

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Doctorado en Ciencias Aplicadas

Doctoranda
Ing. Carolina Mónica Mendieta

Obtención de etileno a partir aserrín de pino

**Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de
“Doctora 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. María Cristina AREA

Posadas, 28 de julio 2023



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



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
Facultad de Ciencias Exactas Químicas
y Naturales



OBTENCIÓN DE ETILENO A PARTIR ASERRÍN DE PINO

Disposición N° 909/23

Ing. Mendieta Carolina Mónica

Directora:

Dra. María Cristina Area UNaM

TRIBUNAL EVALUADOR (Según Disposición 659/22)

Dra. Licia María PERA (PROIMI)

Universidad Nacional del Nordeste

Dra. Laura Ana RAMALLO

Universidad Nacional de Misiones

Dra. María Isabel FONSECA

Universidad Nacional de Misiones

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA (Disposición N° 909/23)

Posadas, 28 de Julio del 2023

OBTENCIÓN DE ETILENO A PARTIR ASERRÍN DE PINO

Lugar de desarrollo del trabajo de tesis

Tesis realizada en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN), en el grupo de investigación del Instituto de materiales de Misiones (IMAM), perteneciente al programa de Celulosa y Papel (PROCyP).

Ing. Carolina Mónica Mendieta

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN

Dra. Silvia Daniela Romano	(GER-FI-UBA)
Dra. Beatriz del Valle Arguello	(FCEQyN-UNaM)
Dra. María Daniela Rodríguez	(INBIOMIS-FCEQyN-UNaM)

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 de Julio 2023-

AGRADECIMIENTOS

Principalmente doy gracias a Dios y a la Virgen María, por permitirme realizar este estudio de posgrado y terminarlo satisfactoriamente pese a la pandemia que tuvimos durante el ciclo lectivo 2020-2021, la cual nos impidió trabajar de manera presencial en la oficina de trabajo y en el laboratorio para llevar a cabo las experiencias propuestas dentro del plan de tesis.

Doy gracias a mi familia, principalmente a mi padre y mis hermanos que estuvieron acompañándome durante estos cinco años de estudio y a mi madre que desde el cielo sé que me guió, me acompañó y protegió durante esta etapa para que pueda terminar en tiempo y forma este posgrado.

Al CONICET por concederme la beca de posgrado que me permitió concretar el plan de tesis y poder contribuir a mi carrera profesional.

A mi directora de tesis Dra. María Cristina Area, por brindarme su permanente acompañamiento durante estos cinco años de estudio, por el asesoramiento continuo tanto en la parte teórica como en la parte experimental que requiere el plan de tesis y que me permitió comprender el proceso de aprendizaje que implica el doctorado en ciencias aplicadas y de esta manera poder cumplir con los requisitos obligatorios que presenta el doctorado y con todas las actividades que implica el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Fernando Felissia por la paciencia y la predisposición eterna en el laboratorio. Gracias por las enseñanzas otorgadas durante todo este período.

A la Dra. Miriam Chade, por brindarme una pasantía en el módulo de farmacia y bioquímica, con la finalidad de aprender repique y conservación de hongos levaduriformes, que me permitieron desarrollar las experiencias pactadas con la misma cepa, manteniendo la calidad de la producción de bioetanol y bioetileno.

Al Dr. Gerardo Santori, por permitirme terminar mis experiencias de bioetileno en el Instituto CINDECA, por su compromiso y hospitalidad para brindarme el equipamiento para realizar la producción de etileno.

A la Dra. Ana María Arismendy por brindarme todo su conocimiento en la parte experimental de la producción de bioetanol, más precisamente en las estrategias de fermentación, que me sirvieron de guía para avanzar con las experiencias para obtener mi producto objetivo.

A mi compañera, Julia Kruyeniski, por ayudarme en cada experiencia realizada, por brindarme su conocimiento tanto en la redacción de escritos, en la presentación de trabajos a congresos

como también en las presentaciones orales que me permitieron avanzar en el desarrollo del plan de tesis.

A mi comisión de supervisión Dra. Silvia Daniela Romano, Dra. Beatriz Del valle Arguello y Dra. Daniela Rodriguez, por el tiempo brindado y por las recomendaciones. A la Dra. Alicia Ares y a todo el equipo que integra el Doctorado en Ciencias Aplicadas por el trabajo impecable realizado desde el momento de inscripción hasta el final del desarrollo de la tesis.

A mis compañeros del PROCYP por los buenos momentos compartidos, por generar una excelente armonía de trabajo durante todos estos años. En especial a Gisel, quien fue la que me dio el aviso de la búsqueda de becarios y con la que inicié este hermoso camino de posgrado. A Rocío, que ingresó un año después, una gran persona, extraordinariamente servicial, que me brindó su amistad desde el primer día.

A mi apoyo incondicional Carlos, que me acompañó desde el día 1 en mi estudio. Gracias por darme los mejores consejos e incentivos para no flaquear antes los primeros obstáculos que sin dudas, fueron los primeros escritos. Gracias también por escucharme en mis ensayos de seminario, presentaciones a congresos como en compartir pequeños viajes para realizar los cursos y presentaciones que se realizaron en la provincia de Bs As.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como la oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein (1879-1955)

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	17
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	19
1.1 Introducción	19
1.1.1 Aserrín de pino	19
1.1.2 Celulosa	21
1.1.3 Bioetanol	22
1.1.4 Bioetileno	26
1.2 Procesos involucrados	28
1.2.1. Pretratamientos de la biomasa	28
1.2.2. Hidrólisis enzimática	30
1.2.3 Fermentación	32
1.2.5 Purificación	34
1.2.4 Deshidratación	34
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	40
2.1 Introducción	40
2.2 Hipótesis	40
2.3 Objetivos	40
2.3.1 Objetivo general	40
2.3.2 Objetivos específicos involucran:	41
CAPITULO 3. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL 2G	42
3.1. Objetivos	42
3.2. Materiales y Métodos	42
3.2.1. Materia prima, microorganismos y enzimas	42
3.2.1.1 Conservación de la cepa de hongos levaduriformes <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IMR 1181 (SC 1181)	43
3.2.2. Caracterización del sustrato e hidrolizados	47
3.2.3. Estrategia de hidrólisis y fermentación separada (SHF)	47

3.2.3.1 Hidrólisis enzimática	47
3.2.3.2 Determinación de la actividad enzimática	48
3.2.3.3 Estudio cinético	49
3.2.4 Fermentación	51
3.2.4.1 Preparación del preinóculo e inóculo	51
3.2.4.2 Fermentación en la estrategia SHF	52
3.2.5 Estrategia de sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF)	52
3.3 Resultados y discusión	54
3.3.1. Materia prima, microorganismos y enzimas	54
3.3.1.1 Caracterización del sustrato	54
3.3.1.2 Caracterización de la cepa de hongos levaduriformes <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IMR 1181 (SC 1181)	54
3.3.2 Estrategia de hidrólisis y fermentación separada (SHF)	55
3.3.2.1 Hidrólisis enzimática	55
3.3.2.2 Parámetros del modelo pseudo-homogéneo de Michaelis-Menten	56
3.3.3 Fermentación	60
3.3.4 Rendimiento de bioetanol mediante la estrategia de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)	61
3.3.5 Hidrólisis y fermentación en separado (SHF) vs. Sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF)	63
3.4 Conclusión	64
CAPITULO 4. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL 2G	66
4.1 Objetivos	66
4.2 Materiales y métodos	66
4.2.1. Materia prima, microorganismos y enzimas	66
4.2.2 Caracterización del Sustrato y Fracción Líquida del Proceso de Fermentación	67
4.2.3 Preparación del pre-inóculo e inóculo	68
4.2.4 Estrategia de sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF)	68
4.2.5 Diseños experimentales	68
4. 3 Resultados y discusión	69
4.3.1 Caracterización del sustrato	69
4.3.2 Caracterización de la cepa de hongos levaduriformes <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IMR 1181 (SC 1181) y enzimas Cellic Ctec 2	70
4.3.3 Estrategia de sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF)	70
4.3.3.1 Producción de bioetanol 2G	70
4.3.4 Diseño experimental	73
4.3.4.1 Modelo completo	73
4.3.4.2 Modelo I	74
4.3.4.3 Modelo II	75
4.4 Conclusión	77
CAPITULO 5. PRODUCCIÓN DE BIOETILENO 2G	79
5.1 Objetivo	79

5.2 Materiales y métodos	80
5.2.1 Caracterización de los catalizadores	81
5.2.1.1 Técnica de desorción de piridina por FTIR para determinación de sitios ácidos	81
5.2.1.1 Sortometría de nitrógeno (método BET) para determinación de área superficial y geometría de poros	82
5.2.2 Caracterización de bioetanol y productos de reacción	82
5.2.3 Proceso de deshidratación de bioetanol de 2G	83
5.3 Resultados y discusión	84
5.3.1 Caracterización de los catalizadores	84
5.3.1.1 Técnica de desorción de piridina por FTIR para determinación de sitios ácidos	84
5.3.1.2 Sortometría de nitrógeno (método BET) para determinación de área superficial y geometría de poros	87
5.3.2 Proceso de deshidratación. Caracterización de etanol (como referencia), bioetanol y productos de reacción	89
5.3.2.1 Efecto de la masa de catalizador en la reacción de deshidratación de etanol	92
5.3.2.2 Efecto de la concentración del reactivo en la obtención del producto objetivo	94
5.4 Conclusión	96
CAPITULO 6. CONCLUSIÓN GENERAL	98
CAPITULO 7. RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS	99
BIBLIOGRAFÍA	100
ARTICULOS PUBLICADOS EN REVISTA INDEXADAS	115
ARTICULOS PUBLICADOS EN REVISTAS DE DIVULGACIÓN	116
CAPÍTULO DE LIBROS	117
FINANCIAMIENTO	118

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Costo de producción de etileno reportado por varios estudios.	27
Tabla 2. Resumen de Catalizadores para la deshidratación de etanol a etileno.....	35
Tabla 3. Composición Química de la Fracción Sólida Obtenida por el Pretratamiento con Soda-Etanol	54
Tabla 4. Parámetros cinéticos para la sacarificación y contenido de lignina de las pulpas...	59
Tabla 5. Rendimiento de bioetanol a través de la estrategia de hidrólisis y fermentación por separado (SHF) aplicada a la pulpa 3.....	60
Tabla 6. Rendimientos de bioetanol de las pulpas 1, 2 y 3 a través de la estrategia de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)	61
Tabla 7. Glucosa equivalente experimental para SSF y los datos del modelo de la concentración de glucosa de la sacarificación a las 48 h y 72 h.....	63
Tabla 8. Las condiciones de las variables operacionales en la estrategia SSF.	69
Tabla 9. Composición química del aserrín de pino y de la pulpa soda-etanol	70
Tabla 10. Resultados de los rendimientos de bioetanol obtenidos mediante la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) de una pulpa soda-etanol de aserrín de pino (bioetanol teórico $11,36 \text{ gL}^{-1}$).....	70
Tabla 11. Propiedades ácidas de las muestras de zeolitas comerciales, antes y después del tratamiento de calcinación	84
Tabla 12. Propiedades físicas de las muestras de zeolitas comerciales antes y después del tratamiento de calcinación.	88
Tabla 13. Resultados conversión de etanol y selectividad de etileno	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de utilización del aserrín de pino en el plan de tesis.....	19
Figura 2. Bioplásticos a partir de la celulosa en una biorrefinería química	23
Figura 3. Derivados del bioetanol por conversión catalítica.....	24
Figura 4. Esquema general para obtener bioetanol de 2G a partir de biomasa lignocelulósica25	
Figura 5. Clasificación de los pretratamientos aplicados a la biomasa lignocelulósica	29
Figura 6. Mecanismo de hidrólisis enzimática en la celulosa (Danigno 2012).....	31
Figura 7. Mecanismo de deshidratación de etanol a etileno.....	37
Figura 8. Ataque de una zeolita altamente ácida. Los (δ^+ y δ^-) se refieren a los sitios ligeramente cargados	37
Figura 9. Pérdida de un protón para la formación de etileno.	38
Figura 10. Técnica de siembra en estría para la cepa (SC 1181) en tubos y placa de Petri .	43
Figura 11. Estufa de cultivo empleada para el crecimiento de la cepa (SC 1181).	44
Figura 12. Preparación del medio de cultivo y de conservación para la cepa (SC 1181)	44
Figura 13. Fraccionamiento del medio de cultivo en tubos y placas de Petri.....	45
Figura 14. Conservación de cepa (SC 1181) en tubos Eppendorf de 1,5 mL.....	46
Figura 15. Esquema de microcultivo en láminas (Medvedeff et al. 2005).....	46
Figura 16. Esquema del proceso SHF para la producción de bioetanol 2G	48
Figura 17. Proceso de formación de preinóculo e inóculo.	51
Figura 18. Microrreactores para fermentar bioetanol, empleando trampa de aire.....	52
Figura 19. Esquema del proceso SSF para la producción de bioetanol 2G.....	53
Figura 20. Rendimientos de hidrólisis enzimática para las pulpas de soda-etanol con tres composiciones químicas diferentes (siendo la pulpa 1 la que tiene mayor contenido de lignina y menor contenido de glucano).....	55
Figura 21. Determinación de K_M y k	56
Figura 22. Concentración de glucosa de la hidrólisis enzimática de las pulpas 1, 2, 3 (los datos experimentales están representados por puntos y las predicciones teóricas por líneas).....	58
Figura 23. Determinación de la constante de equilibrio K	59
Figura 24. Concentración de glucosa en la sacarificación (los datos experimentales están representados por puntos y las predicciones teóricas por líneas) Nota: SAC es el proceso de sacarificación.....	62
Figura 25. Esquema SSF para la producción de bioetanol 2G variando dosificación de carga enzimática y temperatura.....	66
Figura 26. Rendimiento de bioetanol observado versus predicho por la Ecuación 25	74
Figura 27. Contorno de superficie de respuesta estimada del Modelo I (39 °C).	75
Figura 28. Rendimientos de fermentación experimentales y teóricos (calculados con el Modelo I) a 39 °C	75
Figura 29. Contorno de la superficie de respuesta estimada del Modelo II (72h)	76
Figura 30. Rendimientos de fermentación experimentales y teóricos (calculados con el Modelo II) a 35°C.....	77
Figura 31. Esquema de la producción del bioetileno de 2G	79
Figura 32. Proceso de recuperación del bioetanol de 2G por destilación fraccionada.....	80
Figura 33. Catalizadores empleados en el proceso de deshidratación.....	81
Figura 34. Cromatógrafo de gases (Shimadzu GCMS QP5050A) para cuantificar etanol y productos de reacción (etileno y dimetileter)	83
Figura 35. Esquema del proceso de deshidratación de bioetanol para la producción de bioetileno	84

Figura 36. Mecanismo de deshidratación de etanol a etileno mediante una zeolita ácida	87
Figura 37. Isotermas de desorción de las muestras de zeolitas comerciales, antes y después del tratamiento de calcinación.....	88
Figura 38. Isotermas de adsorción de las muestras de zeolitas comerciales, antes y después del tratamiento de calcinación.....	89
Figura 39. Mecanismo de deshidratación de etanol empleando HZSM-5 como catalizador.	91
Figura 40. Mecanismo de deshidratación de etanol empleando ZSM-5 como catalizador....	91
Figura 41. Mecanismo de deshidratación de etanol empleando HYCBV-5 como catalizador	92
Figura 42. Influencia de la conversión de etanol variando la dosificación de HZSM-5.....	93
Figura 43. Influencia del rendimiento de etileno variando la dosificación de HZSM-5	93
Figura 44. Conversión de etanol a diferentes concentraciones	95
Figura 45. Rendimiento de etileno variando la concentración de etanol.....	95
Figura 46. Rendimiento de bioetileno empleando las zeolitas protonadas con una dosificación de 400 mg.....	96
Figura 47. Conversión de bioetanol empleando las zeolitas protonadas con una dosificación de 400 mg.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

Bioetanol 2 G: Bioetanol de segunda generación

Bioetileno 2G: Bioetileno de segunda generación

NEA: Región nordeste de Argentina

SHF: Hidrólisis y fermentación por separado

SSF: hidrólisis y fermentación en simultáneo

FPU: Unidades de papel de filtro

HE: Hidrólisis enzimática

HPLC: High performance liquid chromatography

NaOH: Hidróxido de sodio

NREL: National Renewable Laboratory

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

RPM: Revoluciones por minuto

YPD: Medio de cultivo (Yeast-peptone-dextrose) es decir contiene levadura-peptona y dextrosa.

