration of 24 h, presenting a bioethanol yield of 44%. Unlike the yeast *S. cerevisiae* 1181, this microorganism presented a higher yield of bioethanol production in less time.

According to the results obtained in the development of this thesis, it is concluded that it is possible to obtain bioethanol from rice husk through the SSF process applying severe and mild pretreatments, so it is motivating to continue the study of this process to improve the obtaining of this biofuel.

Keywords: Rice husk, hydrolysis and simultaneous fermentation, hydrolysis followed by fermentation, cellulose, hemicelluloses, lignin, enzymes, enzymatic dosage.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFEX: Explosión de fibra con amoníaco

ANOVA: Análisis de la varianza

Bioetanol 1 G: Bioetanol de primera generación

Bioetanol 2 G: Bioetanol de segunda generación

Bioetanol 3 G: Bioetanol de tercera generación

CA: Alginato de calcio

CBHs: Celobiohidrolasas

CBP: Consolidado de Bioprocesos

DNS: Ácido dinitrosalicílico

DS: Desviación estándar

EGs: Endoglucanasas

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FPU: Unidades de papel de filtro

HE: Hidrólisis enzimática

HMF: Hidroximetilfurfural

HPLC: High performance liquid chromatography

IUPAC: Unión Internacional para la Química Pura y Aplicada

LPMOs: Monooxigenasas

LSD: Test de comparación de medias

NaOH: Hidróxido de sodio

NREL: National Renewable Laboratory

ODW: (Oven dry weight), peso seco obtenido al secar la biomasa en estufa

PSSF: Presacarificación e hidrólisis y fermentación simultánea

PVA: Alcohol polivinílico

RPM: Revoluciones por minuto

SC: *Saccharomyces cerevisiae*

SHF: Hidrólisis seguida de fermentación

SSF: Hidrólisis y fermentación simultánea

YPD: Medio de cultivo utilizado conformado por extracto de levadura, peptona y dextrosa

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
ÍNDICE DE TABLAS.....	18
ÍNDICE DE FIGURAS.....	19
CAPITULO 1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	21
1.1 HIPÓTESIS:.....	21
1.1.2 OBJETIVOS:.....	21
1.1.2.1 Objetivo General.....	21
1.1.2.2 Objetivos Específicos.....	21
CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO.....	22
2.1 EL ARROZ.....	22
2.1.1 Usos de la cascarilla de arroz.....	27
2.1.2 Producción de Bioetanol a nivel mundial.....	28
2.1.3 Producción de Bioetanol en Argentina.....	29
2.2 CLASIFICACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	30
2.2.1 Celulosa.....	31
2.2.2 Hemicelulosas.....	32
2.2.3 Lignina.....	32
2.3 APLICACIONES DE LOS COMPONENTES DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	33
2.4 PRETRATAMIENTOS APLICADOS A BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	34
2.4.1 PRETRATAMIENTOS FÍSICOS.....	34
Trituración Mecánica.....	34
2.4.2 PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS.....	34
2.4.2.1 Pretratamiento Alcalino.....	34
2.4.2.2 Pretratamiento Ácido.....	35
2.4.2.3 Pretratamiento Oxidativo.....	35
2.4.2.4 Pretratamiento con Ozono.....	35
2.5 PRETRATAMIENTO CON ORGANOSOLVENTES.....	35
2.5.1 PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	35
2.5.1.1 Explosión por Vapor.....	35
2.5.1.2 Explosión de Fibra con Amoníaco (AFEX).....	35
2.5.1.3 Explosión con CO ₂ :.....	36

2.6 PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS	36
2.6.1 Pretratamiento con Microorganismos	36
2.6.2 Compuestos de degradación formados en el pretratamiento	37
2.7 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	38
2.7.1 Endoglucanasas o 1,4-β-D-glucano-4-glucanohidrolasas:	38
2.7.2 Exoglucanasas compuestas por 1,4-β-D-glucano-glucanohidrolasas (celodextrinasas), 1,4-β-D-glucano-celobiohidrolasas (celobiohidrolasas)	38
2.7.3 β-glucosidasas	38
2.7.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CELULOSA	39
2.8 PRODUCCIÓN DE CELULASAS	40
2.8.1 Cultivo Sumergido	40
2.8.2 Fermentación en Estado Sólido	40
2.8.3 Enzimas Celulolíticas	42
2.9 FERMENTACIÓN	45
2.9.1 MICROORGANISMOS FERMENTATIVOS	46
2.9.2 HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF)	47
2.9.3 OTRAS ESTRATEGIAS DE FERMENTACIÓN	51
2.9.3.1 Inmovilización o encapsulación celular	51
2.9.3.2 Consolidado de Bioprocesos (CBP)	52
CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.1. ENSAYOS PRELIMINARES DE HIDRÓLISIS Y FERMENTANCIÓN SIMULTÁNEA CON SISTEMA DE CELULAS LIBRES E INMOVILIZADAS	54
3.1.1. Materia prima, microorganismos y enzimas	54
3.1.2. Caracterización de la materia prima y productos de reacción	54
3.1.3. Determinación de la actividad enzimática	57
3.1.4. Caracterización de los microorganismos	57
3.1.5. Tratamientos de la materia prima	58
3.1.6. Hidrólisis y fermentación simultánea con sistema de células libres	59
3.1.7. Determinación de etanol	60
3.1.8. Hidrólisis y fermentación simultánea utilizando células inmovilizadas	61
3.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CASCARILLA DE ARROZ	63
3.2.1 Tratamiento ácido- alcalino y ácido- organosolv	63
3.2.2 Métodos Analíticos	63
3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	65
3.3.1. Materias primas e insumos	65

3.3.2. Caracterización de la cascarilla de arroz	65
3.3.3. Determinación de la actividad enzimática.....	65
3.3.4. Pretratamiento de la materia prima	65
3.3.5. Hidrólisis enzimática	66
3.3.6. Métodos analíticos	67
3.3.7. Diseños experimentales	67
3.3.8. Análisis estadístico	68
3.4. HIDRÓLISIS SEGUIDA DE FERMENTACIÓN E HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON PÁRAMETROS OPTIMIZADOS.....	68
3.4.1. Materia prima, microorganismos, enzimas.....	68
3.4.2. Caracterización de la cascarilla de arroz	69
3.4.3. Determinación de la actividad enzimática.....	70
3.4.4. Preparación del preinóculo e inóculo.....	71
3.4.5. Hidrólisis seguida de fermentación	71
3.4.5.1. Hidrólisis enzimática	71
3.4.5.2. Fermentación	72
3.4.5.3 Hidrólisis y Fermentación Simultánea	72
3.4.5.4 Métodos analíticos	74
3.4.5.5 Análisis estadístico	74
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
4.1. ENSAYOS PRELIMINARES DE HIDRÓLISIS Y FERMENTANCIÓN SIMULTÁNEA CON SISTEMA DE CELULAS LIBRES E INMOVILIZADAS.....	75
4.1.1. Materia prima, microorganismos y enzimas.....	75
4.1.1.1 Composición de la cascarilla de arroz	75
4.1.1.2. Actividad enzimática de celulasas de <i>Trichoderma reesei</i>	75
4.1.1.3. Caracterización de los microorganismos.....	75
4.1.2. Hidrólisis y fermentación simultánea utilizando células libres	76
4.1.3. Hidrólisis y fermentación simultánea utilizando células inmovilizadas	80
4.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CASCARILLA DE ARROZ	81
4.2.1. Caracterización de la cascarilla de arroz pretratada con hidróxido de sodio y organosolv.....	81
4.2.2. Determinación de la actividad enzimática.....	81
4.2.3. Hidrólisis enzimática	81
4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	84
4.3.1. Composición de la cascarilla de arroz	84
4.3.2. Determinación de la actividad enzimática.....	84

4.3.3. Selección de variables	84
4.3.4. Optimización	86
4.4. HIDRÓLISIS SEGUIDA DE FERMENTACIÓN E HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON PARÁMETROS OPTIMIZADOS.....	90
4.4.1. Caracterización de la cascarilla de arroz	90
4.4.2. Determinación de la actividad enzimática.....	90
4.4.3. Hidrólisis enzimática	91
4.4.4. Evaluación del tipo de proceso de producción de bioetanol	101
4.4.5. Influencia del tipo de levadura	108
4.5. PROPUESTAS PARA EL APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LA CASCARILLA DE ARROZ	108
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	110
CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES	112
BIBLIOGRAFÍA.....	113
PRESENTACIONES A CONGRESOS Y EVENTOS.....	125
ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDEXADAS.....	126
ARTICULOS PUBLICADOS EN REVISTAS DE DIVULGACIÓN	126
FINANCIAMIENTO	127

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de arroz en cáscara (millones de toneladas) en Sur América en los años 2017 y 2018	26
Tabla 2. Producción de bioetanol (millones de galones) a nivel mundial en los últimos 5 años	28
Tabla 3. Producción de bioetanol en Argentina	30
Tabla 4. Microorganismos productores de enzimas celulolíticas	42
Tabla 5. Rendimientos de hidrólisis enzimática en diferentes biomásas	43
Tabla 6. Producción de bioetanol por SSF, SHF y PSSF a partir de diferentes biomásas.....	48
Tabla 7. Condiciones de trabajo en los diseños experimentales aplicados con 1% de celulosa	66
Tabla 8. Hidrólisis y fermentación simultánea de la cascarilla de arroz a 32°C.....	76
Tabla 9. Hidrólisis y fermentación simultánea de la cascarilla de arroz a 35°C.....	77
Tabla 10. SSF con <i>Kluyveromyces marxianus</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a 35°C.....	79
Tabla 11. Resultados del diseño de cribado de hidrólisis enzimática	85
Tabla 12. Resultados del diseño de optimización de la hidrólisis enzimática	86
Tabla 13. % Rendimientos de azúcares con pH 4,5 y 5,0.....	88
Tabla 14. Resultados de los ensayos de variación de celulosa hidrolizable	88
Tabla 15. Caracterización de la cascarilla pretratada y molida y cascarilla pretratada sin moler (% Componentes/ 100 g de cascarilla seca)	90
Tabla 16. Rendimientos de glucosa y azúcares totales en cascarilla molida y sin moler	91
Tabla 17. Comparación de rendimientos de hidrólisis enzimática para diferentes biomásas por SHF	99
Tabla 18. Comparación de la hidrólisis seguida de fermentación (SHF) versus sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) usando <i>S. cerevisiae</i> 1181	101
Tabla 19. (%) Rendimientos de hidrólisis enzimática en diferentes biomásas	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la planta y grano de arroz	24
Figura 2. Ciclo de vida de la planta de arroz,	25
Figura 3. Producción de arroz en Argentina desde el año 2001 a 2016	26
Figura 4. Producción de arroz en Argentina	27
Figura 5. Estructura de la biomasa lignocelulósica	31
Figura 6. Estructura de la celulosa	32
Figura 7. Estructura de las hemicelulosas (molécula de xilano presente en gramíneas)	32
Figura 8. Estructura de lignina presente en gramíneas	33
Figura 9. Algunos productos que pueden obtenerse a partir de los componentes de la biomasa lignocelulósica	34
Figura 10. Esquema del efecto originado por el pretratamiento en biomasa lignocelulósica	36
Figura 11. Esquema de degradación enzimática de la fibra de celulosa	39
Figura 12. Esquema de producción de bioetanol por SHF	45
Figura 13. Microorganismos fermentativos y sus características	46
Figura 14. Proceso de hidrólisis y fermentación simultánea (SSF) de la cascarilla de arroz	48
Figura 15. Estructura del gel en la formación de las cápsulas	51
Figura 16. Esquema de producción de bioetanol por CBP (Consolidado de Bioprocesos).....	53
Figura 17. Esquema experimental de caracterización de biomasa.	56
Figura 18. Equipamiento utilizado para realizar caracterización de la cascarilla de arroz a) Estufa para realizar determinación de humedad, b) Equipo Soxhlet para determinación de extractivos de la biomasa, c) Manta calefactora para determinación de carbohidratos y lignina, d) Mufla para determinación de inorgánicos contenidos en la cascarilla.	57
Figura 19. Reactores para realizar pretratamiento de remoción de hemicelulosas y lignina, a) reactor para remoción de hemicelulosas, b) reactor para remoción de lignina.....	58
Figura 20. Esquema experimental de la secuencia de pretratamientos realizada a la biomasa	59
Figura 21. Esquema experimental de formación de cápsulas de los microorganismos en alginato de calcio.	62
Figura 22. Agitador de vaivén para hidrólisis y fermentación (SSF).	62
Figura 23. a) Cromatograma de determinación de etanol, donde se observan los picos del estándar interno utilizado (metilbutilcetona) y etanol. La metilbutilcetona se presenta a los 1,19 min y el etanol a los 1,72 min. b) Curva de calibración para la determinación de etanol.	64
Figura 24. Baño húmedo de agitación orbital para colocar hidrolizados de cascarilla de arroz.....	67
Figura 25. Elementos utilizados para pretratar la cascarilla a) Autoclave para realizar pretratamiento b) Cascarilla pretratada.	69
Figura 26. a) Tamices para determinación de granulometría de la cascarilla (80 y 20 micras) b) Máquina de moler para realizar molienda de la cascarilla c) Cascarilla sin moler d) Cascarilla molida	70
Figura 27. Esquema de hidrólisis y fermentación simultánea e hidrólisis seguida de fermentación	73
Figura 28. Montajes de SHF y SSF a) Hidrolizados de cascarilla para SHF b) Montaje a 37°C de SHF y SSF.....	74
Figura 29. Composición de la cascarilla de arroz pretratada con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio	75

Figura 30. a) Caja de Petri con medio CHROMagar, b) Diferentes virajes de color en medio CHROMagar c) Microorganismos en cajas de Petri en medio sólido YPD	76
Figura 31. % Rendimiento de glucosa con cascarilla pretratada con hidróxido de sodio y organosolv.....	81
Figura 32. Esquema de diferencias medias para el pretratamiento con hidróxido (1) y organosolv (2).....	83
Figura 33. Esquema de las diferencias de medias en los tiempos (h) de duración de la hidrólisis enzimática.	83
Figura 34. Gráfico de contornos de optimización del rendimiento de hidrólisis (13 h de tratamiento).....	87
Figura 35. Residuo de hidrolizado de cascarilla	88
Figura 36. a) Determinación de celulasas con DNS b) Determinación de β -glucosidasa con <i>p</i> - ..	91
Figura 37. % Rendimiento de glucosa y azúcares totales de cascarilla pretratada sin moler.....	92
Figura 38. % Rendimiento de glucosa y azúcares totales de la cascarilla pretratada y molida.	93
Figura 39. Concentración (g/L) de glucosa y azúcares totales en cascarilla molida y sin moler.	94
Figura 40. Diferencia de medias de producción de glucosa a los diferentes tiempos de los dos tipos de cascarilla.....	95
Figura 41. Diferencia de medias de producción de glucosa de los dos tipos de cascarilla.....	95
Figura 42. Diferencia de medias de producción de azúcares totales a los diferentes tiempos en cascarilla molida y sin moler.	96
Figura 43. % Rendimientos de carbohidratos de la cascarilla sin moler	97
Figura 44. % Rendimientos de carbohidratos de la cascarilla molida	97
Figura 45. Comparación de hidrólisis seguida de fermentación e hidrólisis y fermentación simultáneas, usando <i>S. cerevisiae</i> 1181	102
Figura 46. Producción de bioetanol, glucosa, y presencia de otros carbohidratos en SHF con SC 1181.....	103
Figura 47. Producción de bioetanol, glucosa, y otros carbohidratos en SSF con SC 1181	104
Figura 48. Producción de bioetanol, glucosa y otros carbohidratos en SSF con SC 1507	105
Figura 49. Comparación del tratamiento SSF utilizando SC 1181 y SC 1507.....	108

CAPITULO 1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.1 HIPÓTESIS:

- Puede obtenerse bioetanol a partir de la cascarilla de arroz, por medio de la hidrólisis y fermentación simultánea realizada por enzimas y microorganismos que trabajan a una misma temperatura.

1.1.2 OBJETIVOS:

1.1.2.1 Objetivo General

- Evaluar el proceso de hidrólisis y fermentación simultánea de la cascarilla de arroz.

1.1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar las variables más importantes que afectan el proceso de hidrólisis para aplicarlos a la hidrólisis y fermentación simultánea e hidrólisis seguida de fermentación.
- Evaluar el rendimiento de bioetanol generado en el proceso simultáneo y separado.
- Evaluar la eficiencia del tratamiento simultáneo respecto de la hidrólisis seguida de fermentación.

Este trabajo se enmarca en el aprovechamiento de residuos generados en la actividad industrial de arroceras ubicadas en el Nordeste Argentino, en este caso la cascarilla de arroz para producción de bioetanol de segunda generación. Teniendo en cuenta que el etanol que se utiliza actualmente es de primera generación, debido a que se obtiene a partir de biomasa que se usa también para satisfacer las necesidades del sector alimenticio, por lo que es necesario cultivar grandes cantidades de estas biomásas, para lograr el cubrimiento total de su demanda.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que es posible la obtención de bioetanol a partir de cascarilla de arroz por proceso simultáneo, en comparación con el proceso de hidrólisis seguida de fermentación. Los ensayos realizados fueron a escala de laboratorio, pero indican que es posible continuar el estudio de la producción de bioetanol a partir de la cascarilla de arroz, ya que se dieron los primeros avances de la producción del bicomcombustible con este proceso innovador.

CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 EL ARROZ

El arroz (*Oryza sativa* L.), es un cereal que se consume en el mundo desde la antigüedad. Es el alimento principal de más de la mitad de la población mundial.

En el continente asiático se centra el mayor consumo, mayor producción y exportación de este cereal, ya que según reportes de la FAO solo en el año 2016 China produjo más de 209 millones de toneladas, seguido de India con 158 millones de toneladas. El arroz se caracteriza por poseer mayor cantidad de lisina, almidón y amilopectina que otros cereales como el trigo, maíz y sorgo (Agrotendencia, 2020).

El arroz es considerado una planta anual subacuática, puede crecer en climas templados y subtropicales. En climas tropicales la planta puede sobrevivir como perenne al rebrotar después de la cosecha. Las partes de esta planta son:

- El **sistema radical** se encuentra formado por **raíces de la corona** y **raíces de los nudos**. **Las raíces de la corona** se forman por nudos bajo el suelo, este tipo de raíces se subdividen en **raíces superficiales laterales** y **raíces comunes**. **Las raíces de los nudos** se caracterizan por adaptarse en condiciones de inundación profunda. El **sistema radical** posee gran adaptación a condiciones de falta de oxígeno, por lo tanto, las raíces pueden crecer hasta 40 cm de profundidad.
- **Hojas:** Las **hojas son alternas**, con el limbo lineal, agudo largo y plano. En el punto de unión de la vaina y el limbo se encuentra una lígula membranosa, bífida y erguida.
- **Tallo:** El tallo se forma de nudos y entrenudos, es cilíndrico, nudoso, glabro de 60 -120 cm de longitud, en el tallo se forman hojas y yemas, de las yemas se originan las macollas. La yema está ubicada entre el nudo y la base de la vaina de la hoja. El tallo con sus hojas forma una macolla.
- **Flor y floración:** Las flores de esta planta se encuentran agrupadas en una inflorescencia llamada panícula o espiga, las flores son de color verde blanquecino y se encuentra formando espiguillas que conforman una panoja grande. Las **panículas** se clasifican en abiertas, compactas e intermedias. La **espiguilla** es la unidad básica de la inflorescencia y se encuentra adherida a las ramificaciones por el pedicelo.
- **Fruto y semilla:** El **fruto** es un **cariósipide** o **fruto simple** que se forma por un carpelo. La semilla de arroz es un ovario maduro y fecundado, seco e indehiscente, se encuentra formado por la **lemma**, **pálea**, **raquilla** y **arista** (Agrotendencia, 2020).

En la figura 1, se observa las partes de la planta y grano de arroz (Agrotendencia, 2020).



a) Raíces

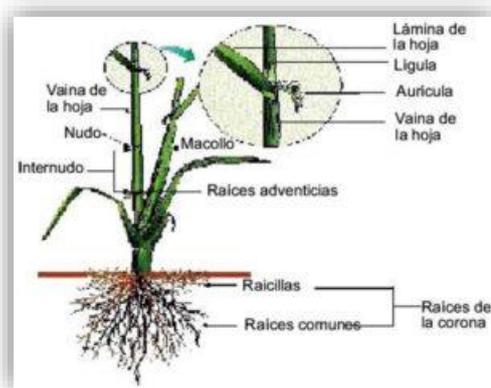


b) Hojas

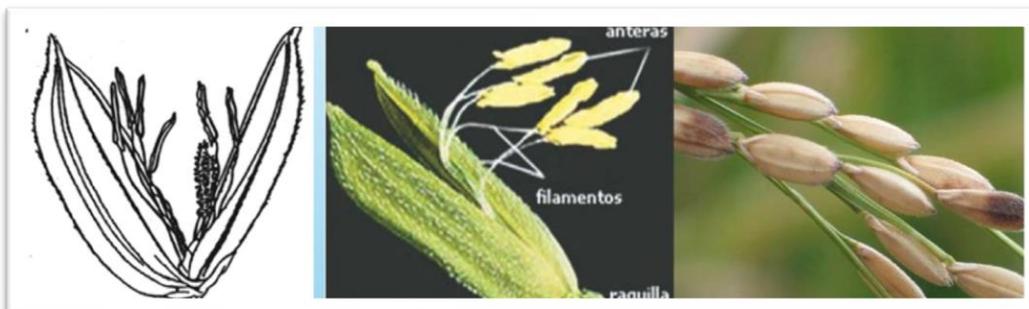


c) Tallos

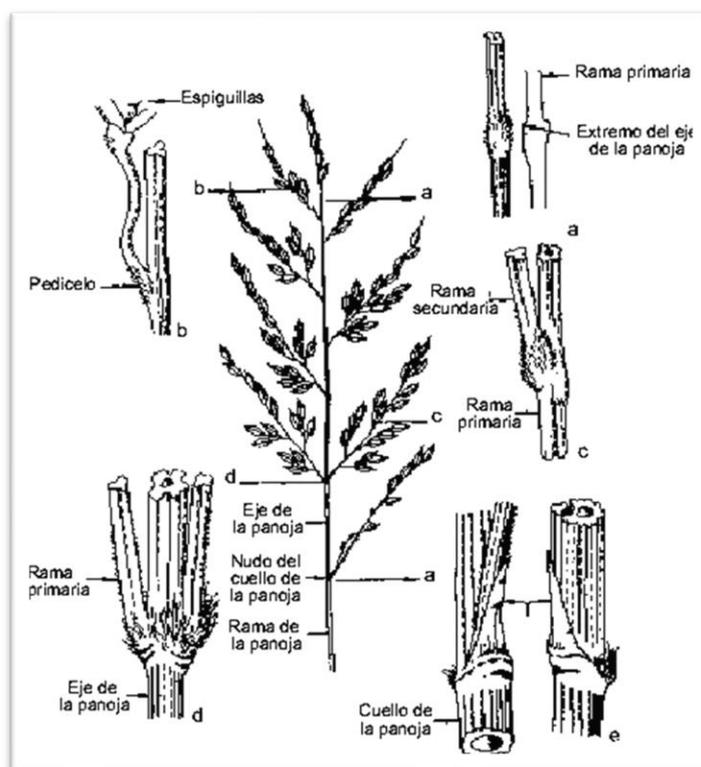
d) Sistema radicular y tallo



e) Flores



f) Panícula



g) El grano de arroz y sus partes

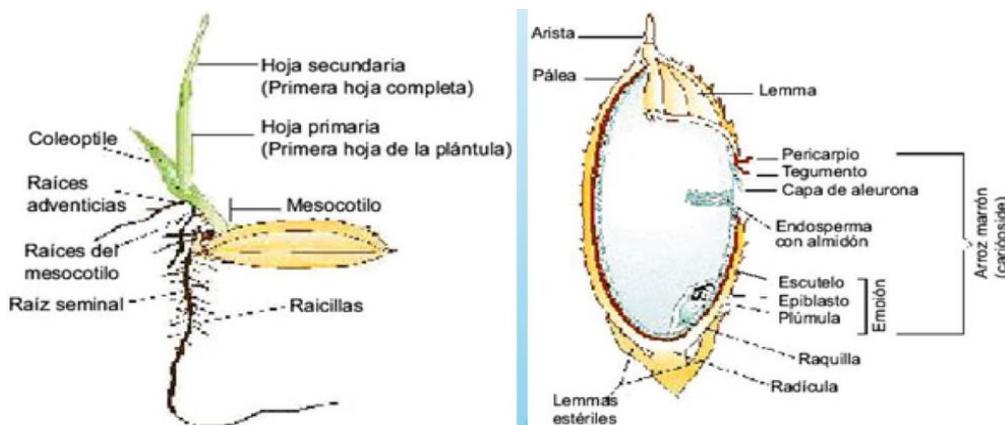


Figura 1. Partes de la planta y grano de arroz (Agrotendencia, 2020)

El ciclo de vida del arroz comprende la germinación y emergencia, formación de la plántula, macollaje, y emergencia de la panoja hasta a la formación de la planta madura.

La **germinación** y el desarrollo óptimo de la plántula dependen de la absorción adecuada de agua y exposición a temperaturas entre 30°C-35°C, del período de siembra a emergencia puede durar entre 5 y 30 días.

El **macollaje** para su óptimo desarrollo requiere de factores como fertilidad del suelo, fertilización, lámina de agua adecuada (menor a 10 cm), entre otros factores. La temperatura óptima para el macollamiento se encuentra entre 32°C-35°C, temperaturas menores o mayores pueden generar la paralización del macollamiento.

En la etapa de **madurez** las plantas presentan un tallo principal y cierta cantidad de macollas, las macollas reproductivas son aquellas que desarrollan una panoja fértil.

Finalmente, el **llenado de granos**, es un período en el que la intensidad de la luz es muy importante, debido a que el 60% de los carbohidratos trasladados desde las hojas al grano son fotosintetizados en esta etapa (Agrotendencia, 2020).

En la figura 2, se observa cada una de las etapas que comprenden el ciclo de vida de la planta de arroz (Gonzales, 2005).

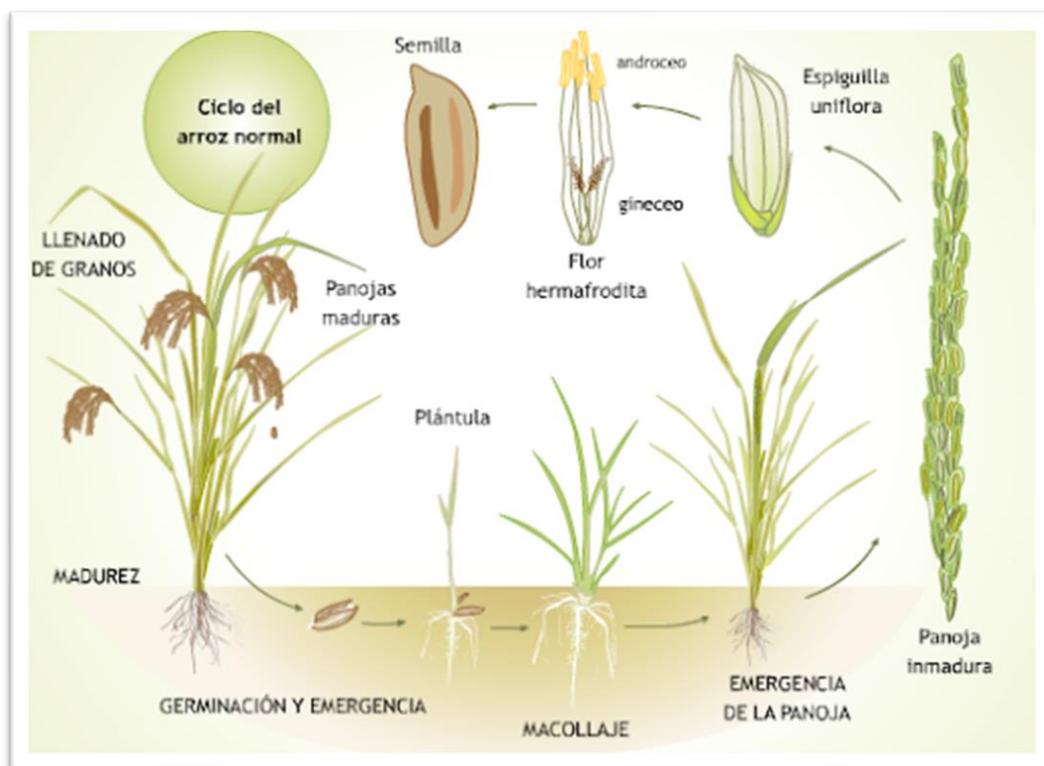


Figura 2. Ciclo de vida de la planta de arroz, (Gonzales, 2005)

Según cifras reportadas por la FAO en los años 2017 y 2018 se generaron 517,50 y 516,80 millones de toneladas de arroz en cáscara en el mundo, las cuales se destinaron a consumo humano, piensos, entre otros usos. La producción de arroz en cáscara fue de 22,0 millones de toneladas en 2017 y 21,1 millones de toneladas en 2018 en Sur América (FAO, 2018).

En la Tabla 1, se observa la producción de arroz detallada en países sudamericanos durante los años 2017 y 2018, según datos reportados por la FAO.

Tabla 1. Producción de arroz en cáscara (millones de toneladas) en Sur América en los años 2017 y 2018 (FAO, 2018)

Países	2017	2018
Argentina	1,30	1,30
Brasil	12,30	11,40
Colombia	2,70	2,70
Ecuador	1,20	1,20
Perú	3,00	3,20
Uruguay	1,40	1,30

La producción de arroz en Argentina desde el año 2001 hasta 2016 ha oscilado entre 700.000 a 1.300.000 toneladas (De Bernardi, 2016), como se puede observar en la Figura 3.



Figura 3. Producción de arroz en Argentina desde el año 2001 a 2016 (De Bernardi, 2016)

La producción de arroz en Argentina se centra principalmente en las provincias de Formosa, Chaco, Corrientes, Santa Fe y Entre Ríos (De Bernardi, 2016), como se observa en la Figura 3.



Figura 4. Producción de arroz en Argentina (De Bernardi, 2016)

En la Figura 4, se observa que la mayor producción de arroz se centró en la provincia de Corrientes con 635.900 ton, seguidamente Entre Ríos con 500.000 ton, Santa Fe 202.580 ton, Chaco 34.800 ton y Formosa 31.700 ton (De Bernardi, 2016).

2.1.1 Usos de la cascarilla de arroz

En países como Argentina y Colombia, la cascarilla de arroz también se ha utilizado como adhesivo tipo mortero para colocación de baldosas cerámicas, debido a la gran cantidad de sílice que forma parte de la composición química de la cascarilla. Así se disminuye el uso de arena en este tipo de adhesivos, y consecuentemente aminora la explotación de este recurso que genera gran impacto ambiental (Mafla, 2009; Novoa *et al.*, 2016).

La cascarilla de arroz también es utilizada en la agricultura, como humus, ya que contribuye a mejorar las características físicas del suelo, facilitando la aireación, absorción de humedad y filtraje de nutrientes.

También beneficia la actividad macro y microbiológica de la tierra, ya que posee gran cantidad de sílice lo que favorece a los vegetales, brindándoles mayor resistencia contra insectos y microorganismos.

Mantener cascarilla de arroz en los suelos agrícolas, se convierte en una fuente de humus. La cascarilla carbonizada, aporta al suelo fósforo y potasio, también ayuda a corregir la acidez del suelo (Portal Frutícola, 2018).

2.1.2 Producción de Bioetanol a nivel mundial

Debido al agotamiento de los combustibles fósiles, y la problemática ambiental, se han buscado otras fuentes de energía alternativa (Abdel-banat and Hoshida, 2010; Raud *et al.*, 2014), para reemplazar los combustibles fósiles líquidos, una opción interesante es la producción de biocombustibles como el bioetanol (Renewable Fuels Association, 2019) .

Los residuos generados en la industria arrocera (cáscaras de arroz, paja de arroz) pueden ser utilizados para producción de biocombustibles como el bioetanol (Quynh *et al.*, 2015), biohidrógeno (Ramprakash y Muthukumar, 2014), y bio-diesel (Alvarez *et al.*, 2014).

Actualmente los mayores productores de etanol a nivel mundial son Estados Unidos y Brasil, la Tabla 2 muestra estadísticas de la producción de etanol en los últimos años en el mundo (Renewable Fuels Association, 2019).

Tabla 2. Producción de bioetanol (millones de galones) a nivel mundial en los últimos 5 años (Renewable Fuels Association, 2019)

Región	2015	2016	2017	2018	2019	% Producción mundial
Estados Unidos	14.807	15.413	15.936	16.091	15.778	54%
Brasil	7.200	6.760	6.680	8.010	8.570	30%
Unión Europea	1.380	1.370	1.400	1.430	1.440	5%
China	813	845	860	1.050	900	3%
Canadá	436	436	470	480	500	2%
India	195	275	210	400	530	2%
Tailandia	334	322	370	390	420	1%
Argentina	211	264	290	290	290	1%
Resto del Mundo	391	490	414	549	600	2%
Total	25.767	26.175	26.630	28.690	29.030	100 %

2.1.3 Producción de Bioetanol en Argentina

La producción de bioetanol en Argentina se realiza principalmente de biomásas como la caña de azúcar, y maíz, siendo este biocombustible de **primera generación o 1G**, debido a que estas biomásas se cultivan para suplir necesidades alimentarias y del sector energético. En Argentina hasta el año 2011 se producía bioetanol exclusivamente de caña de azúcar en plantas del Noroeste Argentino, a partir del año 2012 se inició la producción del biocombustible en la provincia de Córdoba y luego en la provincia de Santa Fe (Ramseyer, 2020).

Las principales plantas productoras de bioetanol de maíz son ProMaíz, ACA Bio Cooperativa Ltda en Villa María, Córdoba, planta Vicentín en Avellaneda, Santa Fe, Bioetanol Río Cuarto, en Río Cuarto y la planta Diaser en la ciudad de San Luis, por último se encuentra Maíz Energía con seis pequeñas destilerías en las ciudades de Córdoba, San Luis y Santiago del Estero (Ramseyer, 2020).

Los biocombustibles de **segunda generación o 2G**, a diferencia de los de **primera generación o 1G**, se realizan con materias primas provenientes de residuos de actividades industriales como son mazorca de maíz, cascarilla de arroz, bagazo de caña de azúcar, entre otros (Trigo *et al.*, 2011).

Los biocombustibles de **tercera generación o 3G** se generan a partir de biomasa microalgal, con ayuda de microorganismos modificados genéticamente que permiten la eficiente producción de biocombustibles (King *et al.*, 2010).

En la Tabla 3, se observa la producción de bioetanol (m³) en Argentina durante los años 2017, 2018 y 2019, elaborada por la Secretaria de Energía Argentina (Ministerio de Producción y Trabajo, 2019).