V_{MP}: Volumen de microporo

A_{MP}: Area de microporo

RESUMEN

La región noreste de Argentina (NEA) es la zona más boscosa del país y genera cantidades importantes de residuos lignocelulósicos cuya disposición final ocupa espacio, produce contaminación al medio ambiente, riesgo de incendios y de plagas, entre otros. La biorrefinería química de la biomasa lignocelulósica permite su aprovechamiento integral mediante su conversión sostenible a biocombustibles, bioproductos y biomateriales de alto valor agregado, que no compiten con la industria de alimentos. En este contexto, el aserrín de pino es una materia prima valiosa para la producción de bioetileno.

Actualmente, el bioetileno es un precursor químico esencial para la producción de bioplásticos, por lo que puede cerrar el esquema de biorrefinería como una fuente valiosa para la obtención de otros productos de alto valor agregado.

El proceso para obtener bioetileno 2G contiene un pretratamiento para separar la celulosa, que se puede convertir en etanol en un proceso de dos pasos, primero se despolimeriza en glucosa por hidrólisis enzimática y luego estos azúcares se convierten en etanol utilizando levaduras comerciales, que se emplean en mecanismos tradicionales de fermentación alcohólica. Finalmente, la reacción de bioetanol a bioetileno se produce por la deshidratación catalizada del etanol, en condiciones adecuadas.

La Hipótesis de trabajo es que es técnicamente factible producir etileno a partir de bioetanol de segunda generación producido a partir de aserrín de pino, en forma económica y ambientalmente sostenible.

El objetivo general de este trabajo es optimizar el proceso de producción de etileno mediante la deshidratación del bioetanol generado a partir de aserrín de pino.

El trabajo forma parte de los estudios que realiza el grupo sobre aprovechamiento integral de residuos forestoindustriales y se plantea como una continuación de investigaciones ya realizadas tendientes a cerrar un esquema de biorrefinería de aserrín de pino para la obtención de productos de alto valor, utilizando procesos de baja contaminación y aportando al equilibrio ambiental global del entorno. Por esto, las experiencias llevadas a cabo para la producción de bioetileno parten de 3 pulpas pretratadas con soda-etanol (con diferentes composiciones químicas). Las pulpas sometidas a un pretratamiento alcalino presentaron los mejores rendimientos de hidrólisis enzimática, ya que el álcali es uno de los agentes más efectivos para el hinchamiento de la biomasa, permitiendo extraer la mayor cantidad de lignina posible y abrir los poros de las fibras. Esto aumenta el área superficial, facilita la accesibilidad de las enzimas y mejora la conversión enzimática. Estas pulpas se emplearon para la producción de bioetanol mediante las estrategias de fermentación: hidrólisis y fermentación por separado (SHF) e hidrólisis y fermentación en simultáneo (SSF), a fin de comparar los

rendimientos de etanol producidos. En el primer método, ambas etapas se realizan por separado en sus condiciones óptimas 50 °C para el proceso de hidrólisis enzimática y (30-35) °C para el proceso de fermentación, pero tiene la desventaja de generar productos de inhibición, por ejemplo, glucosa para la hidrólisis y etanol para la fermentación. En el proceso simultáneo, tanto la hidrólisis como la fermentación se realizan en un solo reactor. Su principal ventaja es que la glucosa liberada por el complejo enzimático durante la hidrólisis es metabolizada directamente a etanol por las levaduras, consumiendo glucosa del medio. Esto produce una menor inhibición del producto final, una reducción del tiempo total del proceso y mayores productividades de etanol. Además, el costo se reduce debido al uso de un solo reactor, lo que hace que el procesamiento sea más eficiente.

Se emplearon enzimas celulolíticas Cellic® Ctec2 y levadura *Saccharomyces Cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181), con los siguientes parámetros: 30 FPU/ g de sustrato, 1% de celulosa hidrolizable T=37 °C, 10 ml de inóculo, pH=5 y 130 rpm. Con la estrategia SHF se obtuvo un rendimiento de fermentación $Y_{P/T}$ (%)= 84,8 y en la estrategia SSF un rendimiento de fermentación $Y_{P/T}$ (%)= 100 para la pulpa que contiene el menor contenido de lignina en su composición (3,67%). Como resultado de esta experiencia, se comprobó que la sacarificación y fermentación simultánea es más eficiente que el proceso separado y que la pulpa con el menor contenido de lignina produce la máxima conversión de glucosa en etanol.

Una vez determinada la estrategia que brinda la mayor concentración de bioetanol y trabajando con la misma pulpa, se realizaron experiencias con la estrategia SSF con el objetivo de evaluar la producción de bioetanol variando carga enzimática (30-20-10) FPU/g glucanos y temperatura (39-37-35) °C, empleando 2 % de celulosa hidrolizable. Los resultados obtenidos experimentalmente se analizaron mediante diseños experimentales variando el tiempo conjuntamente con otras variables (carga enzimática y temperatura de trabajo) en la estrategia SSF, con el fin de optimizar estos parámetros para obtener el mayor rendimiento de bioetanol. El período de tiempo varía de 0 a 24 h (Modelo I) y de 24 a 72 h (Modelo II). Las mejores condiciones encontradas en los dos diseños fueron 30 FPU g⁻¹ glucanos, 39 °C, 24 h para el Modelo I, y 30 FPU g⁻¹ glucanos, 35 °C, 72 h para el Modelo II. Los valores óptimos de fermentación fueron 63,2% y 81,9% para los Modelos I y II, respectivamente. El bioetanol producido posteriormente se recuperó por destilación fraccionada.

Para el proceso de deshidratación, el objetivo fue evaluar la temperatura en la cual se logra la mayor conversión de etanol y selectividad de etileno, empleando bioetanol 2G y etanol comercial (como referencia) con catalizadores comerciales Y-Al₂O₃, zeolitas ZSM-5 (Si O₂ /Al₂O₃) = 23 molar, YCBV-500 (SiO₂/Al₂O₃) = 5,2 molar. También se usaron zeolitas protonadas (HZSM-5 y HYCBV-500) con un tratamiento de calcinación y las siguientes condiciones de operación: T= 550 °C, t= 2h, 2 °C/min.

En el proceso de deshidratación con etanol comercial se obtuvieron los siguientes resultados: 98,5% de conversión de etanol y 100% selectividad de etileno con γ - Al_2O_3 a 395 °C, 97,0% de conversión de etanol y 100% selectividad de etileno con ZSM-5 a 398 °C, 96,6% de etanol y 100% selectividad de etileno con HZSM-5 a 286 °C y 97,7% de conversión a etanol y 100% selectividad de etileno con HYCBV-500 a 357 °C. Se realizaron experiencias con etanol comercial variando la dosificación del catalizador (HZSM-5) a 400 mg, 200 mg y 100 mg y también se evaluó el efecto de la concentración del etanol en la obtención del producto objetivo, empleando una concentración de etanol al 96% y al 53%. Como resultado, se obtuvo que disminuyendo la concentración de etanol en la entrada y empleando una dosificación de catalizador menor a 400 mg, el rendimiento de etileno disminuye notoriamente. Por ello, para la deshidratación de bioetanol 2G se seleccionaron los catalizadores protonados (HZSM-5 y HYCBV-500), puesto que lograron la mayor conversión de etanol y selectividad de etileno a menor temperatura, empleando una dosificación de 400 mg.

Para la obtención de etileno 2G mediante el catalizador HZSM-5 se logró 94,6 % de conversión de etanol y 100% de selectividad de etileno a 321 °C y con el catalizador HYCBV-500, 85,5% de conversión y 100% de selectividad de etileno a 334°C. De los resultados obtenidos para la producción de etileno empleando etanol comercial y bioetanol de 2G, es evidente que la cantidad de agua que contiene el etanol de entrada afecta notoriamente el mecanismo de deshidratación, requiriendo mayor temperatura para lograr mayores conversiones de etanol y selectividad de etileno.

Como conclusión, utilizando un proceso SSF, con 2% de celulosa hidrolizable se obtuvo un rendimiento de bioetanol del 81% y por mecanismo de deshidratación empleando catalizador protonado (HZSM-5) se logró 95% de conversión de bioetanol y 100 % selectividad de bioetileno a 372 °C.

Palabras claves: Aserrín de pino, estrategia SSF, bioetanol 2G, deshidratación catalítica, bioetileno 2G.

ABSTRACT

The work is part of the studies carried out by the group on the integral use of forest-industrial residues and is proposed as a continuation of already made research tending to close a pine biorefinery scheme to obtain high-value products, using processes of low pollution and contributing to the global environmental balance. For this reason, the experiences carried out for the production of bioethylene start from 3 pulps pretreated with soda-ethanol (with different chemical compositions).

The pulps subjected to an alkaline pretreatment presented the best enzymatic hydrolysis yields since alkali is one of the most effective agents for biomass swelling, allowing extracting the highest lignin amount possible and opening the pores of the fibers. The treatment increases the surface area, facilitates the accessibility of enzymes, and improves enzymatic conversion. These pulps were used for bioethanol production through fermentation strategies: separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) to compare the yields of ethanol produced. In the first method, both stages are carried out separately under their optimum conditions of 50 °C for the enzymatic hydrolysis process and (30-35) °C for the fermentation process, but have the disadvantage of generating inhibition products, e.g., glucose for hydrolysis and ethanol for fermentation. Its primary advantage is that the glucose produced during hydrolysis is immediately metabolized to ethanol by the yeasts, consuming the glucose of the medium. This results in less end-product inhibition, reduced overall process time, and higher ethanol productivity. In addition, the cost is reduced due to a single reactor use, making the processing more efficient.

Cellic® Ctec2 cellulolytic enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181) yeast were employed with the following parameters: 30.0 FPUg⁻¹ of the substrate and 1% hydrolyzable cellulose, T=37 °C, 10 ml of inoculum, pH=5 and 130 rpm. With the SHF strategy, the fermentation yield was $Y_{PT} (\%) = 84.8$, and with the SSF strategy, it was $Y_{P/T} (\%) = 100$ for the pulp that contains the lowest lignin content (3.7%) in its composition. As a result of this experience, it was proven that simultaneous saccharification and fermentation are more efficient than the separate process and that the pulp with the lowest lignin content produces the maximum conversion of glucose into ethanol.

Once the strategy that provides the highest concentration of bioethanol has been determined and working with the same pulp, experiments were carried out with the SSF strategy to evaluate the production of bioethanol varying the enzyme load (30-20-10) FPU g⁻¹ glucans and temperature (39-37-35) °C, employing 2% hydrolyzable cellulose. For the SSF strategy, two experimental designs were applied to optimize time, enzymatic load, and working temperature

to obtain the highest bioethanol yield. For Model I, the time varies from 0 to 24 h and 24 to 72 h (Model II). The best conditions found in the two designs were 30 FPU g⁻¹ glucans, 39 °C, 24 h for Model I, and 30 FPU g⁻¹ glucans, 35 °C, 72 h for Model II. For both models, optimal fermentation values were 63.2 and 81.9, respectively. The bioethanol produced subsequently was recovered by fractional distillation.

For the dehydration process, the objective was to evaluate the temperature at which the highest ethanol conversion and ethylene selectivity are achieved, using 2G bioethanol and commercial ethanol (as reference) with commercial catalysts Y-Al₂O₃, zeolites ZSM-5 (Si O₂ /Al₂O₃) = 23 molar, YCBV-500 (SiO₂/Al₂O₃) = 5,2 molar. Protonated zeolites (HZSM-5 y HYCBV-500) were also used, with a calcination treatment and the following operating conditions T=550 °C, t=2h, 2 °C/min.

In the dehydration process with commercial ethanol, the following results were obtained: 98.5% ethanol conversion and 100% ethylene selectivity with Y-Al₂O₃ at 395 °C, 97.0% ethanol conversion and 100% ethylene selectivity with ZSM-5 at 398 °C, 96.6% ethanol and 100 % ethylene selectivity with HZSM-5 at 286 °C and 97.7% conversion to ethanol and 100% ethylene selectivity with HYCBV-500 at 357 °C. Experiences with commercial ethanol were carried out varying the dosage of the catalyst (HZSM-5) at 400mg, 200 mg and 100 mg. The effect of the ethanol concentration in obtaining the objective product was also evaluated, using a 96% ethanol concentration and at 53%. As a result, it was obtained that by decreasing the ethanol concentration at the inlet and using a catalyst dosage of less than 400 mg, the ethylene yield decreased significantly. Thus, for the dehydration of 2G bioethanol, the protonated catalysts (HZSM-5 and HYCBV-500) were selected since they achieved the highest ethanol conversion and ethylene selectivity at lower temperatures, using a dosage of 400 mg.

To obtain ethylene 2G, 94.6% ethanol conversion and 100% ethylene selectivity were achieved at 321 °C using the HZSM-5 catalyst, and 85.5% conversion and 100% selectivity of ethylene at 334 °C with the HYCBV-500 catalyst.. From the results obtained for ethylene production using commercial ethanol and 2G bioethanol, it is evident that the water amount in the input ethanol notoriously affects the dehydration mechanism, requiring higher temperatures to achieve higher ethanol conversions and ethylene selectivity.

In conclusion, using an SSF process, with 2% hydrolyzable cellulose, a bioethanol yield of 81% was obtained, and by dehydration mechanism using a protonated catalyst (HZSM-5), 95% bioethanol conversion and 100% bioethylene selectivity were achieved at 372 °C.

Keywords: Pine sawdust, SSF strategy, 2G bioethanol, catalytic dehydration, 2G bioethylene.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

Esta tesis busca lograr el aprovechamiento integral del aserrín mediante su conversión sostenible a un bioproducto (bioetileno) de alto valor agregado (figura 1). En este contexto, este trabajo representa una utilidad esencial del aserrín de pino para la producción de biocombustibles, bioproductos y biomateriales dentro de un posible esquema de biorrefinería.

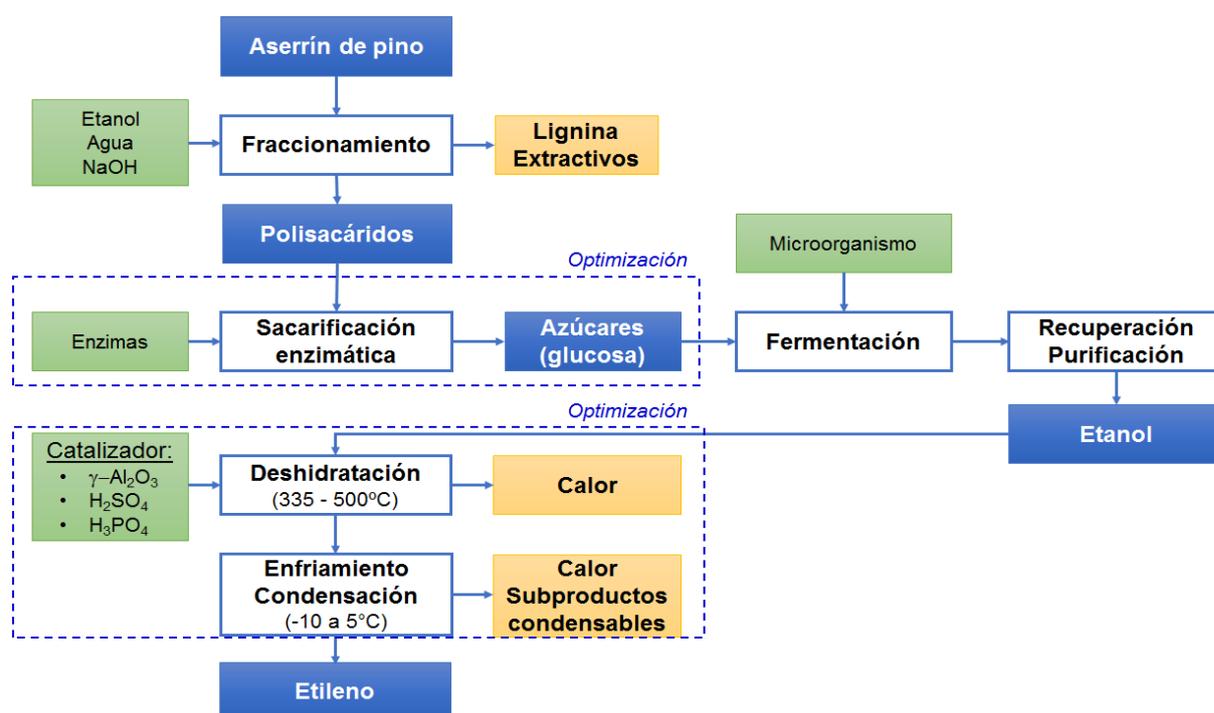


Figura 1. Esquema de utilización del aserrín de pino en el plan de tesis

1.1.1 Aserrín de pino

Las proyecciones más recientes realizadas por la FAO estiman que para 2030, el consumo global de madera aumentará un 60% respecto a los niveles actuales hasta alcanzar aproximadamente los 2.400 millones de m³ (Peirano *et al.* 2019).

El aserrín de pino es un sustrato ligero, con una densidad aparente de 0.1 a 0.45 g.cm⁻³. La porosidad total es superior al 80 %, la capacidad de retención de agua es de baja a media. (Area and Park 2017).

En la Argentina, la superficie boscosa consiste en unos 33 millones de hectáreas de bosques nativos y más de 1,1 millones de hectáreas forestadas de monte implantado. En particular, la provincia de Misiones posee 380.000 ha forestadas, según datos de 2020. La

mayoría son especies de pinos y de eucaliptos (400.000 ha), representado el 14 % de la superficie de la provincia (Argentina innovadora 2020). En Misiones se han implantado 380.000 ha, las variedades principales son las norteamericanas *Pinus elliotti* y *Pinus taeda*. Otras especies implantadas son la *Pinus caribea*, variedad *hondurensis*, y la *Pinus caribea*, variedad *caribea*.

La industria maderera genera gran cantidad de residuos que se componen de corteza (7 %), aserrín (17%), 12 costaneros (21 %), virutas (8 %), despuntes (2 %) y chips/astillas (45 %) que en total representan 2.100.000 toneladas por año (Uasuf and Hilbert 2012). Se estima que el 50% de la madera industrialmente procesada se convierte en 2 millones de toneladas secas al año de residuos que no están siendo adecuadamente aprovechados.

Actualmente el aserrín de pino es tratado como un desecho de difícil aprovechamiento, por ejemplo en la ciudad de Montecarlo se utiliza para la fabricación de bloques de madera con hormigón. Es un producto muy eficiente, evita revoque grueso porque cumple con las funciones de aislación y nivelación (Simacon 2017).

El aserrín de pino también es utilizado 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. Es un material orgánico que puede disminuir la población de malezas, cuando es incorporado como cobertura en la superficie del suelo de los jardines (Pineda-Pineda *et al.* 2012).

Algunas investigaciones y aplicaciones en establecimientos de ganado ovino han demostrado que el aserrín de pino es útil en la alimentación de rumiantes, la dieta formulada está integrada entre 15 a 30% de aserrín y el resto por ingredientes que aportan proteína, energía y minerales, como son pasta de soya, canola, granos como maíz, sorgo, e incluso urea (Medina 2021).

La combustión de biomasa de desechos forestales (ramas, acículas, aserrín y viruta), al igual que los combustibles fósiles convencionales, puede considerarse materia prima en la producción de combustible y generación de energía eléctrica, térmica y potencial, para su uso en los sectores industrial, comercial, familiar y del transporte (García *et al.* 2013).

Es importante destacar que la región nordeste de Argentina es la zona más boscosa del país y genera enormes cantidades de residuos lignocelulósicos cuya disposición final ocupa un espacio valioso, produciendo contaminación al medio ambiente, riesgo de incendios y de plagas que amenazan la salud humana.

Como toda biomasa lignocelulósica, el aserrín de pino está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina y extractivos (Bajpai 2016a). Ésta varía su composición de acuerdo al tipo de especie, que contiene entre un (35-50)% de celulosa, (20-35)% de hemicelulosa, (10-15)% de lignina y (2-4)% de extractivos (Limayem and Ricke 2012; Luo *et al.*

2010; Sjöström 1993). Siendo fundamental conocer la cantidad relativa de estos polímeros para decidir el mecanismo óptimo de conversión (McKendry 2002).

Las hemicelulosas son el segundo polímero más abundante en la biomasa. Se componen de diferentes monosacáridos como xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico, formando cadenas ramificadas (Saha 2003). Las hemicelulosas son los polímeros termoquímicamente más sensibles entre los componentes de los materiales lignocelulósicos, y su eliminación completa aumenta significativamente la digestibilidad celulósica del material (Bajpai 2016b).

La lignina es el tercer polímero más abundante, con una estructura tridimensional compuesta por unidades fenilpropano. En general, las ligninas de coníferas están compuestas principalmente de unidades guayacil propano (Area *et al.* 2012a).

Los extractivos son componentes que presentan baja masa molecular, por lo cual es posible extraerlos con diversos solventes y son los responsables de algunas características como la resistencia natural a la pudrición, el sabor y las propiedades abrasivas (Álvarez Godoy 2017). En las coníferas, los extractivos son principalmente los ácidos resínicos, pero además contienen ácidos grasos, esteres grasos, esteroides, azúcares, almidón, taninos condensados, sales (orgánicas e inorgánicas) y lignanos. Los extractivos pueden ocasionar problemas en el procesamiento químico de la biomasa, tales como la disminución del rendimiento, el aumento del consumo de reactivos en los tratamientos alcalinos para neutralizar los ácidos, y problemas de pitch en medio ácido (sustancia pegajosa que se adhiere a los equipos, filtros, etc.). Otros componentes minoritarios son los inorgánicos (no extraíbles) (Sluiter *et al.* 2004).

1.1.2 Celulosa

La celulosa es probablemente el compuesto orgánico con usos más versátiles y frecuentes. Se usa en diversidad de industrias como las de madera, papel, fibras y ropa, alimentos veterinarios, cosmética y farmacéutica entre otras. El principal consumidor mundial de celulosa es la industria de papel. Ello determina que la demanda de celulosa a nivel mundial crece según la demanda de papel. En este contexto, la producción mundial de papel fue de 416 millones de toneladas en 2021 y sigue incrementando proporcionalmente. Las fibras de celulosa que se utilizan en la fabricación de papel pueden ser fibra virgen o recuperada. La madera figura como la materia prima básica de la industria papelera (ASPAPPEL 2021).

La celulosa es el principal biopolímero de la pared de la fibra, está compuesta por moléculas de β -D-glucosa combinadas por enlaces β -1,4 glucosídicos, y al hidrolizarse totalmente, la glucosa obtenida puede convertirse simplemente en etanol mediante los métodos tradicionales de fermentación alcohólica (Zhu *et al.* 2011). La estructura de la celulosa favorece

que las cadenas se organicen en conjuntos/paquetes con un orden cristalino, que se mantienen juntos por fuertes puentes de hidrógeno, produciendo una configuración fibrosa.

La celulosa presenta un elevado potencial de funcionalización debido a la presencia de 3 grupos hidroxilo libres en cada residuo de glucosa. Esto permite el enlace químico de diferentes reactivos dando lugar a derivados de celulosa. No obstante, la estructura cristalina y la red de puentes de hidrógeno existentes en la macromolécula, hacen necesarios tratamientos previos para desensamblar su estructura y hacer disponibles los grupos OH^{-1} , es decir para aumentar la reactividad y accesibilidad de la celulosa (Erick *et al.* 2014). Uno de estos procesos, consiste en disolver la celulosa en medio básico para después regenerarla en medio ácido en forma de fibras de aplicación textil (Rayón), membranas de aplicación como envolturas de alimentos (celofán) y esponjas (Martínez 2020). Muchos derivados de celulosa se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica y cosmética. Entre ellos, los éteres y ésteres de celulosa son los dos principales derivados con diferentes propiedades fisicoquímicas y mecánicas (Locane 2019), que se utilizan generalmente en la formulación de productos de farmacéuticos y sanitarios. Estos compuestos juegan un papel importante como sistemas de administración osmótica, bioadhesivos y mucoadhesivos, potenciadores de compresibilidad en tabletas, agentes espesantes en dosificaciones líquidas, aglutinantes y agentes gelificantes en muchos productos farmacéuticos (Mejía 2016).

Varias formas de derivados de celulosa son reconocidas generalmente como sustancias seguras para la alimentación (GRAS) según la FDA. Muchas de ellas son ampliamente utilizadas en la industria de alimentos, por ejemplo: la carboximetilcelulosa (CMC) que se utiliza como espesante en productos derivados lácticos y como estabilizantes de una amplia gama de alimentos, ya que es resistente a medios ácidos y no cambia sus propiedades después de los procesos térmicos, como por ejemplo la deshidratación de sopas (Maupoey *et al.* 2001).

1.1.3 Bioetanol

La búsqueda de alternativas para la obtención de etanol para obtención de biocombustibles de segunda generación se centra en la aplicación de la celulosa como fuente de glucosa en la fermentación alcohólica (Arismendy *et al.* 2020; Mendieta *et al.* 2021, 2022).

La biomasa lignocelulósica se revela como una fuente importante de materias primas dado su carácter poco contaminante, permitiendo la obtención de combustibles y de otros productos (Brodin *et al.* 2017).

La biorrefinería química de la biomasa lignocelulósica, rica en celulosa, hemicelulosas y lignina, permite su aprovechamiento integral mediante su conversión sostenible a combustibles, bioproductos y biomateriales de alto valor agregado, que no compiten con la industria de alimentos. Es una alternativa sostenible, de bajo costo y altamente disponible para el reemplazo de combustibles fósiles. La industrialización de estos productos aún se encuentra en

estudio, debido a que su desarrollo aún se encuentra en escalas de laboratorio y piloto (Area *et al.* 2012b). El bioetanol de 2G es un precursor prometedor para la obtención de bioplásticos (figura 2) contribuye al aprovechamiento de la biomasa disponible en la región nordeste de Argentina dentro de un posible marco de biorrefinería (Mendieta *et al.* 2019).

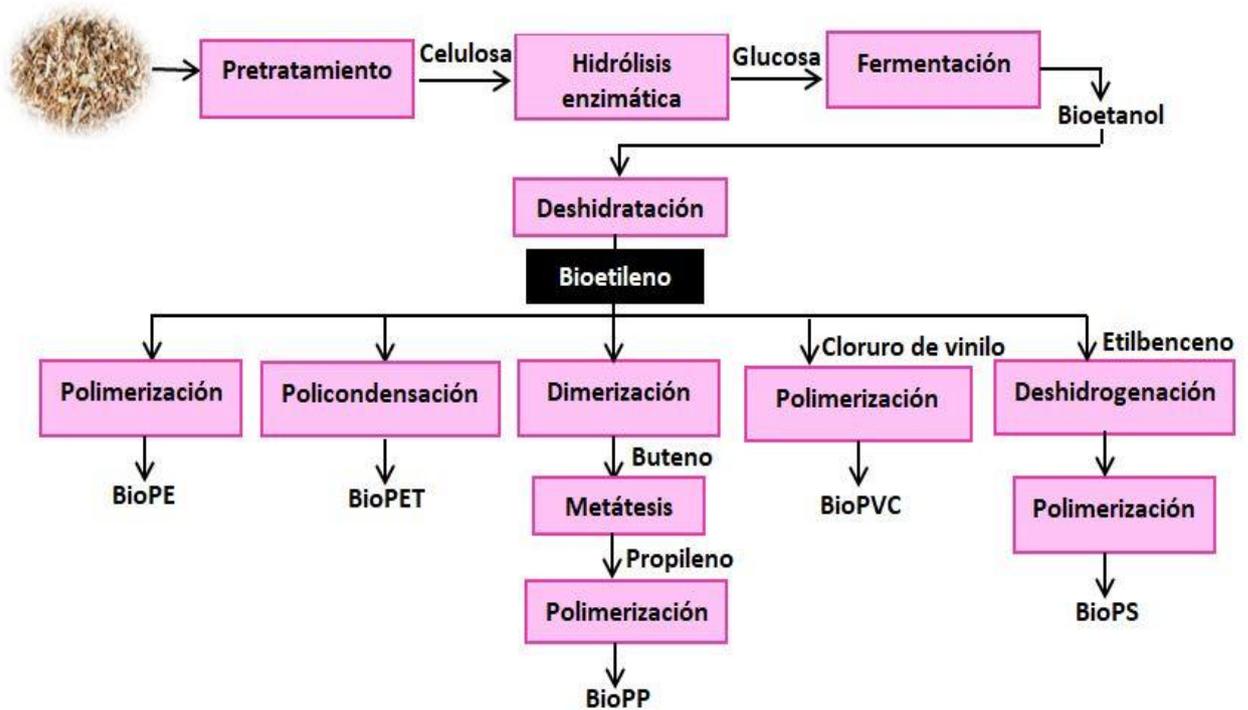


Figura 2. Bioplásticos a partir de la celulosa en una biorrefinería química

El bioetanol es un biocombustible que podría reemplazar al combustible fósil y se lo clasifica dependiendo de la materia prima utilizada: bioetanol de primera generación (1G), de segunda generación (2G) y de tercera generación (3G) (Prasad *et al.* 2007). El de 1G utiliza como materia prima cultivos empleados generalmente con fines alimenticios, el de 2G aprovecha biomasa lignocelulósica y el de 3G usa métodos de producción similares a los de segunda, pero empleando como materia prima cultivos bioenergéticos específicamente diseñados o adaptados para mejorar la conversión de biomasa a biocombustible (Kikuchi *et al.* 2013).