Tabla 3. Producción de bioetanol en Argentina (Ministerio de Producción y Trabajo, 2019)

	2017			2018			2019		
	De caña	De maíz	Total	De caña	De maíz	Total	De caña	De maíz	Total
Enero	37.794	46.551	84.345	33.251	50.443	83.694	30.505	39.815	70.320
Febrero	35.607	44.489	80.096	35.328	45.593	80.921	26.711	41.685	68.396
Marzo	38.696	44.100	82.796	17.968	49.519	67.486			
Abril	35.355	45.218	80.573	24.522	50.537	75.058			
Mayo	44.053	40.222	84.275	38.336	49.606	87.942			
Junio	51.159	41.800	92.959	57.254	49.484	106.737			
Julio	53.924	43.396	97.320	60.456	46.815	107.271			
Agosto	55.711	48.852	104.563	59.362	47.953	107.315			
Septiembre	55.345	47.483	102.828	59.862	46.146	106.009			
Octubre	60.415	50.850	111.265	54.597	48.608	103.205			
Noviembre	48.724	47.841	96.565	49.554	48.981	98.535			
Diciembre	36.361	51.160	87.521	37.673	51.933	89.606			
TOTAL	553.144	551.963	1.105.107	528.162	585.619	1.113.781	57.215	81.500	138.715

2.2 CLASIFICACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La producción de biocombustibles también se puede realizar por materiales lignocelulósicos, como se ha nombrado anteriormente, estos materiales no compiten con las necesidades alimentarias, por lo tanto su costo es menor (Cardona y Sánchez, 2007).

Cardona and Sánchez (2007), propusieron la siguiente clasificación para materias primas lignocelulósicas, en seis grupos:

1. Residuos agrícolas (bagazo de maíz, cascarilla de arroz, paja de trigo)
2. Maderas duras (álamo, chopo)
3. Maderas blandas (pino)
4. Residuos celulósicos (papel de diario, lodos de papeleras)
5. Biomasa herbácea (alfalfa, pasto, limoncillo)
6. Residuos sólidos urbanos

La biomasa lignocelulósica posee como ventaja principal su bajo costo y alta disponibilidad, pero presenta dificultades de accesibilidad para sacarificar carbohidratos que generen azúcares fermentables, por lo tanto es necesario utilizar tecnología combinada de procesos físicos, químicos y biológicos que sean de bajo costo (Lynd *et al.*, 2002).

El mayor componente de estas materias primas es la celulosa, aproximadamente 50%, seguidamente las hemicelulosas con 30% y la lignina 20% (Kucharska *et al.*, 2018). En la Figura 5 se observa la

estructura de la biomasa lignocelulósica, formada principalmente por celulosa, hemicelulosas y lignina (Rubin, 2008).

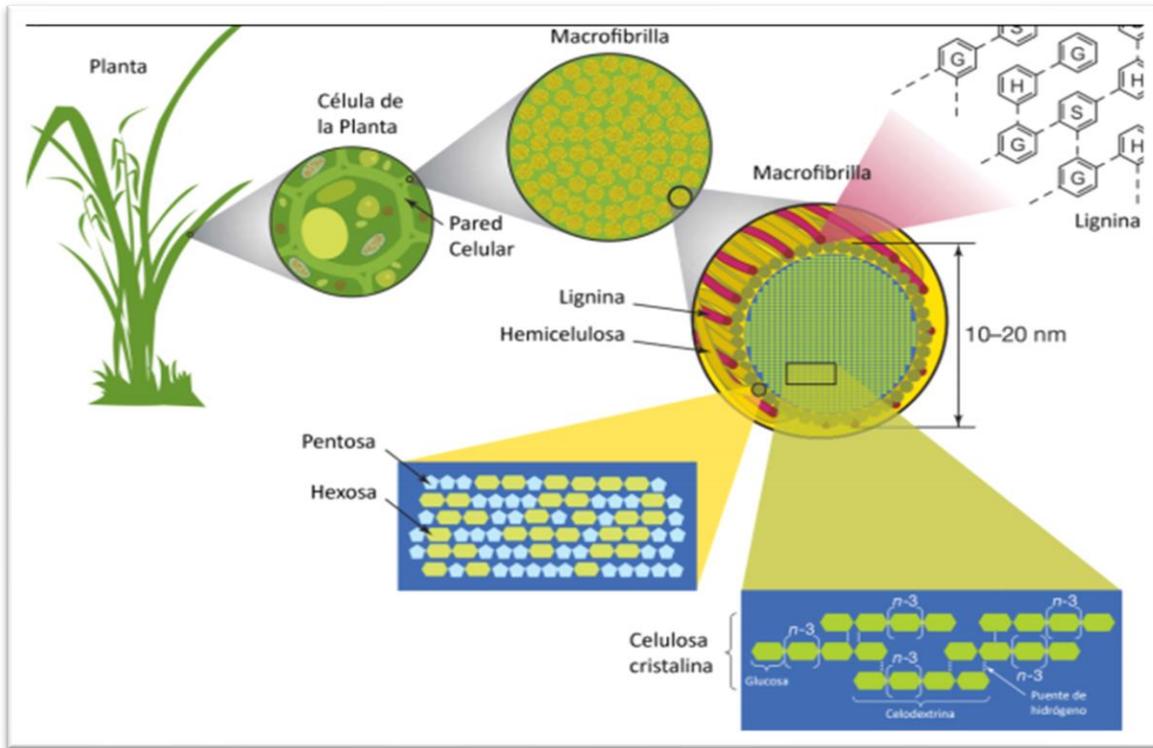


Figura 5. Estructura de la biomasa lignocelulósica (Rubin, 2008)

2.2.1 Celulosa

La celulosa posee una estructura cristalina que dificulta su solubilización en agua y despolimerización. La celulosa se encuentra unida a las hemicelulosas y lignina por medio de enlaces covalentes que forman el complejo lignina-carbohidrato. Este tipo de enlaces genera alto grado de recalcitrancia en la biomasa, dificultando de esta forma la efectividad de procesos posteriores, como son la penetración de líquidos con diferentes reactivos en los pretratamientos y la accesibilidad de las enzimas al sustrato en la hidrólisis enzimática (Himmel *et al.*, 2007; Chen y Qiu, 2010). En la figura 6, se observa la estructura de la celulosa (Laine, 2005).

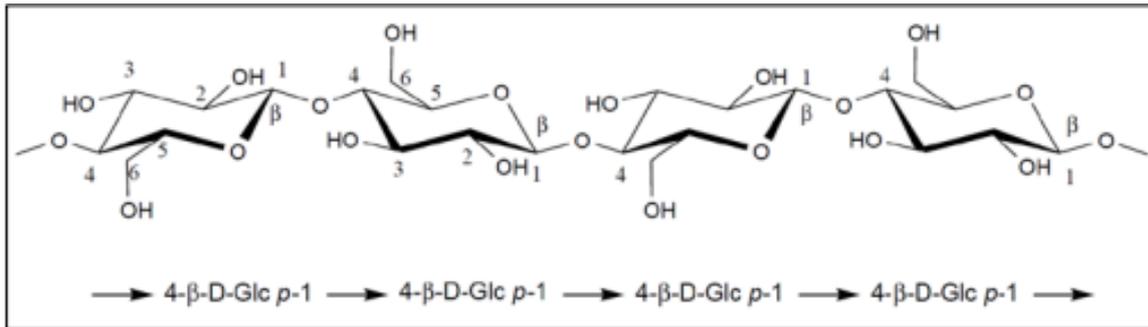


Figura 6. Estructura de la celulosa (Laine, 2005)

2.2.2 Hemicelulosas

Las hemicelulosas son heteropolímeros de azúcares de seis átomos de carbono, como son (glucosa, manosa y galactosa), y de cinco átomos de carbono (xilosa y arabinosa) (Arvidsson *et al.*, 2011). En la Figura 7, se observa la estructura de un tipo de hemicelulosas (Arvidsson *et al.*, 2011).

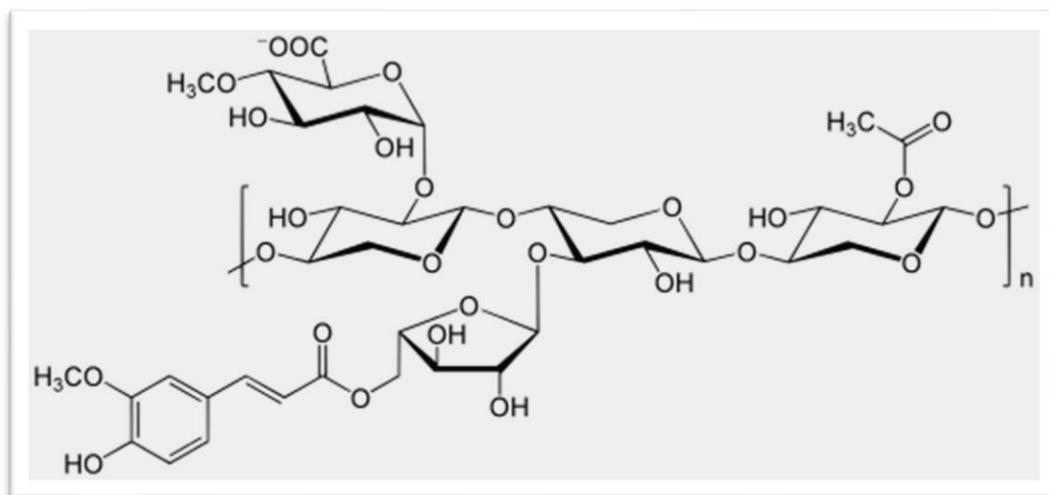


Figura 7. Estructura de las hemicelulosas (molécula de xilano presente en gramíneas), (Scheller y Ulkskov, 2010)

2.2.3 Lignina

La lignina es un polímero aromático complejo, formado por unidades de fenilpropano (Rubin, 2008). En la lignina se distinguen tres tipos de unidades de fenilpropano que son *p*-hidroxifenil propano, guayacil propano y siringil propano, que se presentan en diferentes proporciones de acuerdo con la especie de planta. Las gramíneas, como la planta del arroz, poseen los tres tipos de enlace (Glasser, 2000). En la Figura 8, se observa la estructura de la lignina (Arvidsson *et al.*, 2011).

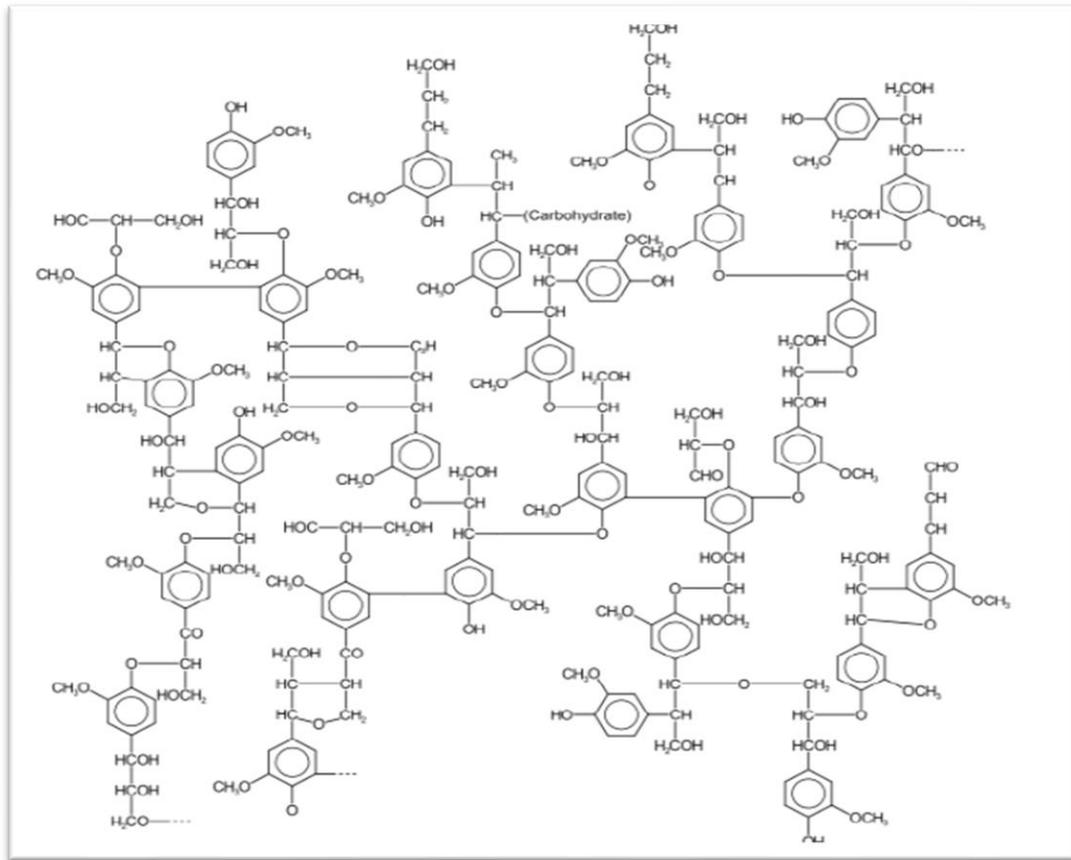


Figura 8. Estructura de lignina presente en gramíneas (Arvidsson *et al.*, 2011)

2.3 APLICACIONES DE LOS COMPONENTES DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

En la Figura 9 se observan algunos potenciales productos de valor agregado que se pueden obtener de los componentes de la biomasa lignocelulósica. La industrialización de estos productos aún se encuentra en estudio, debido a que su desarrollo aún se encuentra en escala de laboratorio y escala piloto (Area y Vallejos, 2012).



Figura 9. Algunos productos que pueden obtenerse a partir de los componentes de la biomasa lignocelulósica (Area y Vallejos, 2012)

Para la obtención de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica, es necesario realizar tres procedimientos que incluyen pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación de azúcares (Kucharska *et al.*, 2018).

2.4 PRETRATAMIENTOS APLICADOS A BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Para realizar el proceso de deslignificación de la materia prima existen varios pretratamientos de naturaleza física, química y biológica, algunos de ellos se presentan a continuación.

2.4.1 PRETRATAMIENTOS FÍSICOS

Trituración Mecánica: El proceso de trituración permite la reducción del tamaño de partícula del material y de esta forma contribuye a reducir la cristalinidad de la celulosa y aumentar la superficie específica y densidad aparente, para facilitar el posterior proceso de hidrólisis. En este proceso se puede utilizar molino de bolas, rodillo, fresado, martillo, etc. (Taherzadeh y Karimi., 2007).

2.4.2 PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS

La finalidad de este pretratamiento es solubilizar la lignina para mejorar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa.

2.4.2.1 Pretratamiento Alcalino: El pretratamiento con NaOH diluido produce un aumento del área superficial interna y la reducción en la cristalinidad, separación de uniones estructurales entre lignina y carbohidratos, y ruptura de la estructura de la lignina. Este proceso consiste en la saponificación de los enlaces ésteres intramoleculares entre los xilanos y otros componentes de las hemicelulosas (Sun y Cheng, 2002). Se considera que este tipo de pretratamiento es más eficaz para remover lignina que

el pretratamiento ácido, se puede operar a menor presión y temperatura durante días (Carvalho *et al.*, 2008).

2.4.2.2 Pretratamiento Ácido: Es uno de los mecanismos más utilizados para solubilizar las hemicelulosas y genera poco efecto sobre la lignina. El pretratamiento puede realizarse con ácidos diluidos o fuertes. Debido a la hidrólisis de las hemicelulosas se generan azúcares y productos de degradación como furfural e hidroximetilfurfural (Saha *et al.*, 2005). En este tipo de pretratamiento se han utilizado reactivos como el ácido sulfúrico, clorhídrico, fosfórico nítrico, ácido oxálico, fórmico y acético (Gómez *et al.*, 2006; Hernández - Salas *et al.*, 2009; Lee y Jeffries, 2011).

2.4.2.3 Pretratamiento Oxidativo: El pretratamiento oxidativo es un proceso que se realiza con sustancias oxidantes como, por ejemplo, el peróxido de hidrógeno. Se realiza con la finalidad de eliminar la lignina y hemicelulosas para aumentar la accesibilidad a la celulosa. Durante el pretratamiento oxidativo se pueden utilizar oxidantes no selectivos que pueden generar remoción de hemicelulosas y lignina y producir compuestos inhibitorios, facilitando la accesibilidad a la celulosa (García-Cubero *et al.*, 2009).

2.4.2.4 Pretratamiento con Ozono: El tratamiento realizado con ozono actúa principalmente sobre la lignina, ya que en ciertas condiciones puede aplicarse sin mayor efecto en las hemicelulosas y celulosa. Posee ventajas como alto rendimiento de deslignificación y no se producen compuestos inhibitorios, pero el proceso es costoso (Sung y Cheng., 2002).

2.5 PRETRATAMIENTO CON ORGANOSOLVENTES

En este proceso se emplean solventes orgánicos o acuosos en presencia de un catalizador ácido (clorhídrico o sulfúrico) que ayudan a romper los enlaces internos entre la lignina y las hemicelulosas. Los solventes más empleados han sido metanol, etanol, acetona, entre otros (Zhao *et al.*, 2009).

2.5.1 PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS

Este tipo de pretratamientos utilizan los organosolventes junto a factores físicos para mejorar la remoción de lignina y hemicelulosas de la biomasa.

2.5.1.1 Explosión por Vapor: La biomasa lignocelulósica se somete a temperaturas entre 190-230°C, con aplicación de vapor durante determinado tiempo y posteriormente el material se somete a una rápida despresurización. Los efectos que ejerce este proceso en la biomasa lignocelulósica son la ruptura de las fibras, despolimerización y rotura de enlaces (Oliva *et al.*, 2003).

2.5.1.2 Explosión de Fibra con Amoníaco (AFEX): Es un proceso similar al de explosión de vapor, pero se utiliza amoníaco líquido a temperaturas entre 60-100°C, seguidamente se somete el material a

una ligera descompresión (Sun y Cheng., 2002). El AFEX remueve lignina, permitiendo disminuir la cristalinidad de la celulosa en la biomasa lignocelulósica (Laureano-Perez *et al.*, 2005). En este tipo de pretratamiento se eliminan los grupos acetilo (desacetilación) contribuyendo a mejorar la posterior digestibilidad de la biomasa.

2.5.1.3 Explosión con CO₂: La explosión con dióxido de carbono forma ácido carbónico lo cual contribuye a mejorar los rendimientos de hidrólisis, ya que contribuye a la remoción de lignina. Se ha demostrado que el proceso es más económico que la explosión con amoníaco, no se generan compuesto inhibitorios y permite el aumento de área superficial de la biomasa, (Schacht *et al.*, 2008).

2.6 PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

2.6.1 Pretratamiento con Microorganismos

Este proceso se lleva a cabo con microorganismos que generan enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, los microorganismos más usados son los hongos de pudrición blanca como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus ostreatus*, *P. chrysosporium*, por ejemplo, produce enzimas lignino y manganeso peroxidasa, las cuales degradan lignina de diferentes materiales lignocelulósicos (Shi *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009). En la Figura 10, se observa el efecto originado por el pretratamiento en la biomasa lignocelulósica (Mosier *et al.*, 2004).

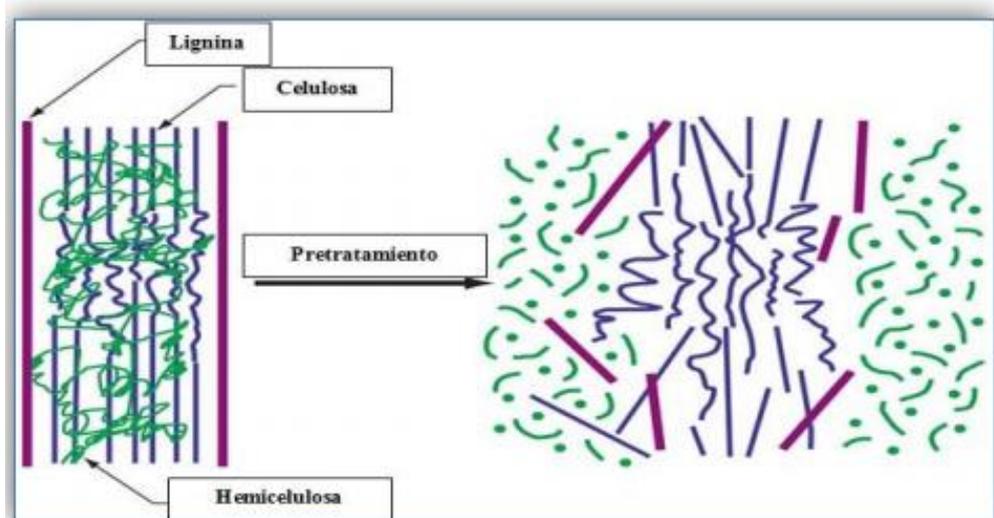


Figura 10. Esquema del efecto originado por el pretratamiento en biomasa lignocelulósica (Mosier *et al.*, 2004)

2.6.2 Compuestos de degradación formados en el pretratamiento

En la etapa de pretratamiento se ha encontrado que se generan algunos compuestos inhibitorios, los cuales están agrupados principalmente en tres clases: ácidos alifáticos, furanos y compuestos fenólicos (Pereira *et al.*, 2011).

Entre estos compuestos inhibitorios se encuentran el **hidroximetilfurfural (HMF)**, el **furfural**, el **ácido acético** y el **ácido fórmico**. El furfural e HMF son formados principalmente por deshidratación de azúcares de cinco y seis átomos de carbono (Klinke *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2011). Estos compuestos se consideran potentes inhibidores de la actividad de la levadura en el proceso de fermentación, en cuanto a su productividad y rendimiento de bioetanol (Modig *et al.*, 2008). Los ácidos alifáticos generados en el pretratamiento, principalmente el ácido acético y el ácido fórmico, se producen por desacetilación de las hemicelulosas.

La presencia de HMF y furfural en bajas concentraciones en un medio con microorganismos en estado de anaerobiosis, puede provocar la reducción de estos compuestos a alcoholes de baja toxicidad para los microorganismos (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000; Oliva *et al.*, 2003; Mussatto y Roberto, 2004). En altas concentraciones los furanos ejercen una actividad inhibitoria del microorganismo, debido a que interfieren con las enzimas glicolíticas y síntesis de macromoléculas provocando la disminución de productividad de etanol (Klinke *et al.*, 2004).

El HMF también genera ácido levulínico, en concentraciones muy bajas. Este tipo de ácido que se encuentra generalmente en el medio en forma no disociada y puede atravesar la membrana de las células, produciendo una disminución del pH intracelular, por lo que esta acción se compensa mediante un bombeo de protones al exterior de la célula por medio de la enzima ATPasa. En ocasiones en que la forma disociada de estos ácidos en el medio es elevada, se supera la cantidad de bombeo de protones, provocando la acidificación del citoplasma y finalmente la muerte celular (Almeida *et al.*, 2007).

Los derivados fenólicos que se generan comúnmente producto de la actividad de la degradación de la lignina son 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído, acetosiringona, ácido vainílico, ácido siríngico, guayacol, alcohol siríngico, 4-hidroxiacetofenona, acetovainillona, acetosiringona, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido cumárico y ácido ferúlico (Klinke *et al.*, 2004). Los compuestos fenólicos afectan la integridad celular provocando reducción en el crecimiento celular y consumo de azúcares (Palmqvist y Hahn-Hägerdal., 2000).

En la continua búsqueda de microorganismos con mayor adaptación a medios con inhibidores, se han utilizado estrategias de ingeniería evolutiva, obteniéndose así beneficios como son mayor crecimiento,

viabilidad, mayor rendimiento y productividad de etanol, por parte de los microorganismos (Nielsen *et al.*, 2015).

Algunas estrategias propuestas por la ingeniería evolutiva de microorganismos consisten en realizar precultivos de microorganismos expuestos a cantidades pequeñas de inhibidores en medios definidos o hidrolizados, y seguidamente se puede ir aumentando la concentración de compuestos inhibitorios en los medios. Esto permite que el microorganismo reaccione de forma positiva ante el estrés producido por la presencia de inhibidores en el medio, la estrategia facilita el crecimiento del microorganismo y el mejoramiento de los rendimientos de fermentación (Nielsen *et al.*, 2015).

2.7 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática es el proceso en que la celulosa y las hemicelulosas se convierten en glucosa y xilosa (Kucharska *et al.*, 2018), mediante la acción sinérgica de varias enzimas. El complejo enzimático que realiza la hidrólisis enzimática de celulosa se compone de tres enzimas que son:

2.7.1 Endoglucanasas o 1,4-β-D-glucano-4-glucanohidrolasas: Realizan la hidrólisis de enlaces β-1,4- glucosídicos. La actividad de escisión al azar por parte de esta enzima permite que se genere una disminución rápida en la longitud de la cadena de celulosa.

2.7.2 Exoglucanasas compuestas por 1,4-β-D-glucano-glucanohidrolasas (celodextrinasas), 1,4-β-D-glucano-celobiohidrolasas (celobiohidrolasas): Remueve las unidades de celobiosa desde los extremos no reductores de las moléculas de celulosa.

2.7.3 β-glucosidasas: Hidroliza la celobiosa y otros β-1,4- oligoglucósidos para producir glucosa (Bansal *et al.*, 2009; Wang y Cheng., 2011; Crespo *et al.*, 2012).

2.7.4 Enzimas hemicelulolíticas: Para la degradación de los xilanos intervienen las siguientes enzimas:

Endo-1,4 β-xilanasas, β-xilosidasas, α-glucuronidasas, α-L-arabinofuranosidasas y acetilxilano, estas enzimas contribuyen a la hidrólisis de los xilanos, mientras que la galactomananasa y glucomanasa sacarifican a los glucomananos (Chin *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2014).

Los factores que afectan el proceso de hidrólisis son: concentración de sustrato, carga de enzima, temperatura y tiempo de sacarificación (Kucharska *et al.*, 2018).

Para mejorar los rendimientos de hidrólisis enzimática se han utilizado tensoactivos, que permiten aumentar la superficie de la celulosa o ayudan a la remoción de la lignina inhibitoria, para contribuir al aumento de la eficiencia del proceso de sacarificación (Kaar y Holtzaple., 1998).

Narra *et al.* (2015) reportan que el uso de 1% de Tween 80 en hidrólisis y fermentación simultánea de paja de arroz, paja de trigo y bagazo contribuyó al aumento del rendimiento de la hidrólisis enzimática en un 13.25%.

Zhu *et al.* (2014), también han reportado que el uso de Tween 20 permitió reducir el dosaje enzimático en el proceso de sacarificación.

2.7.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CELULOSA

En la Figura 11, se observa el mecanismo de acción de la hidrólisis enzimática de la celulosa, por parte del complejo enzimático formado por endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, con la finalidad de obtener glucosa.

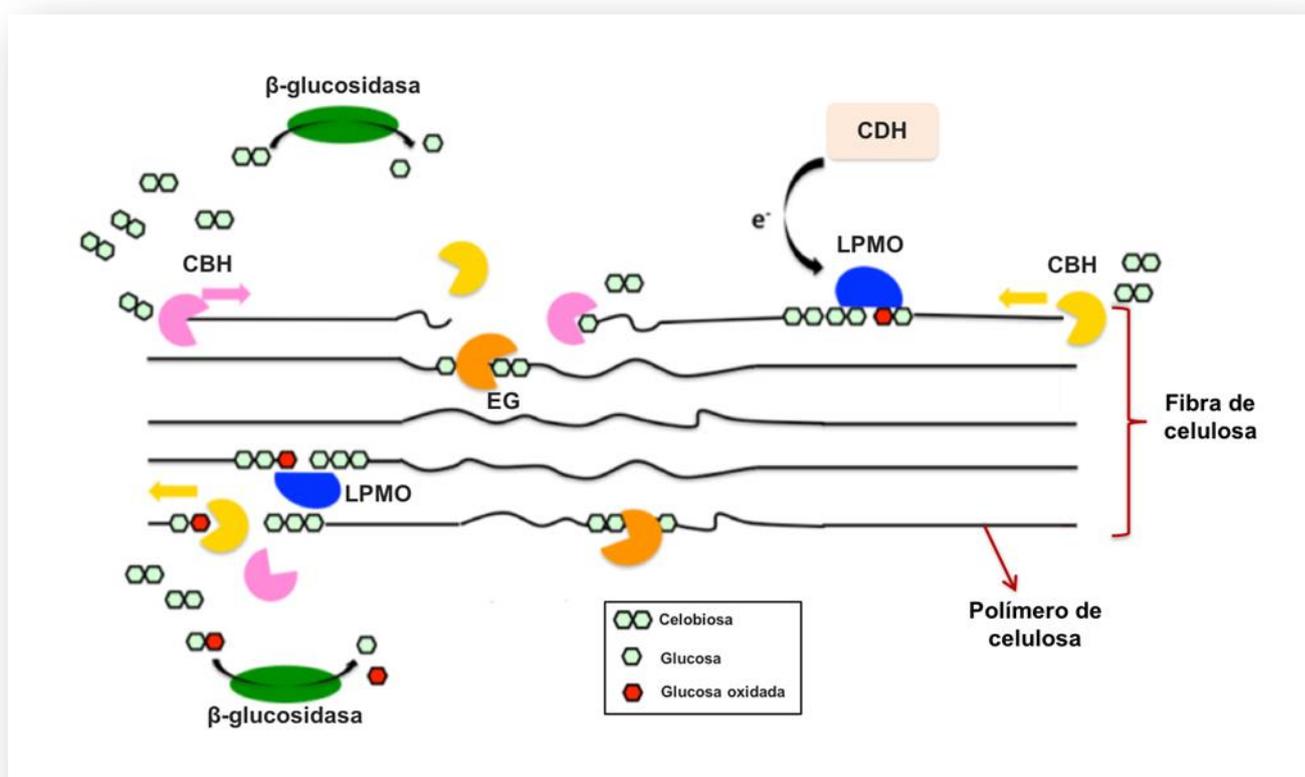


Figura 11. Esquema de degradación enzimática de la fibra de celulosa (*esquema adaptado de Dimarogona et al., 2012*).

La fibra de celulosa se encuentra constituida por cadenas de glucosa. La degradación de la celulosa requiere la acción sinérgica de un complejo enzimático.

Las endoglucanasas (EGs) y monooxigenasas (LPMOs) rompen enlaces internos de la cadena de celulosa para dejar disponibles puntos de acción de las CBHs. Las celobiohidrolasas (CBHs) o exoglucanasas degradan la celulosa desde los extremos para producir moléculas de celobiosa.

Por último, la β -glucosidasa degrada cada molécula de celobiosa para producir dos unidades de glucosa. (Dimarogona *et al.*, 2012).

2.8 PRODUCCIÓN DE CELULASAS

Las enzimas celulasas se producen comúnmente por fermentación sumergida, y algunas por fermentación en estado sólido, (Pandey *et al.*, 2003).

2.8.1 Cultivo Sumergido

Las celulasas son producidas generalmente por los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei* por cultivo sumergido, (Singhania *et al.*, 2010). La fermentación por cultivo sumergido se caracteriza por realizarse en presencia de exceso de agua, la mayoría de enzimas generadas a gran escala se producen por cultivo sumergido, debido a la facilidad y mayor control del manejo del proceso (Cherry y Fidantsef, 2003; Kumar *et al.*, 2004).

El cultivo sumergido es una estrategia para la producción de celulasas que permite controlar parámetros tales como temperatura, agitación, aireación, espuma, pH, etc. (De Bekker *et al.*, 2011).

Esta técnica tiene gran posibilidad de escalamiento a nivel industrial, al permitir controlar la mayoría de los parámetros del proceso (De Bekker *et al.*, 2011), también el producto final obtenido es más puro en comparación con el proceso de fermentación en estado sólido.

2.8.2 Fermentación en Estado Sólido

La fermentación en estado sólido para producción de celulasas permite la producción de enzimas y crecimiento microbiano, con la humedad contenida en el sustrato utilizado, es decir no es necesario la adición de agua al proceso (Pandey, 2003).

La fermentación en estado sólido en este caso es adecuada para hongos filamentosos que pueden ser cultivados en ausencia de agua (Raghavarao *et al.*, 2003), solo con la humedad necesaria para el crecimiento de los hongos (Singhania *et al.*, 2009). Algunos autores propusieron lo siguiente sobre la fermentación en estado sólido.

Holker *et al.* (2004) indicó que su realización disminuye los costos de producción, debido a que reduce el consumo de energía y también permite la obtención de mayores rendimientos de celulasas, en comparación con el cultivo sumergido (Raghavarao *et al.*, 2003; Holker *et al.*, 2004).

Farinas *et al.* (2011), afirmó que las condiciones del sistema, como son preparación del inóculo, pH, temperatura, y humedad pueden afectar positiva o negativamente la producción de enzimas en este proceso.

Chen *et al.* (2013) propusieron que durante la producción de celulasas se dificulta controlar el pH, el cual se ajusta al principio de la fermentación, pero durante el transcurso del proceso fermentativo, no es monitoreado este parámetro. Las fluctuaciones de pH se pueden generar como consecuencia de la formación de ácidos orgánicos, y consumo de sales de amonio por parte de los microorganismos (Ingold y Hudson., 1995).

Para prevenir las fluctuaciones de pH en el proceso, es necesario que el medio utilizado para la fermentación en estado sólido contenga fuentes de nitrógeno, las cuales actúan como amortiguador frente a los cambios de pH, disminuyendo las variaciones de este parámetro (Cen y Xia.,1999; Chen *et al.*, 2013).

La temperatura también es otro factor a tener en cuenta para el desarrollo de la fermentación en estado sólido. En el caso de los hongos es particular para cada especie, por ejemplo, el *P. chrysosporium* se cultiva normalmente a 37°C (Shresta *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010).

Se debe tener en cuenta también en la fermentación en estado sólido que las temperaturas demasiado altas pueden desnaturalizar las enzimas generadas en el proceso, por esta razón hay que encontrar un equilibrio en el proceso, que permita el adecuado crecimiento del hongo y la producción de la enzima (Huang *et al.*, 2010) (Deswal *et al.*, 2011).

En la fermentación en estado sólido se pueden utilizar residuos agroindustriales como sustrato y fuente de carbono y energía para los microorganismos (Philippoussis *et al.*, 2011; Herculano *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*,2013;).

Esta técnica disminuye la contaminación y acumulación de subproductos agrícolas en el medio ambiente (Kumar y Kanwar., 2012), también es una alternativa de utilización para microorganismos como son los hongos filamentosos (Binod *et al.*,2010; Sarkar *et al.*, 2012; Liang *et al.*,2012).

2.8.3 Enzimas Celulolíticas

Los microorganismos utilizados para producción de enzimas celulasas son hongos y bacterias (Rabinovich *et al.*, 2002). En la Tabla 4, se presentan algunos ejemplos de estos microorganismos y la enzima que producen.

Tabla 4. Microorganismos productores de enzimas celulolíticas

Microorganismos	Enzima	Referencia Bibliográfica
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Exoglucanasa</i>	(Shrestha <i>et al.</i> , 2008)
<i>Lentinus edodes</i>	β - glucosidasa	(Mata y Savoie, 1998)
<i>Formitopsis sp</i>	β -glucosidasa	(Deswal <i>et al.</i> , 2011)
<i>Irpex lacteus</i>	<i>Celebiohidrolasa</i> β –glucosidasa	(Xu <i>et al.</i> , 2009)
<i>Pleurotus sajor –caju</i>	β -glucosidasa	(Kumaran <i>et al.</i> , 1997)
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Endo-glucanasa</i>	(Nwodo-Chinedu <i>et al.</i> , 2005)
<i>Paecilomyces thermophila</i>	<i>Celulasas</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 2011)
<i>Fusarium sp.</i>	<i>Endo-glucanasa</i>	(Nwodo-Chinedu <i>et al.</i> , 2005)
<i>T. versicolor</i> , <i>T. trogii</i> ; <i>T. pubescens</i> ; <i>T. hirsute</i> ; <i>T. ochrace</i>	<i>Celulasas</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 2011)
<i>T. reesei</i>	β -glucosidasa	(Broeck <i>et al.</i> , 2001)
<i>Bacillus polymyxa</i>	β -glucosidasa	(Howard <i>et al.</i> ,2003)
<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Celulasa</i>	(Howard <i>et al.</i> ,2003)
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Endo-1, 4-β-xilanasa</i>	(Howard <i>et al.</i> , 2003)
<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>Celulasa</i>	(Yan <i>et al.</i> , 2018)
<i>T. reesei</i>	<i>Celulasa</i>	(Narra <i>et al.</i> , 2016)
<i>A. niger</i>	<i>Celobiasa</i>	(Narra <i>et al.</i> , 2016)
<i>A. terreus</i>	<i>Celulasa</i>	(Narra <i>et al.</i> , 2016)
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Celulasa</i>	(Libardi <i>et al.</i> , 2017)

En la Tabla 5, se pueden observar rendimientos de hidrólisis enzimática en diferentes biomásas.