Casi el 80-90% de la producción de bioetanol se utiliza como biocombustible en mezclas con gasolina (5-10 %), lo que representa un ahorro del 5-27% de los recursos petroleros. Otros usos del bioetanol son como solvente para productos saborizantes y colorantes, perfumes, medicamentos, tintes, aditivos en la industria de pinturas, productos químicos agrícolas y agentes de olor (Mika *et al.* 2018). El costo de producción varía considerablemente según las variaciones de los precios del petróleo. Se espera que el aumento de los rendimientos de los

procesos de producción de bioetanol y la reducción de los costos de producción mediante la optimización de los procesos favorezca su uso como intermediario químico de productos químicos de alto valor (Araújo 2016). El uso de bioetanol como materia prima para la fabricación de productos químicos ha logrado el desarrollo del mercado, identificándose como uno de los principales bioproductos para la industria química (Barboza- Devos and Colla 2022), como se puede observar en la Figura 3.

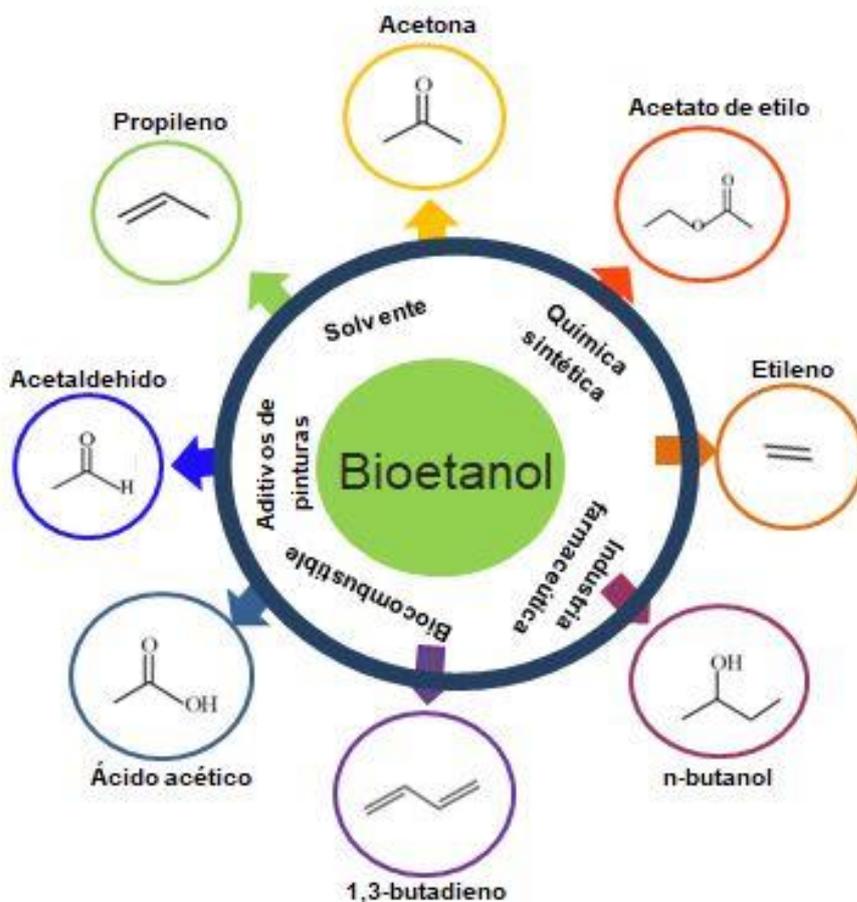


Figura 3. Derivados del bioetanol por conversión catalítica

El bioetanol podría convertirse en un intermediario primario en química orgánica industrial basada en recursos renovables. La catálisis heterogénea juega un papel fundamental en el desarrollo y mejora de los procesos requeridos (Garbarino *et al.* 2020). Se ha avanzado en la conversión catalítica de bioetanol en productos químicos relevantes como etileno, propileno, 1,3-butadieno, isobutileno, hidrógeno, acetaldehído, óxido de etileno, n-butanol, ácido acético, acetato de etilo, acetona y éter dimetílico. Algunos de ellos se producen actualmente a partir de recursos fósiles. Los procesos de conversión pueden involucrar deshidratación, deshidrogenación, oxidación, reformado, gasificación, descomposición,

acoplamiento, entre otros. Muchos desarrollos aún se encuentran en las etapas iniciales de diseño (escala de laboratorio o piloto).

La producción del bioetanol 2G involucra el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, la hidrólisis de la fracción de polisacáridos, la fermentación de azúcares y la destilación. El pretratamiento elegido depende de la materia prima e influye en los pasos posteriores (Kruyeniski 2017a). El pretratamiento tiene como objetivo romper la matriz de biomasa lignocelulósica para obtener los carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosas) y la lignina. La hidrólisis enzimática es un proceso catalítico en el que las enzimas actúan sinérgicamente para producir monómeros de glucosa mediante la ruptura de enlaces entre polisacáridos en condiciones moderadas (generalmente, pH de 4,5 a 5,0 y temperaturas de entre 40 y 50 °C) (Tahezadeh and Karimi 2007a). Luego de esta etapa, el uso de estrategias de fermentación permite obtener el producto objetivo como se observa en la figura 4.

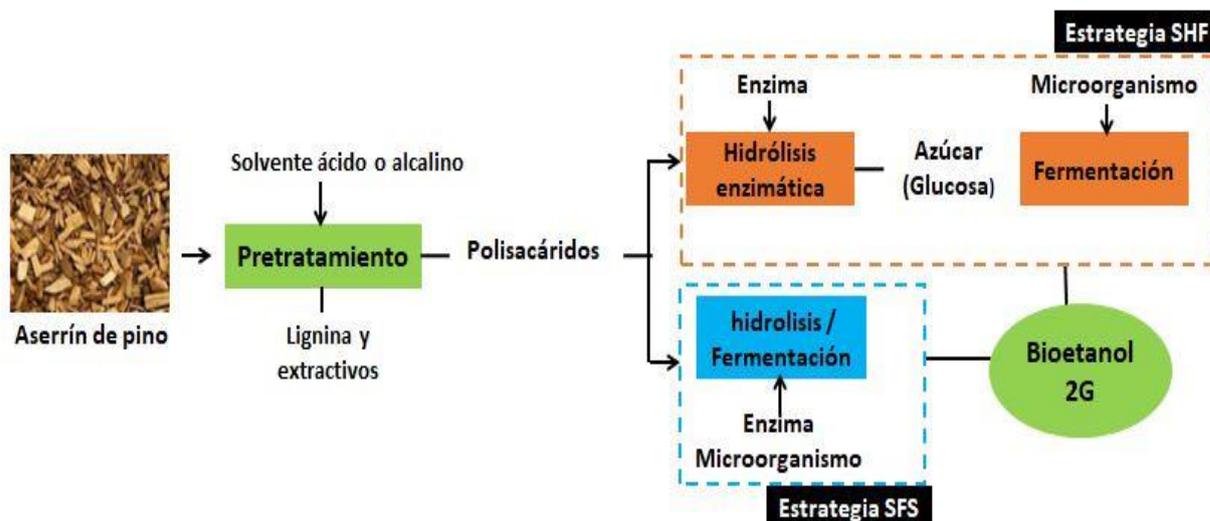


Figura 4. Esquema general para obtener bioetanol de 2G a partir de biomasa lignocelulósica

El bioetanol de 2G presenta ciertas complicaciones tecnológicas que dificultan el proceso. Entre ellas, el material contiene importantes cantidades de hemicelulosas (principalmente pentosas), que son refractarias a los procesos tradicionales de fermentación, la presencia de lignina obstaculiza el tratamiento debido a que compacta la estructura del material, y la celulosa se encuentra principalmente en forma cristalina y debe ser depolimerizada para poder ser fermentada (Kruyeniski *et al.* 2017).

1.1.4 Bioetileno

El etileno es un componente químico muy utilizado en el sector petroquímico. Se obtiene tradicionalmente mediante el craqueo de los hidrocarburos del petróleo usando vapor (Kniel *et al.* 1980) y se recupera del gas craqueado de refinería (Zimmermann and Walzl 2000).

En la industria petroquímica, la deshidratación de etanol a etileno es un proceso habitual (Kniel *et al.* 1980). Sin embargo, para el proceso de etileno, la pureza del etanol debe ser superior al 95% en peso. Además, el bioetanol tiene particularidades que hacen necesario un tratamiento adicional previo al procesamiento del etileno.

En los últimos años, los investigadores se han centrado en alternativas sostenibles al etileno para disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y reducir la dependencia de los combustibles fósiles (Melander and Qvint 2016), siendo el bioetanol de 1G obtenido de la fermentación de la caña de azúcar, jugo y melaza (Brasil) y también por almidón hidrolizado de granos de maíz (Estados Unidos) y otros posibles cultivos como papa, trigo, mandioca, remolacha, entre otros (Harsem and Hackmann 2013). Incluso si son fuentes renovables, estas materias primas son empleadas principalmente por la industria alimenticia, sin embargo el bioetanol de segunda generación se elabora a partir de carbohidratos no alimentarios mediante la conversión de residuos agroforestales de bajo costo que favorecen su valorización (Castillo *et al.* 2012).

A diferencia del etanol de base fósil, tanto el bioetanol 1G como el 2G provienen de un caldo de fermentación que contiene microorganismos, nutrientes y subproductos de reacción. El bioetanol obtenido debe purificarse antes de su procesamiento para obtener bioetileno, mediante la eliminación de contaminantes y agua adicional. Considerando que esta es una etapa de gran consumo energético (Cardona *et al.* 2006), es uno de los pasos que requieren optimización para contribuir a la viabilidad económica del bioetileno.

La capacidad actual de producción global anual de etileno es de más de 140 a 150 millones de toneladas (Alonso-Fariñas *et al.* 2018; Oliveira *et al.* 2019). El tamaño del mercado del etileno fue de aproximadamente \$160,000 millones de dólares en 2015 y se estima que supere los \$235,000 millones de dólares en 2024 (Global Market Insights 2020). El precio de venta del etileno fluctuó entre 2018 y 2019. Disminuyó entre un 15% y un 35%, alcanzando los \$1.000 USD/t en mayo de 2019 (ICIS 2020), principalmente por la disminución de los precios del petróleo (Min-hee 2019).

El precio de venta informado del bioetileno 1G es de aproximadamente \$1100 a \$1500 USD/t (Budzinski and Nitzsche 2016; Jiang *et al.* 2019; Nitzsche *et al.* 2016), pero en algunos casos puede alcanzar más de \$2,000 USD/t (Taylor, R., Natrass, L., Alberts, G., Robson, P., Chudziak, C., Bauen, A., Libelli, I. M., Lotti, G., Prussi, M., Nistri 2015). Según información de inversión reciente, los costos de capital para la producción de bioetileno, dependiendo del proceso, podrían oscilar entre \$460 USD/t (Becerra *et al.* 2017), entre \$1,100 y \$1,400 USD/t

(Broeren 2013), \$3,880 USD/ t (Nitzsche et al. 2016), y \$5,750 USD/t de etileno por año (Budzinski and Nitzsche 2016). Algunos de los costos de producción se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Costo de producción de etileno reportado por varios estudios.

Materia prima	Capacidad (t etileno/ año)	Año	Costo de producción (USD/t)	País	Referencia
Hayas de madera	400.000 ^a	2016	1,349 ^b	Alemania	(Nitzsche <i>et al.</i> 2016)
Maíz ^b	-	2009	2,060	USA	(Broeren 2013)
Caña de azúcar	-	2009	1,190	Brasil	(Broeren 2013)
Caña de azúcar	-	2009	1,220	India	(Broeren 2013)
Remolacha azucarera	-	2009	2,570	Unión Europea	(Broeren 2013)
Sorgo dulce	-	2009	1,650	China	(Broeren 2013)
Bagazo de caña de azúcar	500.000	2019	1,006 a 1,436	Brasil	(Oliveira <i>et al.</i> 2019)
Abeto – Salix – Maíz	200.000	2011	1,012 to 1,084 ^c	Suecia	(Hackl <i>et al.</i> 2015)
Caña de azúcar	1.000.000	2012	1,347	Brasil	(Cameron <i>et al.</i> 2012)
Maíz	9.9 to 38.9 ^d	2013	1,724 to 1,762 ^c	Unión Europea	(Haro <i>et al.</i> 2013)
Biomasa	9.9 to 38.9 ^d	2013	1,219 to 1,182 ^c	USA	(Haro <i>et al.</i> 2013)
Caña de azúcar	9.9 to 38.9 ^d	2013	1,053 to 1,016 ^c	Brasil	(Haro <i>et al.</i> 2013)

^aMateria prima por año. ^bPrecio mínimo de venta en €. ^cValores en €. ^dt/h.

Los precios y costos de producción del bioetileno son similares a los del etileno derivado del petróleo (Nitzsche *et al.* 2016; Santagata *et al.* 2020). Sin embargo, el precio de mercado de los derivados del bioetileno, como los polímeros, es ligeramente superior al precio de mercado de los derivados del petróleo (Taylor, R., Nattrass, L., Alberts, G., Robson, P., Chudziak, C., Bauen, A., Libelli, I. M., Lotti, G., Prussi, M., Nistri 2015). Algunos investigadores han informado

de una prima del 30 % al 60 % en el precio del BioPE (Nitzsche et al. 2016; Taylor, R., Natrass, L., Alberts, G., Robson, P., Chudziak, C., Bauen, A., Libelli, I. M., Lotti, G., Prussi, M., Nistri 2015). Del mismo modo, el precio del bio-PET no es competitivo con el precio habitual del PET (Taylor, R., Natrass, L., Alberts, G., Robson, P., Chudziak, C., Bauen, A., Libelli, I. M., Lotti, G., Prussi, M., Nistri 2015). Sin embargo, el concepto de biorrefinería parece muy prometedor cuando se considera la disposición de los consumidores a pagar un precio más alto por los biopolímeros y el bioetileno (Budzinski and Nitzsche 2016).

Las evaluaciones de sensibilidad desarrolladas para la producción de bioetileno utilizando caña de azúcar y madera de haya como materias primas mostraron una fuerte dependencia del precio de la materia prima (Nitzsche *et al.* 2016; Oliveira *et al.* 2019) y los precios de venta de los productos (Nitzsche *et al.* 2016). En estos trabajos, el costo de la materia prima era más de \$100 USD/t en algunos casos. Sin embargo, en los países en desarrollo, los costos de la materia prima y la mano de obra son más bajos que en los países desarrollados, por lo que la producción de bioetileno puede ser una alternativa atractiva para agregar valor a los desechos lignocelulósicos. Por ejemplo, la materia prima puede representar del 60% al 75% de los costos de producción dependiendo principalmente del producto final (biomasa o etanol) y la región geográfica, pero en regiones donde la materia prima y la mano de obra son más baratas, como Brasil, India y Argentina, los costos de producción podrían reducirse (Mohsenzadeh *et al.* 2017).

Actualmente, plantas como Braskem en Brasil (Broeren 2013; Oliveira *et al.* 2019), India Glycols Limited en India (Global Market Insights 2020) y Greencol Taiwan Corporation en Taiwán (Chemicals-Technology 2020), producen etileno 1G a partir de caña de azúcar y melaza, con capacidades anuales entre 100 y 200 kt. También hay proyectos en etapa de desarrollo como Dow/Mitsui en Brasil a partir de caña de azúcar (con una capacidad de proyecto de 300 kt/año) (Plastics News 2013). Hay informes de varias plantas en China con capacidades anuales entre 9 kt y 80 kt, pero se desconoce su estado (Broeren 2013).

1.2 Procesos involucrados

1.2.1. Pretratamientos de la biomasa

Para realizar el proceso de deslignificación de la materia prima existen varios pretratamientos de naturaleza física, química y biológica; algunos de ellos se presentan en la figura 5.

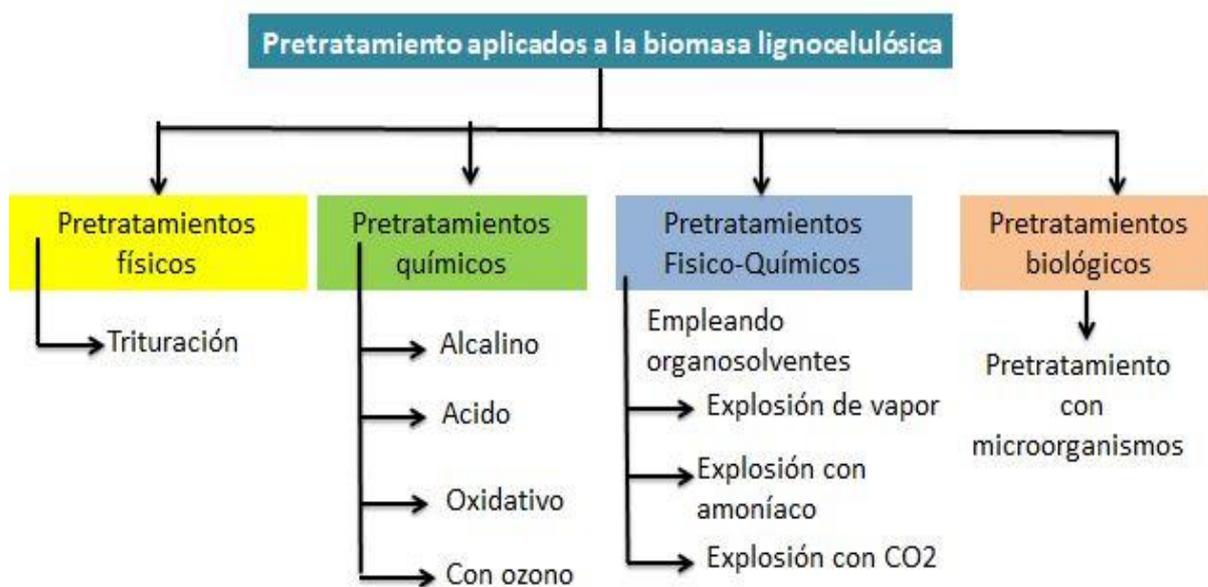


Figura 5. Clasificación de los pretratamientos aplicados a la biomasa lignocelulósica

En el pretratamiento físico se realiza una trituración mecánica, la cual permite reducir el tamaño de la partícula del material, favoreciendo a la reducción de la cristalinidad de la celulosa, y aumentar el área superficial para facilitar los procesamientos posteriores. En este proceso comúnmente se utiliza un molino de bolas, rodillo, fresado, martillo, entre otros (Tahezadeh and Karimi 2007b).

En los pretratamientos químicos, el objetivo principal es solubilizar la lignina para mejorar la accesibilidad del complejo enzimático al material pretratado. Dentro de ellos se encuentra el pretratamiento alcalino, en el cual se utiliza NaOH diluido, que mejora el rendimiento de la hidrólisis enzimática, ya que el álcali es uno de los agentes más efectivos para el hinchamiento de la biomasa. El tratamiento alcalino permite extraer la mayor cantidad de lignina posible, abriendo los poros de las fibras aumentando el área superficial y permitiendo la accesibilidad de la enzima en los componentes restantes, lo que mejora la conversión enzimática (Kruyeniski *et al.* 2019).

El pretratamiento con ácidos (diluidos o fuertes) permite solubilizar las hemicelulosas y genera poco efecto sobre la lignina. En este pretratamiento se generan azúcares y productos de degradación (furfural e hidroximetilfurfural), que pasan a ser productos de inhibición para el complejo enzimático en la etapa de sacarificación enzimática. Los reactivos que más se utilizan son el ácido sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, nítrico, ácido oxálico, fórmico y acético (Area *et al.* 2012a; Das *et al.* 2019; Santos Meneses 2018).

En el pretratamiento oxidativo la finalidad es eliminar la lignina y hemicelulosas para aumentar la accesibilidad del complejo enzimático a la celulosa en la hidrólisis enzimática; comúnmente se utiliza el peróxido de hidrógeno como sustancia oxidante. En el pretratamiento

con ozono, éste actúa removiendo la lignina sin tener efecto en la hemicelulosas y celulosa, no produce compuestos inhibitorios y presenta alto rendimiento en la deslignificación, pero es un proceso costoso (Sun and Cheng 2002).

Dentro de los pretratamientos fisico-químicos, se utilizan organosolventes junto a procedimientos físicos para remover las hemicelulosas y lignina de la biomasa. En el proceso con explosión de vapor se aplican temperatura que oscilan entre 190-230 °C por un determinado tiempo y luego una despresurización para favorecer la ruptura de las fibras (Guarnizo *et al.* 2009).

El proceso de explosión con amoníaco, es similar al pretratamiento con explosión de vapor, utilizando amoníaco como reactivo en un rango de temperatura entre 60 y 100 °C seguido de una descompresión, lo que permite remover la lignina, grupos acetilos (desacetilación) y disminuir la cristalinidad de la celulosa, favoreciendo la digestibilidad de la biomasa en los procesos posteriores.

El pretratamiento biológico, se lleva a cabo con microorganismos los cuales generan enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas que permiten la degradación de la biomasa lignocelulósica. Los microorganismos más usados son: *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus ostreatus* y *P. chrysosporium* (Bajpai 2016b).

1.2.2. Hidrólisis enzimática

Las enzimas responsables de la ruptura de los enlaces glucosídicos que hidrolizan la celulosa son las celulasas. El proceso de hidrólisis enzimática se lleva a cabo en dos pasos. La hidrólisis primaria se produce en la superficie del sólido liberando oligómeros con un grado de polimerización hasta 6 en fase líquida, mientras que la hidrólisis secundaria implica la hidrólisis de celobiosa a glucosa por las enzimas β -glucosidasas (Danigno 2012) (figura 6).

La hidrolisis enzimática se lleva a cabo bajo condiciones suaves (pH 4,5-5,0 y temperaturas entre 40 y 50 °C).

Los factores que influyen en la eficiencia enzimática son el origen de la materia prima, la concentración de enzimas, su absorción, la inhibición de la reacción por productos finales, su inactivación térmica, sinergia entre enzimas y actividad específica (Kruyeniski 2017). Los rendimientos de hidrólisis enzimática (RHE) se pueden calcular mediante la ecuación. 1.

$$RHE (\%) = \frac{g \text{ glucosa} * 0,9}{g \text{ glucanos en la biomasa inicial}} * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde se suma el factor 0,9 para expresar la concentración de glucosa como glucanos (Kruyeniski 2017).

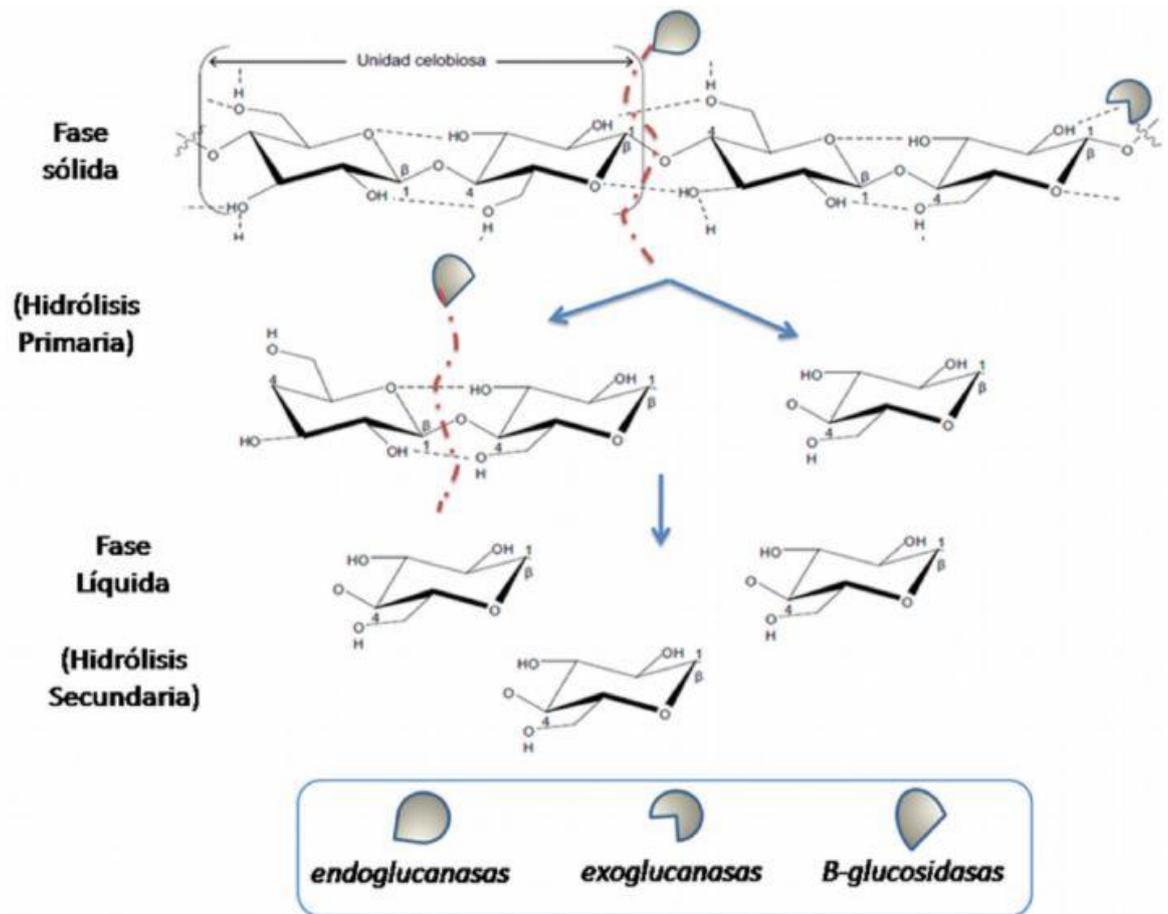


Figura 6. Mecanismo de hidrólisis enzimática en la celulosa (Danigno 2012)

La acción de las enzimas está influenciada por las características estructurales del material lignocelulósico, por lo que el principal objetivo del pretratamiento en la producción del bioetanol 2G es disminuir la recalcitrancia de la celulosa al ataque enzimático (Kruyeniski 2017). La lignina restringe la accesibilidad de la celulosa. En general, cuanto mayor es el contenido de lignina, menor es el rendimiento de hidrólisis enzimática, lo que explica parcialmente por qué las coníferas tienden a ser más resistentes al ataque enzimático (Stoffel 2017). Los pretratamientos deslignificantes alcalinos son más eficientes para obtener un grado significativo de separación de lignina y alto rendimiento de hidrólisis enzimática en pinos, ya que los tratamientos ácidos generan reacciones de condensación que hacen que la lignina sea menos reactiva y difícil de extraer (Kruyeniski 2017).

1.2.3 Fermentación

El uso de celulosa hidrolizada y hemicelulosas de materiales lignocelulósicos es una alternativa sostenible y económicamente viable para producir bioetanol 2G, pero por el momento esta técnica está en desarrollo sin producción a escala comercial (Morschbacker 2009). La obtención de etanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos requiere microorganismos que produzcan etanol con un alto rendimiento de todas las azúcares presentes (hexosas y pentosas) (Gu *et al.* 2014; Hahn-Hagerdal *et al.* 2006; Ximenes *et al.* 2011). El mecanismo de fermentación de hexosas y pentosas por el metabolismo de los microorganismos se puede representar mediante las Ecs. 2 y 3.



La fermentación con levaduras se realiza tradicionalmente con *Saccharomyces cerevisiae*, que es el microorganismo más utilizado en la fermentación industrial debido a su capacidad para fermentar eficientemente la glucosa a bioetanol. Esta levadura se considera un GRAS (generalmente reconocido como segura) y un microorganismo efectivo debido a su alta productividad, tolerancia al etanol, rango de trabajo de pH ácido y de temperatura, entre 25 y 35 °C (Olsson and Hahn-Hägerdal 1996). Este proceso es muy utilizado por el hombre para la producción de bebidas alcohólicas como la cerveza y el vino. Actualmente se está empleando para producción de bioetanol, pero para ello se requieren procesos previos como la hidrólisis enzimática, para generar los azúcares que van a ser fermentados a bioetanol y CO₂.

El rendimiento teórico es 0,511 g etanol / g hexosa (Area *et al.* 2012b). El rendimiento en la producción de bioetanol está influenciado por varios factores como la materia prima, la elección del pretratamiento (Arora *et al.* 2013; Balat 2011; Chu *et al.* 2012), y la estrategia de fermentación (Matano *et al.* 2012; Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000). Esta última puede involucrar: hidrólisis y fermentación separadas (SHF), que realiza las etapas por separado; sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) en la que ambas etapas se realizan al mismo tiempo en un solo reactor (San Martín *et al.* 1995); o conversión microbiana directa (DMC), donde la producción de celulasas, la hidrólisis de celulosa y la fermentación de la glucosa se combinan en una sola etapa (Gray *et al.* 2006). Frecuentemente, los rendimientos de etanol se comparan con los rendimientos teóricos, es decir 0,511 g de etanol / g de hexosas (Alshammari *et al.* 2016; Hamelinck *et al.* 2005). Suele ser imprescindible utilizar un procedimiento de detoxificación para reducir los inhibidores durante el proceso de fermentación, como el 5-hidroximetilfurfural (HMF), furfural o ácido acético, entre otros (Chen *et al.* 2007a; Galvita V. V. *et al.* 2001; Ren *et al.* 2009).

La estrategia SHF 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 (Arismendy Pabón, Ana María Felissia *et al.* 2020; Mendieta *et al.* 2021). 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 (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000).

El SSF es un proceso que permite llevar a cabo la hidrólisis y fermentación en un solo paso (Xiros and Olsson 2014). 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 (Mendes *et al.* 2019, 2020). 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) (Wood *et al.* 2016).