Tabla 5. Rendimientos de hidrólisis enzimática en diferentes biomásas

Cantidad de Biomasa	Condiciones de operación de hidrólisis enzimática	de Pretratamiento	% Rendimiento Hidrólisis Enzimática	Referencia Bibliográfica
<p>Tallo de planta Jerusalem artichoke (<i>Heliantus tuberosus</i> L). (10% p/v)</p>	<p>30 FPU / g glucano celulasa RUT – C30 de <i>Trichoderma reesei</i>, 7,5 µg pectinasa/ mg sustrato de Pectinex Ultra SP-L Novozymes, 22,5 µg xylanasa/ mg sustrato endo-1, 4-β-xylanasa de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>, Sigma Aldrich. El proceso de HE se realizó a 37°C, durante 40 horas.</p>	<p>10 % p/v de tallos picados de (<i>Heliantus tuberosus</i> L), se suspendieron en una solución (hidroperóxido: ácido acético = 5:5, (v/v), e incubados a 80°C por 3 h. Después de tratados los tallos se lavaron con agua para eliminar residuos de la solución de peróxido.</p>	<p>91,60 % glucosa</p>	<p>(Song <i>et al.</i>, 2016)</p>
<p>Planta <i>Phartenium hysteroporus</i> (5% p/v)</p>	<p>64 FPU/ g biomasa seca de celulasa de Sigma Aldrich. La HE se realizó a 37°C durante 12 horas.</p>	<p>5% p/v de biomasa de la planta <i>Phartenium hysteroporus</i>, fue pretratada con una solución de 0,2 M de hidróxido de sodio durante 3 h a temperatura ambiente, seguidamente se trataron con ácido</p>	<p>61,50 % azúcares reductores</p>	<p>(Tavva <i>et al.</i>, 2016)</p>

			sulfúrico y luego hidróxido de sodio a 121°C en autoclave.		
Residuos de producción algodón (5% p/v)	de 85 mg/ g biomasa seca de celulasa Cellic CTec2. La HE se realizó durante 96 horas a 37°C.	de 0,4 g NaOH/ g biomasa seca a 120°C durante 1 h.		54,40 % glucosa	(Fockink <i>et al.</i> , 2015)
Cascarilla de arroz (2% p/v)	30 FPU/g glucano de celulasa Cellic CTec2. La HE se realizó a 37°C durante 13 horas.	10 % p/v de cascarilla seca, sumergida en solución de NaOH 3% p/v, a 120°C, durante 1 hora en autoclave.		41,16% azúcares reductores	Este trabajo
Rastrojo de maíz (8% p/v)	20 FPU/ g sustrato de celulasa de <i>Trichoderma reesei</i> suplementada con celobiasa en proporción (2 FPU:1 CBU). La HE se realizó a 50°C durante 48 horas.	20 g secos de rastrojo de maíz sumergidos en 200mL con 10% NH4OH y se incubo a 26°C durante 24 h, seguidamente la biomasa se deslignificó con 1 L HCL 0,3 M a 100°C durante 1 hora.		Aproximadamente 50 % de azúcares reductores	(Chen <i>et al.</i> , 2009)

2.9 FERMENTACIÓN

La fermentación alcohólica es un proceso utilizado por el hombre para la producción de bebidas alcohólicas como la cerveza y el vino, entre otras. En el caso de la utilización de biomasa lignocelulósica para producción de bioetanol, los azúcares generados en la hidrólisis enzimática son fermentados por los microorganismos produciendo etanol y CO₂.

El proceso de fermentación se representa mediante la siguiente ecuación estequiométrica:



El rendimiento teórico es 0,511 g etanol/ g hexosa (Area y Vallejos, 2012).

La secuencia comúnmente empleada para la producción de bioetanol lignocelulósico consiste principalmente en la realización de un pretratamiento, hidrólisis enzimática de la celulosa y fermentación de los azúcares sacarificados (SHF), este proceso es denominado hidrólisis seguida de fermentación (Fig. 12).

Este proceso permite realizar la hidrólisis y la fermentación en condiciones óptimas de temperatura y pH. Las enzimas sacarifican a temperaturas alrededor de 50°C, y pH entre 4-5 y la fermentación se puede realizar en el rango de 30°C a 37°C (Jorgensen *et al.*, 2007).

La desventaja que posee este proceso es la acumulación de glucosa y celobiosa en la hidrólisis enzimática, inhibiendo a las celulasas implicadas en el proceso, lo que puede afectar los rendimientos de hidrólisis (Stenberg *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2004).

Pretratamiento de la biomasa

- El pretratamiento remueve lignina y hemicelulosas
- Puede ser mecánico, físico o biológico.

Hidrólisis enzimática

- Se realiza con enzimas celulasas en un rango de temperaturas entre 40°C-50°C.
- Los tiempos son de 48 a 72 h.

Fermentación

- Se realiza con el hidrolizado lignocelulósico obtenido previamente, junto con microorganismos (levaduras), generalmente se usa *Saccharomyces cerevisiae*
- Después de transcurridas 24- 48 horas se obtiene el bioetanol .

Figura 12. Esquema de producción de bioetanol por SHF (Arismendy *et al.*, 2020)

2.9.1 MICROORGANISMOS FERMENTATIVOS

El microorganismo utilizado comúnmente, tanto para el proceso SHF (hidrólisis seguida de fermentación) como para el SSF (hidrólisis y fermentación simultánea) ha sido *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que posee características muy favorables en los procesos fermentativos, al igual que otros microorganismos como *Escherichia coli* y *Pichia stipitis* que fermentan glucosa y pentosas. Para el mejoramiento de los procesos también se ha utilizado otro microorganismo, que es *Kluyveromyces marxianus*, debido a que puede fermentar sustratos como la glucosa, lactosa, inulasa, entre otros, a temperaturas elevadas de hasta 42°C, (Gao *et al.*, 2015; Charoensopharat *et al.*, 2015). Los microorganismos más utilizados y sus características se pueden observar más detalladamente en la Figura 13 (Gírio *et al.*, 2010; Hasunuma y Kondo, 2012).

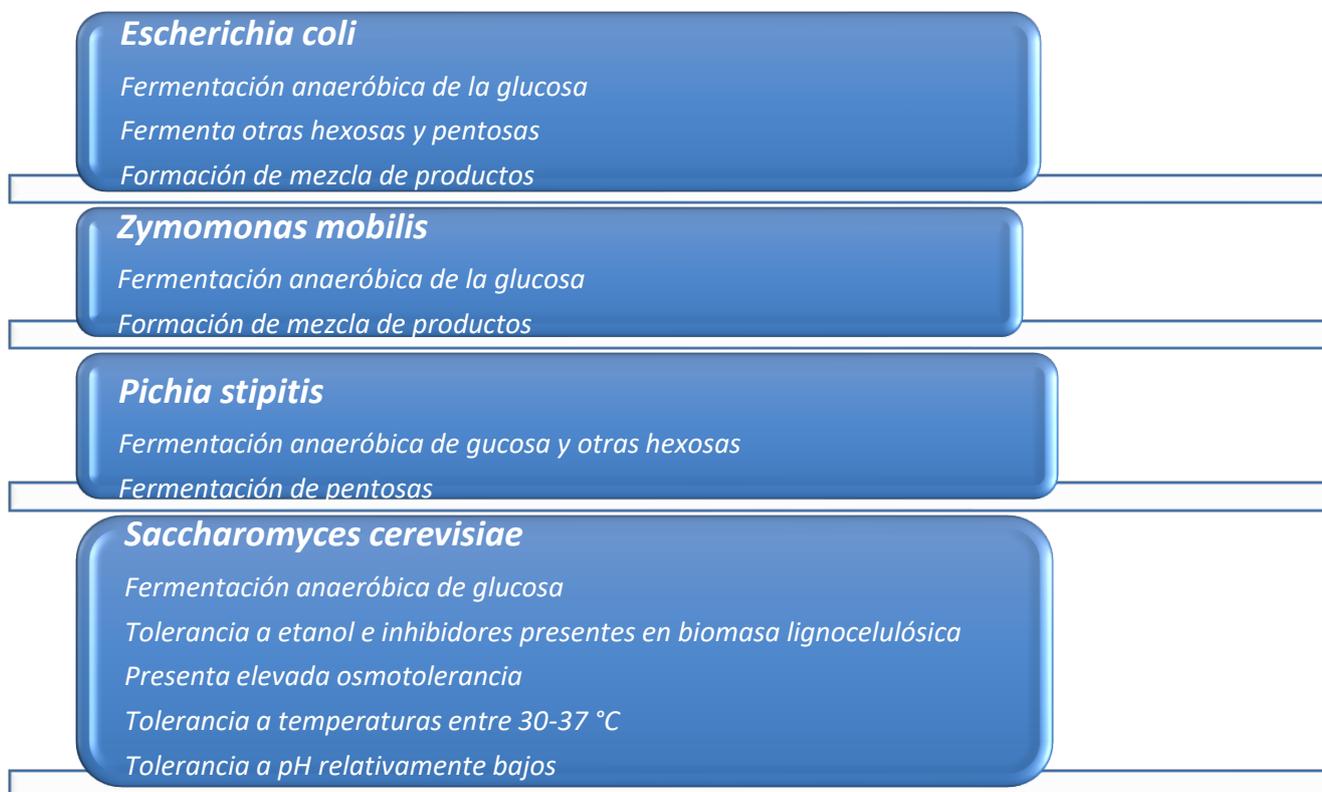


Figura 13. Microorganismos fermentativos y sus características (Gírio *et al.*, 2010; Hasunuma y Kondo, 2012)

2.9.2 HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF)

El SSF es un proceso que permite llevar a cabo la hidrólisis y fermentación en un solo paso (Olofsson *et al.*, 2008). El SSF se caracteriza por la pronta conversión de los azúcares a etanol por parte de los microorganismos, por lo que se previene la inhibición originada por la alta acumulación de azúcares (Viruthagiri y Sasikumar.,2007). El SSF también posee ventajas como reducción de los costos de equipamiento, disminución de riesgo de contaminación y del tiempo en que se desarrolla el proceso en comparación la hidrólisis seguida de fermentación (SHF) (Kang *et al.*,2012).

El SSF puede realizarse también variando algunas partes de su procedimiento con la finalidad de obtener mejores rendimientos, una estrategia para el mejoramiento del proceso simultáneo es el PSSF, en el que se realiza una hidrólisis corta antes de llevar a cabo el SSF, para que los microorganismos obtengan una fuente de carbono para su supervivencia en el lapso en que se generan azúcares en el proceso (Goncalves *et al.*, 2015).

El SSF permite emplear un solo reactor para realizar los procesos y se puede llevar a cabo en corto tiempo.

Se puede observar en la Figura 14 el SSF de la cascarilla de arroz, relacionado con la temática de este trabajo (Arismendy *et al.*, 2020).

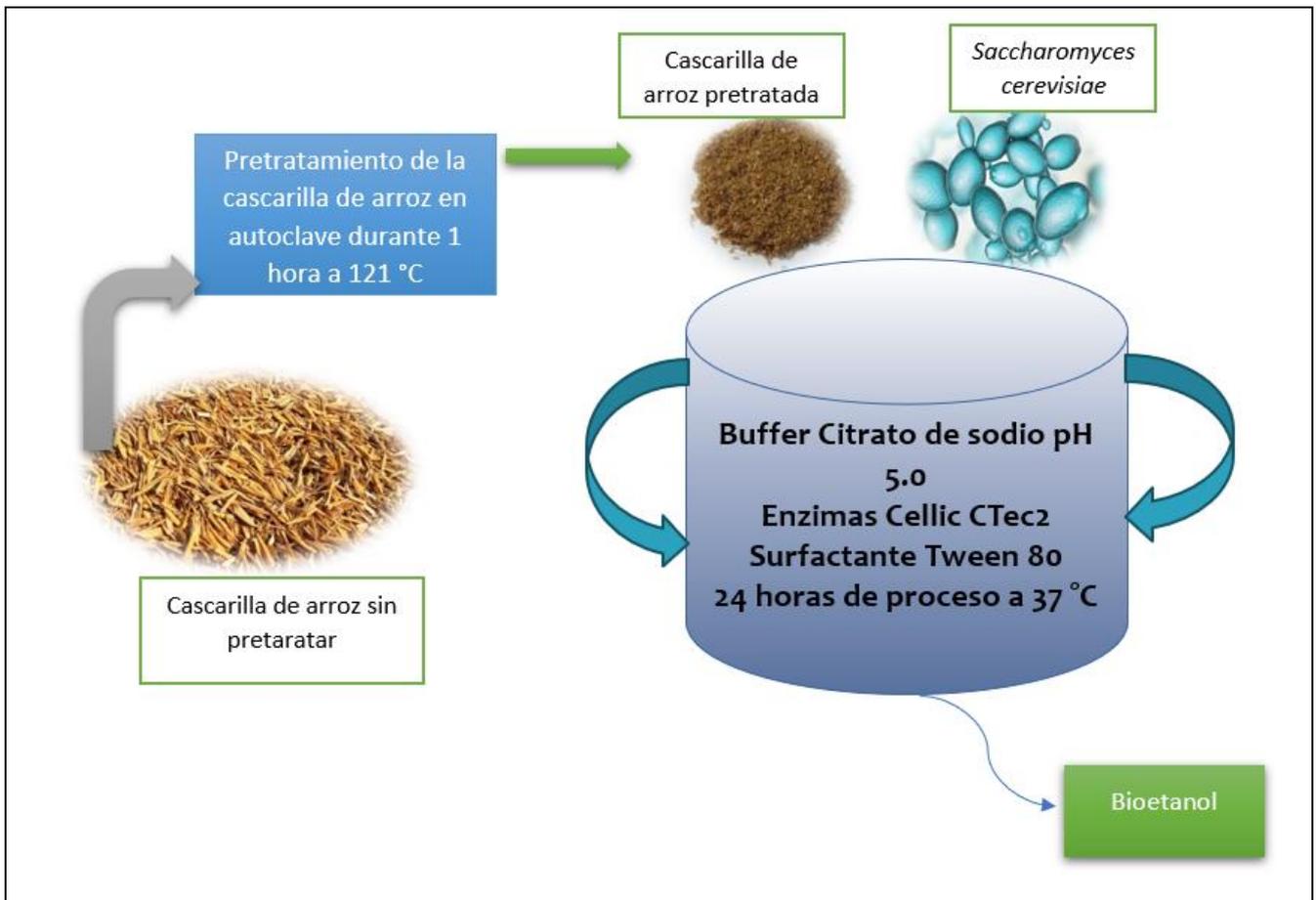


Figura 14. Proceso de hidrólisis y fermentación simultánea (SSF) de la cascarilla de arroz (Arismendy *et al.*, 2020)

En la Tabla 6, se observa la comparación de SSF, SHF y PSSF aplicados a diferentes biomásas lignocelulósicas, como diferentes estrategias para la producción de bioetanol de segunda generación. Se busca obtener un proceso que pueda ser rentable a nivel industrial y amigable con el medio ambiente, debido a que un inconveniente para llevar a escala industrial este proceso ha sido el alto costo que implica la obtención del biocombustible.

Tabla 6. Producción de bioetanol por SSF, SHF y PSSF a partir de diferentes biomásas

Microorganismo	Cantidad de biomasa	Proceso	Pretratamiento	Condiciones de los Procesos	Concentración de etanol obtenido g/L	Referencia
<i>M. circinelloides</i>	Paja de arroz (100 g/L paja pretratada)	SSF	La biomasa se dejó en solución de NaOH 1 M en proporción 80 g secos de paja de arroz/ L NaOH durante la noche luego se pretrató con NaOH en autoclave durante 1 h.	Se utilizó micelasa, celulasa Tamano 4, pectinasa, hemicelulosa, Cellulase Y-NG, Cellulase “Onozuka 3S”, Cellulase “Onozuka R-10 en proporción de 2 g/L proteína. El proceso se realizó a 28°C, pH 5,5 durante 96 h.	30,60	(Takano y Hoshino, 2018)
<i>S. cerevisiae</i>	Paja de arroz (3% p/v glucano de paja pretratada)	SSF	La paja se pretrato en solución acuosa de amoníaco. 20% p/p concentración de amonio, durante 12 h a 70°C.	Se utilizaron celulasas Celluclast 1,5 L y Accellerase 1500, 15 FPU/ g glucano Novozyme 188, 30 CBU de β -glucosidasa/g glucano, a 38°C durante 168 h.	12,70	(Ko <i>et al.</i> , 2009)
<i>Kluyveromyces sp.</i>	Paja de arroz (10% p/v de paja de arroz, paja de trigo y bagazo de caña pretratados)	SSF	50 g secos de paja de arroz, paja de trigo y bagazo de caña, se mezclaron en una solución con H ₂ SO ₄ (4% p/v) a 121°C durante 30 min. Seguidamente para deslignificar la biomasa se colocó en solución de NaOH (0,5% p/v), a 121°C durante 30 min.	Se utilizó celulasa de <i>Aspergillus terreus</i> 9 FPU/ g sustrato suplementada con celulasa de <i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921 y celobiasa de <i>Aspergillus niger</i> durante 72 h a 42°C.	23,22	(Narra <i>et al.</i> , 2015)
					18,29	
					17,91	
<i>Escherichia coli FBR5</i>	Cascarilla de arroz (15% p/v)	SHF	H ₂ SO ₄ (1,0%, v/v), a 140°C.	Se realizó la hidrólisis enzimática con mezcla de tres enzimas, Celluclast, Novozyme 188 y Viscostar 150 L en proporción de 2 g proteína/ 100g paja. Se dejó el proceso durante a 45°C, 72 horas y 39 h de fermentación.	17 g/L	(Saha y Cotta, 2008)
		SSF		9,10 g/L		

				Para el proceso SSF se colocó la biomasa a 35°C durante 122 h.		
<i>Saccharomyces cerevisiae 1507</i>	Cascarilla de arroz (2% p/v)	SSF	NaOH (3% p/v), (10% p/V) de biomasa durante 1 hora a 121°C.	Se emplearon 24 horas de proceso, 16 FPU/ g sustrato a 37°C.	2,10 g/L	Este trabajo
		SHF		En el SHF se emplearon 13 h de HE y 13 de fermentación.	1,80 g/L	
<i>Saccharomyces cerevisiae (Ethanol Red, France)</i>	Paja de trigo (6% p/v)	PSSF	Explosión de vapor a 200°C durante 2,5 min.	Se utilizó Celluclast 1,5 L con una carga enzimática de 15FPU/ g biomasa seca y 15 IU/ g biomasa seca Novozyme 188, 35°C durante 72 h, para la presacarificación se dejaron 16 horas de sacarificado previo al SSF.	6,30 g/L	(De La Torre <i>et al.</i> , 2017)
		SSF			6,10 g/L	
<i>Saccharomyces cerevisiae J672</i>	Paja de trigo (2% p/v)	SHF	2 g de biomasa seca se pretrataron en una mezcla ácido/etanol, en una proporción de 1: 4 (v/v de ácido nítrico-etanol) y luego se llevó a ebullición por 1 h.	Se utilizó 15 FPU/ g biomasa seca de celulasa Cellic CTec3, las condiciones de operación de la fermentación fueron 30°C, durante 24 h.	23,85 g/L	(Brandenburg, 2018)

2.9.3 OTRAS ESTRATEGIAS DE FERMENTACIÓN

2.9.3.1 Inmovilización o encapsulación celular

En el SSF también se utiliza la inmovilización celular, que consiste en formar matrices de geles donde se hallan contenidas las células (Rebros *et al.*, 2005).

La inmovilización se utiliza generalmente en hidrolizados con compuestos tóxicos o procesos con altas temperaturas, para mejorar la tolerancia al estrés celular (Desimone *et al.*, 2002; Talebnia *et al.*, 2005; Pourbafrani *et al.*, 2007).

En contraste a esto, se sugirió que la inmovilización celular genera mayor resistencia a ácidos por ejemplo el ácido acético. La membrana de las cápsulas se forma por gelificación o solidificación de algunos polímeros, por medio de un cambio de temperatura en el caso de geles termorreversibles, mediante productos químicos o iónicos, reticulación o formación de un complejo insoluble.

Las ventajas que puede ofrecer la inmovilización celular es la posibilidad de reutilizar las células, el aumento de absorción del sustrato y el aumento del rendimiento del producto (Kourkoutas *et al.*, 2004).

Las principales desventajas que presenta la encapsulación de microorganismos es la transferencia de masa posible a la cápsula, la biocompatibilidad y la estabilidad mecánica y química de la cubierta de las cápsulas, entre otros factores (Talebnia, 2008).

Los geles han sido utilizados para la encapsulación, especialmente el alginato, debido a su biocompatibilidad, facilidad de formulación y condiciones de gelación suaves (Talebnia, 2008).

El alginato es un copolímero formado por ácido manurónico y ácido gulurónico, dispuestos en secuencias largas que contienen todas las unidades de ácido manurónico, todas las unidades de ácido gulurónico, o bien se ubican de forma alterna (Talebnia, 2008).

En la Figura 15, se observa la estructura del gel al formarse la cápsula (Talebnia, 2008).

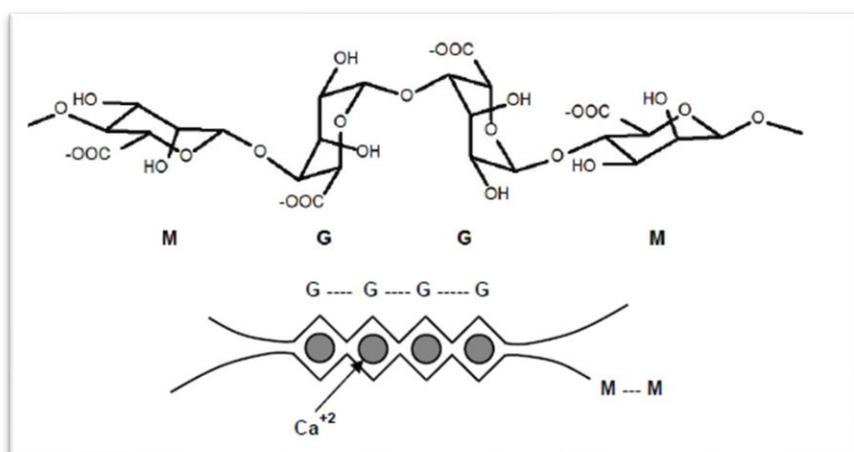


Figura 15. Estructura del gel en la formación de las cápsulas (Talebnia, 2008)

Wirawan *et al.* (2012) realizaron un ensayo utilizando células de *Zymomonas mobilis* encapsuladas. Compararon la inmovilización en alginato de calcio (CA) y alcohol polivinílico (PVA) con los procesos de SSF y SHF utilizando como materia prima residuos agrícolas. Para el caso de rendimiento de células inmovilizadas con CA fue menor la producción con SHF, la mayor concentración de etanol y el rendimiento de etanol fueron de 5,52 g / L y 69,96% respectivamente. Para el caso de SSF, la concentración máxima de etanol y el rendimiento de etanol fueron de 5,53 g / L y 70,09% para las células inmovilizadas de *Z. mobilis* con PVA, y para células inmovilizadas con CA fueron 5,44 g / L y 68,95%, respectivamente (Wirawan *et al.*, 2012).

Marx *et al.* (2014) realizaron un trabajo con bagazo de sorgo dulce, utilizando como microorganismos fermentadores a *Sacharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*. Evaluaron la producción de etanol por separado y en conjunto. Para los hidrolizados de bagazo de sorgo dulce por separado, *Zymomonas mobilis* produjo 7,15 g/L de etanol, para el caso de *Sacharomyces cerevisiae* 6,70 g/L de etanol. La fermentación en conjunto produjo 9,30 g /L de etanol (Marx *et al.*, 2014).

Por otra parte (Watanabe *et al.*, 2012) utilizó células de *Saccharomyces cerevisiae* encapsuladas en matrices de cuentas de resina foto-reticulables en SSF con paja de arroz. Los resultados obtenidos en la investigación mostraron una concentración final de etanol de 38 g/L en fermentaciones de lotes repetidos alimentados con 20% w/w de paja de arroz.

Ylivero *et al.*, (2011) realizó una encapsulación de alginato de calcio-quitosa para evaluar la resistencia de *Saccharomyces cerevisiae* al aumento de temperatura utilizando glucosa para producción de bioetanol. Las perlas se sometieron a 42°C y se obtuvo 0,44 g de bioetanol/ g de glucosa, también fueron reutilizadas para varios cultivos en serie.

2.9.3.2 Consolidado de Bioprocesos (CBP)

Uno de los desafíos actuales es la modificación genética de cepas, para solucionar los inconvenientes que se presentan en los procesos como SSF. La modificación genética busca mejorar el rendimiento de las celulasas y también la calidad de las enzimas, para lograr mejores resultados en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos (Kirk *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2008; Chande *et al.*, 2012).

Estudios recientes afirman que el CBP permite la producción de enzimas, sacarificación y fermentación en una sola etapa, este proceso se ha considerado una gran alternativa para producción de etanol, ya que no se invertiría capital para adquisición de materia primas e insumos para la producción de enzimas (Cardona y Sánchez., 2007; Xu *et al.*, 2009). Estos inconvenientes se han tratado de solucionar a través de la ingeniería de proteínas y utilización de cepas de levaduras termotolerantes (Abdel-Banat *et al.*, 2010).

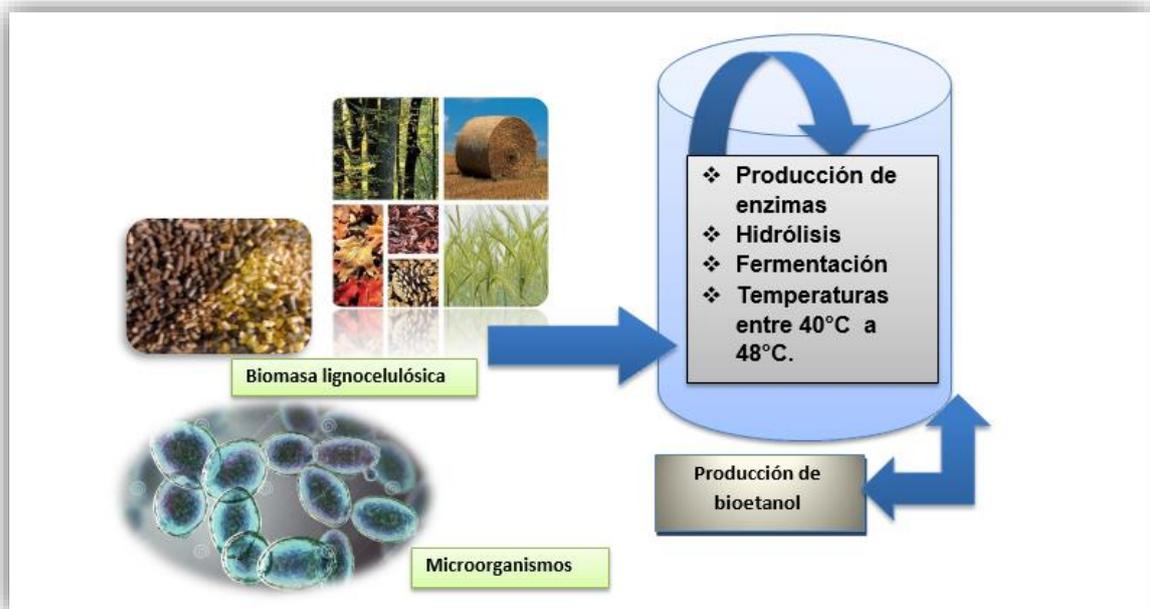


Figura 16. Esquema de producción de bioetanol por CBP (Consolidado de Bioprocesos), (Arismendy *et al.*, 2020)

La levadura que ha sido ampliamente utilizada para fermentaciones ha sido *Saccharomyces cerevisiae* ya que presenta resistencia a pH bajos, altas temperaturas entre otros inhibidores. (Hasunuma y Kondo, 2011; Yamada *et al.*, 2011) desarrollaron una cepa de *S. cerevisiae* recombinante capaz de expresar tres tipos de celulasas que son (EGII, CBHII y BGL1). Por medio de la integración simultánea de expresiones génicas, esta cepa recombinante produjo 3,10 g/L de etanol a partir de 20 g de biomasa (Yamada *et al.*, 2011).

Hasunuma y Kondo, 2011; Sakamoto *et al.* (2011) desarrollaron también una cepa con genes de *T. reesei*, *Aspergillus oryzae* y *A. aculeatus*, para expresar β -xilosidasa y BGL1, esta cepa fue capaz de producir 8,20 g/L de etanol a partir de una mezcla hemicelulósica de paja de arroz, estos son algunos ejemplos, de trabajos de algunos autores con miras a mejorar las estrategias de aprovechamiento de biomasa y perfeccionamiento del proceso de producción de biocombustibles de segunda generación.

CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ENSAYOS PRELIMINARES DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON SISTEMA DE CELULAS LIBRES E INMOVILIZADAS

Se realizaron ensayos preliminares de hidrólisis y fermentación simultánea (SSF) con sistema de células libres a 32°C y 35°, la finalidad de evaluar la producción de bioetanol a dos temperaturas, teniendo en cuenta que el objetivo es lograr el aumento de temperatura en los procesos. También se realizaron experiencias mediante SSF utilizando células inmovilizadas. Estas experiencias preliminares se desarrollaron en el Centro de Investigación QUIMOBIO UTN, Resistencia.

3.1.1. Materia prima, microorganismos y enzimas

La cascarilla de arroz de la variedad *epagri*, fue provista por productores locales (Chaco, Argentina). La cascarilla se sometió inicialmente a un tratamiento mecánico, pasándola por un molinillo para disminuir el tamaño de partícula (< 10 mm).

Se utilizaron enzimas comerciales provistas por Sigma-Aldrich, celulasas de *Trichoderma reesei* y celobiasas de *Aspergillus niger*.

Las cepas de *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis* y *Candida guilliermondii* fueron donadas por el cepario de hongos y levaduras del Hospital Malbrán, situado en la ciudad de Buenos Aires, Argentina.

3.1.2. Caracterización de la materia prima y productos de reacción

Las muestras del material (cascarilla de arroz) pretratado con una secuencia ácido-alcalina, según se describe posteriormente, se tomaron y prepararon según lo propuesto en la técnica NREL/TP-510-42620 “Preparación de muestras para análisis de composición” (Hammes *et al.*, 2005). El contenido de sólidos totales y humedad fue evaluado según NREL/TP-510-42621 (Sluiter *et al.* 2008), utilizando el método de horno a convección, contenido de sustancias extractivas en agua y etanol según protocolo optimizado de la norma (NREL/TP 510-42621) (Sluiter *et al.*, 2008). La determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa se llevó a cabo según el procedimiento NREL/TP-510-42618 (Sluiter *et al.*, 2008), por último, la determinación de inorgánicos se realizó bajo el procedimiento de la norma NREL/TP-510-42622 (Sluiter *et al.*, 2005) (Figs. 17 y 18).

Las ecuaciones utilizadas para la caracterización de la biomasa son las siguientes:

% Humedad

$$= \frac{(\text{peso de la muestra seca} - \text{peso de la cápsula seca})}{\text{Peso de la muestra húmeda}} * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

ODW (Biomasa seca)

$$= \frac{(\text{Peso del cartucho con muestra} - \text{peso del cartucho}) * \% \text{ Total de sólidos de la muestra}}{100} \quad \text{Ec. 2}$$

% Extractivos

$$= \frac{(\text{Peso del matraz con extractivos} - \text{Peso del matraz})}{\text{ODW de la muestra}} * 100 \quad \text{Ec. 3}$$

% Azúcares libres de extractivos

$$= \frac{C \text{ anhidro} * V \text{ filtrado} * 1 \text{ g}/1000}{\text{ODW de la muestra}} * 100 \quad \text{Ec. 4}$$

C anhidro: Corrección que se le realiza a los azúcares, en el caso de la glucosa, galactosa y manosa se multiplica la cantidad cuantificada por 0,9 y en el caso de la xilosa y arabinosa se multiplica por 0,88.

V filtrado: Volumen utilizado de la filtración 87 mL.

% Lignina ácido insoluble

$$= \frac{(\text{Peso crisol con residuo filtrado} - \text{Peso crisol})}{\text{Peso del filtrado húmedo}} * 100 \quad \text{Ec. 5}$$

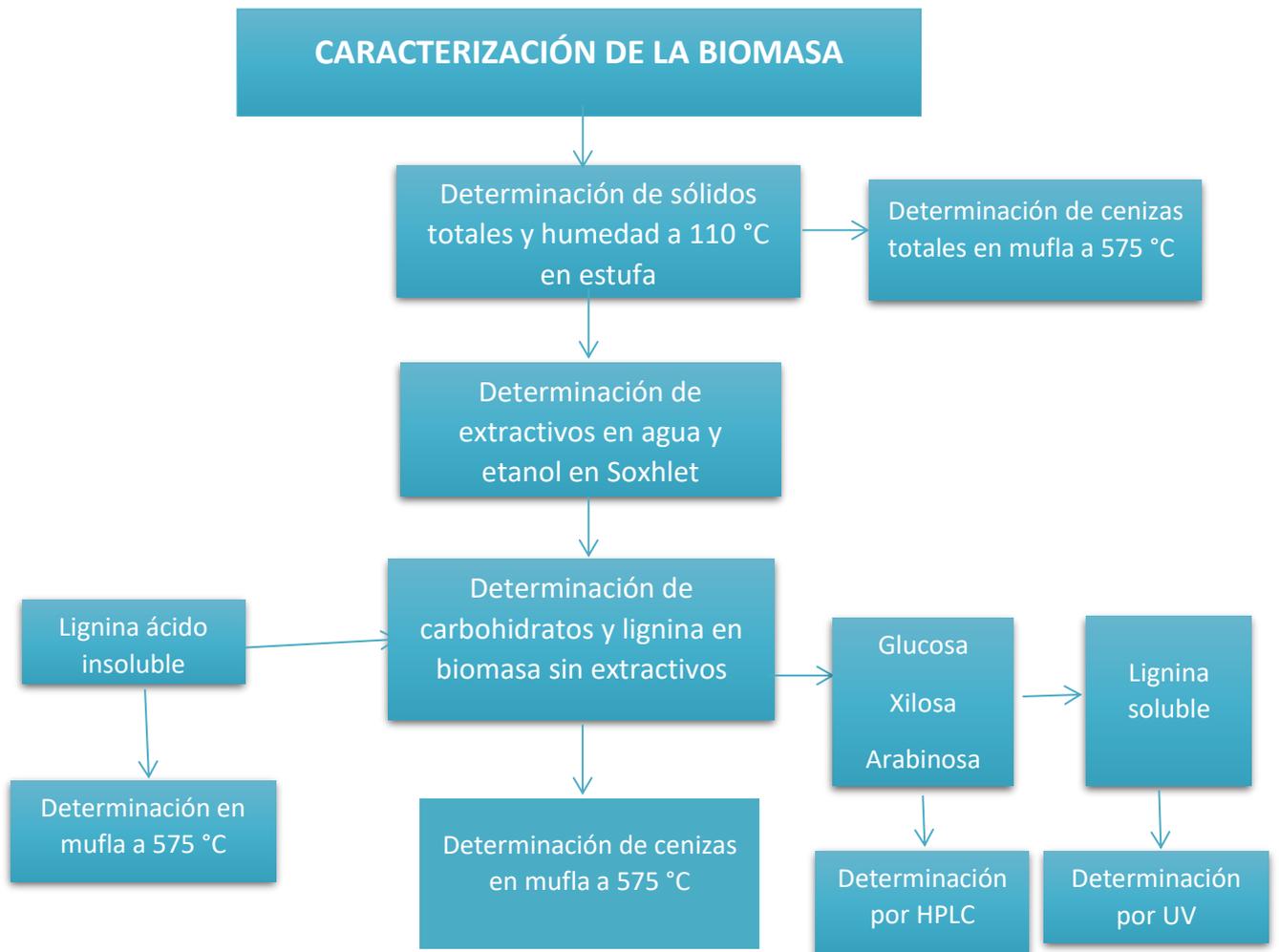


Figura 17. Esquema experimental de caracterización de biomasa.



a



b



c

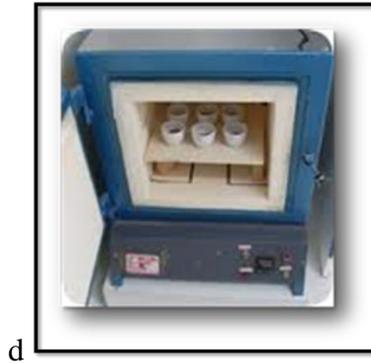


Figura 18. Equipamiento utilizado para realizar caracterización de la cascarilla de arroz a) Estufa para realizar determinación de humedad, b) Equipo Soxhlet para determinación de extractivos de la biomasa, c) Manta calefactora para determinación de carbohidratos y lignina, d) Mufla para determinación de inorgánicos contenidos en la cascarilla.