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 (Manfredi *et al.* 2018). El SSF permite emplear un solo reactor para realizar los procesos y se puede llevar a cabo en corto tiempo.

Las levaduras se suelen utilizar para la transformación de la glucosa presente en los hidrolizados a bioetanol (Zheng *et al.* 2011), entre ellas, las más utilizados son *Saccharomyces cerevisiae* (el microorganismo de uso común a nivel industrial) (Srilekha Yadav *et al.* 2011) y *Zymomonas mobilis*, que fermenta hexosas pero no xilosas (Fu *et al.* 2009). Las ventajas del *Saccharomyces cerevisiae* es que desarrolla tolerancia a los inhibidores que están presentes en los hidrolizados lignocelulósicos en el rango de pH del proceso a través de la fermentación anaeróbica de azúcares como glucosa y hexosas (Paysepar 2018; Wu and Wu 2017). Dado que los microorganismos mencionados anteriormente no fermentan los azúcares de cinco carbonos (Ju *et al.* 2013), se requiere el uso de microorganismos con esta capacidad, como la bacteria *Escherichia coli* o *Pichia stipites* (Noller and Thomke 1979; Paysepar 2018; Wang *et al.* 2021). El rendimiento de etanol se puede calcular utilizando la ecuación 4 (Kruyeniski 2017b).

$$RE (\%) = \frac{\text{Etanol producido } \frac{g}{L}}{0,51 * \text{glucosa en la muestra } \frac{g}{L}} * 100 \quad \text{Ec. 4}$$

Para la producción de bioetanol, la fermentación de gravedad muy alta (VHG) surge como una opción interesante para explorar y optimizar cuando se usa SHF, ya que puede

mejorar el rendimiento de la fermentación y purificar el etanol simultáneamente (Kang *et al.* 2014).

1.2.5 Purificación

El proceso de etileno requiere una pureza de etanol superior a 95 % en peso. El proceso de purificación consiste en la eliminación de las diferentes sustancias presentes en el caldo de fermentación. En primer lugar, el caldo se concentra para separar los sólidos y sustancias no volátiles de la solución etanol-agua por sistemas de extracción por vapor (columna de cerveza). Estas sustancias se envían a un separador sólido-líquido. El líquido separado es evaporado para obtener un jarabe de disueltos y no volátiles que se mezclan con la fracción sólida del separador para su combustión. El etanol se extrae de la solución acuosa de decapado con una pureza de aprox. 95% en peso utilizando un sistema de destilación (columna de rectificación) (Hamelinck *et al.* 2005). Este paso es uno de los que más energía consume y tiene el principal impacto en la demanda total de energía en etanol producción. Una alta concentración de etanol (> 99% en peso) puede lograrse por destilación con desecantes, pervaporación, o técnicas de membrana (Cardona Alzate and Sánchez Toro 2006).

Para ello, varios métodos combinan destilación, adsorción, extracción, entre otros, como la separación por pervaporación de membrana (Feng and Huang 1997), la destilación extractiva o la destilación heteroazeotrópica (Aditya *et al.* 2016).

1.2.4 Deshidratación

El proceso para obtener etileno de calidad polimérica comercializable a partir de etanol consta de varias etapas de purificación. En primer lugar, el agua presente en la salida de la corriente de gas se condensa en una torre de enfriamiento rápido (0,1 MPa), por enfriamiento del gas con agua de la parte superior. Una fracción del líquido del fondo se enfría a 20 °C y se recicla. El gas seco se comprime a continuación a 2,7 MPa en un compresor de tres etapas con el fin de permitir un nivel de presión suficiente y temperatura favorable para otros procesos. Detrás de cada etapa del compresor, el gas se enfría y se elimina el agua condensada. Después, el CO₂ es absorbido en una torre cáustica, lavando el gas con NaOH en una columna rellena. Para eliminar el NaOH, el gas se lava con agua pulverizada en la parte superior de la columna. El agua restante en el gas rico en etileno se retira entonces utilizando un tamiz molecular. Para la separación de impurezas más pesadas, el gas rico en etileno se enfría a saturación y se envía a una columna de destilación criogénica. Esta columna consta de 84 etapas y supone una caída de presión de 0,25 MPa. La eficiencia en la columna es del 75%. En el flujo inferior, el más pesado, se eliminan los hidrocarburos y el producto superior es una corriente de gas etilénico (velocidad de recuperación de etileno: 99,1%). En un Stripper en

sentido descendente con 20 etapas, con una caída de presión 0,25 MPa, el monóxido de carbono (CO), Metano (CH₄) e hidrógeno (H₂) se separan del etileno con una eficiencia del 75%. El producto de fondo se ajusta al etileno polimérico. El producto de cabeza se presuriza y se envía al condensador parcial donde los subproductos ligeros se ventilan y el etileno condensado se devuelve al separador (Morschbacker 2009; Nitzsche *et al.* 2016).

La producción de bioetileno a partir de biomasa lignocelulósica a nivel industrial requiere procesos que alcancen el rendimiento teórico de 2 moles de etileno / mol de glucosa o 0,31 g/g por fermentación de glucosa a etanol y posterior deshidratación de etanol catalizada por ácido a etileno. Idealmente, 1 mol de glucosa se puede convertir en 2 mol de etileno producido a partir de etanol, utilizando enzimas para la deshidratación junto con microorganismos productores de etanol. Sin embargo, se requieren más estudios sobre el equilibrio de la reacción de deshidratación y las condiciones de fermentación para determinar la factibilidad técnica de este proceso (Endres 2017; Flórez Pardo *et al.* 2018).

La deshidratación de alcoholes, principalmente etanol, ha sido estudiada durante mucho tiempo, utilizando diversas tecnologías con una amplia variedad de catalizadores como alúmina, sílice, zeolitas, arcillas, ácido fosfórico, entre otros. Dependiendo de las características del catalizador y del proceso de deshidratación utilizado, la conversión de etanol suele estar entre 95,0 y 99,5% y la selectividad de etileno entre 95,0 y 99,0% (Morschbacker 2009). La reacción de deshidratación del bioetanol se lleva a cabo utilizando reactores que operan isotérmica o adiabáticamente, favoreciendo la formación de etileno a temperaturas superiores a 300 °C (Chen *et al.* 2007b). Para que la producción de etileno a gran escala sea rentable, muchos estudios están explorando varios catalizadores sintetizados en laboratorio y nuevas técnicas de reacción para aumentar el rendimiento de etileno y evaluando su practicidad en aplicaciones industriales en comparación con plantas de craqueo a vapor (Fan *et al.* 2013a). Los diferentes catalizadores que se han probado y desarrollado para producir bioetileno se muestran en la Tabla 2.

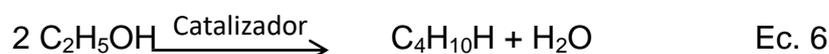
Tabla 2. Resumen de Catalizadores para la deshidratación de etanol a etileno

Catalizadores	Max. Selectividad de etileno (%)	Conversion de etanol (%)	Treacción (°C)	Estabilidad	Referencia
Zeolita HZSM-5 modificada con 0.5%-La-2% P	99,9	100	240-280	Alta	(Hu <i>et al.</i> 2010)
Si/Al	99,0	100	500	Alta	(Rossetti <i>et al.</i> 2017)
Y-Al ₂ O ₃	80,0	100		Estable	
HZSM-5	98,8	99,0	250	Alta	(Sheng <i>et al.</i>

HT400	98,9	99,0	260		(2013)
HT500	98,5	98,6	275		
HT550	98,2	94,9	290		
La-modificada con zeolita HZSM-5	98,5	99,5	260	Alta	(Ouyang <i>et al.</i> 2009)
Phosphorus (P) modificado con H-ZSM-5	98,0	99,0	450	Alta	(Ramesh <i>et al.</i> 2010)
Al ₂ O ₃	97,7	99,8	> 400	Alta	(Tripodi <i>et al.</i> 2019)
Al ₂ O ₃	97,0	99,0	450	Alta	(Kagyрманова <i>et al.</i> 2011)
Zeolita HZSM-5	90,0	90,0	245-260	Estable	(Moon <i>et al.</i> 2019)
Al ₂ O ₃	82,8	90,1			
HZSM-5	93,1	97,3			
SAPO-34	86,0	93,5	350 a 475	Estable	(Zhang <i>et al.</i> 2008)
NiAPSO-34	92,3	96,5			
Zeolite ZSM-5	80,0	99,0	400	Baja	(Wu and Wu 2017)

Los estudios demostraron que la producción de bioetileno a partir de la deshidratación del bioetanol tiene ciertas ventajas sobre la producción de etileno petroquímico, como su mayor pureza y el carácter renovable de su materia prima (Azevedo *et al.* 2015). Además, la eficiencia económica de la producción de bioetileno se basa en la alta disponibilidad de las materias primas, la selectividad de etileno durante el proceso de deshidratación, la facilidad del procesamiento y la separación de productos (Chen *et al.* 2016). El mecanismo de reacción de deshidratación de etanol a etileno ocurre a través de un proceso de absorción de energía, requiriendo altas temperaturas de reacción para obtener el producto principal (etileno) (Yakovleva *et al.* 2016a). Es muy importante tener en cuenta la temperatura para obtener selectivamente el producto objetivo porque el etileno es generado como producto principal a temperaturas superiores a 300 °C, pero el éter se obtiene como subproducto principal por debajo de 300 °C, con cantidades relativamente pequeñas de acetaldehído (Zhang and Yu 2013), ciertos hidrocarburos como etano, butileno, metano, propileno y gases como CO₂, CO y

H₂ (Galvita V. V. *et al.* 2001). No obstante, la mayor parte del mecanismo de la reacción de deshidratación del etanol considera principalmente sólo la formación de etileno y éter, como se ve en las Ecs. 5 y 6 (Tanabe, K.; Misono, M.; Ono, Y.; Hattori 1990).



Para la producción de etileno, el proceso de deshidratación es el término técnico que denota el rompimiento de una molécula en dos partes, una de las cuales es el agua. Es fácil observar que al retirar un átomo de hidrógeno y un ión hidroxilo (OH⁻¹), se producirá etileno. El mecanismo se presenta en la siguiente figura 7.

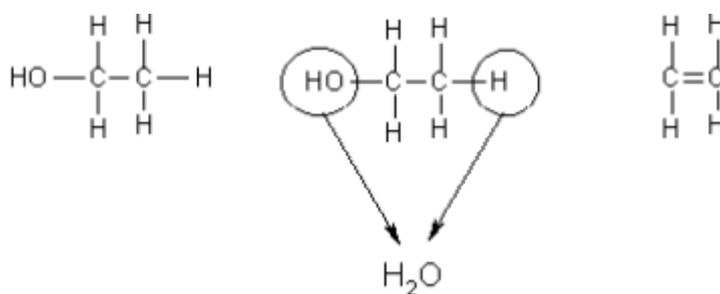


Figura 7. Mecanismo de deshidratación de etanol a etileno

La mejor manera para obtener este resultado (figura 8) es por el uso de zeolita como catalizador de forma similar al craqueo de hidrocarburos. El mecanismo de reacción es ácido-base. La manera de romper la molécula de etanol es por medio de donar una base (ión hidroxilo, OH⁻) y un ácido, el ión etil carbeno CH₃CH₂⁺. Sitios altamente ácidos en los poros de la zeolita atacan el OH⁻ del etanol, produciendo un enlace con una molécula de agua ligada a la superficie del ión etil carbeno.

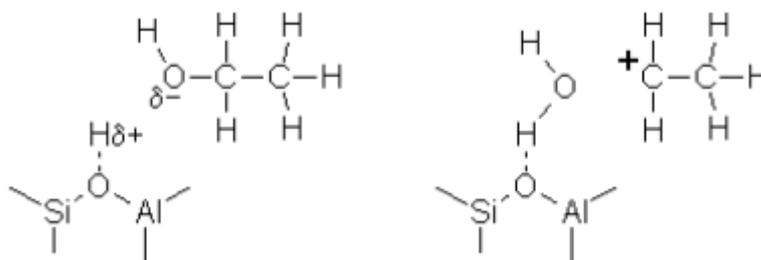


Figura 8. Ataque de una zeolita altamente ácida. Los (δ+ y δ-) se refieren a los sitios ligeramente cargados

A pesar que este ión es altamente reactivo, no puede prevalecer en la presencia de agua en el ambiente restringido por los poros de la zeolita. El ión etil carbeno encuentra mayor facilidad en la pérdida de un ión hidrógeno, produciéndose etileno.

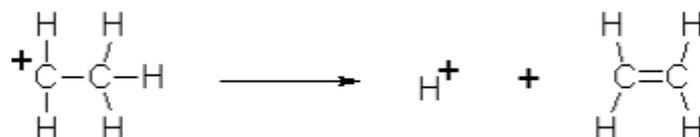


Figura 9. Pérdida de un protón para la formación de etileno.

Existe controversia sobre la forma de formación del etileno, considerando su producción a partir de etanol deshidratado o indirectamente del éter. Las rutas de las reacciones reversibles son (Zhang and Yu 2013).

– Deshidratación intramolecular de etanol a etileno: La formación de etileno se produce a partir de la deshidratación catalítica del etanol, a través de las reacciones de eliminación E1 y E2 (Smith and March 2007). La reacción E1 es un mecanismo de reacción de primer orden, con la formación de un carbocatión intermedio y la pérdida del protón para generar el doble enlace de la olefina. La reacción E2 procede sin la formación de intermediarios, consiste en eliminar hidrógenos del carbono adyacente al que posee la salida del grupo, formando entre ellos el doble enlace de la olefina. Sin embargo, se ha observado que los carbocationes formados en la reacción E1 no generan etanol, que E2 no es una reacción reversible y que los mecanismos de reacción del proceso de deshidratación están influenciados por factores como la pureza del etanol y el tipo de catalizador (Noller and Thomke 1979).

– Deshidratación intermolecular de etanol a éter y deshidratación de éter a etileno: La reacción de deshidratación intermolecular de etanol a éter es una reacción de sustitución. La generación de éter sigue esencialmente el mecanismo de reacción SN1 (reacción de sustitución nucleófila de un solo molécula) o SN2 (sustitución nucleófila bimolecular reacción) (Smith and March 2007). La reacción SN1, a su vez, se divide en dos pasos: el primer paso es que los reactivos se disocian a carbocationes (siendo el mismo paso para la reacción E1 mecanismo), y el segundo paso es la asociación de los carbocationes con nucleófilos con una extremadamente velocidad de reacción rápida. Sin embargo, en la reacción SN2 (una reacción de segundo orden) no hay formación de carbocationes en la reacción, por lo que el par de electrones del nucleófilo ataca al átomo central electrofílico, formando el intermediario. El oxígeno en la molécula de éter tiene un par de electrones no compartidos, que pueden ser considerados como álcali débil. En este momento, cuando la temperatura aumenta, el enlace éter se rompe para generar un carbocatión y puede formar etileno, siguiendo el mecanismo de reacción E1 (Zhang and Yu 2013). La conversión de etanol (X_{etanol}), selectividad de etileno

(S_{etileno}), el rendimiento de éter (R_{eter}) y el rendimiento de etileno (R_{etileno}) se definen de la siguiente manera:

$$X_{\text{etanol}} = \frac{\text{MeO} - \text{Me}}{\text{MeO}} * 100 \quad \text{Ec. 7}$$

$$S_{\text{etileno}} = \frac{\text{Me1}}{\text{MeO} - \text{Me}} * 100 \quad \text{Ec. 8}$$

$$R_{\text{etileno}} = \frac{\text{Me1}}{\text{MeO}} * 100 \quad \text{Ec. 9}$$

$$R_{\text{eter}} = \frac{\text{Me2}}{\text{MeO}} * 100 \quad \text{Ec. 10}$$

Donde, Me, MeO, Me1 y Me2 corresponde a las cantidades molares de etanol después de la reacción (Me), etanol antes de la reacción (MeO), etanol convertido en etileno (Me1) y éter después de la reacción (Me2), respectivamente.