3.1.3. Determinación de la actividad enzimática

Las enzimas (celulasas y celobiasas) fueron caracterizadas mediante la determinación de su actividad enzimática (Unidades de Papel de Filtro) siguiendo el procedimiento detallado por IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (Ghose,1987). La actividad enzimática se define como FPU/mL que es la capacidad de la enzima para sacarificar 2,0 mg de glucosa en papel de filtro, durante 1 h a 50°C.

La ecuación utilizada para la determinación de FPU es la siguiente:

$$FPU = \frac{0.37}{\text{Conc. enzima para producir 2,0 mg glucosa}} \quad \text{Ec. 6}$$

FPU: Unidades de papel de filtro FPU/mL

3.1.4. Caracterización de los microorganismos

Para verificar el tipo de las levaduras utilizadas se realizaron repiques en medio CHROMagar, el cual genera un viraje de color específico para cada tipo de levadura.

3.1.5. Tratamientos de la materia prima

La cascarilla de arroz fue pretratada, para la remoción de hemicelulosa y lignina, con solución de ácido sulfúrico diluido según los protocolos optimizados en el Centro QUIMOBÍ (Dagnino *et al.*, 2013) y luego con hidróxido de sodio y antraquinona (Figs. 19 y 20).

El procedimiento alcalino se realizó con una solución de hidróxido de sodio al 10% en base seca de sólido, catalizado con antraquinona 0,1%, manteniendo una proporción de 10% sólido-licor. La mezcla sólido-licor fue colocada en un reactor construido en acero inoxidable AISI 316 de 180 mL. El mismo fue calentado en un baño de silicona termorresistente hasta una temperatura de 160°C. El tiempo de reacción fue de 60 min y alrededor de 25 min fueron necesarios para alcanzar la temperatura de operación. Finalizada la reacción, el reactor se colocó en agua fría y se separó la mezcla por filtración. El material sólido fue lavado con agua destilada repetidas veces hasta la eliminación completa del licor.



a



b

Figura 19. Reactores para realizar pretratamiento de remoción de hemicelulosas y lignina, a) reactor para remoción de hemicelulosas, b) reactor para remoción de lignina

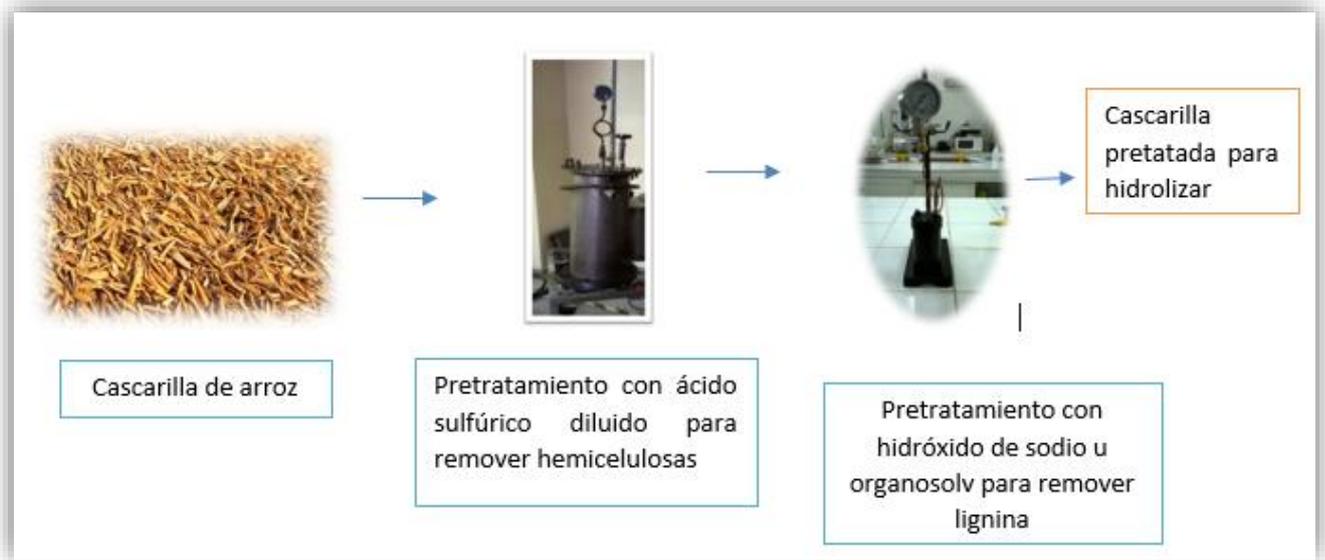


Figura 20. Esquema experimental de la secuencia de pretratamientos realizada a la biomasa

3.1.6. Hidrólisis y fermentación simultánea con sistema de células libres

Las cepas de levaduras donadas por el Hospital Malbrán de la ciudad de Buenos Aires, fueron conservadas en glicerol 30% (p/v) y agua destilada a temperatura de -20°C aproximadamente en la colección de microorganismos del Departamento de Micología del Centro de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste de la ciudad de Resistencia, para la realización de las fermentaciones nos facilitaron viales con células de levaduras en solución salina 0,9% (p/v) NaCl o en glicerol 30% (p/v).

Las cepas de levaduras (*S. cerevisiae*, *C. kefir*, *C. tropicalis* y *C. guilliermondii*) fueron activadas al ser sembradas por método masivo, en medio YPD sólido marca Merck y Britania compuesto por extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 20 g/L y agar 10 g/L, como indica la norma NREL (510-42630) (Dowe y McMillan., 2008) y fueron incubadas a 30°C por 48 h. Seguidamente los microorganismos fueron transferidas a medio líquido YPD al cual se le agregaron las siguientes sales: cloruro de amonio, sulfato de magnesio heptahidratado y fosfato de potasio; todas se agregaron en concentración de 10 g/L.

Los inóculos se realizaron preparando en frascos Erlenmeyers de 100 mL suspensiones celulares de ~ 40 mL, de las cuales se extrajeron 10 mL o 20 mL (en el caso de fermentaciones con volumen de 200 mL) del medio de cultivo y fueron incubados a 30°C , por 24h, en agitación de vaivén 130 vaivenes/min. La densidad celular del inóculo fue de $\sim 10 \times 10^7$ células/mL.

Ensayo 1: El volumen de trabajo utilizado fue de 200 mL en erlenmeyers de 250 mL, compuesto por buffer ácido cítrico (0,1 M, pH 4,8) (500 mL/L); Tween 80, 0,1 g/L; azida de sodio 20 g/L (como antibiótico para prevenir la contaminación bacteriana); cascarilla de arroz pretratada previamente con ácido-álcali 2% (p/v) (20 g/L); celulasas (40 FPU/ glucano) (5.330 µL/L), celobiasas (530 µL/L) y agua destilada para completar el volumen utilizado.

Los frascos erlenmeyers de 250 mL, se sembraron con una 10% (v/v) de inóculo, posteriormente se colocaron en un baño termostático a 32°C con agitación de vaivén (130 vaivenes/min), durante 48 h. Se tomaron muestras en función del tiempo.

Ensayo 2: Se realizó también un ensayo preliminar de SSF a 35°C. El medio de trabajo utilizado estaba compuesto por 100 mL, y 1% (p/v) (10 g/L) de cascarilla de arroz pretratada con ácido álcali. Las condiciones de trabajo fueron las mismas que las del ensayo anterior. Debido a que el aumento de temperatura podría enlentecer la producción de bioetanol por parte de los microorganismos, se optó por dejar los ensayos durante 10 días. Transcurridos 4 días se tomó una muestra de cada ensayo para realizar un seguimiento del proceso antes de los 10 días y observar el funcionamiento de la hidrólisis y la fermentación.

Ensayo 3: Finalmente se realizó un tercer ensayo de SSF a 35°C, con 2% (p/v) de sustrato, y agitación orbital utilizando manta calefactora a 130 rpm e introduciendo un agitador dentro de los tubos en los cuales se colocó el medio. Las condiciones de trabajo fueron las mismas que las utilizadas en las experiencias anteriores y el tiempo de fermentación de 3 días.

Para cada experiencia se desarrolló un ensayo con cada una de las levaduras y un blanco que contenía el medio de trabajo, pero sin el agregado del inóculo.

3.1.7. Determinación de etanol

Para calcular el porcentaje de rendimiento de etanol, se cuantificaron por HPLC los gramos de etanol producidos (g de etanol medidos). Se utilizó el valor de la glucosa teórica obtenida de la caracterización de la cascarilla de arroz para calcular los gramos teóricos de alcohol (gramos de etanol teóricos).

$$\% \text{ Rendimiento de etanol} = \frac{\text{g de etanol medidos}}{\text{g de etanol teóricos}} * 100 \quad \text{Ec. 7}$$

3.1.8. Hidrólisis y fermentación simultánea utilizando células inmovilizadas

3.1.8.1. Inmovilización de las células de levaduras

La inmovilización de células se propuso inicialmente con el objetivo de realizar el proceso a 40°C, debido a que los microorganismos y las enzimas en el proceso simultáneo no funcionan a la misma temperatura, la encapsulación se utilizaría como alternativa que permitiría a los microorganismos soportar el estrés causado por el aumento de temperaturas (Nikolic *et al.*, 2012).

Las levaduras *S. cerevisiae* y *C. kefir* fueron cultivadas en medio sólido YPD, e incubadas durante 48 h a 32°C. Seguidamente, las levaduras se sembraron en caldo YPD con el agregado de sales, según se describió anteriormente (ítem 3.1.6). La concentración inicial de células en el medio fue de $\sim 10 \times 10^7$ células/mL, determinada en cámara de Neubauer, mediante diluciones seriadas de cloruro de sodio 0,90% (p/v) (Herrera, 2013; Martínez y Quintero, 2013; Cacia *et al.*, 2018). El cultivo se incubó a 30°C, durante 24 h con agitación de vaivén.

Se prepararon 240 mL de una solución de alginato de sodio al 2% (p/p), y para la encapsulación de cada microorganismo se emplearon ~ 50 mL de la solución.

Posteriormente el cultivo de levadura se agregó a la solución de alginato de sodio. Se tomaron 10 mL de dicha suspensión celular y seguidamente con un gotero plástico de 3 mL, se tomaron alícuotas y se agregaron a una solución de CaCl₂, 2,65% (p/v). Al gotear la suspensión celular en la solución de CaCl₂, se formaban esferas con los microorganismos retenidos en la matriz polimérica. Se tomó una esfera de alginato de sodio, se agregó a solución salina y se determinó la cantidad de células, presentando una densidad de $\sim 48 \times 10^6$ células/ mL (Fig 21).

Las cápsulas de microorganismos se dejaron en la solución de CaCl₂ durante 12 h y se repitió el ensayo durante 24 h, a temperatura de 4°C, para evaluar si la exposición a la solución de cloruro de calcio aumentaba la resistencia a ruptura de la membrana de alginato de sodio donde se encontraban los microorganismos (Nikolic *et al.*, 2012).

3.1.8.2. Hidrólisis y fermentación simultánea

Se realizó un ensayo preliminar de SSF, con los microorganismos encapsulados, a 32°C, en un volumen de trabajo de 100 mL.

El medio fue conformado por 500 mL/L de buffer citrato de sodio, cascarilla pretratada en una secuencia ácido-alcalina, (2% p/v) 20 g/L y agua destilada. El medio se inóculo con una concentración del 10% (v/v), que fue el volumen correspondiente a las células encapsuladas previamente. Se continuó utilizando un dosaje enzimático de 40 FPU/g glucano de celulasas (5,333 μ L/L) suplementada con

celobiasa (533 $\mu\text{L/L}$). Se realizó el ensayo con los microorganismos encapsulados, que se dejaron a 12 y 24 h de exposición en cloruro de calcio.

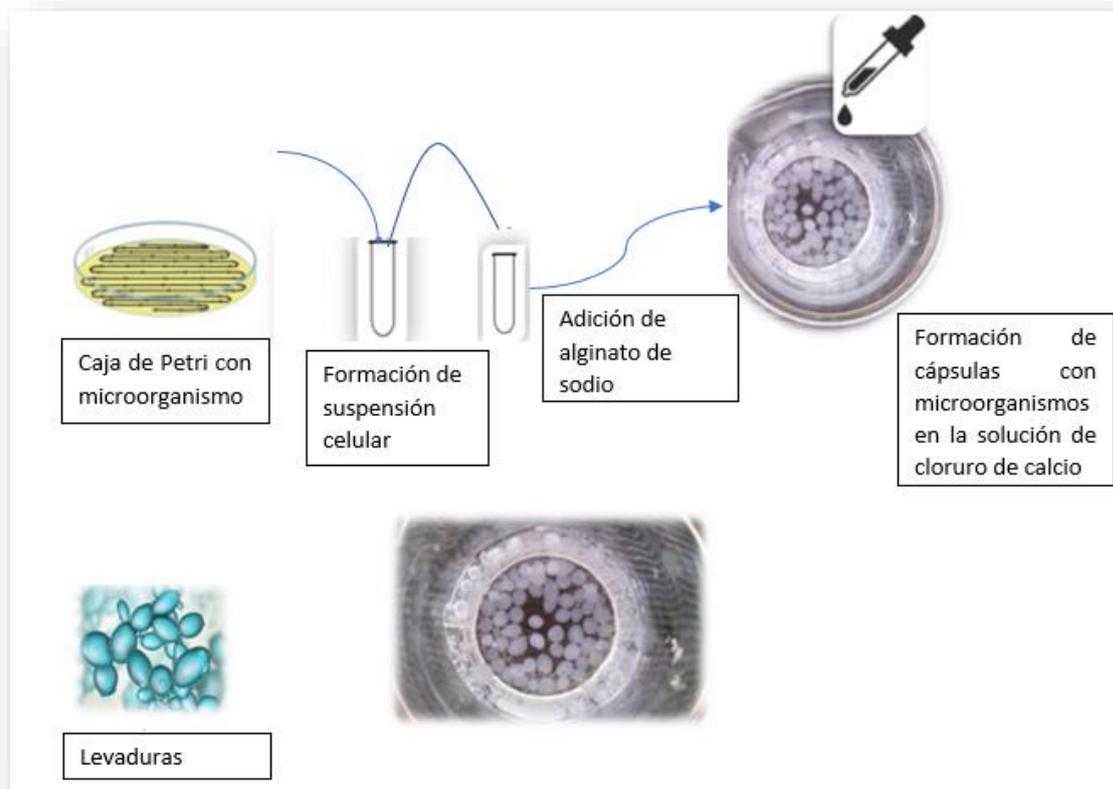


Figura 21. Esquema experimental de formación de cápsulas de los microorganismos en alginato de calcio.



Figura 22. Agitador de vaivén para hidrólisis y fermentación (SSF).

3.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CASCARILLA DE ARROZ

Se realizó un ensayo de hidrólisis de la cascarilla de arroz con las enzimas Cellic CTec2 donadas por Novozymes Brasil, debido a que se observó en las determinaciones enzimáticas anteriores que las celulasas de *T. reesei* disminuían su actividad enzimática rápidamente. Este ensayo se realizó para evaluar los rendimientos de hidrólisis con estas nuevas enzimas, se optó por evaluar el dosaje enzimático de 20 FPU/g glucano aumentando la cantidad de biomasa a hidrolizar. En las experiencias anteriores se utilizó 2% (p/v) (20 g/L) y en este caso se evaluó aumentar a 4% (p/v) (40 g/L).

Se utilizó cascarilla pretratada con secuencia ácido-alcalina, según el procedimiento descrito anteriormente y con secuencia ácido-organosolv,

El medio para la hidrólisis estaba compuesto por buffer citrato de sodio (pH 4,8), 500 mL/L; Tween 80, 0,1 g/L; azida de sodio, 20 g/L; enzimas Cellic CTec2 200 µL/L (20 FPU/ g glucano); cascarilla pretratada, 4% (p/v) (40 g/L), el volumen se completó con agua destilada.

Los ensayos de hidrólisis se realizaron con agitación orbital utilizando una manta calefactora a 130 rpm y 35°C. Se realizaron muestreos durante las 72 h que se operó el ensayo.

La determinación enzimática se realizó según protocolo de la IUPAC, como se describió anteriormente con las enzimas celulasas de *T. reesei*, de Sigma Aldrich.

3.2.1 Tratamiento ácido- alcalino y ácido- organosolv

En este ensayo la cascarilla fue pretratada con secuencia ácido-alcalina, en el que se especificaron las condiciones de trabajo en los ensayos nombrados anteriormente. Se incorporó el pretratamiento organosolv que se optimizó en el año 2016 en Centro QUIMOBÍ, que consiste en colocar la biomasa en un reactor con presión autogenerada a temperatura de 170°C durante 1 h con una mezcla de etanol y agua, utilizando en este caso el hidróxido de sodio como catalizador. Esto se realizó para observar cómo funciona la hidrólisis enzimática con 20 FPU/g glucano y 4% (p/v) de sólidos en estos dos pretratamientos, con la finalidad de reducir el dosaje enzimático y aumentar la cantidad de sólidos a hidrolizar.

3.2.2 Métodos Analíticos

La cuantificación de bioetanol y azúcares producidos en los procesos se realizó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (Waters HPLC System), con una columna Aminex-HPX87H (BIO-RAD) con las siguientes condiciones cromatográficas: H₂SO₄ 4 mM como eluyente, 0,6mL/min, 35°C y detectores de índice de refracción y arreglo de diodos. También se realizó determinación de bioetanol por cromatografía de gases. La Figura 19, muestra el cromatograma de calibración donde

se observa aparición del patrón interno utilizado que es la metilbutilcetona en 1,19 minutos y la aparición de etanol en 1,72 minutos, también se observa la curva de calibración que se realizó con diferentes concentraciones de etanol.

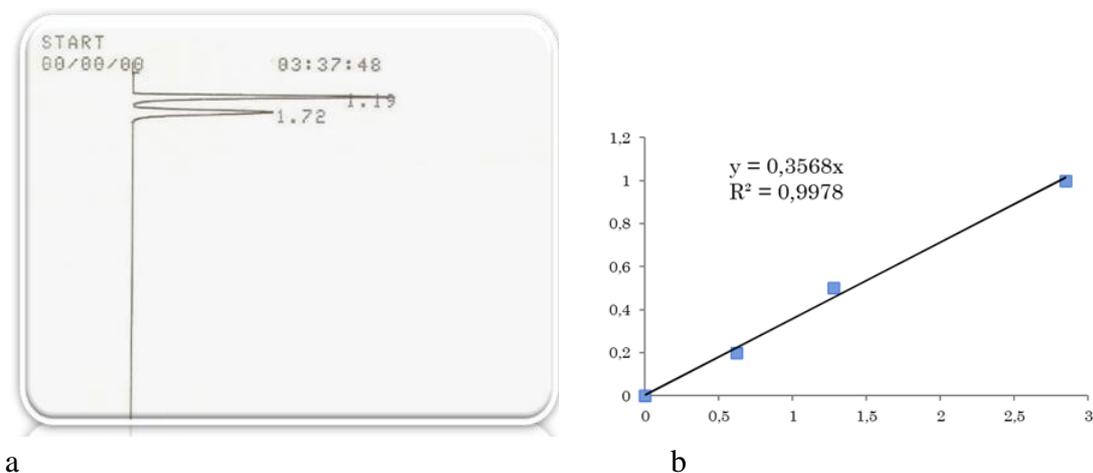


Figura 23. a) Cromatograma de determinación de etanol, donde se observan los picos del estándar interno utilizado (metilbutilcetona) y etanol. La metilbutilcetona se presenta a los 1,19 min y el etanol a los 1,72 min. b) Curva de calibración para la determinación de etanol.

En el caso del ensayo de hidrólisis enzimática con cascarilla pretratada con hidróxido de sodio y organosolv, el ensayo se operó durante 72 horas con muestreos cada 8 horas y las muestras se analizaron con el método colorimétrico de ácido dinitrosalicílico para determinación de glucosa obtenida en la sacarificación, según método optimizado por la IUPAC.

Los cálculos de la hidrólisis enzimática se realizaron utilizando las siguientes ecuaciones:

Concentración de glucosa g/L

$$= \frac{(g \text{ cascarilla secos} * 0,75)}{0,9} * 100 \quad \text{Ec. 8}$$

Concentración de glucosa g/L

$$= \frac{(g \text{ cascarilla secos} * 0,80)}{0,9} * 100 \quad \text{Ec. 9}$$

% Rendimiento de glucosa

$$= \frac{(g \text{ azúcares obtenidos})}{(g \text{ glucosa teórica})} * 100 \quad \text{Ec. 10}$$

Donde: 0,75 y 0,80 es la cantidad de celulosa en el material (hidróxido de sodio u organosolv) que fue previamente determinada por HPLC (en la caracterización de la cascarilla) y 0,9 es el factor de hidrólisis.

3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Los ensayos de optimización de la hidrólisis enzimática se realizaron en el Laboratorio del Grupo de Investigación Biotransformación de la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

3.3.1. Materias primas e insumos

La cascarilla de arroz fue provista por la Central Mayorista de la ciudad de Medellín, Colombia. La misma fue sometida inicialmente a un tratamiento mecánico en molino para disminuir el tamaño de partícula. Se utilizaron enzimas Cellic CTec2 donadas por Novozymes Latin América Araucaría Brasil.

3.3.2. Caracterización de la cascarilla de arroz

Se caracterizó la cascarilla sin pretratamiento y pretratada utilizando las normas NREL (*National Renewable Energy Laboratory*). Se determinó contenido de humedad y sustancias volátiles (NREL/TP-510-4262) (Sluiter *et al.*, 2008), contenido de sustancias extractivas solubles en agua y etanol (NREL/TP 510-42621) (Sluiter *et al.*, 2008), carbohidratos y lignina (NREL/TP-510-42618) (Sluiter *et al.*, 2008), y cenizas (NREL/TP-510-42622) (Sluiter *et al.*, 2005).

3.3.3. Determinación de la actividad enzimática

Las enzimas se caracterizaron mediante la determinación de su actividad enzimática (Unidades de Papel de Filtro) siguiendo el procedimiento detallado por la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry, Ghose 1987*).

3.3.4. Pretratamiento de la materia prima

Se pretrató la cascarilla de arroz con hidróxido de sodio 3% (p/v) y 10% (p/v) de biomasa durante una h a 121°C en autoclave según protocolo optimizado en el Grupo Biotransformación, (Niño, 2012).

3.3.5. Hidrólisis enzimática

Se realizó mediante protocolo propuesto en la norma NREL para hidrólisis enzimática (NREL/TP-510-42629) (Selig *et al.*, 2008) modificando la cantidad de carga enzimática a utilizar. En este trabajo se utilizó 30 FPU/g glucano, el tensoactivo Tween 80 (0,1 g/L) se adicionó para mejorar el funcionamiento de la hidrólisis enzimática y no se agregaron antibióticos. Se determinó la humedad y sustancias volátiles (NREL/TP-510-42621) de la cascarilla pretratada (Sluiter *et al.*, 2008). El proceso de hidrólisis enzimática se aplicó a la cascarilla pretratada según dos diseños experimentales y se realizó un ensayo preliminar para verificar un eventual aumento de celulosa hidrolizable. Con la finalidad de encontrar los factores significativos de la hidrólisis enzimática, se aplicó inicialmente un diseño de cribado. Las condiciones de dicho diseño se pueden observar en la Tabla 7.

Se utilizó un volumen de trabajo de 200 mL en todos los diseños aplicados, incluyendo los ensayos preliminares. El medio de reacción estaba compuesto por buffer citrato de sodio (500 ml/L), Tween 80, 0,1 g/L, cascarilla pretratada 2 % (p/v) (20 g/L) y agua destilada. La concentración del surfactante y de enzimas varió según el diseño experimental planteado.

Tabla 7. Condiciones de trabajo en los diseños experimentales aplicados con 1% de celulosa

Tipo de diseño	FPU/ g sustrato	pH	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Tiempo (h)	Concentración de surfactante (g/L)
Cribado	10	4,8	32	100	8	0,1
	20	6,0	37	180	12	0,3

A partir de los resultados obtenidos del diseño de cribado se planteó un diseño de optimización rotatable, según se describe más adelante.

La concentración y el rendimiento de los azúcares en la hidrólisis enzimática se obtuvieron como se muestra en la siguiente ecuación.

% Rendimiento de Azúcares Totales

$$= \frac{\text{Azúcares totales reales (g / L)}}{\text{Azúcares totales potenciales (g / L)}} * 100 \quad \text{Ec. 11}$$



Figura 24. Baño húmedo de agitación orbital para colocar hidrolizados de cascarilla de arroz

3.3.6. Métodos analíticos

Los carbohidratos obtenidos en los ensayos de hidrólisis enzimática se determinaron por el método de azúcares reductores DNS (ácido dinitrosalicílico), (Miller, 1959) y cromatografía líquida en fase reversa (Waters HPLC System), usando la columna Aminex HPX-87H, HPX-87P marca BIORAD en el caso de la caracterización de la cascarilla de arroz.

3.3.7. Diseños experimentales

Para la hidrólisis enzimática, con la finalidad de encontrar los factores significativos, se aplicó un diseño de cribado de un octavo de fracción, 4 puntos centrales y resolución 3 por duplicado, completando una totalidad de 24 experiencias.

Para obtener las condiciones con mayores rendimientos de producción de azúcares se propuso un diseño de optimización rotatable con 5 puntos centrales, por duplicado, completando 38 experiencias. En los diseños se trabajó con el error puro.

Con las condiciones óptimas obtenidas en el diseño anterior de hidrólisis enzimática, se realizaron ensayos para evaluar el rendimiento de azúcares con la cantidad de biomasa que contiene 6, 8 y 10% de celulosa hidrolizable.

3.3.8. Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron por duplicado utilizando el programa Startgraphics Centurión. Todos los análisis se realizaron con un nivel de confianza del 95%.

3.4. HIDRÓLISIS SEGUIDA DE FERMENTACIÓN E HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON PARÁMETROS OPTIMIZADOS

Los parámetros optimizados en el proceso de hidrólisis enzimática se aplicaron a los procesos de hidrólisis seguida de fermentación (SHF) y e hidrólisis y fermentación simultánea (SSF), con una temperatura de 37°C. Estos ensayos se realizaron en el Grupo de Investigación PROCYP del Instituto de Materiales de Misiones.

3.4.1. Materia prima, microorganismos, enzimas

La cáscara de arroz fue proporcionada por el campo de arroz de Las Palmas, Chaco, Argentina. Parte de la cáscara se sometió a un tratamiento mecánico en un molino de cuchillas para reducir el tamaño de partícula y se tamizó utilizando un tamiz de malla cuadrada de 2 mm. Las cáscaras de arroz molidas y no molidas se pretrataron con 3% (p/v) de hidróxido de sodio y 10% (p/v) de biomasa en autoclave a 121°C durante 1 h (Niño, 2012).

Se usaron las enzimas Cellic® CTec2 de Novozymes con una carga enzimática de 50 µL/L en los ensayos.

Las levaduras usadas fueron *S. cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181) y *S. cerevisiae* IMR 1507 (SC 1507).

La levadura *S. cerevisiae* IMR 1181 es la misma que se utilizó en los ensayos preliminares, la cual fue ingresada y se mantuvo conservada en la colección de cultivos del Departamento de Micología del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste, y la levadura *S.cerevisiae* IMR 1507 fue donada por este instituto para continuar con el desarrollo de esta tesis.

En la Figura 25, se observa la autoclave utilizada durante el pretratamiento de la cascarilla



a



b

Figura 25. Elementos utilizados para pretratar la cascarilla a) Autoclave para realizar pretratamiento b) Cascarilla pretratada.

3.4.2. Caracterización de la cascarilla de arroz

Las cáscaras de arroz pretratadas, molidas y sin moler, se caracterizaron utilizando los estándares NREL (Laboratorio Nacional de Energía Renovable). Se determinaron contenido de humedad y sustancias volátiles (NREL / TP-510-42) (Sluiter *et al.*, 2008), contenido de sustancias extractivas solubles en agua y etanol (NREL / TP 510-4262) (Sluiter *et al.*, 2008), carbohidratos y lignina (NREL / TP-510-42618) (Sluiter *et al.*, 2008), y cenizas (NREL / TP-510-42622) (Sluiter *et al.*, 2005) (Fig. 26).



a



b



c



d

Figura 26. a) Tamices para determinación de granulometría de la cascarilla (80 y 20 micras) b) Máquina de moler para realizar molienda de la cascarilla c) Cascarilla sin moler d) Cascarilla molida

3.4.3. Determinación de la actividad enzimática.

La actividad enzimática expresada en FPU (Unidad de papel de filtro), que es la capacidad de la enzima para sacarificar celulosa a glucosa, se determinó siguiendo el procedimiento detallado por la IUPAC; y también se realizó la determinación de β -glucosidasa por su capacidad de hidrolizar el *p*-nitrofenol- β -D-glucopiranosido (p-NPG) a 4-nitrofenol (p-NP) (Matsuura *et al.*, 1995). Las unidades se expresan en IU, unidades internacionales que se definen como la cantidad de enzima requerida para liberar un μ mol de azúcar reductor por minuto en condiciones estándares. La determinación de la actividad de la β -glucosidasa se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$IU = [p - NP] * FD * Vr / t * Ve \quad Ec. 10$$

IU: Unidades internacionales $\mu\text{mol/ min mL}$

p-NP: Absorbancia de producción de p-NP

FD: Factor de dilución

Vr: mL

t: Tiempo (min)

Ve: mL

3.4.4. Preparación del preinóculo e inóculo

Para el preinóculo y el inóculo, se prepararon 100 mL de medio líquido. El medio se complementó con micronutrientes como fosfato de potasio 5 g/L, cloruro de amonio 1,5 g/L y sulfato de magnesio heptahidratado 0,65 g/L (Arismendy *et al*, 2017).

Se sembró la levadura *S. cerevisiae* 1181, contenida en un vial con 2 mL solución salina 0,9% (p/v) NaCl, en 10 mL del medio líquido YPD. El cultivo se incubó con agitación a 130 rpm y 34°C, hasta que se obtuvo una densidad óptica de 0,8. Seguidamente se agregaron los 10 mL del preinóculo a 90 mL de medio YPD y se incubó bajo las mismas condiciones que el preinóculo, hasta obtener una densidad óptica de 0,73. La densidad óptica obtenida corresponde al tubo 4 de Mac Farland para levaduras (según protocolo utilizado en Laboratorio de Micología, UNNE), que sería aproximadamente 110×10^6 células/mL. El estándar de Mac Farland es conformado por el precipitado que forma la mezcla de BaCl_2 1% (p/v) y H_2SO_4 1% (v/v). La lectura de la densidad óptica se realizó por espectrofotometría a 640 nm según lo propuesto por la norma para SSF (NREL / TP-510-42630) (Dowe y McMillan., 2008).

El proceso de formación del preinóculo e inóculo tuvo una duración de aproximadamente 25 h. El mismo procedimiento desarrollado para *S. cerevisiae* 1181, se realizó para la levadura *S. cerevisiae* 1507.

3.4.5. Hidrólisis seguida de fermentación

3.4.5.1. Hidrólisis enzimática

El volumen de trabajo utilizado para realizar la HE fue de 100 mL, se usaron 50 mL de tampón de citrato de sodio en una concentración de 0,1 M (500mL/L). Para mejorar la sacarificación, se usó tensoactivo Tween 80, ya que permite una adecuada homogenización del medio.

Los rendimientos de glucosa y azúcares totales en la EH de la cascarilla de arroz pretratada se calcularon utilizando las ecuaciones 12,13 y 14:

Glucosa teórica g/L

$$= \frac{(g \text{ cascarilla seca} * glucanos)}{0,9} * 10 \quad \text{Ec. 12}$$

% Rendimiento de glucosa

$$= \frac{(g / L \text{ glucosa obtenida})}{(g / L \text{ glucosa teórica})} * 100 \quad \text{Ec. 13}$$

% Rendimiento de azúcares totales

$$= \frac{\text{Azúcares reductores (g)} * 0,9}{\text{polisacárido presente en el sustrato (g)}} * 100 \quad \text{Ec. 14}$$

3.4.5.2. Fermentación

El sobrenadante de la HE de cascarilla molida y pretratada se extrajo de la fracción sólida por decantación. El sobrenadante se complementó con 10 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de peptona, según lo propuesto por el estándar (NREL / TP-510-42630) (Dowe y McMillan., 2008). Luego se inoculó el 10% (v/v) del volumen de trabajo total (100 mL).

En el proceso SHF, se cargaron 90 mL de medio de cultivo seguido de 10 mL de inóculo. El proceso SHF se realizó a 130 rpm durante 24 h. La fermentación se realizó con hidrolizado de cascarilla pretratada y molida.

3.4.5.3 Hidrólisis y Fermentación Simultánea

La SSF se realizó en un volumen total de medio de 100 mL, compuesto por tampón citrato de sodio (500 mL/L), suplementado con extracto levadura (10 g/L) y peptona (10 g/L), cáscara de arroz pretratada 2% (p/v), agua destilada y se inoculó con una relación del 10% (v/v) del volumen de trabajo total.

Se realizó de la misma manera que para SHF en erlenmeyers de 250 mL con un volumen de trabajo de 100 mL, a 37 °C, 130 rpm con una duración de 72 h.

Los rendimientos de bioetanol obtenidos en el proceso SHF y SSF se calcularon utilizando la Ecuación 13:

Rendimiento de bioetanol (%)

$$= \frac{\text{Etanol producido (g / L)}}{0,511 * \text{Glucosa en cáscara pretratada (g / L)}} * 100 \quad \text{Ec. 15}$$

Las Figuras 27 y 28 muestran las etapas en las que se desarrolla el proceso de SHF y SSF, y los montajes utilizados para realizar el proceso simultáneo y separado en forma experimental.