En el proceso de obtención de etileno a partir de la deshidratación de bioetanol a partir de caña de azúcar en la empresa Braskem, el etanol se calienta y vaporiza en un horno para la temperatura deseada para la reacción de deshidratación. La deshidratación del etanol a etileno se lleva a cabo en el reactor, que es el equipo crítico del proceso. La corriente del reactor se enfría en la torre de enfriamiento por pulverización de agua. El etileno se purifica por absorción de CO_2 en la torre de soda cáustica (NaOH) y el agua restante se elimina en un secador (tamiz molecular). Los subproductos más pesados del fondo de la columna de etileno se pueden utilizar como combustible en el horno para reducir los requisitos de combustible.

Para la deshidratación se suelen utilizar reactores adiabáticos o isotérmicos. Los reactores isotérmicos requieren un calentamiento fluido para suministrar calor y mantener la temperatura (Zhang and Yu 2013). Este tipo de reactor está limitado porque estos fluidos sufren degradación térmica por encima de los 370 °C pero la conversión de etanol y la selectividad de etileno disminuyen por debajo de esta temperatura. El reactor adiabático permite operar a temperaturas más altas (450–500 °C), y consiste principalmente en uno o más reactores tubulares adiabáticos en serie. Alta conversión de etanol y selectividades de etileno se pueden lograr con menor contenido de subproductos. Además, este reactor es menos costoso que el reactor isotérmico (Morschbacker 2009).

CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Introducción

Este trabajo se enmarca en el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos generados en la actividad primaria industrial del sector maderero en la región Noreste de Argentina, en este caso en particular el aserrín de pino para la producción de bioetileno de segunda generación.

En este contexto, la originalidad de esta investigación, mérito científico e importancia ambiental, consisten en que en la actualidad el bioetileno de base biológica se produce exclusivamente a partir de etanol de primera generación basado en cultivos (caña de azúcar, maíz y remolacha) como materia prima, utilizando sus azúcares comestibles. Incluso si son fuentes renovables, se utilizan especialmente para fines alimentarios. Sin embargo, el bioetileno de segunda generación no compite con la producción de alimentos e intenta maximizar el uso de residuos lignocelulósicos, que no se explotan ni se utilizan con fines industriales.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que es posible la obtención de bioetileno a partir de aserrín de pino mediante la deshidratación catalítica del bioetanol producido empleando una estrategia de fermentación en 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 bioetileno a partir de aserrín de pino, con el fin de optimizar el proceso para la producción de bioplásticos.

2.2 Hipótesis

La Hipótesis de trabajo es que es técnicamente factible producir etileno a partir de bioetanol de segunda generación producido a partir de aserrín de pino, en forma económica y ambientalmente sostenible.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

- El objetivo general de este trabajo es optimizar el proceso de producción de etileno mediante la deshidratación del bioetanol generado a partir de aserrín de pino.

2.3.2 Objetivos específicos involucran:

- Obtener un material celulósico apto para su conversión a bioetanol.
- Optimizar la sacarificación enzimática de la fracción de hexosas del material celulósico obtenido a partir de aserrín de pino pretratado.
- Obtener bioetanol bajo condiciones óptimas de fermentación y recuperación a partir de la fracción de azúcares de aserrín de pino.
- Optimizar la deshidratación del etanol en etileno.

CAPITULO 3. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL 2G

3.1. Objetivos

Para la producción de bioetanol de segunda generación, se realizaron experiencias de fermentación de los azúcares hidrolizados, empleando estrategias de fermentación: hidrólisis y fermentación por separado (SHF) e hidrólisis y fermentación en simultáneo (SSF), con el objetivo de comparar los rendimientos de bioetanol producidos incluyendo un estudio cinético de la hidrólisis enzimática en SHF como herramienta de diseño. Estas experiencias se desarrollaron en el Instituto de Materiales de Misiones (IMAM-PROCYP).

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Materia prima, microorganismos y enzimas

La mezcla industrial de aserrín de *Pinus elliottii* y *Pinus taeda* fue proporcionada por un aserradero en Misiones, Argentina. El pretratamiento de soda-etanol fue seleccionado considerando las características físico-químicas de la materia prima para extraer la lignina y las hemicelulosas. Las condiciones se eligieron en base a resultados preliminares para obtener pulpas con diferentes contenidos de lignina. Se utilizaron tres pulpas de soda-etanol con diferentes composiciones químicas para evaluar la idoneidad de los tratamientos aplicados y el modelo cinético.

Las condiciones de operación del pretratamiento de soda-etanol fueron las siguientes: una relación licor-madera (L: M) de 5,44:1, una temperatura máxima de 170 °C, t= 60 min y la relación EtOH:H₂O (35:65 % v/ v) fueron constantes en todos los casos. Las condiciones variables (NaOH (% p/p) y el tiempo) fueron las siguientes: 19,0% p/p y 60 min para el experimento 1 (pulpa 1); 19% p/p y 100 min para el experimento 2 (pulpa 2) y 23,3% p/p y 140 min para el experimento 3 (pulpa 3).

Para la hidrólisis enzimática se utilizaron enzimas comerciales Cellic® CTec2 proporcionadas por Novozymes. Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181) aplicadas durante el proceso de fermentación fueron donadas por el Instituto de Modelamiento e Innovación Tecnológica IMIT (UTN-CONICET), Resistencia, Argentina.

3.2.1.1 Conservación de la cepa de hongos levaduriformes *Saccharomyces cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181)

Las levaduras se conservaron para ser recuperadas y utilizadas en toda esta serie de estudios (Medvedeff *et al.* 2005). Se reactivaron en cajas y tubos Petri mediante el método en estrías (rayas) y se incubaron a 28 °C durante 48-72 h, como se observa en la figura 10 y 11.



Figura 10. Técnica de siembra en estría para la cepa (SC 1181) en tubos y placa de Petri



Figura 11. Estufa de cultivo empleada para el crecimiento de la cepa (SC 1181).

El medio de cultivo, $19,6 \text{ gL}^{-1}$ de agar glucosa Sabouraud suspendida en 300 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se calentó en agua baño hasta que alcanzó una consistencia gelatinosa. Una vez que el medio de cultivo estaba listo, se procedió a fraccionarlo en los tubos (5 a 7 mL) y placas de Petri (15 a 20 mL). Es importante tener en cuenta que los tubos tienen que tener una pequeña inclinación cuando se lo deja reposar para que se forme el llamado "pico de flauta", para permitir mayor superficie de contacto una vez que se siembra la levadura como se observa en la figura 12 y 13.



Figura 12. Preparación del medio de cultivo y de conservación para la cepa (SC 1181)

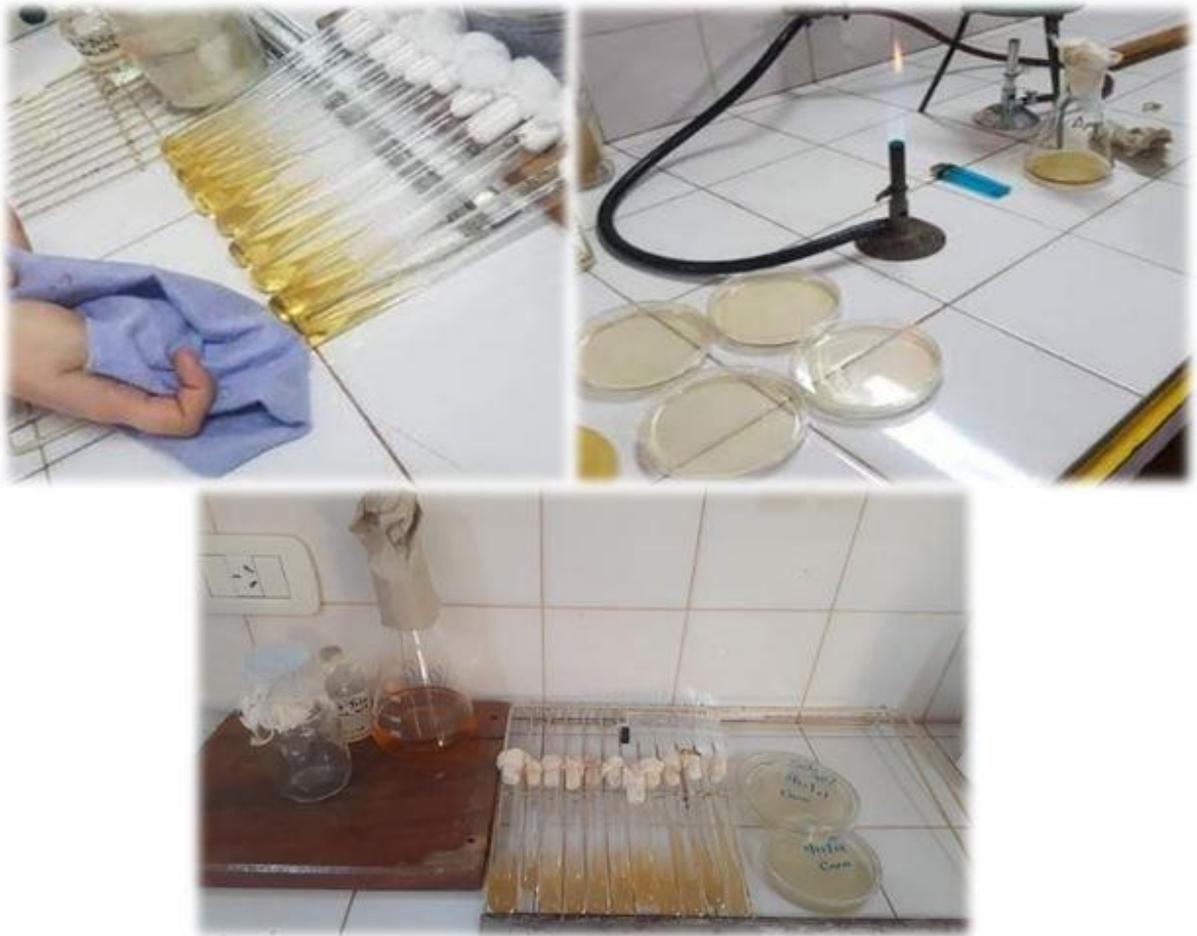


Figura 13. Fraccionamiento del medio de cultivo en tubos y placas de Petri.

Las cepas de levadura recuperadas se conservaron por duplicado en agar agua y medio Castellani y refrigerado a 4-8 °C (Capriles *et al.* 1989). Las colonias se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h para su adaptación al medio y se almacenaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL (figura 14), con agar agua a 4 °C.



Figura 14. Conservación de cepa (SC 1181) en tubos Eppendorf de 1,5 mL

La técnica del microcultivo (método microbiológico convencional), consistente en los estudios sistemáticos de características macro y micromorfológicas, se utilizó para la reconocimiento de fenotipo de cepas puras aisladas (Medvedeff *et al.* 2005). En una placa de Petri estéril se colocó un portaobjetos de soporte y en posición perpendicular a éste se agregó otro portaobjetos sobre el cual se depositaron 3 ml de medio Agar leche al 2% con Tween 80. Se sembró con un ansa, realizando cortes transversales al portaobjetos, y se colocaron cubreobjetos previamente flameados sobre las líneas de siembra. Con el propósito de formar una cámara húmeda, se humedeció un papel de filtro dispuesto en la base de la placa, y finalmente se incubó el sistema a 28-30 °C durante 48 h, como se observa en la siguiente figura 15.

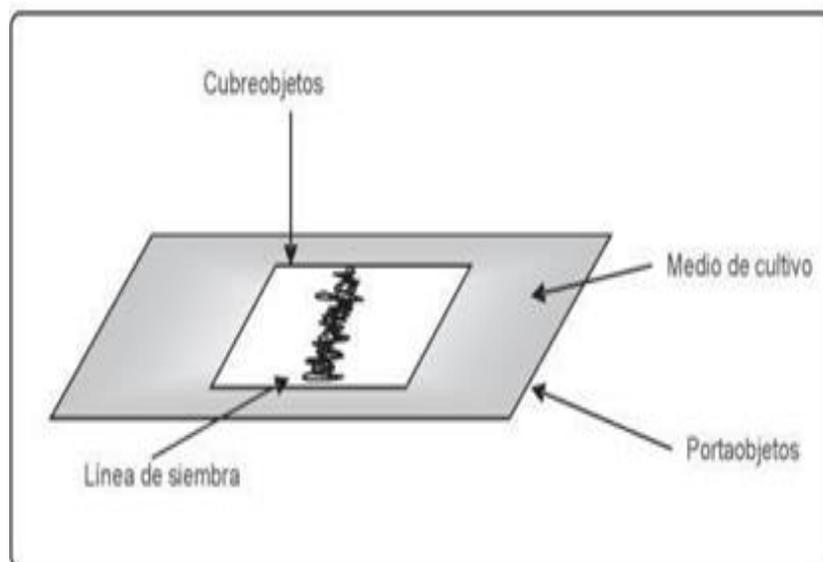


Figura 15. Esquema de microcultivo en láminas (Medvedeff et al. 2005)

3.2.2. Caracterización del sustrato e hidrolizados

La composición química del aserrín se determinó en un trabajo anterior (Imlauer et al. 2021). El aserrín y las pulpas de pino (sustrato) se caracterizaron de acuerdo con los estándares del NREL (National Renewable Energy Laboratory), incluidos los sólidos totales y la humedad (NREL/TP-510-42621) (Sluiter *et al.* 2008), los carbohidratos estructurales y la lignina (NREL/TP-510-42621) (Sluiter *et al.* 2004). Se usó HPLC con una columna SHODEX SP810 para determinar el contenido de carbohidratos (glucano, xilano, manano, galactano y arabino) en el material pretratado. Las condiciones operativas utilizadas fueron agua como eluyente, 0,6 mL/min, 85 °C y detector de índice de refracción.

La cuantificación de los homopolímeros, es decir, glucanos, xilanos, galactanos, mananos y arabinanos en la parte sólida, se realizó multiplicando los azúcares por los factores estequiométricos de hidrólisis, es decir, 0,88 (132/150) para azúcares con cinco carbonos (xilosa y arabinosa) y 0,90 (162/180) para azúcares con seis carbonos (glucosa, manosa y galactosa). La cuantificación de glucosa, total azúcares y bioetanol se realizó mediante cromatografía líquida HPLC (Waters Corp., Milford, MA), utilizando una columna AMINEX-HPX97H (BIO-RAD) con las siguientes condiciones cromatográficas: un eluyente de 4 mM de H₂SO₄, un flujo de 0.6 mL/min, una temperatura de 35 °C y un detector de índice de refracción y una matriz de diodos

3.2.3. Estrategia de hidrólisis y fermentación separada (SHF)

3.2.3.1 Hidrólisis enzimática

Para llevar a cabo la producción de bioetanol mediante la estrategia de fermentación SHF, se empleó la siguiente metodología como se muestra en la figura 16.