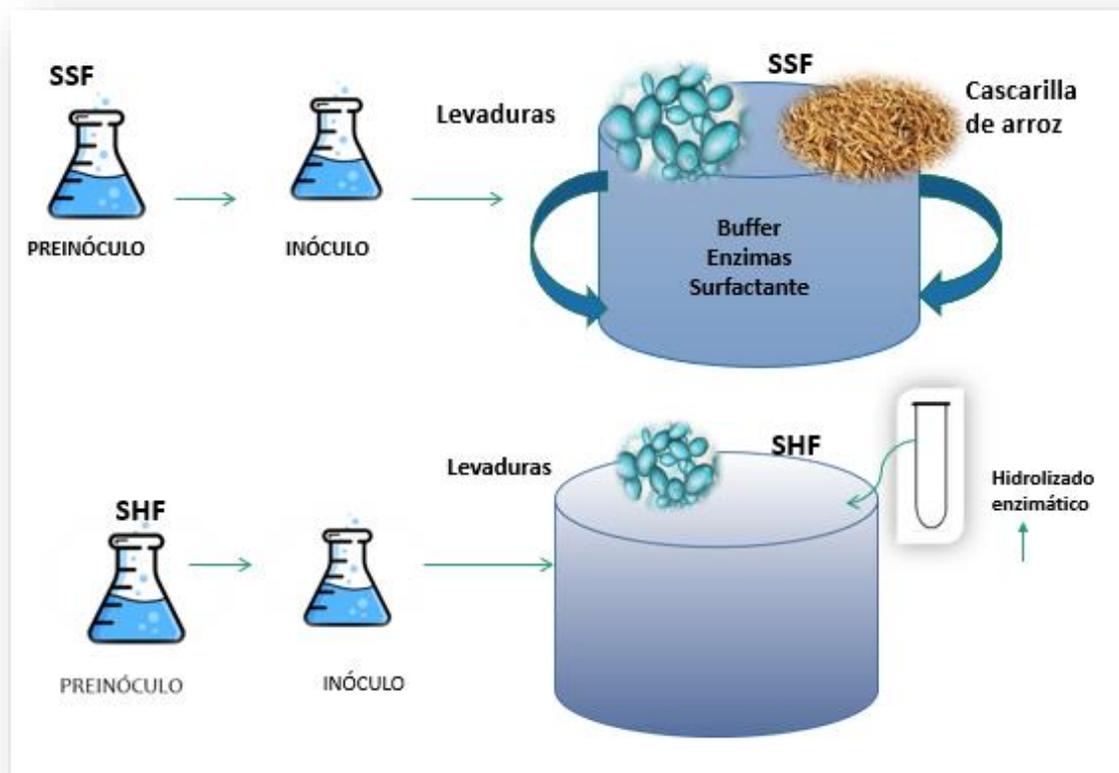


Figura 27. Esquema de hidrólisis y fermentación simultánea e hidrólisis seguida de fermentación



a



b

Figura 28. Montajes de SHF y SSF a) Hidrolizados de cascarilla para SHF b) Montaje a 37°C de SHF y SSF

3.4.5.4 Métodos analíticos

Los azúcares (glucosa, xilosa, arabinosa) se cuantificaron por cromatografía líquida (HPLC), usando una columna Aminex HPX-87H (BIORAD). Las condiciones cromatográficas fueron: H₂SO₄ 4 mM como eluyente, 0,6 ml / min, 35°C y detectores de índice de refracción y arreglo de diodos.

3.4.5.5 Análisis estadístico

Las pruebas de ANOVA multifactorial y de rangos múltiples (LSD) se llevaron a cabo utilizando el programa Startgraphics Centurion. Todos los análisis se realizaron con un nivel de confianza del 95%.

CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ENSAYOS PRELIMINARES DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON SISTEMA DE CELULAS LIBRES E INMOVILIZADAS

4.1.1. Materia prima, microorganismos y enzimas

4.1.1.1 Composición de la cascarilla de arroz

La composición de la cascarilla de arroz pretratada con la secuencia ácido-alcalina se muestra en la Figura 29.

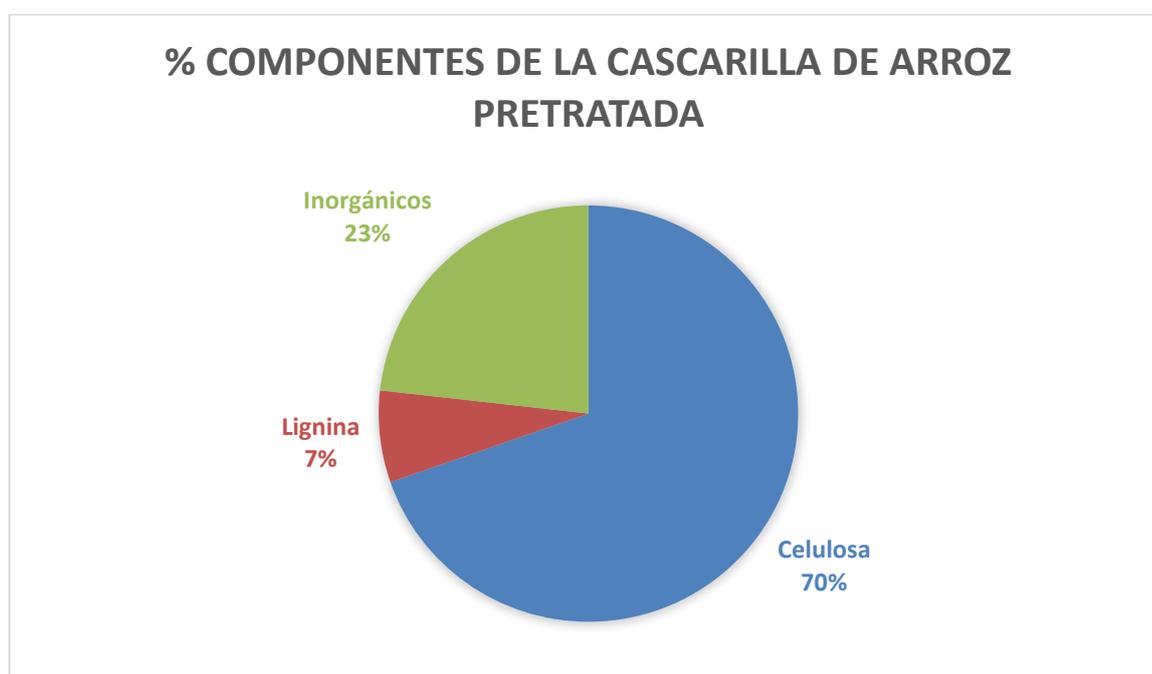


Figura 29. Composición de la cascarilla de arroz pretratada con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio

4.1.1.2. Actividad enzimática de celulasas de *Trichoderma reesei*

La actividad enzimática de las enzimas celulasas resultó 75 FPU/mL.

4.1.1.3. Caracterización de los microorganismos

La caracterización de las levaduras en medio CHROMagar, arrojó los siguientes resultados: Colonias de color azul para *C. tropicalis*, colonias rosadas para *S. cerevisiae* y colonias de color crema para *C. guilliermondii* y *C. kefir* (Odds y Bernaerts, 1994) (Fig. 30).

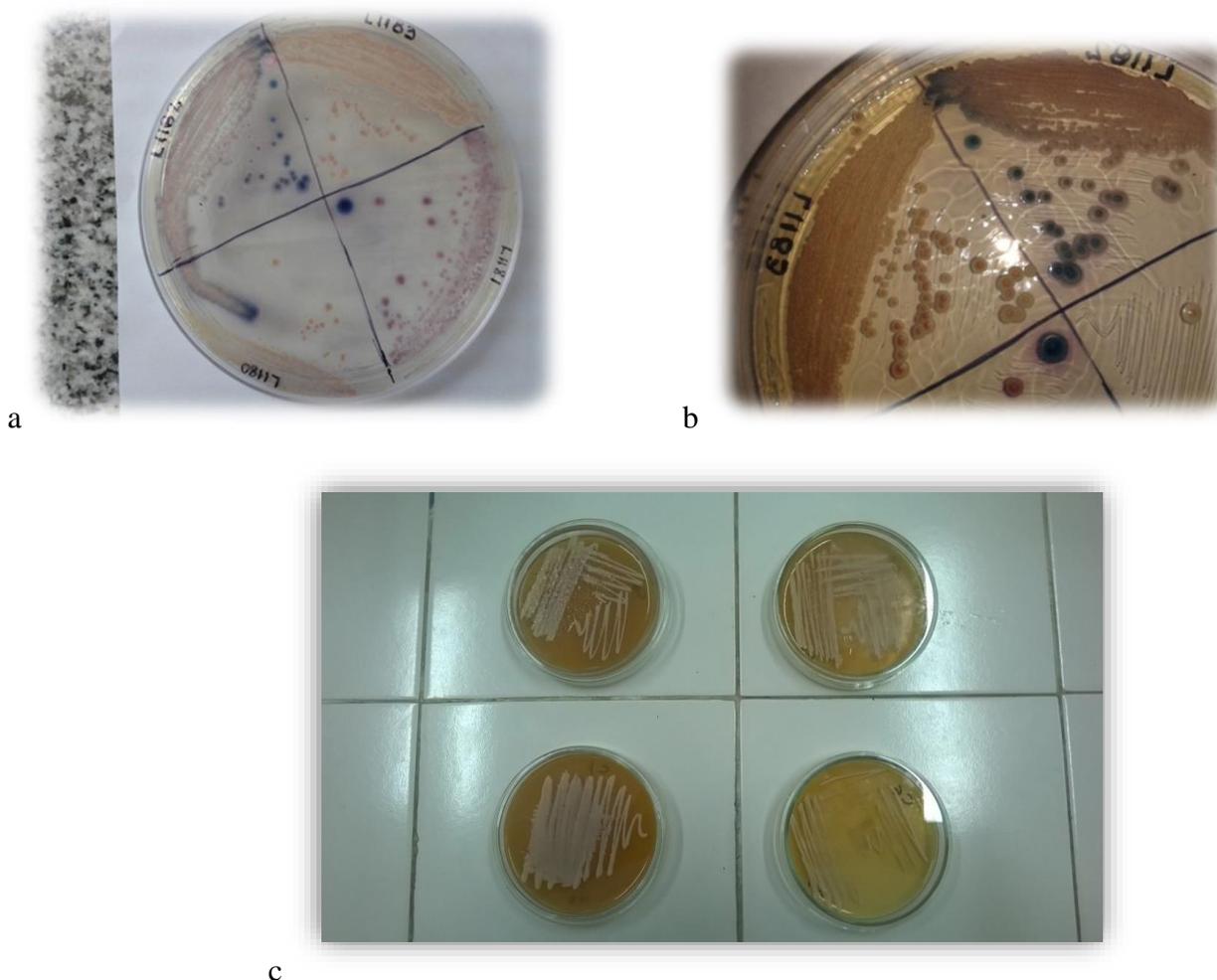


Figura 30. a) Caja de Petri con medio CHROMagar, b) Diferentes virajes de color en medio CHROMagar c) Microorganismos en cajas de Petri en medio sólido YPD

4.1.2. Hidrólisis y fermentación simultánea utilizando células libres

En este apartado se muestran los resultados de producción de etanol obtenidos en los procesos de hidrólisis y fermentación simultánea (SSF), a 32°C y 35°C, con las diferentes levaduras.

En las Tablas 8 y 9, se muestran los resultados de los procesos SSF a 32°C y 35°C, respectivamente.

Tabla 8. Hidrólisis y fermentación simultánea de la cascarilla de arroz a 32°C

Muestra	Bioetanol (g/L)	Productividad (g/L*h)	Rendimiento bioetanol (%)
Blanco	0,00	0,00	0,00
<i>Candida guilliermondii</i>	2,00	0,02	18

<i>Candida tropicalis</i>	0,80	0,01	7,06
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	5,12	0,07	51,73
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5,70	0,083	57

Tiempo de fermentación: 48 h.

Tabla 9. Hidrólisis y fermentación simultánea de la cascarilla de arroz a 35°C

Microorg.	4 días de fermentación			10 días de fermentación		
	Bioetanol (g/L)	Productividad (g/L*h)	Rend. bioetanol (%)	Bioetanol (g/L)	Productividad (g/L*h)	Rend. bioetanol (%)
Blanco	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Candida guilliermondii</i>	0,05	0,00005	2,09	0,05	0,00005	2,10
<i>Candida tropicalis</i>	0,18	0,00018	7,79	0,18	0,00018	7,79
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1,56	0,00163	67,73	1,75	0,00182	75,98
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,48	0,00154	64,74	1,48	0,00145	64,74

En las Tablas 8 y 9, se observan los resultados de la SSF a 32°C y 35°C, respectivamente. En estos resultados se puede evidenciar que los mayores rendimientos de bioetanol son presentados por *S. cerevisiae* y *K. marxianus*, en ambos procesos SSF. A 32°C y durante 48 h, se observan rendimientos del 57 % para *S. cerevisiae* y del 52% para *K. marxianus*. A 35°C, *S. cerevisiae* presenta un rendimiento del 65%, luego de 4 días de fermentación, el cual se mantuvo constante hasta los 10 días, y *K. marxianus* presenta un rendimiento del 68 % a los 4 días, el cual se incrementó hasta 76 %, luego de 10 días de fermentación.

Es posible que *S. cerevisiae* presentó mayor rendimiento a 35°C en comparación con 32°C, debido a que el ensayo realizado a mayor temperatura se operó por más tiempo, hasta completar 10 días.

K. marxianus presentó mayor rendimiento de bioetanol a 35°C debido a que este microorganismo es considerado termotolerante. Es importante mencionar también que el tiempo empleado por esta levadura para alcanzar este rendimiento fué de 10 días, observándose un aumento del 8 % aproximadamente desde el día 4 hasta completar el día 10. Por el contrario, la producción de bioetanol por *S. cerevisiae* finalizó al 4to día, posiblemente porque la muerte celular de esta levadura se inició más rápido, a diferencia de *K. marxianus* que tolera más estrés celular provocado por aumento de temperatura, lo que implica que la muerte celular de este microorganismo sea más lenta y por esta razón continuó fermentando en el transcurrir de los días.

Por otra parte, los microorganismos *C. guiliermondii* y *C. tropicalis* presentaron rendimientos de bioetanol muy bajos en comparación con las otras levaduras, debido a que estas fermentan preferiblemente pentosas como xilosa entre otros sustratos.

Puede mencionarse observando otros trabajos, que el rendimiento obtenido por *C. kefir* (75,98%) es comparable con rendimientos reportados por Ballesteros *et al.* (2004), quienes obtuvieron rendimientos de etanol de 60,90% con bagazo de sorgo dulce pretratado con explosión de vapor, en un proceso simultáneo, con 15 FPU/g sustrato, utilizando a *C. kefir* a 42°C. Nachaiwieng *et al.* (2015) obtuvieron 74,50% de rendimiento de bioetanol con cascarilla de arroz pretratada con una solución de hidróxido de sodio (2% p/v) a 130°C durante 30 min, con 20 FPU/ g sustrato de celulasa “Meicelase”, durante 96 horas utilizando a *K. marxianus* CK8 a 43°C. García- Aparicio. *et al* (2011), obtuvo 67,4% de rendimiento de bioetanol con paja de cebada pretratada con explosión de vapor a 210°C durante 5 min, 20 FPU/ g sustrato de Celuclast 1,5 de Novozymes, utilizando a *K. marxianus* CECT 10875 a 42°C.

Autores como Moreno *et al.* (2013) obtuvieron rendimientos de producción de bioetanol de 68,62% con paja de trigo pretratada con explosión de vapor a 220°C durante 2,5 min, utilizando *S. cerevisiae*, 15 FPU / g de sustrato de NS50013 y 15 IU / g de sustrato de NS50010, 35°C durante 72 h, también se utilizó *K. marxianus* con las mismas condiciones de trabajo presentando un rendimiento de bioetanol de 69,20%. Linde *et al.* (2008) utilizó paja de trigo pretratada con ácido sulfúrico en concentración de 0,2% (20 g de líquido/ g de paja seco), 190°C por 10 min, 15 FPU/ g sustrato de Celluclast 1,5 L de Novozyme, el ensayo se operó durante 72 h a 35°C, con *S. cerevisiae* y se obtuvo un rendimiento de bioetanol de 67%.

Según lo anterior, se puede deducir que los resultados que se presentan en este trabajo son comparables con los trabajos reportados por otros autores.

En la Tabla 10, se muestra la producción de bioetanol por las levaduras *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, ya que estos microorganismos generaron los mejores rendimientos en los ensayos previos, debido a esto se optó por realizar este ensayo con estos microorganismos.

Tabla 10. SSF con *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* a 35°C

Muestra	Bioetanol (g/L)	Productividad (g/L*h)	Rendimiento bioetanol (%)
Blanco	0	0	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	3,20	0,044	62 ± 0,020
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,90	0,040	57 ± 0,005

Tiempo de fermentación: 3 días.

En la Tabla 10 se observa que *S. cerevisiae* presentó un rendimiento de etanol del 57 % y *K.marxianus* del 62 %, luego de 3 días de fermentación.

Al comparar con el proceso SSF de la experiencia anterior (Tabla 9), los resultados de la Tabla 10 evidencian que para obtener rendimientos similares, es necesario mayores tiempos de proceso. Aun así, se puede concluir que a 35 °C se obtuvieron buenos rendimientos de etanol a los 3 días, aunque estos valores fueron menores a los obtenidos luego de 4 días de proceso.

También se observa que la agitación orbital a diferencia de la de vaivén no repercute de gran manera en los rendimientos, ya que como se nombró anteriormente los rendimientos son relativamente similares en menor tiempo.

En las próximas experiencias se optó por realizar los ensayos de SSF en un lapso de 72 h y aumentar la temperatura, pues tiempos más prolongados pueden repercutir en la rentabilidad del proceso.

Aunque en este caso *K. marxianus* presentó el mayor rendimiento, los rendimientos de *S. cerevisiae* son comparables a los informados por otros autores a 35°C, con condiciones similares, por lo que se optó por continuar los procesos con la levadura *S. cerevisiae*.

4.1.3. Hidrólisis y fermentación simultánea utilizando células inmovilizadas

Las células de levaduras encapsuladas que fueron utilizadas para los ensayos de SSF, presentaron en su mayoría ruptura de la matriz polimérica inclusive aquellas que fueron expuestas a la solución de cloruro de calcio durante 12 h o 24 h. Algunos factores que pueden provocar la ruptura de las membranas de alginato de calcio que envuelve las células son la liberación de dióxido de carbono y el aumento de la densidad celular durante la fermentación.

La exposición de las células durante tiempos prologados al cloruro de calcio se realizó con el objetivo de ofrecer más estabilidad a la membrana de alginato de sodio, pero se observó que las células inmovilizadas al iniciar el proceso de fermentación continuaban presentando ruptura.

La estabilidad del gel depende del exceso de Ca^{2+} presente en la solución circundante, es decir en la solución de cloruro de calcio, pues esto permite contrarrestar la liberación de iones Ca^{2+} del gel, para adquirir un hidrogel más estable, ya que el alginato reacciona con un polication polimérico (Westman *et al.*, 2012).

Cheong *et al.* (1993), utilizaron encapsulación de *S. cerevisiae* y observaron fuga de células por permeabilidad de gases. Xu *et al.* (2012) utilizaron cepas de *Clostridium thermocellum*, y *Clostridium thermolacticum*, para producción de bioetanol, que se caracterizan por su alta sensibilidad a altas concentraciones de etanol y pH. Las células fueron encapsuladas en alginato de sodio y observaron que estas toleraban muy poco las concentraciones de etanol, aunque no llegó a afectarse la membrana que envuelve las células. Sin embargo, no se logró disminuir la sensibilidad de las células al etanol, que era el objetivo principal de la encapsulación. Youngsukkasem *et al.* 2012, reportaron la encapsulación de células de bacterias productoras de metano en matrices de alginato-quitosan. No se observó producción de biogás, posiblemente porque el quitosan posee actividad antimicrobiana, inhibiendo así la producción de biogás por parte de las bacterias.

Los inconvenientes presentados en este trabajo con la encapsulación son comparables a los encontrados por otros autores, ya que no se obtuvo la estabilidad y permeabilidad necesaria para el correcto funcionamiento de las células encapsuladas.

Existen agentes reticulantes que permiten mejorar la estabilidad de las esferas de alginato, como Tween 20, quitosano, glutaraldehído, entre otros. En este trabajo no se utilizó ningún tipo de estos agentes porque en su mayoría presentan cierta toxicidad a las células (Westman *et al.*, 2012). En el caso del SSF se utiliza el Tween 80 como tensoactivo para mejorar la eficiencia de la hidrólisis enzimática, por lo que no se adicionó a las esferas. Debido a que se observó gran inestabilidad en las esferas de alginato de sodio se optó por continuar los ensayos con sistema de células libres.

4.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CASCARILLA DE ARROZ

En este apartado se presentan los resultados obtenidos de los rendimientos de la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz sometida a dos tipos de pretratamientos para deslignificar que son pretratamiento con hidróxido de sodio y organosolv.

4.2.1. Caracterización de la cascarilla de arroz pretratada con hidróxido de sodio y organosolv

La cascarilla de arroz con pretratamiento de hidróxido de sodio presentó 75% de celulosa, 8% de lignina y 17% de inorgánicos. Por otra parte, la cascarilla pretratada con organosolv contenía 80% de celulosa, 5% de lignina y 15% de inorgánicos.

4.2.2. Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática de la celulasa Cellic CTec2 que fue donada por Novozymes, Brasil, presentó 135 FPU/mL. Se observa que esta actividad es mayor que la presentada por las enzimas celulasa de *T. reesei* (Sigma Aldrich), cuya mayor actividad que presentaron fue de 75 FPU/mL, y al poco tiempo 26 FPU/mL. Por esta razón se optó por continuar los ensayos de la tesis con las enzimas Cellic CTec2.

4.2.3. Hidrólisis enzimática

En la Figura 31, se observa la cinética de hidrólisis enzimática para el pretratamiento con hidróxido de sodio y organosolv, utilizando las enzimas Cellic CTec2.



Figura 31. % Rendimiento de glucosa con cascarilla pretratada con hidróxido de sodio y organosolv.

Se puede observar en la Figura 31 que la hidrólisis enzimática aumentó hasta las 32 h, tiempo a partir del cual prácticamente finaliza el proceso de producción de glucosa, ya que se evidencia disminución

de los rendimientos, lo cual pudo deberse a que en el proceso de hidrólisis enzimática se genera inhibición de la enzima.

La cascarilla pretratada con la secuencia ácido-alkalina, presentó mayores rendimientos de hidrólisis enzimática, debido a que el pretratamiento genera mayor disponibilidad de superficie de área para las enzimas (Thompson, 1992), disminuye el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, y se rompe la estructura de la lignina, facilitando la sacarificación y obtención de mayores rendimientos (Tahezadeh y Karimi, 2007).

Se evidencia también que luego del pretratamiento organosolv, el material contiene aproximadamente 75-80% de celulosa, por lo que es posible que los componentes que quedan después del pretratamiento (lignina y cenizas) pueden estar obstaculizando en gran medida la eficiencia de la hidrólisis enzimática, repercutiendo en los rendimientos.

Se realizó el análisis de ANOVA multifactorial, y se observó que existen diferencias significativas en las variables pretratamiento ($p = 0,01$) y tiempo ($p = 0,00$).

En el análisis de prueba de rangos múltiples LSD de Fischer se observó que existen diferencias significativas entre las medias del % Rendimiento de glucosa entre los pretratamientos con hidróxido de sodio y organosolv. También el análisis LSD mostró que existe diferencia significativa en todas las medias del tiempo de duración de la hidrólisis enzimática de los dos tipos de pretratamiento.

En las Figuras 32 y 33, se puede observar la representación gráfica de estas medias, para las variables pretratamientos y tiempo.

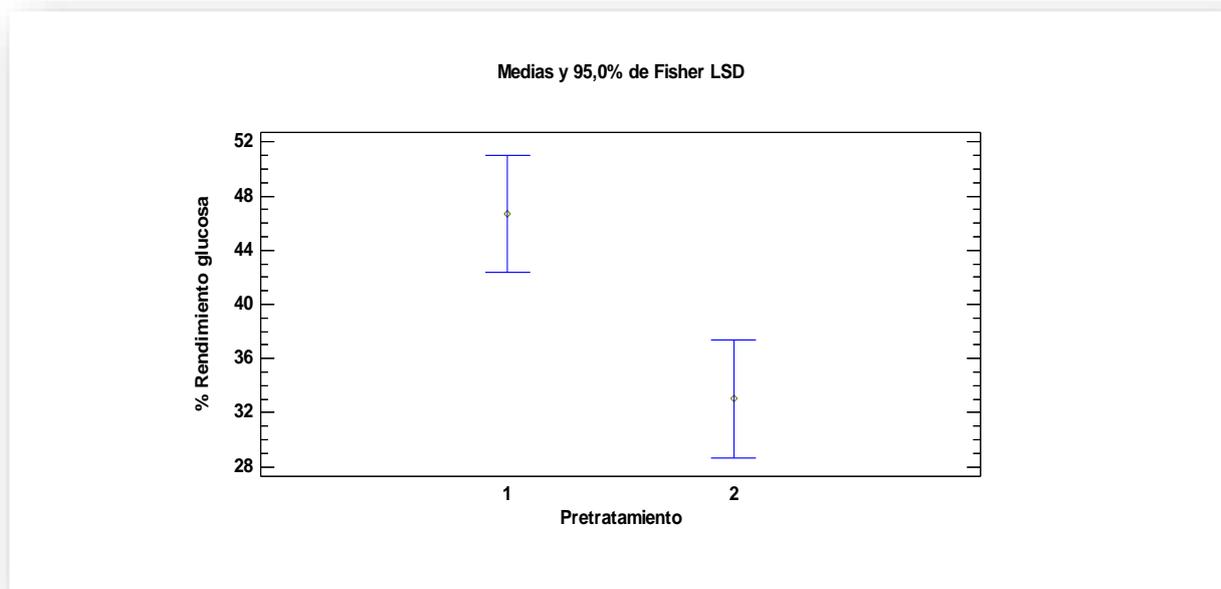


Figura 32. Esquema de diferencias medias para el pretratamiento con hidróxido (1) y organosolv (2)

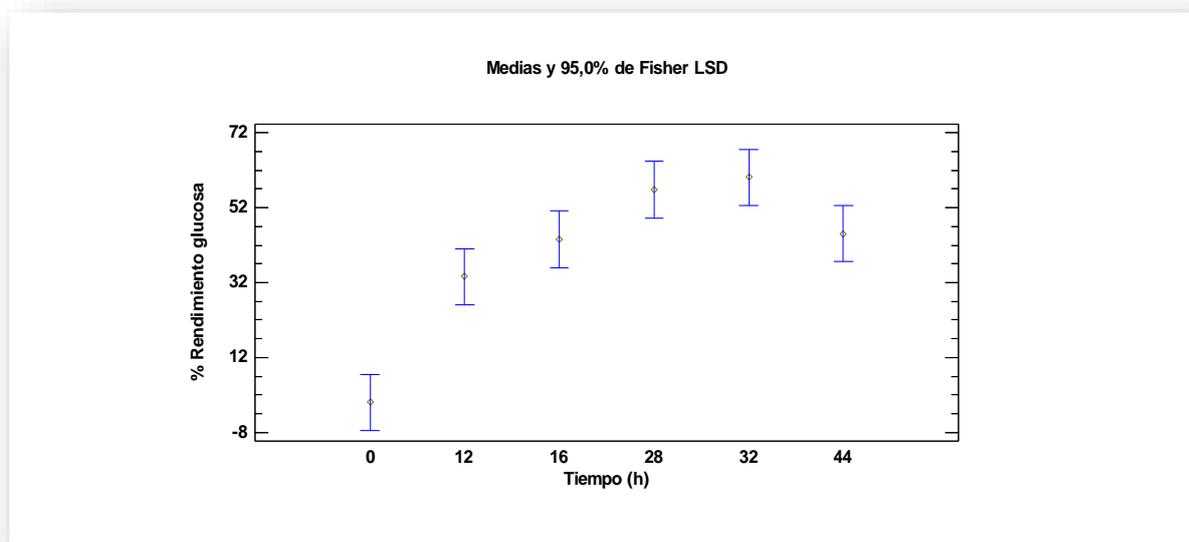


Figura 33. Esquema de las diferencias de medias en los tiempos (h) de duración de la hidrólisis enzimática.

Autores como Wei *et al.* (2009), obtuvieron 72% rendimiento de azúcares reductores de cáscaras de arroz pretratadas con 1,0% H₂SO₄ seguido por 1,0% de NaOH, 120°C durante 1 hora, 1,000 U Celluclast 1,5 L, 2% (p/v) de sustrato, 50°C y 48 horas.

Cai *et al.* (2016), obtuvieron 53,40% de rendimiento de producción de glucosa con el rastrojo de maíz pretratado con 1% (p/p), 60°C durante 24 h; la sacarificación se realizó con 15 FPU/ g sustrato de celulasa NS50013, Novozymes, 1% (p/v) de sustrato, 50°C durante 48 horas.

Mesa *et al.* (2011), utilizó bagazo de caña pretratado con 30% (v/v) de etanol a 190°C durante 60 minutos, y obtuvo 29,1% de rendimiento de glucosa, con un dosaje enzimático de 15 FPU/ g sustrato de Celluclast 1,5 L, B -glucosidasa (Novozyme 188), 5% (p/v) de sustrato, 50°C durante 24 h.

Garriga *et al.* (2009), pretrataron bagazo de caña de azúcar con etanol 50% (m/v), a 175°C durante 1 hora y sacarificados con Celluclast 1,5 L 15 FPU/ g sustrato, 300 UI/ g de sustrato de xilanasa, a 50°C durante 24 horas, presentando un rendimiento de glucosa de 51,29%.

Puede mencionarse que estos resultados son comparables con los obtenidos en este trabajo en condiciones similares de pretratamiento, 15 FPU/ g celulosa de celulasa Cellic CTec2 de Novozymes y 4% (p/v) sustrato.

4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

4.3.1. Composición de la cascarilla de arroz

La composición de la cascarilla de arroz sin pretratamiento (original) fue: lignina insoluble en ácido 20,40%; extractivos totales 15%; inorgánicos 10%; 55% carbohidratos totales (glucanos y xilanos), mientras que su composición después del pretratamiento fue: lignina insoluble en ácido 11,30%; inorgánicos 2,0%; 51% glucanos; 13% de extractivos totales y 16,10 % xilanos.

4.3.2. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática de las celulasas Cellic CTec2 resultó de 50 FPU/mL.

4.3.3. Selección de variables

Los resultados del diseño de cribado para verificar la significación de las variables sobre la hidrólisis enzimática se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados del diseño de cribado de hidrólisis enzimática

FPU/ g glucanos	pH	Agitación (rpm)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Concentración surfactante(g/L)	Rendimiento glucosa (%)
10	4,8	100	37	12	0,3	31,08 (± 0,00)
20	6,0	100	37	8	0,1	34,91 (± 0,03)
20	6,0	180	37	12	0,3	30,24 (± 0,00)
10	4,8	180	37	8	0,1	21,87 (± 0,09)
20	4,8	100	32	8	0,3	36,56 (± 0,00)
10	6,0	100	32	12	0,1	14,68(± 0,05)
15	5,4	140	34	10	0,2	*31,36 (±0 ,09)
20	4,8	180	32	12	0,1	38,51 (± 0,06)
10	6,0	180	32	8	0,3	15,72 (±0, 03)

* Promedio de 8 repeticiones del punto central. Cascarilla pretratada: 2 % (p/v).

El análisis de varianza indicó que las variables FPU/g glucano, pH, temperatura, tiempo y concentración de surfactante g/L (Tween 80) influyeron significativamente en el proceso de hidrólisis enzimática ($p < 0,05$), mientras que la agitación prácticamente no resultó significativa en el proceso (p cercano a 0,05). Esto significa que para los volúmenes y la concentración de sólidos utilizada, esta última variable puede descartarse. Sin embargo, esto podría cambiar al aumentar la concentración de sólidos ($> 2\%$ p/v).

Los resultados de la influencia de la concentración de surfactante sobre la hidrólisis enzimática confirman que contribuye a mejorar la eficiencia de la interacción entre sustrato y enzima, mejorando así la accesibilidad de la enzima al sustrato (Eriksson *et al.*, 2002; Kaar y Holtzapple, 1998).

Con cantidades de carga enzimática en rangos de 10 a 20 FPU/g sustrato se obtuvieron rendimientos de alrededor del 40% en 12 h como máximo.

Observando que a 37°C se generan rendimientos aceptables de azúcares fermentables, siendo además está la temperatura máxima que podría llegar a soportar *S. cerevisiae* y considerando que se han reportado rendimientos significativos de etanol con levaduras comerciales (*S. cerevisiae*) a dicha temperatura, se decidió fijar la temperatura en 37°C para los futuros ensayos SSF.

A partir de lo expuesto anteriormente, se dejaron fijas las variables: concentración de: surfactante (0,3 g/L), velocidad de agitación (180 rpm) y temperatura (37 °C), para la realización del diseño de optimización.

4.3.4. Optimización

Para realizar el diseño de optimización, y en base a los resultados obtenidos del diseño de cribado, se dejaron fijas las variables agitación en 180 rpm, temperatura 37°C, concentración de surfactante en 0,3 g/L y se estudió el efecto del pH entre 4,1 a 6,4, FPU/g entre 3 a 40 y tiempo entre 8 a 18 h.

Los resultados de optimización de la hidrólisis enzimática se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados del diseño de optimización de la hidrólisis enzimática

pH	FPU/g glucano	Tiempo (h)	Rendimiento glucosa (%) (D.S)
4,5	10	8	28,50 (±0,23)
6,0	10	8	21,76 (± 0,40)
4,5	40	8	39,75 (± 0,73)
6,0	40	8	25,70 (± 0,63)
4,5	10	18	23,49 (± 0,62)
6,0	10	18	15,00 (± 0,03)
4,5	40	18	42,40 (± 0,13)
6,0	40	18	25,15 (± 0,11)
4,1	25	13	31,80 (± 0,02)
6,4	25	13	6,71 (± 0,54)
5,3	3	13	11,30 (± 0,40)
5,3	47	13	48,95 (± 0,07)
5,3	25	6	35,47 (± 0,01)
5,3	25	20,4	18,30 (± 0,02)
5,3	25	13	32,44* (± 0,88)

*Promedio de 10 repeticiones del punto central. Cascarilla pretratada: 2 % (p/v).

La ecuación del modelo ajustado ($R^2= 90,50$) se presenta a continuación. La ecuación se elaboró con variables transformadas.

$$\% \text{Rendimiento de azúcares} = 32,43 - 5,27 * pH + 9,00 * FPU - 2,00 * Tiempo - 4,54 * pH^2 - 4,00 * pH * FPU - 2,70 * pH * Tiempo - 0,64 * FPU^2 - 2,00 * Tiempo^2 \quad \text{Ec. 16}$$

La Figura 32, muestra la representación del modelo de rendimiento de hidrólisis enzimática a diferentes cargas enzimáticas y pH, en un rango de 4,5-6,0 para un tiempo de 13 h (punto central).

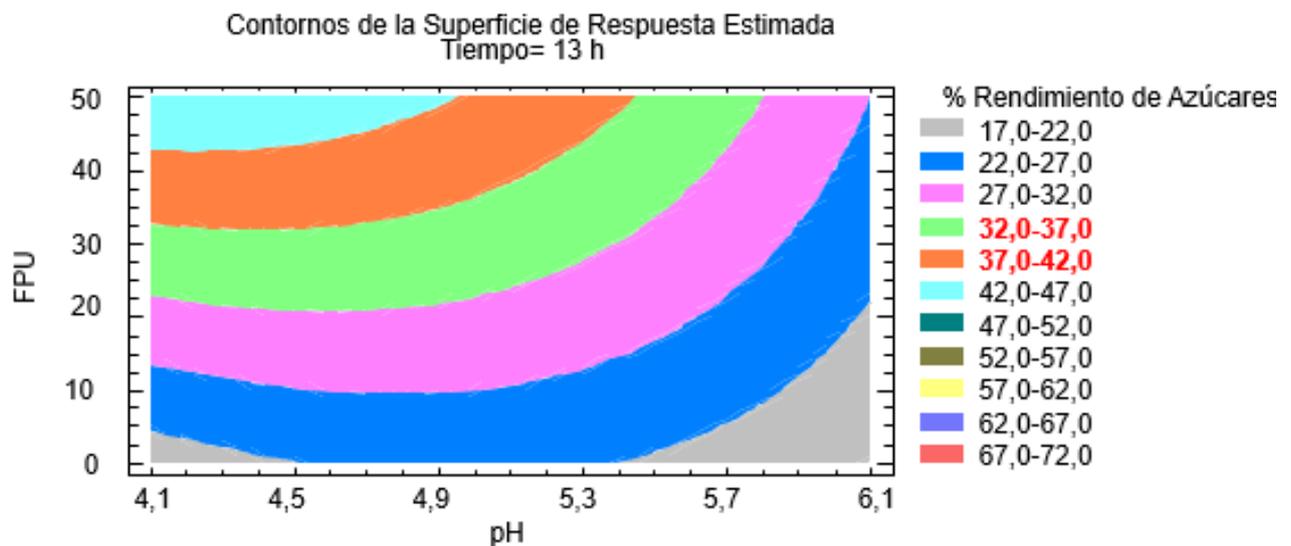


Figura 34. Gráfico de contornos de optimización del rendimiento de hidrólisis (13 h de tratamiento).

A partir de los resultados obtenidos del diseño de optimización de la hidrólisis enzimática, el máximo rendimiento de azúcares obtenido a las 13 h, fue de ~ 62%, con más de 50 FPU/g sustrato y pH ~ 4,9. Se ha reportado que la carga enzimática para materiales lignocelulósicos puede variar entre 7 y 33 FPU/g sustrato, según la concentración de sustrato utilizado y el tipo de material (Sun y Cheng, 2002). Del diseño de optimización se obtuvieron las condiciones en las que se podrían llegar a obtener elevados rendimientos de azúcares, pero con una cantidad muy significativa de enzima lo que podría afectar la rentabilidad del proceso. Por esta razón se realizaron ensayos posteriores con una cantidad menor de enzima, tomada como referencia de la gráfica de contornos.

Siguiendo el modelo representado en la Figura 34, se decidió realizar ensayos de comprobación tomando como referencia los parámetros 30 FPU/g glucano (15 FPU/ g sustrato) y 13h, a pH 4,5 y 5,0, considerando que en estas condiciones se obtendría un rendimiento teórico de azúcares cercano al 40%. Además, los pH seleccionados podrían resultar favorables para los microorganismos en los procesos SSF.

Los rendimientos de azúcares (%) para los pH de 4,5 y 5,0 fueron 32,50% y 37,60% respectivamente, como se presenta en la Tabla 13.

Tabla 13. % Rendimientos de azúcares con pH 4,5 y 5,0

Condiciones de trabajo	% Rendimiento de azúcares
30 FPU; pH 4,5; 13 h	32,50 ± 0,23
30 FPU; pH 5,0; 13 h	37,60 ± 0,30



Figura 35. Residuo de hidrolizado de cascarilla

Se puede observar que la diferencia al hidrolizar biomasa a pH 4,5 y pH 5,0 es importante; siendo mayor la producción de azúcares con pH 5,0. Por lo tanto, para el estudio siguiente se tomaron los parámetros: 30 FPU/ g sustrato, pH 5,0 y tiempo 13 h, variando el porcentaje de sólidos a hidrolizar en 12, 16 y 20% (p/v), con cargas de celulosa del 6, 8 y 10%, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados de los ensayos de variación de celulosa hidrolizable

Celulosa (%)	Rendimiento de azúcares (%)	Rendimiento promedio de azúcares (%)
6	51,59	51,11 ± 0,67
6	50,64	
8	29,85	29,92 ± 0,10
8	30,00	
10	11,00	11,07 ± 0,10
10	11,15	

La prueba de múltiple rangos LSD indicó que existen diferencias significativas entre las medias de los rendimientos de azúcares de todos los niveles ensayados ($p < 0,05$).

En la Tabla 14 se observa que utilizando 12% (p/v) de sólidos con 6% de celulosa hidrolizable en la mezcla de reacción, se obtuvo un rendimiento del 51,11 %. Este rendimiento fue superior al obtenido utilizando 16% y 20% de sólidos con un contenido de celulosa de 8 y 10%, respectivamente. Es probable que un aumento en la cantidad de celulosa genere algún tipo de inhibición por sustrato.

Por otra parte, si bien en las experiencias anteriores realizadas con 2 % de sólidos, la agitación no influyó sobre el proceso de hidrólisis, al aumentar la concentración de sólidos en la hidrólisis enzimática, puede que la agitación orbital no sea la más adecuada y que sea necesario mejorar el sistema de agitado, de manera que permita la adecuada homogenización del sustrato y de la enzima en el medio de reacción.

La cascarilla después del pretratamiento posee un porcentaje significativo de lignina y hemicelulosas que afectan la efectividad de la hidrólisis enzimática, esto podría ser también la razón por la cual no se obtuvieron mayores rendimientos. Empleando pretratamientos en condiciones más severas se podrían obtener rendimientos de sacarificación mayores, siendo necesario en este caso, estudiar la rentabilidad de los procesos.

Lo anterior sugiere que el aumento de sólidos en el sistema requiere un estudio más complejo para su optimización.

Se ha reportado en literatura que con pretratamiento de explosión de vapor durante 10 min a 220°C, con una cantidad de 6,0% de biomasa se llegó a obtener un rendimiento menor a 75% con 22FPU/ g sustrato durante 96 h a 50°C, utilizando las enzimas Cellic CTec2 y Cellic HTec2 (Wood *et al.*, 2016). Otro autor propuso el uso de un proceso de deslignificación alcalina en microondas con hidrólisis posterior de 50,0 g de cascarilla pretratada (46,0% de celulosa), en un reactor de 3,0 L, utilizando un coctel enzimático crudo de endoglucanasas 198,2 IU/g, xilanasas 134,3 IU/g y β -glucosidasas 147,8 IU/g (actividades de exoglucanasa 8,2 FPU/g), obteniendo rendimientos cercanos al 88% durante 72 h (Singh *et al.*, 2014). En un estudio sobre rastrojo de maíz, se aplicó un diseño de superficie de respuesta para evaluar la influencia de la temperatura y la carga de hidróxido de sodio en el pretratamiento alcalino utilizando las siguientes condiciones: 130°C; 0,70 g de hidróxido/g de rastrojo de maíz, durante 75 minutos, obteniendo un rendimiento de azúcares de 59,8% (Chen *et al.*, 2013).

4.4. HIDRÓLISIS SEGUIDA DE FERMENTACIÓN E HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA CON PARÁMETROS OPTIMIZADOS

4.4.1. Caracterización de la cascarilla de arroz

En la Tabla 15, se muestran los resultados de la caracterización de la cascarilla pretratada y molida y pretratada sin moler.

Tabla 15. Caracterización de la cascarilla pretratada y molida y cascarilla pretratada sin moler (% Componentes/ 100 g de cascarilla seca)

(%) Componentes	Cascarilla pretratada y molida	Cascarilla pretratada sin moler
Lignina	16,68 ± 0,09	14,91 ± 0,26
Glucano	54,50 ± 0,61	51,86 ± 1,20
Xylano	20,83 ± 0,10	20,50 ± 0,50
Arabinano	1,75 ± 0,10	1,37 ± 0,00
Cenizas	6,28 ± 0,47	6,00 ± 0,00

La Tabla 15, muestra que las cáscaras molidas y sin moler no tienen diferencias significativas en la composición química después del pretratamiento. La cáscara de arroz pretratada todavía contiene un 15% de lignina y un 20% de hemicelulosas, lo que puede dificultar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa, produciendo bajos rendimientos de hidrólisis. Los principales efectos del pretratamiento son la solubilización de sustancias inorgánicas (cenizas) y la eliminación parcial de lignina. Según reportes de bibliografía, la paja de arroz parece ser menos recalcitrante que la cáscara de arroz siendo más propensa a deslignificarse, obteniendo porcentajes de celulosa más altos sobre la biomasa (> 60%), aunque en general los autores utilizan condiciones más energéticas (Zhao *et al.*, 2017; Takano *et al.*, 2018). Los autores que trabajaron con cáscaras de arroz en condiciones alcalinas similares, pero incluyendo peróxido de hidrógeno, obtuvieron un contenido de celulosa algo mayor (56%), (Ayeni *et al.*, 2018). En este trabajo, las condiciones alcalinas utilizadas fueron suaves (3% p/v) de álcali, (10% p/v) de biomasa, durante 1 h, a 121°C, por lo que los efectos sobre la deslignificación y la ganancia de porosidad también fueron leves. Para obtener una mayor disponibilidad de celulosa, es necesario modificar las condiciones de pretratamiento.

4.4.2. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática en la celulasa Cellic CTec2 dio como resultado 110 FPU/mL y la determinación de β-glucosidasa 2000 UI.



a



b

Figura 36. a) Determinación de celulasas con DNS b) Determinación de β -glucosidasa con *p*-Nitrofenol.

En la Figura 36, se observa la coloración que presenta la determinación de FPU (color naranja) con ácido dinitrosalicílico y la β - glucosidasa (color amarillo claro) con *p*- nitrofenol de las enzimas Cellic CTec2.

4.4.3. Hidrólisis enzimática

La producción y rendimiento de azúcares en la HE de la cáscara de arroz molida y sin moler se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Rendimientos de glucosa y azúcares totales en cascarilla molida y sin moler

Tiempo	Cascarilla molida		Cascarilla sin moler	
	Concentración de Glucosa (g/L)	Rendimientos de Glucosa/ Glucano (Azúcares totales/ Polisacárido) (% p/p)	Concentración de Glucosa (g/L)	Rendimientos de Glucosa/Glucano (Azúcares totales/ Polisacárido) (% p/p)
3 h	2,97± 0,04	26,50± 0,3 (27,5)	3,13± 0,15	27,90± 1,3 (26,60)
6 h	3,74± 0,04	33,40± 0,4 (33,33)	3,76± 0,24	33,60± 2,1 (32,40)
12 h	4,10± 0,01	36,60± 0,1 (41,20)	3,98±0,20	35,50± 1,8 (35,90)
24 h	2,66± 0,05	23,70± 0,5 (34,00)	3,57± 0,23	31,80± 2,0 (37,70)
30 h	1,88± 0,23	16,80± 2,1 (27,40)	2,85± 0,25	25,40± 2,3 (31,00)

Los rendimientos máximos de glucosa en la hidrólisis de las cáscaras pretratadas molidas y no molidas son 36,60 y 35,50 respectivamente (Tabla 16), obtenidos a las 12 h. El ANOVA multifactorial indica que el tiempo afectó significativamente a la HE ($p = 0,0000$).

En las Figuras 37 y 38, se observan los rendimientos de glucosa y azúcares totales de la cascarilla pretratada molida y sin moler.

Las Figuras 37 y 38 muestran que los valores máximos de glucosa de la cáscara de arroz molida y sin moler no presentan diferencias significativas. En cascarilla de arroz molida todo el proceso es más rápido, alcanzando los valores máximos de producción de azúcares totales (glucosa, xilosa y arabinosa) a las 12h, llegando a obtenerse rendimientos de 41,20%. La glucosa producida a partir de la cáscara de arroz molida cae después de 12 h, pero la generación de azúcares de la cáscara de arroz sin moler continúa creciendo hasta las 24 h llegando a obtenerse rendimientos de 37,70%. Es decir, el uso de cascarilla de arroz sin moler es conveniente para la hidrólisis enzimática porque no es necesaria la molienda, lo que implica una disminución de los costos de procesamiento.

La reducción del tamaño de las partículas y el pretratamiento alcalino permiten aumentar la superficie interna de la celulosa, disminuyendo la cristalinidad y el grado de polimerización (Niño *et al.*, 2013). Todos estos efectos facilitan la accesibilidad de las enzimas al sustrato debido al aumento de la superficie disponible para las enzimas, lo que conduce a un proceso más rápido (Thompson *et al.*, 1992).

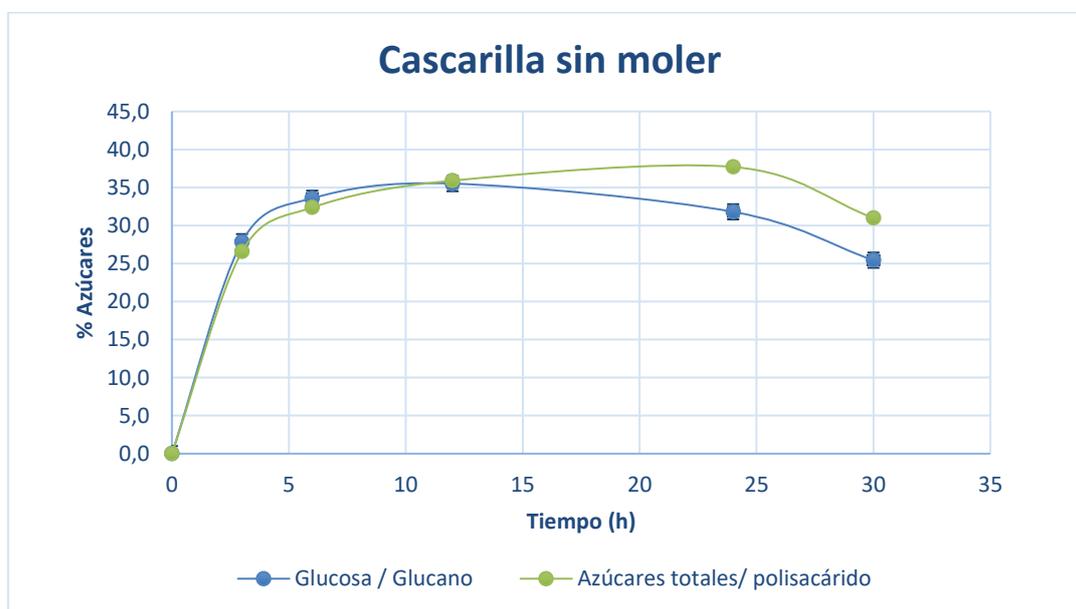


Figura 37. % Rendimiento de glucosa y azúcares totales de cascarilla pretratada sin moler

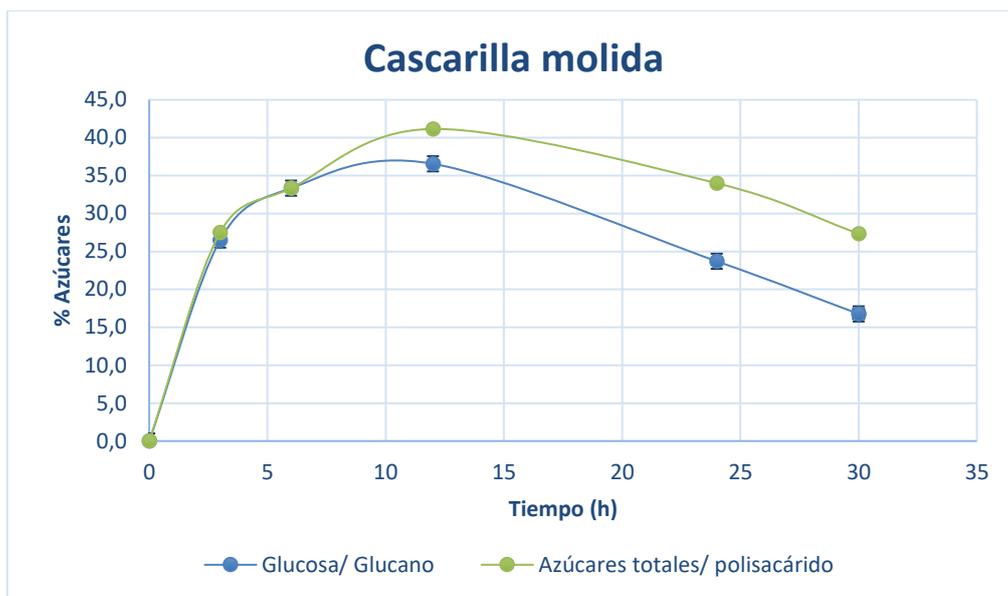


Figura 38. % Rendimiento de glucosa y azúcares totales de la cascarilla pretratada y molida.

En la Figura 39 se presenta la concentración (g/L) de glucosa y azúcares totales en cascarilla pretratada molida y sin moler. En los dos tipos de cascarilla se produjeron cantidades muy similares de azúcares totales (5,92 g azúcares totales/L con cascarilla molida y 5,87g azúcares totales/L con cascarilla sin moler), con la diferencia que en la cascarilla molida se llegó a esta concentración en 12 h y en la cascarilla sin moler en 24 h. En el caso de producción de glucosa también se generan cantidades muy similares (3,98 g glucosa/L con cascarilla sin moler y 4,20 g glucosa/L con cascarilla molida) y en los dos tipos de cascarilla se llegó al máximo de rendimientos a las 12 h de proceso. También cabe mencionarse que en la cascarilla sin moler la disminución de la producción de glucosa no llega a ser tan alta como en la cascarilla molida. Lo anterior muestra que no existe gran diferencia, tanto para la producción de glucosa como de azúcares totales para los dos tipos de cascarilla.

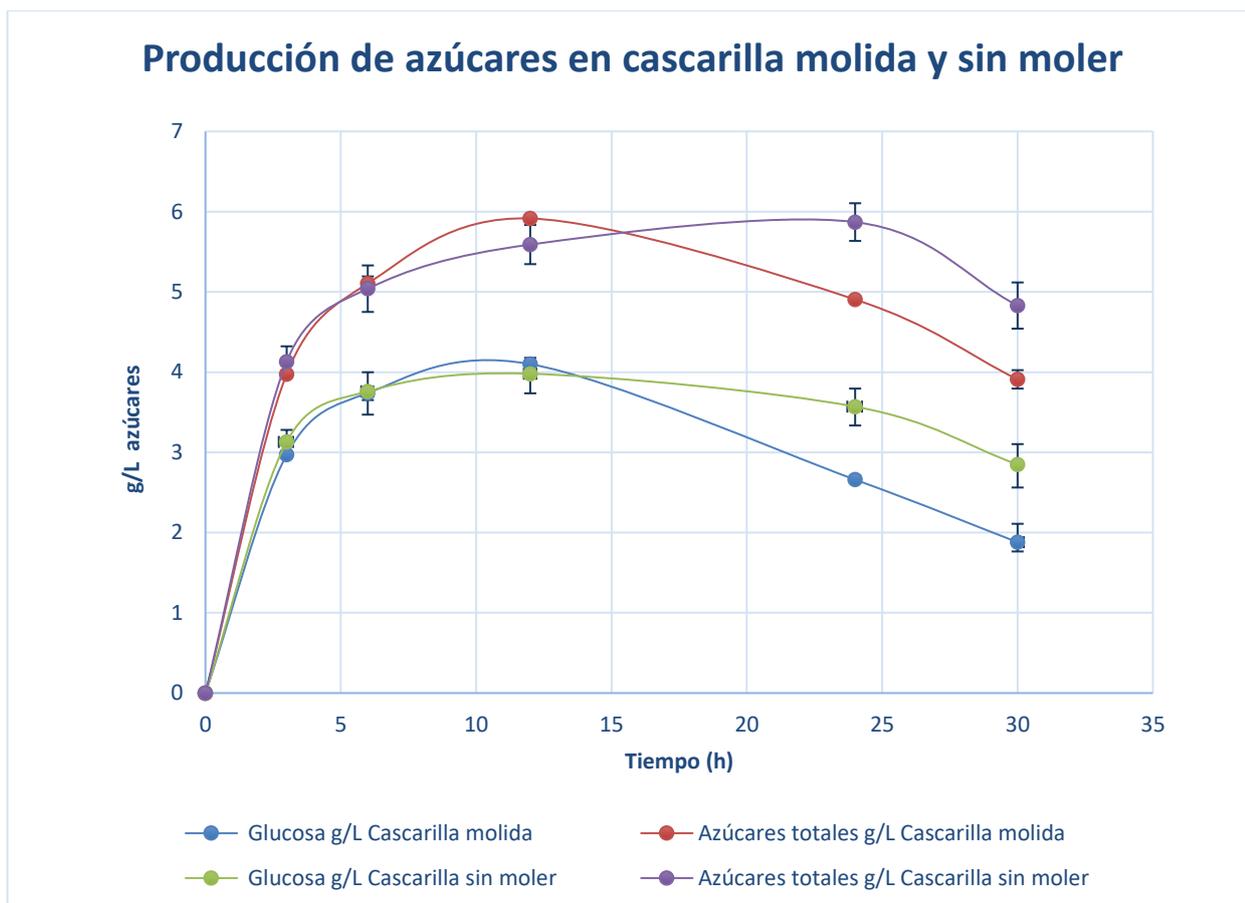


Figura 39. Concentración (g/L) de glucosa y azúcares totales en cascarilla molida y sin moler.

La comparación de medias de glucosa en la hidrólisis enzimática de la cascarilla indicó que existen diferencias significativas en las variables tiempo ($p= 0,000$) y tipo de cascarilla ($p= 0,00137$).

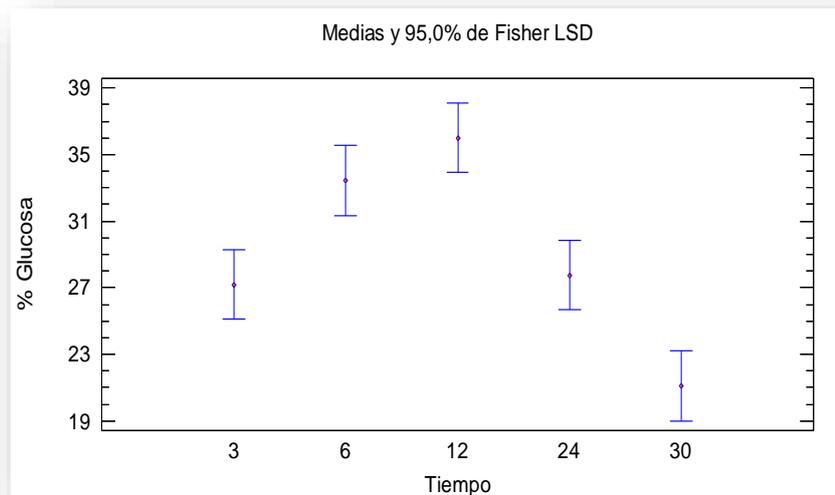


Figura 40. Diferencia de medias de producción de glucosa a los diferentes tiempos de los dos tipos de cascarilla

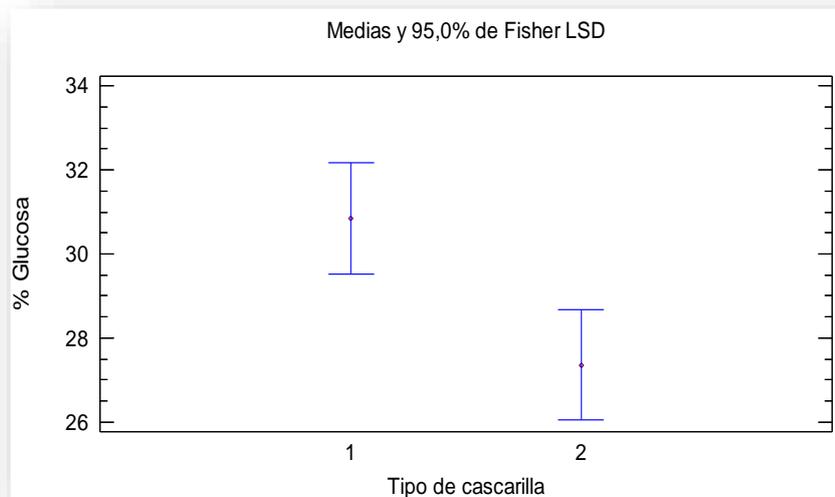


Figura 41. Diferencia de medias de producción de glucosa de los dos tipos de cascarilla

Estos resultados evidencian diferencias significativas en las medias de producción de glucosa en los tiempos estudiados, debido a que la cascarilla molida se hidrolizó más rápido, por lo tanto, el descenso de la producción de glucosa se dio más rápido que en la cascarilla sin moler. Del mismo modo hay diferencias significativas en las medias de producción de glucosa para cascarilla molida (1) y sin moler

(2), debido a que el máximo rendimiento de la cascarilla sin moler se logra a las 24 h, y el descenso de producción de glucosa no es tan significativo como en el caso de la biomasa molida.

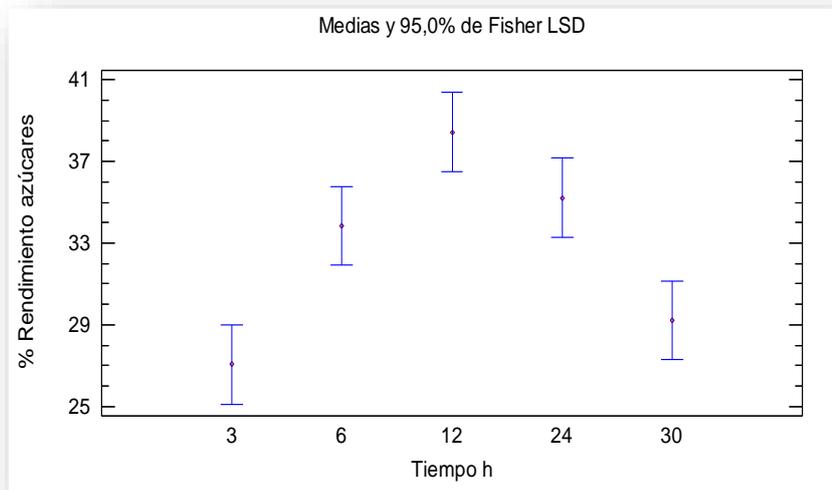


Figura 42. Diferencia de medias de producción de azúcares totales a los diferentes tiempos en cascarilla molida y sin moler.

El análisis estadístico presentó diferencias significativas en la producción de azúcares a los diferentes tiempos para los dos tipos de cascarilla, los resultados de la gráfica evidencian diferencias a las 3h, 12h, 24h y 30h de proceso.

En las Figuras 43 y 44, se observan los rendimientos de producción de glucosa, xilosa y arabinosa en los dos tipos de cascarilla.

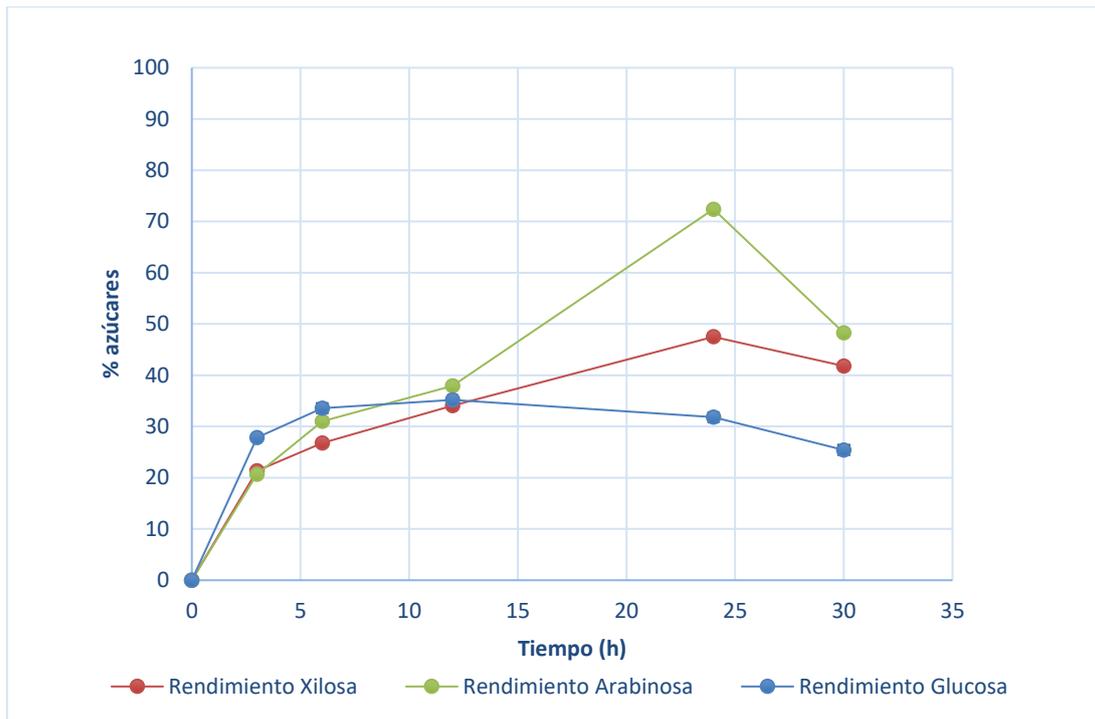


Figura 43. % Rendimientos de carbohidratos de la cascarilla sin moler

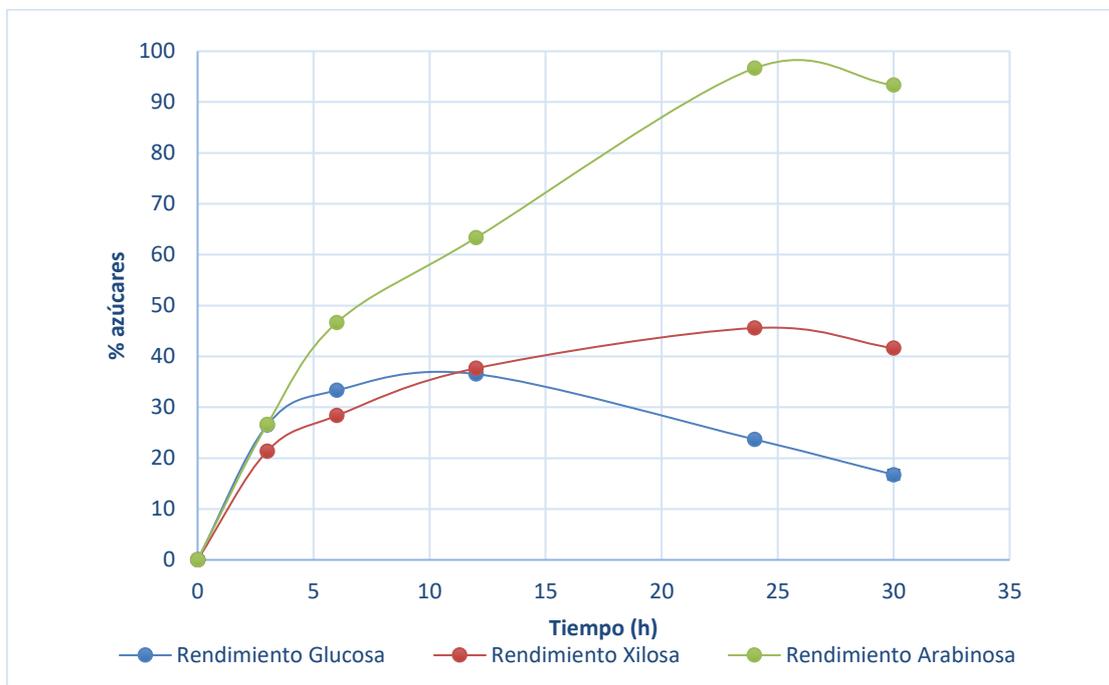


Figura 44. % Rendimientos de carbohidratos de la cascarilla molida

Las Figuras 43 y 44, muestran que los carbohidratos que se hidrolizan mayoritariamente son los arabinanos y xilanos y seguidamente la celulosa. Los arabinanos son hidrolizados casi totalmente en los dos tipos de cascarilla (72,41 - 96%). Los xilanos se sacarificaron en un rango de 45 - 47% para los dos tipos de cascarilla, y la celulosa se hidrolizó minoritariamente, con rendimientos alrededor del 40%.

La celulosa se hidrolizó con rendimientos más bajos que los otros carbohidratos, debido a que las enzimas para sacarificar la celulosa requieren inicialmente hidrolizar las pentosas, que son las estructuras más accesibles, para luego ingresar a la celulosa. La presencia de cantidades significativas de lignina obstaculiza también el ingreso de las enzimas a la celulosa. La acción sinérgica de todas las enzimas que conforman el cóctel permitió la hidrólisis de los azúcares presentes, propiciando la inhibición de la enzima por liberación de distintos tipos de azúcares y finalmente estas causas repercuten en los rendimientos.

Muchos factores influyen en el desempeño de la hidrólisis enzimática, como son el tipo de biomasa, la carga enzimática, el cóctel de enzimas utilizado y el tiempo de hidrólisis, pero la severidad del pretratamiento parece tener la mayor importancia. En este trabajo se obtuvieron rendimientos de 37,70% para cáscara de arroz sin moler y 41,20% para cáscara molida. La Tabla 17, muestra que se reportaron rendimientos de hidrólisis entre 20% y 50% para cascarilla de arroz pretratada con explosión de vapor, peróxido alcalino, ácidos a altas temperaturas y con mayores dosis y tiempos de hidrólisis. Los rendimientos de hidrólisis obtenidos en este trabajo, utilizando condiciones de pretratamiento más suaves, menor dosis de enzima y menor tiempo se encuentran dentro de ese rango de los reportados en la literatura. Esto es prometedor en el desarrollo de un proceso, pero para mejorar el rendimiento de azúcares fermentables podría ser necesario el uso de un exceso de enzimas, como las xilanasas.

Por otro lado, otros autores trabajando con materias primas como la hoja de yuca, pasto (*Guinea Grass*) y el bagazo de caña de azúcar alcanzaron rendimientos de hidrólisis entre 52,9% y 78,9%, pero los pretratamientos involucran temperaturas más altas, mayores cantidades de hidróxido de sodio y tiempos más largos que los de este trabajo.

Tabla 17. Comparación de rendimientos de hidrólisis enzimática para diferentes biomásas por SHF

Biomasa (Concentración en la HE)	Pretratamiento	Tiempo (h)	Tamaño de partícula	Carga enzimática	Rendimiento (%) de azúcares en la HE	Rendimiento (%) de Bioetanol Tiempo (h) de fermentación	Referencias
Hojas de mandioca (8% p/v)	Alcalino (10% p/v sustrato, 4,5% p/v NaOH, 121°C, 60 min)	18	0,6 mm	18,96 FPU/g sustrato, <i>Acellerasa</i> 1500	52,9% (azúcares totales/biomasa)	88,5%, SHF (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 98h)	(Niño, 2012)
Pasto Guinea (<i>Panicum maximum</i>) (5% p/p)	Ácido (H ₂ SO ₄ 12% p/p sustrato, 1,5% p/v H ₂ SO ₄ , 130°C, 60 min)	48	2 mm	25 BHU/ g sustrato 0,27 CBU/ g sustrato (Novozymes celulasas y β- glucosidasas	38% (azúcares totales/biomasa)		(Castillo- Saldarriaga and Velásquez - Lozano, 2018)
Bagazo de caña (5% p/p)	Explosión de vapor (200-215-230°C, 5min)	72	--	15 FPU/ g sustrato of cellulase mixture, 20 UI/ g substrate of β- glucosidase (Novozymes)	60% (200°C), 82% (215°C) y 90% (230°C) base de glucanos		(Amores <i>et al.</i> , 2013)
Bagazo de caña (sólido: 1:10 p/v)	Hidrotérmico (170 C, líquido: sólido: 6:1, 60min) y Organosolv (etanol: agua: 1:1 v/v, 160 and 190 C, 30– 150min, líquido: sólido: 3:9)	48	Pulpa	10 FPU celulasas de (<i>Trichoderma reesei</i>) y 20IU de β-glucosidasas de (<i>Aspergillus niger</i>) /g sustrato	61,8 – 78,9 % (En base a celulosa)		(Vallejos <i>et al.</i> , 2019)
Cascarilla de arroz	Peróxido alcalino (biomasa:líquido:	24	1.18 mm	35 FPU/ g sustrato celulasa de	20,5% Base biomasa		(Ayeni <i>et al.</i> , 2018)

(3% p/v)	1:20, pH 11,5. Condiciones óptimas H ₂ O ₂ 1.38% v/v, 109°C, 2h			(<i>Trichoderma reesei</i>)			
Cascarilla de arroz (10 % p/v)	Ácido. Condiciones óptimas. 5% p/p sustrato, 0,3% p/v H ₂ SO ₄ , 152°C, 33 min	48	<10 mm × 1 mm.	40 FPU/ g glucanos endoglucanasas, 18 FPU/g biomasa, celobiasa de Novozymes endoglucanasa: celobiasa 10:1	Alrededor del 50% de glucanos (22,2% en base de biomasa)	SHF (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 72h) 4.42 g/l bioetanol, 84% de conversión	(Dagnino <i>et al.</i> , 2013)
Cascarilla de arroz (10 % p/v)	Ácido – Condiciones óptimas (10% p/v sustrato, 1 % ácido sulfúrico, 121°C, 1h)	48	Flour (between 80 y 100 mesh)	40 FPU/ g glucanos de Cellic CTec 2	79,8 % En base glucanos		(Lamb <i>et al.</i> , 2018)
Cascarilla de arroz (10% p/v)	Explosión de vapor, 205°C, 11,5 min	72	--	20 FPU/g sustrato, Celluclast complejo celulolítico	37,2% En base glucanos	--	(Montipó <i>et al.</i> , 2019)
Cascarilla de arroz (2% p/v)	Alcalino (10% p/v sustrato, 3% p/v NaOH, 121°C, 60 min)	12	<2 mm (cascarilla molida)	30 FPU/ g glucanos de Cellic CTec2 (alrededor de 16 FPU/g sustrato)	37,5% en base glucanos (cascarilla sin moler), 41,16 % base glucanos (molida)	SHF (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1181), 13h, 35,3%	Este trabajo

4.4.4. Evaluación del tipo de proceso de producción de bioetanol

Los ensayos de SHF y SSF se realizaron con cascarilla de arroz molida, aunque como se ha mencionado anteriormente se puede utilizar cualquier tipo de cascarilla, molida o sin moler, ya que la granulometría no produce diferencias significativas en la producción de azúcares. También es importante a tener en cuenta que a mayor escala se haría necesario evaluar que costo genera la molienda.

Las condiciones óptimas para proceso SSF fueron: 30 FPU/ glucano enzimas Cellic CTec2, Tween 0,3 g/L, pH 5,0 tampón citrato de sodio, agitación preinóculo e inóculo 180 rpm, agitación medio de fermentación 130 rpm.

Las condiciones óptimas para proceso SHF fueron: 30 FPU/ glucano enzimas Cellic CTec2, Tween 0,3 g/L, pH 5,0 tampón citrato de sodio, agitación preinóculo e inóculo 180 rpm, agitación medio de fermentación 130 rpm. Tiempo de hidrólisis enzimática 13 h.

La Tabla 18, muestra la concentración promedio de bioetanol y rendimientos de bioetanol en los procesos SHF y SSF usando levadura SC 1181.

Tabla 18. Comparación de la hidrólisis seguida de fermentación (SHF) versus sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) usando *S. cerevisiae* 1181

Tiempo	SHF			SSF		
	Concentración Bioetanol (g/L)	Productividad (g/L*h)	Rendimiento Bioetanol (%)	Concentración Bioetanol (g/L)	Productividad (g/L*h)	Rendimiento Bioetanol (%)
12 h	2,00± 0,01	0,166	35,3± 0,2	1,16± 0,08	0,096	20,3± 1,4
20 h	1,90± 0,03	0,095	33,4± 0,5	1,89±0,12	0,095	33,2± 2,0
24 h	1,72± 0,04	0,071	30,2± 0,7	1,85±0,16	0,077	32,6± 2,9
36 h				1,94±0,01	0,054	34,2± 0,2
48 h				2.02±0,01	0,042	35,6± 0,2
72 h				2.17±0,03	0,030	38,2± 0,5

La evolución de los rendimientos de ambos procesos se muestra mejor en la Figura 45. La producción máxima de etanol en el SHF se obtuvo a las 12 h aproximadamente, con un valor de rendimiento de ~ 35 %. Por el contrario, mediante SSF un rendimiento similar (~ 36%) se alcanzó recién a las 48 h. En este último proceso (SSF), a las 12 h se alcanzó un rendimiento de etanol de ~20 %, el cual continuó aumentando hasta alcanzar un valor de ~ 38 %, a las 72 h de fermentación.

La rápida conversión a etanol del proceso SHF se produce porque los azúcares están disponibles desde el principio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el proceso de hidrólisis anterior consumió 12 h. Por el contrario, la lenta liberación de azúcares del proceso de SSF hace que la conversión a etanol sea más lenta, pero a su vez, se mantiene en el tiempo, logrando mayores rendimientos.

El proceso SSF no presenta inhibición de azúcares como el SHF, porque los microorganismos consumen los azúcares a medida que se generan. lo que sugiere que es posible obtener mayores rendimientos aumentando el tiempo, lo que hace que este proceso sea más prometedor que el SHF. También se observa que de 24 h en adelante en el SSF se presenta aumento constante de bioetanol hasta 72 h, por lo que se deduce que es muy probable que de 72 h en adelante se continúe generando bioetanol.

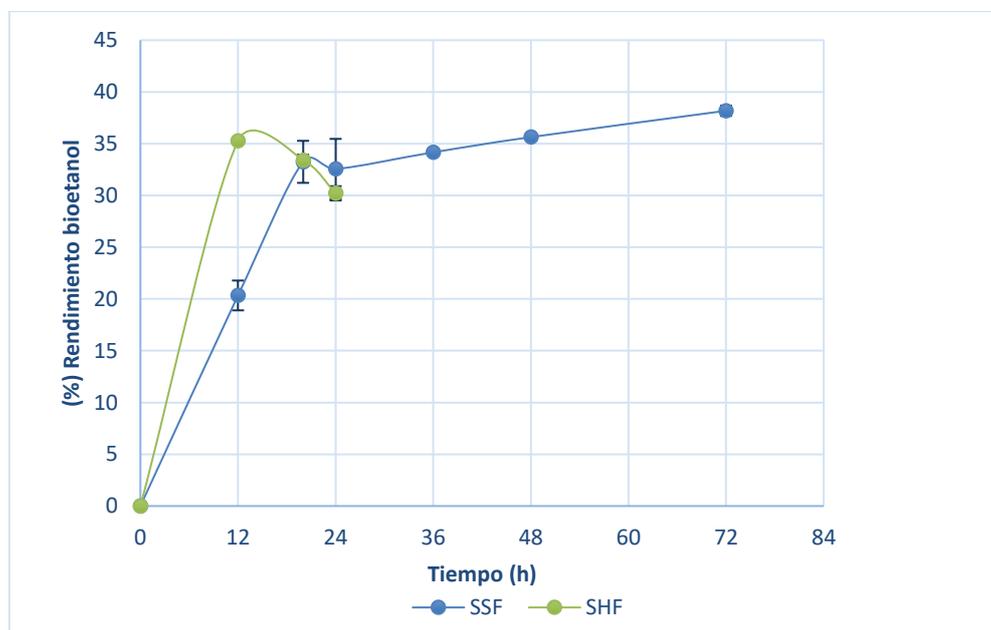


Figura 45. Comparación de hidrólisis seguida de fermentación e hidrólisis y fermentación simultáneas, usando *S. cerevisiae 1181*

En la Figura 46, se muestran las concentraciones (g/L) de glucosa, bioetanol, xilosa y arabinosa presentes en el proceso SHF. Se observa que a medida que avanza el proceso SHF, la concentración de glucosa desciende y el bioetanol aumenta las primeras 12 h y empieza a descender desde las 20 h en adelante. La glucosa residual presente en el medio desde las 12 h fue despreciable, motivo por el cual finalizó la producción de etanol.

Por otra parte, también se observa la presencia de otros azúcares como xilosa y arabinosa, debido a que las enzimas pueden hidrolizar también azúcares de cinco átomos de carbono, pero estos no son aprovechados por *S. cerevisiae* para la producción de bioetanol.

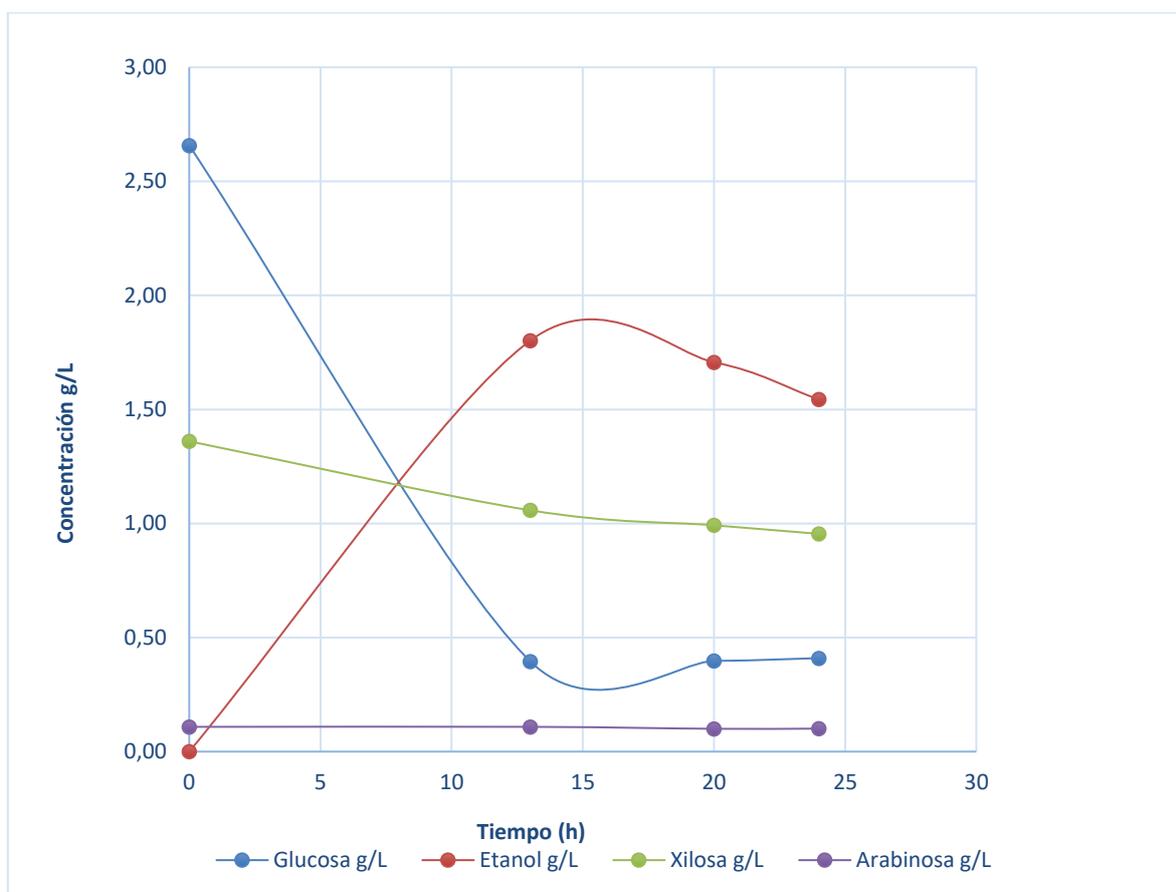


Figura 46. Producción de bioetanol, glucosa, y presencia de otros carbohidratos en SHF con SC 1181.

En la Figura 47, se muestra la concentración de bioetanol, glucosa, xilosa y arabinosa en el SSF con SC 1181. Se puede observar que la mayor cantidad de bioetanol se produjo dentro de las 20 h de proceso y de ahí en adelante se mantuvo constante hasta las 72 h, en que se alcanzó la máxima producción de bioetanol (2,1 g/L). Es posible que de 72 h en adelante continúe la producción de bioetanol. La glucosa presente en el SSF es poco significativa, debido a que las enzimas se encuentran continuamente hidrolizando y los microorganismos continuamente fermentando los azúcares. Por otra parte, también se evidencia la producción de xilosa, que fue máxima a las 48 h (1,37 g/L), igualmente la arabinosa, que también llega a su mayor producción a las 48 h (0,21 g/L). Comparando la producción de bioetanol de esta levadura con *S. cerevisiae* 1507, se observa que es más lenta, posiblemente porque todos los azúcares se encuentran en el medio, como la glucosa y otros que el microorganismo no utiliza, esto puede ralentizar su actividad, ya que se observa que aún después de las 72 h esta levadura sigue fermentando. Debido a lo anterior se decidió seguir ensayando el SSF con otro microorganismo y observar su comportamiento en el transcurso del proceso fermentativo.

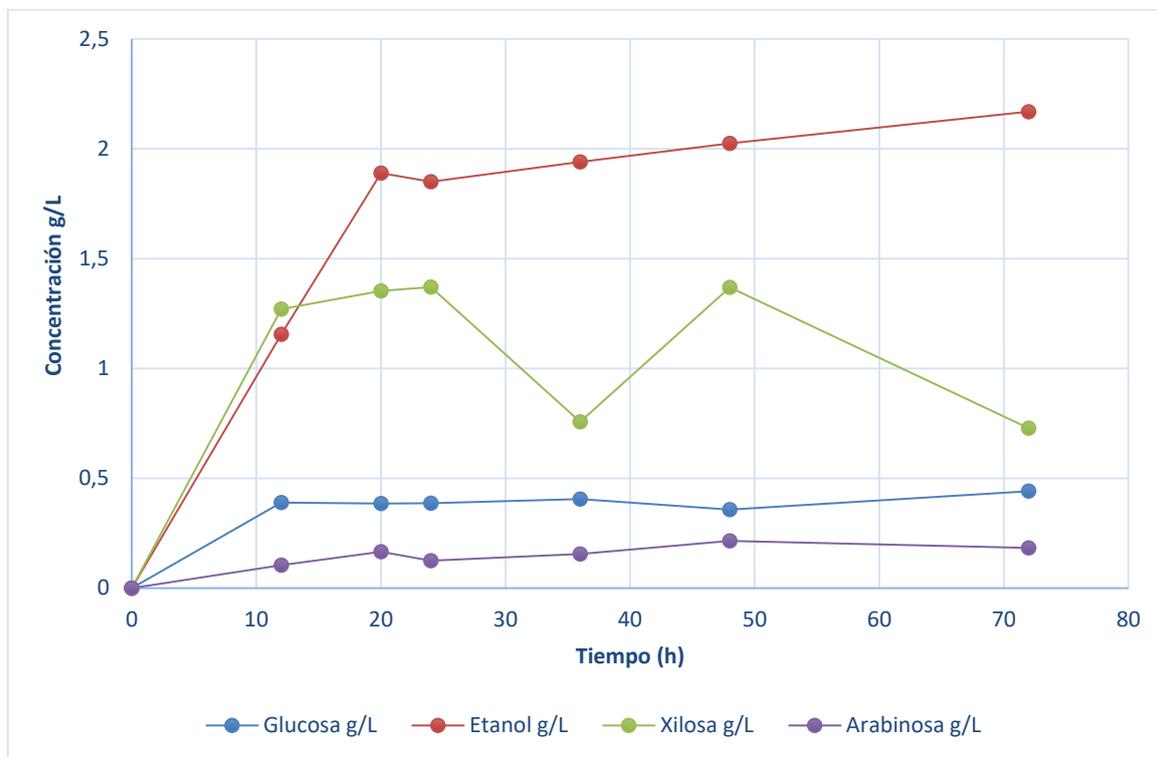


Figura 47. Producción de bioetanol, glucosa, y otros carbohidratos en SSF con SC 1181

En la Figura 48, se muestra la producción de bioetanol, el descenso de la glucosa, y la producción de otros azúcares presentes en el SSF con *S. cerevisiae* 1507. El proceso SSF con este microorganismo evidenció mejor rendimiento de producción de bioetanol, llegando a una concentración máxima de 2,49 g/L a las 48 h. La mayor producción de bioetanol se observó en las primeras 26 h de proceso, la glucosa se mantuvo en valores cercanos a cero, ya que este microorganismo consume la glucosa a medida que se genera durante la sacarificación. Después de 48 h se evidencia un leve descenso de bioetanol y nada de glucosa, debido a que los microorganismos ya habían consumido la totalidad del sustrato y por esta razón se presenta el descenso de bioetanol. Por otra parte, la producción máxima de otros azúcares como la xilosa y arabinosa se presenta hasta las 48 h, de ahí en adelante descienden, muy posiblemente porque las enzimas habían finalizado el proceso de sacarificación.

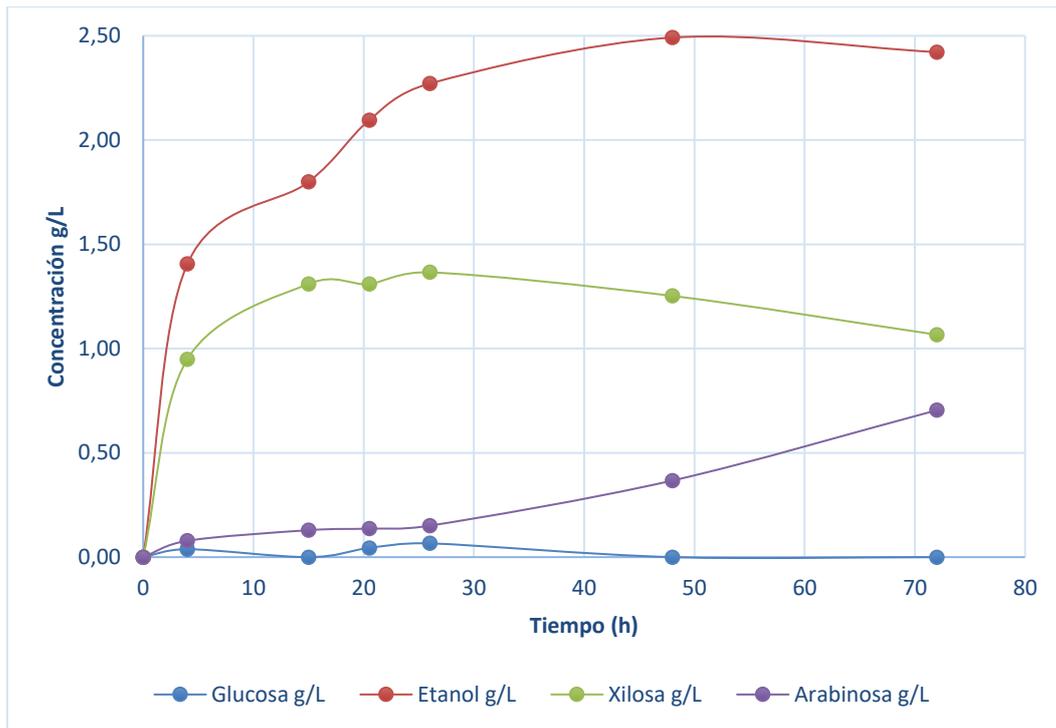


Figura 48. Producción de bioetanol, glucosa y otros carbohidratos en SSF con SC 1507

La Tabla 19, muestra los rendimientos de SSF de otros trabajos, que son comparados con los resultados obtenidos en esta investigación.

Tabla 19. (%) Rendimientos de hidrólisis enzimática en diferentes biomásas

Biomasa (Cantidad)	Pretratamiento	Carga Enzimática	Proceso	% Rendimiento de Bioetanol	Referencias
Racimos de palma de aceite (10%)	Dos secuencias: 0,2M ácido sulfúrico, 121°C, 53 min; 5%w/v NaOH, 121°C, 20 min	Celulasa y β-glucosidasa 5:1 (20 FPU/g y 4 U/g de sustrato). Condiciones óptimas: 12,24% p/v, pH 4,5, levadura 2,04% v/v, 36,94°C	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , 48 h	68,6%	(Sukhang <i>et al.</i> , 2019)
Cáscaras de coco verde (4%)	Autohidrólisis (sólido/líquido: 1:10 v/w, 200°C, 50 min (factor de severidad:4,64)	30 FPU/ g sustrato de Cellic CTec2 y 130 IU/ g sustrato de Cellic HTec2	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. stipitis</i> , <i>Z. mobilis</i> , 48 h	86,90%, 84,19%, 85,6%, respectivamente	(Goncalves <i>et al.</i> , 2015)
Bagazo de caña (16%)	Explosión de vapor, 215°C, 5min.	20 FPU/ g sustrato de mezcla de Celulasa y 20 UI/ g sustrato de β-Glucosidasa (Novozymes)	<i>S. cerevisiae</i> , Ethanol Red, 72 h	63,1%	(Amores <i>et al.</i> , 2013)
Cascarilla de arroz (3%)	Peróxido alcalino (biomasa:líquido: 1:20, pH 11,5. Condiciones óptimas: H ₂ O ₂ 1,38% v/v, 109°C, 2 h	35 FPU/ g sustrato de celulasa de <i>Trichoderma reesei</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 96h	33%	(Ayeni <i>et al.</i> , 2018)
Cascarilla de arroz (20%)	Explosión de vapor (205°C, 11,5min)	20 FPU/ g sustrato de Celluclast 1,5 L	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT- 1, 72h	34,8%	(Montipó <i>et al.</i> , 2019)
Paja de arroz (8%)	Ácido (100 mg H ₂ SO ₄ /g biomasa seca; 1:10 biomasa seca/solución ácida; 120°C, 30 min)	25 FPU/ g sustrato Cellubrix y 25 UI/ g sustrato Novozyme 188	<i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860, 45°C, 6h	82%	(Castro and Roberto, 2014)

Cascarilla de arroz (2%)	Alcalino (10% p/v sustrato, 3% p/v NaOH, 121°C, 60 min)	30 FPU/ g glucanos Cellic CTec2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IMRL-1181, 72 h	38,2%	Este trabajo
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IMRL-1507, 48 h	43,9%	

4.4.5. Influencia del tipo de levadura

En la Figura 49, se muestra el rendimiento de bioetanol en el proceso SSF aplicado a cascarilla de arroz molida y pretratada, utilizando las dos levaduras estudiadas (*S. cerevisiae* 1181 y *S. cerevisiae* 1507).

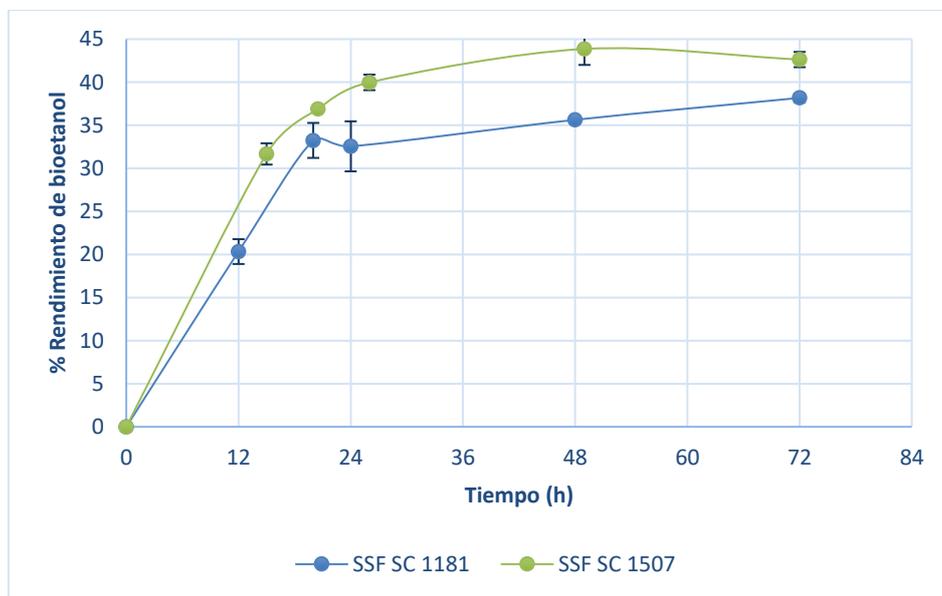


Figura 49. Comparación del tratamiento SSF utilizando SC 1181 y SC 1507

La levadura *S. cerevisiae* 1507 mostró el mejor desempeño en todo momento, obteniendo el rendimiento máximo de bioetanol del 44% en 48h, 7% más alto que el obtenido con *S. cerevisiae* 1181 a las 72h. Por el contrario, en el caso de la levadura *S. cerevisiae* 1181, la cantidad de bioetanol siguió aumentando hasta las 72h, aunque sin igualar el nivel de la otra.

Cantidades significativas de hemicelulosas y lignina permanecieron en la biomasa debido al pretratamiento alcalino suave, lo que dificultó la eficiencia de la HE y, en consecuencia, la producción de bioetanol. Sin embargo, se obtuvieron rendimientos de bioetanol de alrededor del 44% en 48 h (desde ese momento se mantuvo constante).

4.5. PROPUESTAS PARA EL APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LA CASCARILLA DE ARROZ

Se presenta a continuación una propuesta para realizar un tratamiento de los residuos generados en el proceso. Para una biorrefinería de cáscara de arroz, el procesamiento propuesto muestra una perspectiva interesante. Por un lado, el pretratamiento extrae el 87% de la sílice original de la cáscara, que constituye el 24% del material. La sílice se puede separar del licor residual y comercializarse para

la industria electrónica. También es posible que el licor residual se pueda reutilizar para otros pretratamientos, debido a que el líquido queda impregnado con gran cantidad de hidróxido de sodio, por lo que para su eliminación sin generar mayor contaminación se haría necesaria su neutralización.

Además, después de la producción de bioetanol por el proceso SSF (rendimiento del 38-44%), el 70% aproximadamente del material sólido restante presentará una alta porosidad, lo que lo convierte en un material ideal para la producción de carbón activado.

En otro escenario, los azúcares de cinco átomos de carbono se pueden utilizar para la producción de xilitol utilizando levaduras silvestres, no modificadas genéticamente, aprovechando todos los carbohidratos hidrolizados.

Por último, el residuo sólido de los procesos SSF o SHF, que contiene microorganismos y enzimas, puede utilizarse como fertilizante orgánico en la agricultura.

La cascarilla sirve como humus, bocashi completamente orgánico. También la cascarilla carbonizada aporta nutrientes a los suelos agrícolas como fuente de fósforo y potasio.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

- Las variables FPU/g celulosa, pH, tiempo, temperatura, concentración de surfactante y agitación resultaron tener efecto significativo en el proceso de hidrólisis enzimática para 1% de celulosa disponible, con los diseños realizados con las enzimas Cellic CTec2.
- En la hidrólisis con 30,0 FPU/ g celulosa y pH 5,0 durante 13,0 horas, empleando las enzimas Cellic CTec2, se obtiene un rendimiento de azúcares del 41,2%. El lapso es corto en comparación con otros procesos de hidrólisis enzimática que usualmente emplean entre 48-72 horas de proceso.
- En el proceso de hidrólisis enzimática se observó que no es necesario el tamizaje, ya que la disminución de tamaño de partícula no ejerce ningún efecto sobre los rendimientos de hidrólisis, debido a que la cascarilla de arroz en su forma natural posee un tamaño de partícula pequeño.
- En el proceso de hidrólisis enzimática con las enzimas Cellic CTec2, se puede utilizar cascarilla molida o sin moler, ya que las dos generan rendimientos de azúcares similares. En el caso de la cascarilla molida se producen más carbohidratos, pero es necesario evaluar el costo que implica la utilización de molienda en el proceso.
- La actividad enzimática de las celulasas de *Trichoderma reesei* con respecto a Cellic CTec2 resultó muy baja.
- Los pretratamientos con hidróxido de sodio y organosolv a altas temperaturas, remueven un mayor porcentaje de lignina y hemicelulosas, en comparación con el pretratamiento de hidróxido en autoclave. Sin embargo, se optó por seguir utilizando el pretratamiento de hidróxido en autoclave porque posee condiciones menos severas y el equipamiento es más accesible.
- Si se considera la suma de los tiempos de hidrólisis y fermentación, el proceso SHF es menos eficiente. Además, la producción alcanza un máximo y desciende rápidamente. La producción de bioetanol del proceso SSF es superior y sigue aumentando después de 72 horas, por lo que podría incrementarse con un proceso optimizado.
- La levadura *Saccharomyces cerevisiae* 1507 presentó mejor rendimiento de bioetanol obteniendo la máxima producción de bioetanol a las 48 h (alrededor del 44%).
- Los rendimientos de etanol obtenidos son aceptables, dado el tiempo de procesamiento, el pretratamiento en condiciones suaves y la moderada carga enzimática utilizada en el proceso.

- Los carbohidratos y residuos de cascarilla, tanto del proceso separado como simultáneo, sugieren una posible biorrefinería, o utilización de otros microorganismos, para un aprovechamiento integral de todos los componentes de la biomasa utilizada.

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES

- Continuar el estudio del SSF de microorganismos como *Kluyveromyces marxianus* que fueron cedidas por el Laboratorio de Micología del Centro de Medicina Regional de Resistencia.
- Analizar e investigar el aumento de sólidos en la hidrólisis enzimática con miras a lograr una carga de sólidos que permita obtener cantidades significativas de bioetanol en el SSF.
- Analizar y comparar los procesos SHF con el proceso SSF con otros microorganismos.
- Analizar e investigar más factores que influyen en el SSF, como la aplicación de diferentes cargas de densidad celular, realizar SSF con aumento de carga de sólidos, etc.
- El aumento de sólidos a hidrolizar es una opción que permitiría mayor aprovechamiento de la biomasa al obtener el 51% de azúcares fermentables, pero se hace necesario continuar la investigación sobre este proceso si es posible aumentando el tiempo de hidrólisis, obtener mayor conversión de glucosa.

BIBLIOGRAFÍA

Abdel-banat, B. y Hoshida, H., 2010 "High-temperature fermentation : how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 pp. 861–867. doi: 10.1007/s00253-009-2248-5.

Agrotendencia Blog, 2020. Available at: <https://agrotendencia.tv/agropedia/el-cultivo-de-arroz/>.

Almeida, J., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hägerdal, B., Liden, G., Gorwa, G., 2007 "Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82(4), pp. 340–349. doi: 10.1002/jctb.1676.

Alvarez, J., Lopez, G., Amutio, M., Bilbao, J., Olazar, M., 2014 "Bio-oil production from rice husk fast pyrolysis in a conical spouted bed reactor". *FUEL*. 128, pp. 162–169. doi: 10.1016/j.fuel.2014.02.074.

Amores, I., Ballesteros, I., Manzanares, P., Sáez, F., Michelena, G., 2013 "Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Pretreated by Steam Explosion". *Electron J Energy Environ.*, 1(1), pp. 25-36. <https://doi.org/10.7770/ejee-V1N1-art486>

Area, M. C., y Vallejos, M. E., 2012 "Biorefinery from lignocellulosic waste. Conversion of waste to high value products". Académica Spanish Editorial. Saarbrücken, Germany. ISBN 978-3-659-05295-8.

Arismendy, A. M., Sequeira, M., Felissia, F., Chamorro, E., Area, M. C., 2017 "Evaluación de Cepas Fermentativas en la Hidrólisis y Fermentación Simultáneas (SSF) de Cascarilla de Arroz para la Producción de Bioetanol". *RTyC*. 30 (1), pp. 357-363. <http://rtyc.utn.edu.ar/index.php/rtyc/article/view/179>

Arismendy, A. M., Restrepo, A. F., Alcaraz, W., Chamorro, E., Area, M. C., 2019 "Optimización de la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz" *RECYT*. 32 (1), pp. 64-70. <https://doi.org/10.36995/j.recyt.2019.32.010>

Arvidsson, M., Hackl, R., Harvey, S., 2011 "Process integration study of a biorefinery producing ethylene from lignocellulosic feedstock for a chemical cluster." 6th Dubrovnik Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems. Dubrovnik. Croatia.

Ayeni, A. O., Daramola, M. O., Sekoai, P. T., Adeyo, O., Garba M. J., Awosusi, A. 2018 "Statistical modelling and optimization of alkaline peroxide oxidation pretreatment process on rice husk cellulosic biomass to enhance enzymatic convertibility and fermentation to ethanol". *Cellulose*. 25(4). <https://doi.org/10.1007/s10570-018-1714-6>.

Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, I., 2004 "Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875". *Process Biochem.* 39 (1), pp. 1843-1848. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.011>

Bansal, P., Hall, M., Realff, M.J., Lee, J.H., Bommarius, A.S., 2009 "Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates." *Biotechnol. Adv.* 27 (3), pp. 833–848.

Binod, P., Sindhu, R., Singhanian, R.R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., 2010. "Bioethanol production from rice straw: an overview". *Bioresour. Technol.* 101 (1), pp. 4767–4774.

- Brandenburg, J., Poppele, I., Blomqvist, J., Puke, M., Pickova, J., Sandgren, M., Passoth, V., 2018 "Bioethanol and lipid production from the enzymatic hydrolysate of wheat straw after furfural extraction". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102(14), pp. 6269-6277.
- Cai, L., Ma, Y., Ma, X., L, J., 2016 "Improvement of enzymatic hydrolysis and ethanol production from corn stalk by alkali and N-methylmorpholine-N-oxide pretreatments". *Bioresour. Technol.* 212 (4), pp. 42-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.012>.
- Cacua, A., Gelvez, J. J., Rodríguez, D. C., Parra, J. W., 2018 "Production of bioethanol from rice husk pretreated with alkalis and hydrolyzed with acid cellulase at pilot scale "International Meeting on Applied Sciences and Engineering. doi :10.1088/1742-6596/1126/1/012034
- Cardona, C. y Sánchez, O., 2007 "Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities". *Bioresour. Technol.* 98(12), pp. 2415–2457. doi: 10.1016/j.biortech.2007.01.002.
- Carvalho, F., Duarte, L., Gírio, F., 2008 "Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments". *J Sci Ind Res.* 67(11), pp. 849–864.
- Carvalho, A.F.A., de Oliva, P., Da Silva, D.F., Pastore, G.M., 2013. "Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis". *Food Res.* 51 (1), pp.75–85.
- Castillo-saldarriaga, C. R, and Velásquez-lozano, M.E., 2018. " Efecto del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido sobre la hidrólisis enzimática del *Panicum maximum*". *Bio. Agro.* 16(1),pp. 68-79. doi: <http://dx.doi.org/10.18684/bsaa.v16n1.626>
- Cen, P. y Xia, L., 1999. "Production of cellulase by solid-state fermentation." In: Tsao GT, editor. *Recent progress in bio conversion of lignocelluloses.* , New York: Springer Berlin Heidelberg. pp. 69-92 .
- Chande, AK., Chandrasekhar, G., Silva, MB., da Silva SS., 2012 "There alm of cellulases in biorefinery development." *Crit. Rev. Biotechnol.* 32(3), pp. 187-202.
- Charoensopharat, K., Thanonkeo, P., Thanonkeo, S., Yamada, M., 2015 "Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers at high temperature by newly isolated thermotolerant inulin-utilizing yeast *Kluyveromyces marxianus* using consolidated bioprocessing". *Anton Leeuw Int J G* 108(1), pp. 173–190. doi: 10.1007/s10482-015-0476-5.
- Chen, Y., Stevens, M. A., Zhu, Y., 2013 "Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification." *Biotechnol. Biofuels.* pp. 2–10. doi: 10.1186/1754-6834-6-8
- Chen, H. and Qiu, W., 2010 "Key technologies for bioethanol production from lignocellulose". *Biotechnol. Adv.* 28(5), pp. 556–562. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.005.
- Chen, M., Zhao, J., Xia, L., 2009 "Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility." *Biomass Bioenerg.* 33(10), pp. 1381–1385. doi: 10.1016/j.biombioe.2009.05.025. 17.
- Cheong, S.H., Park, J.K., Kim, B.S., Chang, H.N., 1993 "Microencapsulation of yeast cells in the calcium alginate membrane". *Biotechnol Tech.* 7(12), pp. 879–884. doi:10.1007/BF00156366
- Cherry, J. R. and Fidantsef, A.L., 2003. "Directed evolution of industrial enzymes: an update". *Curr .Opin .Biotechnol.* 14 (2), pp.438–443. 32.
- Chi, C., Chang, H.M., Li, Z., Jameel, H., Zhang, Z., 2013 "A method for rapid determination of sugars in lignocellulose prehydrolyzate". *BioResources.* 8 (3), pp. 172–181.

Crespo, C.F., Badshah, M., Alvarez, M.T., Mattiasson, B., 2012 "Ethanol production by continuous fermentation of D-(+)-cellobiose, D-(+)-xylose and sugarcane bagasse hydrolysate using the thermoanaerobe *Caloramator boliviensis*". *Bioresour. Technol.* 103 (2), pp. 186–191.

Dagnino, E.P., Chamorro, E.R., Felissia, F.E., Area, M.C., 2013 "Optimization of the acid pretreatment step of rice hulls for bioethanol production". *Ind Crops Prod.* 42 (1), pp. 363-368.

Dowe, N. and McMillan, J., 2008 "SSF Experimental Protocols – Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation". Laboratory Analytical Procedure (NREL), Issue Date, <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42630.pdf>

Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, A., Sluiter, J. Y., Templeton, D., 2005 "Preparation of Samples for compositional Analysis". Laboratory Analytical Procedures, National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42620.

Herculano, P.N., Porto, T.S., Moreira, K.A., Pinto, G.A., Souza-Motta, C.M., Porto, A.L.F., 2011. "Cellulase production by *Aspergillus japonicus* URM5620 using waste from castor bean (*Ricinus communis* L.) under solid-state fermentation". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165 (2), pp. 1057–1067.

De Bekker, C., van Veluw, G.J., Vinck, A., Wiebenga, L.A., Wösten, H.A.B., 2011. "Heterogeneity of *Aspergillus niger* microcolonies in liquid shaken cultures". *Appl. Environ. Microbiol.* 77(2) , pp.1263–1267.

De Bernardi, L., 2016 " Perfil del Mercado del Arroz". Available at: <https://www.magyp.gob.ar/new/0-0/programas/dma/granos/Perfil%20de%20Mercado%20de%20Arroz%202017.pdf>

De La Torre, M., Martín-Sampedro, R., Fillat, Ú., Eugenio, M., Blánquez, A., Hernández, M., Arias, M., Ibarra, D., 2017 "Comparison of the efficiency of bacterial and fungal laccases in delignification and detoxification of steam-pretreated lignocellulosic biomass for bioethanol production". *J Ind Microbiol Biotechnol.* 44(11), pp. 1561–1573. doi: 10.1007/s10295-017-1977-1.

Desimone, M.F., Degrossi, J., D’Aquino, M., Diaz, L.E., 2002 "Ethanol tolerance in free and sol–gel immobilized *Saccharomyces cerevisiae*". *Biotechnol. Lett.* 24 (3),pp. 1557–1559.

Deswal, D., Khasa, Y., Kuhad, R., 2011 "Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation". *Bioresour Technol.* 102(10), pp. 6065–6072. doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.032. 23.

Dimarogona, M., Topakas, E., Christakopoulos, P., 2012 "Cellulose degradation by oxidative enzymes". *Comput. Struct. Biotechnol.* 3(2). doi: 10.5936/csbj.201209015

Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F., 2002 "Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose." *Enzyme Microb. Technol.* pp. 353–364.

FAO (2018) "www.fao.org/economic/RMM Rice-Network@fao.org," XXI(1).

Farinas, C.S., Vitcosque, G.L.,Fonseca R.F., Neto V.B., Couri S., 2011 "Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor". *Ind Crop Prod.* 34,pp.1186-1192.

Favaro, L., Viktor, M. J., Rose, S., Viljoen-Bloom, H., van Zyl, M., 2015 "Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases. *Biotechnol Bioeng.* 112(9). <https://doi.org/10.1002/bit.25591>

Fockink, D., Maceno, M., Ramos, L., 2015 "Production of cellulosic ethanol from cotton processing

- residues after pretreatment with dilute sodium hydroxide and enzymatic hydrolysis". *Bioresour. Technol.* 187(4), pp. 91–96. doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.096.
- Gámez, S., González-Cabriales, J., Ramírez, J., Gil, M., (2006) "Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid." *J. Food Eng.* 74(1), pp. 78–88. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.02.005.
- Gao, J., Yuan, W., Li, Y., Xiang, R., Hou, S., Zhong, S., Bai, F., 2015. "Transcriptional analysis of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production from inulin using consolidated bioprocessing technology." *Biotechnol. Biofuels.* 8(1), pp. 1–17. doi: 10.1186/s13068-015-0295-y.
- García-Aparicio, M.P., Oliva, J.M., Manzanares, P., Ballesteros, M., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J., 2011. "Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875". *Fuel.* 90(3), pp. 1624-1630. doi:10.1016/j.fuel.2010.10.052
- García-Cubero, M., González-Benito, G., Indacoechea, I., Coca, M., Bolado, S., 2009. "Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw." *Bioresour. Technol.* 100(4), pp. 1608–1613. doi: 10.1016/j.biortech.2008.09.012.
- Garriga, M. L., González, S., Erenio, Castro, G. E., Ruiz, R.E., Romero, I., Cara, C., 2009 "Evaluación de componentes accesorios en la hidrólisis enzimática del bagazo de la caña de azúcar pretratado para la producción de etanol". *Revista Cubana de Química.* 21(2), pp. 80-87.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. "Hemicelluloses for fuel ethanol: A review," *Bioresour. Technol.* 101(13), pp. 4775–4800. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- Ghose, T. K., 1987. "MEASUREMENT OF CELLULASE ACTIVITIES, IUPAC." 59 (2), pp. 257-268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Glasser, W., 2000 "Lignin: Historical, Biological and Materials Perspectives." American Chemical Society.
- Goncálves, F. A., Ruiz, H. A., dos Santos, E. S., Teixeira, J.A., de Macedo, G. R., 2015 "Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis". *Ind Crop Prod.* 77, pp. 1-12.
- González, A. M., 2005. Cátedra de Botánica Morfológica, Universidad Nacional del Nordeste. Available: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/animaciones/ciclos/arroz/ciclo%20normal/presentac-normal.html>
- Hasunuma, T. and Kondo, A., 2012. "Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering." *Biotechnol. Adv.* 30(6), pp. 1207–1218. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.10.011.
- Hernández-Salas, J. M., Villa-Ramírez, M. S., Veloz-Rendón, J. S., Rivera-Hernández, K. N., González-César, R. A., Plascencia-Espinosa, M. A., Trejo-Estrada, S. R., 2009 "Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse." *Bioresour. Technol.* 100(3), pp. 1238–1245. doi: 10.1016/j.biortech.2006.09.062.
- Herrera, F., 2013 "Viabilidad técnica de la producción de etanol a partir de la fracción hemicelulósica de residuos de palma africana usando *Pichia stipitis*". Tesis de maestría. Universidad Nacional Sede Medellín, Colombia.
- Himmel, M. E., Ding, S.Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., 2007 "Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production". *Science*, 315, pp. 804-807. doi: 10.1126/science.1137016. 33.

- Holker, U., Hofer, M., Lenz, J., 2004. "Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64(2), pp.175-86.
- Huang, D.L., Zeng, G.M., Feng, C.L., Hu, S., Zhao, M.H., Lai, C., 2010. "Mycelial growth and solid-state fermentation of lignocellulosic waste by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* under lead stress". *Chemosphere.* 81, pp.1091-1097.
- Ingold, C.T., Hudson, H.J., 1995. "The biology of fungi. London": Chapman & Hall.
- Jorgensen, H., Pedersen, J., Larsen, J., Felby, C., 2007 "Liquefaction of lignocellulose at high solids concentrations". *Biotechnol. Bioeng.* 96, pp. 862–870.
- Kaar, W. E. y Holtzapple, M. T., 1998 "Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover." *Biotechnol. Bioeng.* 59(4), pp. 419–427. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980820)59:4<419::AID-BIT4>3.0.CO;2-J.
- Kirk O., Borchert T.V., Fuglsang C.C., 2002 "Industrial enzyme applications." *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (4), pp. 345 – 351.
- Kang, H.W., Kim, Y., Kim, S.W., Choi, G.W., 2012 "Cellulosic ethanol production on temperature-shift simultaneous saccharification and fermentation using the thermostable yeast *Kluyveromyces marxianus* CHY1612". *Bioprocess Biosyst Eng.* 35, pp.115–122.
- King, D., Inderwildi, O. R., Williams, A., 2010 "The Future of Industrial Relations. World Economic Forum." Committed to improving the state of the world.
- Klinke, H. B., Thomsen, A. B., Ahring, B. K., 2004 "Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66(1), pp. 10–26. doi: 10.1007/s00253-004-1642-2.
- Ko, J.K., Bak, J. S., Jung, M. W., Lee, H. J., Choi, I. G., Kim, T. H., Kim, K. Heon., 2009 "Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes." *Bioresour. Technol.* 100(19), pp. 4374–4380. doi: 10.1016/j.biortech.2009.04.026.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A., 2004 "Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review". *J. Food Microbiol.* 21, pp. 377–397.
- Kumar R., Singh S., Singh O.V., 2008 "Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives." *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (5), 377-391.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, Michael. J., Stroeve, P., 2009 "Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production." *Food Sci. Biotechnol.* 20(5), pp. 3713–3729.
- Kumar, A. y Kanwar, S.S., 2012. "Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications". *Dyn. Biochem. Process Biotechnol. Mol. Biol.* 6, pp. 13-27.
- Kumar, S., Sharma, H. K., Sarkar, B. C., 2011 "Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solid state fermentation (SSF)." *Food Sci. Biotechnol.* 20(5), pp. 1289–1298. doi: 10.1007/s10068-011-0178-3.
- Kumaran, S., Sastry, C. A., Vikineswary, S., 1997 "Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas." *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13(1), pp. 43–49.

doi: 10.1007/BF02770806.

Laine, C., 2005 "Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp," *Department of Chemical Technology*. p. 63. Available at: <http://lib.tkk.fi/Diss/2005/isbn9512276909/>.

Lamb, C. de C., Zacarias da Silva, B. M. D., de Souza., Fornasier, F., Brixner Riça, L., 2018 "Bioethanol production from rice hull and evaluation of the final solid residue". *Chem. Eng. Commun.* 205(6). <https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1422495>

Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B. E., 2005 "Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: Characterization of pretreated corn stover." *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*. 124(1–3), pp. 1081–1099. doi: 10.1385/ABAB:124:1-3:1081.

Lee, J. W. y Jeffries, T. W., 2011 "Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors." *Bioresour. Technol.* 102(10), pp. 5884–5890. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.048.

Liang, X., Huang, Y., Hua, D., Zhang, J., Xu, H., Li, Y., 2012 "Cellulase production by *Aspergillus* sp. on rice grass (*Spartina* spp.) under solid-state fermentation". *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, pp. 6785–6792.

Libardi, N., Soccol, R., Góes-Neto, A., de Oliveira, J., de Souza Vandenberghe, L., 2017 "Domestic waste water as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*." *Process Biochem.* 57, pp. 190–199. doi: 10.1016/j.procbio.2017.03.006.

Linde, M., Jakobsson, E. L., Galbe, M., Zacchi, G., 2008 "Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production". *Biomass Bioenerg.* 32, pp. 326-332.

Lynd, L., Weimer, P., Van Z, W., Pretorius, I., 2004 "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology", HortScience. doi: 10.1128/MMBR.66.3.506.

Mafla, A. B., 2009 "Uso de la cascarilla de arroz como material alternativo en la construcción." *Inventum.* (6), pp. 74–78.

Malmsten, M. y Van Alstine, J. M., 1996 "Adsorption of poly(ethylene glycol) amphiphiles to form coatings which inhibit protein adsorption." *J. Colloid Interface Sci.* 177(2), pp. 502–512. doi: 10.1006/jcis.1996.0064.

Martínez, Y. y Quintero, P., 2013 " Producción de bioetanol utilizando un jarabe glucosado obtenido a partir de subproductos agroindustriales por cultivo en lote utilizando *Saccharomyces* sp." Tesis de grado. Universidad Francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta, Colombia.

Marx, S., Ndaba, B., Chiyanzu, I., Schabort, C., 2014 "Fuel ethanol production from sweet sorghum bagasse using micro wave irradiation". *Biomass Bioenerg.* 65 (1) ,pp. 145-50

Mata, G. y Savoie, J. M., 1998 "Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw." *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14(4), pp. 513–519. doi: 10.1023/A:1008886521091.

Matsuura, M., Sasaki, J., Murao, S., 1995 "Studies on β -glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzín and genistin: isolation and characterization of an isozyme". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* pp.1623-1627.

Mesa, L., González, E., Carab, C., González, M., Castro, E., Mussatto, S.I., 2011 "The effect of

organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse". *Chem. Eng. J.* 168 (1), pp. 1157–1162. doi:10.1016/j.cej.2011.02.003.

Miller, G. L., 1959 "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar" *Analytical Chem.* 31 (3), pp.426-428.

Ministerio de Producción y Trabajo de Argentina, 2019 "Informe Biocombustibles, Abril 2019".

Modig, T., Almeida, J.R.M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lindén, G., 2008 "Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocellulose hydrolysate." *Biotechnol. Bioeng.* 100(3), pp. 423–429. doi: 10.1002/bit.21789. 59.

Montipó, S., Ballesteros, I., Fontana, R., Liu, S., Ballesteros, M., 2019 " Bioprocessing of rice husk into monosaccharides and fermentative production of bioethanol and lactate ". *Cellulose.* 26 (12), <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02571-1>

Moreno, A. D., Ibarra, D., Ballesteros, I., González, A., Ballesteros, M., 2013 "Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase". *Bioresour. Technol.* 135 (2), pp. 239-245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.095>.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., LEE, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2004 "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass". *Bioresour. Technol.* 96 (20), pp. 673–686

Mussatto, S.I. y Roberto, I.C., 2004 "Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative process: a review". *Bioresour. Technol.* 93, pp. 1-10.

Nachaiwieng, W., Lumyong, S., Yoshioka, K., Watanabe, T., Khanongnuch, Ch., 2015 " Bioethanol production from rice husk under elevated temperature simultaneous saccharification and fermentation using *Kluyveromyces marxianus* CK8". *Biocatal. Agricult. Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.10.003>

Narra, M., Balasubramanian, V., James, J. P., 2016 "Enhanced enzymatic hydrolysis of mild alkali pre-treated rice straw at high-solid loadings using in-house cellulases in a bench scale system." *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39(6), pp. 993–1003. doi: 10.1007/s00449-016-1578-9.

Narra, M., James, J. P., Balasubramanian, V., 2015 "Simultaneous saccharification and fermentation of delignified lignocellulosic biomass at high solid loadings by a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces sp.* for ethanol production." *Bioresour. Technol.* 179, pp. 331–338. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.116.

Nielsen, F., Tomás-Pejó, E., Olsson, L., Wallberg, O., 2015 "Short-term adaptation during propagation improves the performance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and co-fermentation". *Biotechnol. Biofuel.*, 1(8), pp. 1-15.

Nikolić, S., Mojović, L., Rakin, Marica., Pejin, J., Djukic-Vuković, A., Bulatović, Ma., 2014 "Simultaneous Enzymatic Saccharification and Fermentation (SSF) in Bioethanol Production from Corn Meal by Free and Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*". *J. Chem. Sci. Technol.*, 1(1), pp. 21-26.

Niño, L., 2012 " *Producción de etanol a partir de residuos lignocelulosicos de yuca (Manihot esculenta Crantz) mediante shf y ssf en modo batch y fed batch*". Tesis de maestría, Universidad de Antioquia, Colombia.

Niño, L., Acosta, A., Gelves, Z. R., 2013 " Evaluation of chemical pretreatments for enzymatic

hydrolysis of lignocellulosic residues cassava (*Manihot esculenta Crantz*) *Faculty of Engineering, University of Antioquia*. 69(1), pp. 317-326. <https://www.redalyc.org/pdf/430/43029812024.pdf>

Novoa, M. A., Becerra, L. D., Vásquez, M. P., 2016 “La ceniza de cascarilla de arroz y su efecto en adhesivos tipo mortero.” *Avances Investigación en Ingeniería*. 11(2). doi: 10.18041/1794-4953/avances.2.233.

Nwodo-Chinedu, S., Okochi, V.I., Smith, H.A., Omidij, O., 2005 “Isolation of Cellulolytic Microfungi Involved in Wood-Waste Decomposition: Prospects for Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Wastes,” *Int J Biomed Sci*. 1(2), pp. 1–7.

Odds, F. C. y Bernaerts, R., 1994 "CHROMagar Candida, a New differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species." *JCM*, 32(8), pp. 1923-1929.

Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, I., Gonzalez, A., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M. 2003 “Effect of Lignocellulosic Degradation Compounds from Steam Explosion Pretreatment on Ethanol Fermentation by Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* .” *Appl. Biochem. Biotechnol*. 105, pp. 141–153. 64.

Olofsson, K., Bertilsson, M., Liden, G. A., 2008. "A short review in SSF and interesting option for ethanol production from lignocellulosic feedstock". *Biotechnol. Biofuels*. 1, pp.1-14

Palmqvist, E. y Hahn-Hägerdal, B., 2000 "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanism of inhibition". *Bioresour Technol*. 74, pp. 25-33.

Pandey., 2003. "Solid-state fermentation". *Biochem. Eng. J*. 2 (13), pp. 81–84.

Pereira, F.B., Guimarães, P.M.R., Gomes, D.G., Mira, N.P., Teixeira, M.C., Sá-Correia, I., Domingues, L., 2011 “Identification of candidate genes for yeast engineering to improve bioethanol production in very high gravity and lignocellulosic biomass industrial fermentations.” *Biotechnol Biofuels*. 4(1), p. 57. doi: 10.1186/1754-6834-4-57.

Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., Papadopoulou, K., Lakhtar, H., Roussos, S., Parissopoulos, G., 2011. "Biomass, laccase and endoglucanase production by *Lentinula edodes* during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues". *World J. Microbiol. Biotechnol*. 27 (3), pp. 285–297.

Pourbafrani, M., Talebnia, F., Niklasson, C., Taherzadeh, M., 2007 "Protective effect of encapsulation in fermentation of limonene-contained media and orange peel hydrolyzate". *Int. J. Mol. Sci*. 8, pp.777–78.

PortalFrutícola, 2018. Humus de cáscara de arroz, un feertilizante orgánico que duplica la producción de cultivos. Available at: <https://www.portalfruticola.com/noticias/2018/03/23/humus-de-cascara-arroz-un-fertilizante-organico-que-duplica-la-produccion-de-cultivos/>

Quynh, N., Sakanishi, K., Nakagoshi, N., Fujimoto, S., 2015 “Potential for rice straw ethanol production in the Mekong Delta.” *Renew. Energy*.74(2), pp. 456–463. doi: 10.1016/j.renene.2014.08.051.

Rabinovich, M. L., Melnik, M. S., Bolobova, A.V., 2002 “Microbial cellulases: A review”. *Appl. Biochem. Microbiol*. 38, pp. 305-321.

Raghavarao, K., Ranganathan, T.V., Karanth, N.G., 2003."Some engineering aspects of solid-state fermentation". *Biochem. Eng. J*.13 (1), pp. 127-35.

Ramprakash, B. y Muthukumar, K., 2014 “ Comparative study on the production of biohydrogen from

- rice mill wastewater,” *Int J Hydrogen Energy*. 39(27), pp. 14613–14621. doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.06.029.
- Ramseyer, F., 2020 “En el 2019 / 20 se producirían 587 mil m3 de bioetanol de maíz,” 20, pp. 1–5.
- Raud, M., Kesperi, R., Oja, T., Olt, J., Kikas, T., 2014 “Utilization of urban waste in bioethanol production: Potential and technical solutions.” *Agron. Res.* 12(2), pp. 397–406.
- Rebros, M., Rosenverg, M., Stlouka, R., Kristofikova, L., 2005. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, pp. 412–416.
- Renewable Fuels Association, 2019. Report Available at: <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>
- Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., Wu, Y. V., 2005 “Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol.” *Process Biochem.* 40(12), pp. 3693–3700. doi: 10.1016/j.procbio.2005.04.006.
- Saha, B. C. y Cotta, M. A., 2008 “Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol.” *Biomass Bioenerg.* 32(10), pp. 971–977. doi: 10.1016/j.biombioe.2008.01.014.
- Sakamoto, T., Hasunuma, T., Hori, Y., Yamada, R., Kondo, A., 2011 "Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells". *J. Biotechnol.* 158 (1), pp. 203–210.
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., 2012. "Bioethanol production from agricultural wastes: an overview". *Renew. Energy.* 37, pp. 19–27.
- Schacht, C., Zetzl, C., Brunner, G., 2008 “From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology.” *J. Supercrit. Fluids.* 46(3), pp. 299–321. doi: 10.1016/j.supflu.2008.01.018.
- Scheller, H. V. and Ulvskov, P., 2010 "Hemicelluloses" *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 61(1), pp. 263–289
- Selig, M., Weiss, N., Ji, Y., 2008 "Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass", Laboratory Analytical Procedure (NREL).
- Shi, J., Chinn, M. S., Sharma-Shivappa, R. R., 2008 “Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*.” *Bioresour Technol.* 99(14), pp. 6556–6564. doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.069.
- Shrestha, P., Rasmussen, M., Khanal, S.K., Pometto, A.L., vanLeeuwen, J., 2008 “Solid-substrate fermentation of corn fiber by *Phanerochaete chrysosporium* and subsequent fermentation of hydrolysate into ethanol.” *J. Agric. Food Chem.* 56(11), pp. 3918–3924. doi: 10.1021/jf0728404.
- Singh, A., Bajar, S., Bishnoi, N. R., 2014 “Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture.” *Fuel.* 116, pp. 699–702. doi: 10.1016/j.fuel.2013.08.072. 85.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. "Recent advances in solid-state fermentation". *Biochem. Eng. J.* 44(1). pp.13-8.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A., 2010. "Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases". *Enzym Microb. Technol.* 46 (7), pp. 541-9
- Song, Y. *et al.* (2016) “Cellulosic bioethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus*

tuberosus L.) using hydrogen peroxide-acetic acid (HPAC) pretreatment,” *Bioresour Technol.* 214 (2), pp. 30–36. doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.065.

Stenberg, K., Bollok, M., Reczey, K., Galbe, M., Zacchi, G., 2000 "Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of Steam pretreated softwood for ethanol production". *Biotechnol. Bioeng.* 68, pp. 205- 210.

Sun, Y. y Cheng, J., 2002 “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review.” *Bioresour Technol.* 83(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7.

Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Wolfe, J., 2008 "Determination of Total Solids in liomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples". Laboratory Analytical Procedures, National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42621.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008 "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass". Laboratory Analytical Procedures, National Renewable Laboratory NREL/LP-510-42618.

Sluiter, B., Hames, R., Ruiz, C., Scarlata, J., Templeton, D., 2005 “Determination of Ash in Biomass”. Natl. Renew. Energy Lab NREL/TP-510-42622.

S. Sukhang., Choojit, S., Reungpeerakul, T., Sangwitchien, Ch., 2019 " Bioethanol production from oil palm empty fruit bunch with SSF and SHF processes using *Kluyveromyces marxianus* yeast" *Cellulose.* 27 (2), https: 10.1007/s10570-019-02778-2.

Taherzadeh, M. and Karimi, K., 2008 “Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review”. *Int. J. Mol. Sci.* 9. pp, 1621-1651.

Taherzadeh, M. J. and Karimi, K., 2007 Enzyme-based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review. *BioResources.* 4(2), pp.707-738.

Takano, M. y Hoshino, K., 2018 “Bioethanol production from rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with statistical optimized cellulase cocktail and fermenting fungus.” *Bioresour Bioprocess.* 5(1). pp. 5-16 doi: 10.1186/s40643-018-0203-y.

Talebnia, F., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2005 "Ethanol production from glucose and dilute-acid hydrolyzates by encapsulated *S. cerevisiae*". *Biotechnol. Bioeng.* 90, pp. 345–353.

Talebnia, F., 2008 "Ethanol Production from Cellulosic Biomass by Encapsulated *Saccharomyces cerevisiae*". pp. 20-21.

Tavva, S. S.M., Deshpande, A., Durhba, S. R., Palakollu, A.R., Goparaju, A. U., Yechuri, V. R., Bandaru, V. R., Muktinutalapati, V. S., 2016 “Bioethanol production through separate hydrolysis and fermentation of *Parthenium hysterophorus* biomass.” *Renew. Energ.* 86, pp. 1317–1323. doi: 10.1016/j.renene.2015.09.074.

Thomas, L., Joseph, A., Gottumukkala, L.D., 2014 "Xylanase and cellulase systems of *Clostridium* sp.: An insight on molecular approaches for strain improvement." *Bioresour. Technol.* 158, pp. 343–350.

Thompson, D. N., Chen, H., Grethlein, H. E., 1992 " *Bioresour. Technol.*, 39 (2), https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90135-K

Trigo, E. J., Mentaberry, A., Cap, E. J., Zelada, A., Villarreal, F., 2011 "El potencial de la bioeconomía y las biorefinerías en la Argentina". Available at

:http://www.argentinainnovadora2020.mincyt.gob.ar/?wpfb_dl=25.ar/?wpfb_dl=25.

Vallejos, M. E., Zambon, M. D., Area, M. C., Curvelo, A. A. S., 2019 "Influencia de la composición química en la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar pretratado con agua caliente y organosolv " *Waste Biomass Valori*. 10 (4). <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00657-2>

Viruthagiri, T. y Sasikumar, E., 2007 "Simultaneous saccharification and fermentation of recycled paper sludge for ethanol production." *Asian J Microbiol Biotechnol Environ*.9,pp.587–590.

Wang, Z. and Cheng, J.J., 2011 "Lime pretreatment of coastal bermudagrass for bioethanol production". *Energy Fuels*. 25, pp. 1830–1836.

Wei, G.Y., Gao, W., Jin, H., Yoo, S.Y., Lee, J., Chung, Chung.,Woo, J., 2009 "Pretreatment and Saccharification of Rice Hulls for the Production of Fermentable Sugars". *Biotechnol. Bioprocess Eng*. 14, pp. 828.834. DOI/10.1007/s12257-009-0029-8.

Westman, J. O., Ylitervo, P., Franzén, C.J., Taherzadeh, M. J., 2012 " Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations". *Appl Microbiol Biotechnol*. 96 (4) pp. 1441–1454. DOI 10.1007/s00253-012-4517-y.

Wirawan, F., Cheng, Ch., Kao, W., Lee, D., Shang, J., 2012 "Cellulosic ethanol production performance with SSF and SHF process using immobilized *Zymomonas mobilis*". *Appl. Energy*. 100,pp. 19-26.

Wood, I. P., Cao, H. G., Tran, L., Cook, N., Ryden, P., Wilson, D. R., Moates, G. K.,Collins, S.R., Elliston, A., Waldron, K. W., 2016 "Comparison of saccharification and fermentation of steam exploded rice straw and rice husk." *Biotechnol Biofuels*. 9(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s13068-016-0599-6.

Xiao, Z., Zhang, X., Greff, D.J., Saddler, J.N., 2004 "Effects of sugar inhibition on cellulases and βglucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates". *Appl. Biochem. Biotechnol*. 113(116) ,pp. 1115-1126.

Xu, L., 2012 "Bio-fuel production by using integrated anaerobic fermentation." PhD thesis, University of Minnesota, Minneapolis, Unites States.

Xu, Q., Singh, A., Himmel, M. E., 2009 "Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose." *Curr. Opin. Biotechnol*. 20(3), pp. 364–371. doi: 10.1016/j.copbio.2009.05.006.

Yamada, R., Taniguchi, N., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A., 2011 "Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression". *Biotechnol. Biofuels*. 4(8).

Yan, Q., Liu, X., Wang, Y., Li, H., Li, Z., Zhou, L., Qu, Y., Lil, Z., Bao1, X., 2018 "Cow manure as a lignocellulosic substrate for fungal cellulase expression and bioethanol production". *AMB Expr*. 8(190), pp. 2-12.

Ylitervo, P., Franzén, C.J., Taherzadeh., M. J., 2011. Ethanol production at elevated temperatures using encapsulation of yeast. *J. Biotechnol* .156, pp. 22-29.

Youngsukkasem ,S., Rakshit, S.K., Taherzadeh, M.J., 2012 "Biogas production by encapsulated methane-producing bacteria". *BioResources* .7(1), pp. 56–65.

Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009 "Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis." *Appl Microbiol Biotechnol*. 82 (5), pp. 815–827. doi: 10.1007/s00253-009-1883-1. 106.

Zhao, C., Qiao, X., Cao, Y., Shao, Q., 2017 " Application of hydrogen peroxide presoaking prior to ammonia fiber expansion pretreatment of energy crops". *Fuel*. 205, pp.184–191. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.05.073>

Zhu, J,Q., Lie, Q., Li, B,Z., Yuan, Y, J., 2014 "Simultaneous saccharification and co- fermentation of aqueous ammonia pretreated corn stover with an engineered *Saccharomyces cerevisiae* SyBE005". *Bioresour. Technol.* 169, pp. 9-18.

Zeng, G., Yu, M., Chen, Y., Huang, D., Zhang, J., Huang, H., 2010. "Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting". *Bioresour. Technol.* 101,pp. 222-7.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y EVENTOS

- Arismendy, A.M., Felissia, F.E., Area, M.C., Chamorro, E. Obtención de bioetanol: Hidrólisis y Fermentación Simultánea de la cascarilla de arroz. Difusión en Feria de la Ciencia, Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina. Mayo 2015.
- Arismendy, A.M., Felissia, F.E., Area, M.C., Chamorro, E. Cascarilla de arroz: Obtención de bioetanol a partir de la hidrólisis y fermentación simultánea. Presentación IMIT- CONICET (Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica). Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina. Septiembre 2015.
- Arismendy, A.M., Felissia, F.E., Area, M.C., Chamorro, E. Preliminary studies of cellulosic bioethanol production for simultaneous hydrolysis and fermentation testing. 3er Congreso Iberoamericano sobre Biorrefinerías (CIAB), 4to Congreso Latinoamericano sobre Biorrefinerías, y 2do Simposio Internacional sobre Materiales Lignocelulósicos. Concepción, Chile. 23 al 25 noviembre 2015.
- Arismendy, A.M., Sequeira, M., Area, M.C., Chamorro, E. Evaluación de cepas fermentativas en la hidrólisis y fermentación simultáneas (SSF) de cascarilla de arroz para la producción de bioetanol. Presentación Congreso de Ingeniería de Procesos y Productos, Rosario, Argentina. Marzo 2016.
- Arismendy, A.M., Sequeira, M., Area, M.C., Chamorro, E. Evaluation of fermentative power of adapted strains in the process of simultaneous hydrolysis and fermentation of rice husks. CIADICYP 2016, Helsinki, Finland, 5-8 September 2016.
- Kruyeniski J., Chamorro E., Arismendy A.M., Felissia, F.E., Area, M.C. Evaluating fermentability of hydrolyzates of pretreated pine sawdust. "I&S WORKSHOP. Insights and strategies towards a bio-based economy". Montevideo, Uruguay, November 22th-25th, 2016.

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDEXADAS

- Arismendy, A.M., Sequeira, M., Area, M.C., Chamorro, E. Evaluación de Cepas Fermentativas en la Hidrólisis y Fermentación Simultáneas (SSF) de Cascarilla de Arroz para la Producción de Bioetanol. RTyC., (30), 357-363 (2017).
- Arismendy, A.M., Restrepo, A. F., Alcaraz, W., Chamorro, E., Area, M.C. Optimización de la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz. RECyT., (32), 64-70 (2019).
- Arismendy, A. M., Felissia, F. E., Mendieta, C. M., Chamorro, E., Area, M.C. Improvement of the bioethanol production process from rice husks. Cellulose Chem. Technol., 54 (7-8), 689-698 (2020). <https://doi.org/10.35812/CelluloseChemTechnol.2020.54.68>

ARTICULOS PUBLICADOS EN REVISTAS DE DIVULGACIÓN

- Arismendy, A. M., Chamorro, E., Area, M.C. “Cascarilla de arroz: Obtención de bioetanol a partir de la hidrólisis y fermentación simultánea”. Revista El Papel., pp. 54-55 Febrero-marzo 2016.

FINANCIAMIENTO

- **“OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO”**
Código: 25L042. 2009-2013. Directora Dra. Ester Chamorro. Financiamiento UTN \$513.708
- **"ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS PARA EL APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA"**. Código: IPUTIRE0002069. 2014-2018. Directora Dra. Ester Chamorro Financiamiento UTN \$937.146
- **"UTILIZACIÓN DE FRACCIONES DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS OBTENIDAS EN EL CONTEXTO DE UNA BIORREFINERÍA"**. Código: IAI4707TC, 2018-2021. Directora Dra. Eliana Paola Dagnino. Financiamiento UTN \$3.379.320
- **“DESARROLLO DE MATERIALES COMPUESTOS BASADOS EN BIOPOLÍMEROS DE FUENTES REGIONALES Y ADITIVOS NANOESTRUCTURADOS” PUE 229 201801 00025 CO.** Entidad Financiadora: Consejo Nacional de investigaciones Técnicas y Científicas (CONICET). Investigador responsable: Dra. María Cristina Area Monto subsidio: 50.000 pesos Fecha de vigencia: 2019-2023
- **VALBIO-3D-VALORIZATION OF RESIDUAL BIOMASS FOR ADVANCED 3D MATERIALS.** Entidad Financiadora: Secretaría de Gobierno de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (SGCTIP), Ministerio de Educación, Cultura y Tecnología. Investigador Responsable: Dra. María Cristina Area. Monto subsidio: 25.000 euros. Fecha de vigencia: 2017-2019.
- **TECNOLOGÍAS DE FRACCIONAMIENTO Y SEPARACIÓN-PURIFICACIÓN DE SUBPRODUCTOS EN BIORREFINERÍAS DE RESIDUOS AGRO Y FORESTOINDUSTRIALES.** Entidad Financiadora: Consejo Nacional de Investigaciones Técnicas y Científicas (CONICET). Investigador responsable: Dra. María Cristina Area. Monto subsidio: 150.000 pesos. Fecha de vigencia: 2016-2018.
- **BIORREFINERÍA A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIALIZACIÓN PRIMARIA DE LA MADERA.** Entidad Financiadora: Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Secretaría de Gobierno de Tecnología e Innovación Productiva (SGCTIP), Ministerio de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología. Investigador Responsable: Dra. María Cristina Area. Monto subsidio: 180.000 pesos. Fecha de vigencia: 2013-2016.

- **BIORREFINERÍA A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIALIZACIÓN PRIMARIA DE LA MADERA.** Entidad Financiadora: Consejo Nacional de Investigaciones Técnicas y Científicas (CONICET). Investigador Responsable: Dra. María Cristina Area. Monto subsidio: 90.000 pesos. Fecha de vigencia: 2013-2015