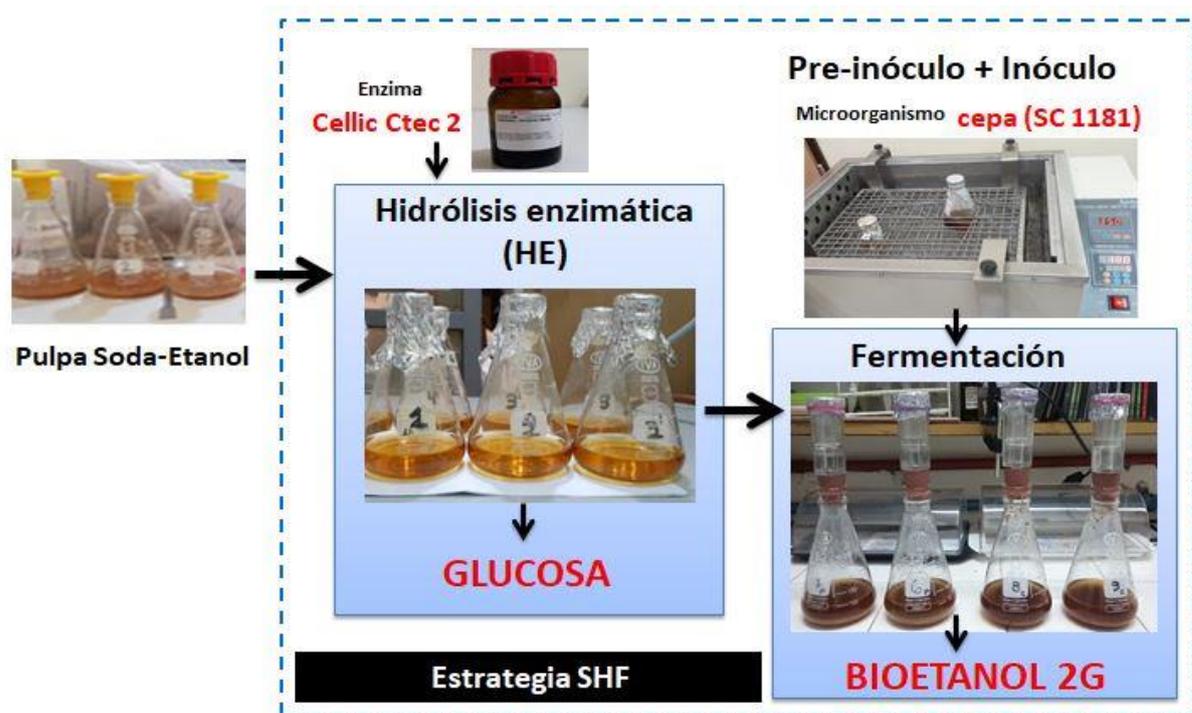


Figura 16. Esquema del proceso SHF para la producción de bioetanol 2G

3.2.3.2 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 (Ec.11):

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Conc. enzima para producir 2,0 mg glucosa}} \quad \text{Ec. 11}$$

FPU: Unidades de papel de filtro FPU/MI

La actividad celulasa se determinó en términos de "unidades de papel de filtro" (FPU) según el estándar NREL/TP-510-42628 (Adney and Baker 2008) y por β -glucosidasa (EC 3.2.1.21), según su capacidad para hidrolizar 4-nitrofenil β -D-glucopiranosido (p-NPG) a 4-nitrofenol (p-NP). Las unidades se expresan en IU, unidades internacionales que se definen como la cantidad de enzima requerida para liberar un μmol de azúcar reductor por minuto en

condiciones estándares. La determinación de la actividad de la β -glucosidasa se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$IU = [p\text{-NP}] * FD * Vr / t * Ve \quad \text{Ec. 12}$$

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

Este método consiste en agregar 0,5 mL de diferentes concentraciones de enzimas a 2 mL de una solución de p-NPG de 1 mmol/L, incubar por 30 min a una temperatura de 50 °C y luego detener la reacción con 2,5 mL de Na_2CO_3 . Finalmente, la absorbancia se midió a 400 nm y se expresó en UI (unidad internacional) (Taylor *et al.* 1995.).

El material sólido se sometió a sacarificación con enzimas Cellic® CTec2 (proporcionadas por Novozymes) de acuerdo con los estándares NREL-LAP (NREL/TP-510 - 42629) (Resch *et al.* 2015). Se modificó el método cambiando la carga enzimática a 30 FPUg⁻¹ de glucanos y agregando 0,3 gL⁻¹ del surfactante Tween 80 para mejorar la eficiencia del proceso (Arismendy Pabón, Ana María *et al.* 2020). Las condiciones de hidrólisis enzimática tomadas de Arismendy *et al.* (2020) involucró celulosa hidrolizable al 1% (materia seca) suspendida en 50 mL de citrato de sodio 0,05 M (pH 5) y 40 mL de agua destilada, a 130 rpm y temperatura de 37 °C, en un matraz Erlenmeyer de 200 mL en un baño térmico. Las muestras se tomaron entre las 3 y las 9 h durante 48 h. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Los rendimientos de hidrólisis enzimática (digestibilidad) se calcularon acorde a la siguiente ecuación:

$$RHE (\%) = \frac{\text{glucosa (g)} * 0,9}{\text{glucanos en el material (g)}} * 100 \quad \text{Ec. 13}$$

3.2.3.3 Estudio cinético

Para el estudio cinético del mecanismo de reacción en la hidrólisis enzimática se empleó un modelo cinético simplificado propuesto por Li *et al.* (2004) (Li *et al.* 2014), considerando un modelo pseudohomogéneo de Michaelis-Menten. Un esquema simplificado del mecanismo de reacción se muestra en la Ecuación 14.



El mecanismo de reacción comprende primero una reacción heterogénea que involucra al sustrato insoluble (S) y la solución enzimática para producir oligosacáridos solubles (O) enlaces glucosídicos β -(1,4), que dan como resultado la generación de extremos de cadena no reductores, y las celobiohidrolasas (CBH) hidrolizan celobiosa, que actúan sobre extremos no reductores. El segundo paso, mucho más rápido que el primero, es una reacción homogénea de los oligosacáridos para obtener glucosa (G). En este proceso de hidrólisis, catalizado principalmente por la β -glucosidasa (BG), los oligosacáridos formados producen celobiosa. La suma de las reacciones de oligosacáridos y glucosa genera productos que inhiben las enzimas celulasas. Si se aplica la suposición simplificadora de que este es el único efecto inhibitorio, entonces el esquema de reacción simplificado se reduce a lo siguiente (Ecuación 15).



El modelo pseudo-homogéneo para determinar la tasa de producción total de azúcar (T) en el tiempo corresponde a la diferencia entre la cantidad máxima producida durante la reacción (T_{∞}) y la cantidad presente en el tiempo t . Mediante este modelo se evalúa la tasa de producción de glucosa en el tiempo, reemplazando el término T por G en la ecuación propuesta por Li *et al.* (2004) (Li *et al.* 2014), como se muestra en la ecuación. 16,

$$\frac{dG}{dt} = \frac{kE_0(G_{\infty} - G)}{K_M * [1 + (\frac{1}{K_I})T] + 0,9(G_{\infty} - G)} \quad \text{Ec. 16}$$

donde G_{∞} es el valor máximo de glucosa alcanzado durante la reacción (gL^{-1}), 0,9 es el factor estequiométrico (relación entre el peso molecular de una unidad de glucosa en celulosa y el peso molecular de la glucosa), k es una constante aparente que representa la frecuencia de enlace entre celulosa y celulasas (h^{-1}), K_M es una constante aparente de Michaelis-Menten que representa la afinidad entre celulosa y celulasas (gL^{-1}), K_I es la constante aparente de inhibición entre celulosa-glucosa y celulasas (gL^{-1}), y E_0 es la concentración inicial de enzima (gL^{-1}). También podría ser una función de las diversas condiciones operativas, por ejemplo, el tipo y tamaño del reactor, la mezcla y la concentración de sustrato. También se sugirió que los valores de G_{∞} podrían depender de las mismas variables y que K_M y K_I son independientes de las variables operativas. Por lo tanto, estos valores difieren al cambiar la enzima o el sustrato, y se debe repetir todo el procedimiento (Albernas-carvajal *et al.* 2015).

3.2.4 Fermentación

3.2.4.1 Preparación del preinóculo e inóculo

Para el preinóculo y el inóculo, se prepararon 100 mL de medio líquido YPD (Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa). El medio YPD se preparó en un matraz Erlenmeyer de 200 mL, con 10 gL^{-1} de extracto de levadura y 20 gL^{-1} de peptona así como 20 gL^{-1} de dextrosa y se complementó con micronutrientes como $0,605 \text{ gL}^{-1}$ de fosfato de potasio, $0,16 \text{ gL}^{-1}$ de cloruro de amonio, $0,10 \text{ gL}^{-1}$ de sulfato de magnesio y agua destilada para un volumen total de 100 mL. Se esterilizó en autoclave a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Se realizó un preinóculo para incrementar el crecimiento celular, agregando en un matraz de 70 mL, 10 mL del medio YPD, un eppendorf de 2 mL que contiene la cepa *Saccharomyces Cerevisiae* 1181, y se incubó en un baño térmico a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a 180 rpm hasta obtener una cantidad constante de células, medida por densidad óptica (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 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 and McMillan 2008). El proceso de formación del preinóculo e inóculo tuvo una duración de aproximadamente 24 h como se muestra en la siguiente figura 17.



Figura 17. Proceso de formación de preinóculo e inóculo.

3.2.4.2 Fermentación en la estrategia SHF

Para los experimentos de fermentación, se adicionaron a matraces erlenmeyer de 200 ml en baño térmico agitado a 130 rpm, 90 mL de los azúcares hidrolizados, 10 mL de inóculo, 0,5 gL⁻¹ de extracto de levadura y 1 gL⁻¹ de peptona. Se utilizaron trampas de aire para evitar la entrada de oxígeno al sistema así como permitir la liberación del CO₂ producido por la levadura como se observa en la figura 18. Los experimentos se realizaron por duplicado.

El rendimiento de fermentación se calculó acorde a la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento de bioetanol (\%)} = \frac{\text{etanol producido } \left(\frac{g}{L}\right)}{0,511 * \text{Glucosa en la pulpa } \left(\frac{g}{L}\right)} * 100 \quad \text{Ec. 17}$$



Figura 18. Microrreactores para fermentar bioetanol, empleando trampa de aire.

3.2.5 Estrategia de sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF)

Para llevar a cabo la producción de bioetanol mediante la estrategia de fermentación SSF, se empleó la metodología que se muestra en la figura 19.

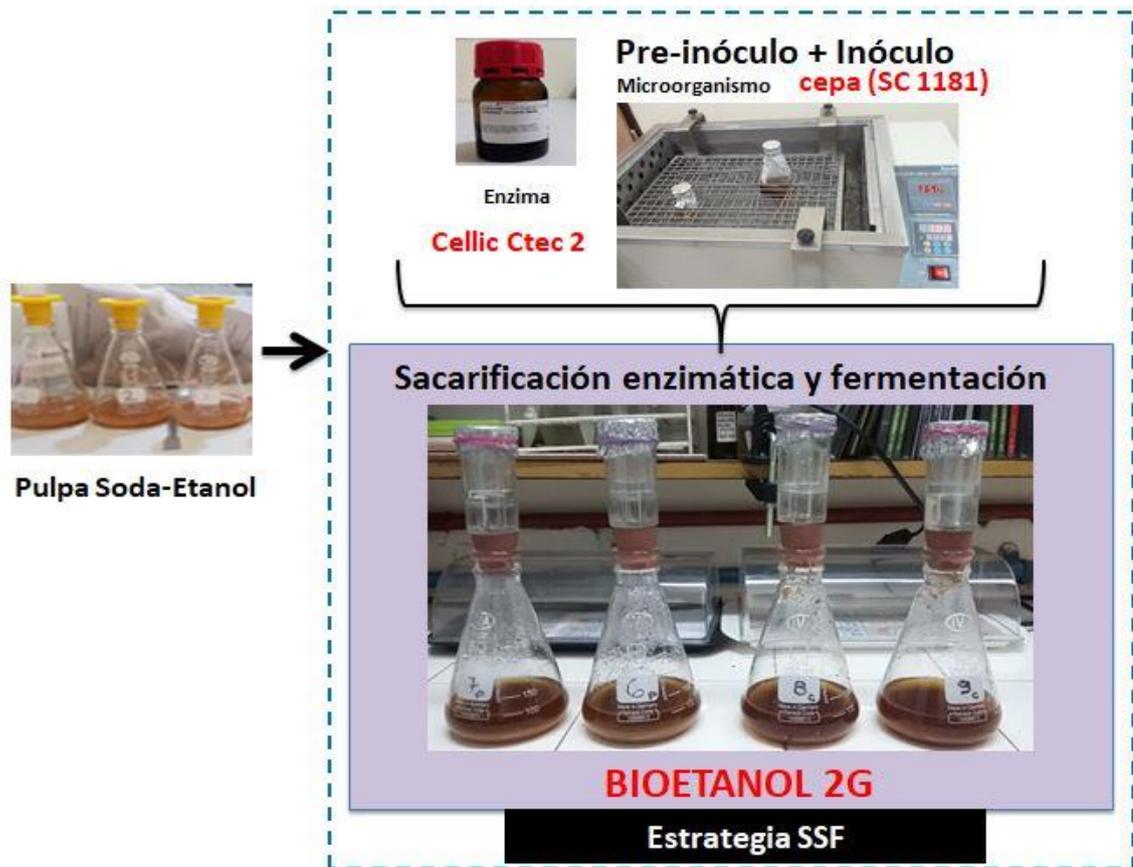


Figura 19. Esquema del proceso SSF para la producción de bioetanol 2G

El material sólido se sometió a fermentación con levadura *Saccharomyces cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181) según NREL-LAP 510-42630 (Dowe and McMillan 2008). El proceso SSF se realizó en matraces Erlenmeyer de 200 mL utilizando celulosa hidrolizable al 1% (porcentaje de materia seca) suspendida en 50 mL de citrato de sodio 0,05 M (pH 5), 40 mL de agua destilada, 10 mL de inóculo, 0,028 mL de surfactante, 30 FPUg⁻¹ de enzima-sustrato Cellic[®] Ctec2, 0,5 gL⁻¹ de extracto de levadura y 1 gL⁻¹ de peptona (un total de 100 mL), y utilizando las mismas condiciones de operación que el proceso SHF. Para ambas estrategias, el rendimiento de fermentación ($R_{P/T}$) se calculó como la eficiencia de fermentación (etanol práctico obtenido frente al etanol teórico) como se muestra en la ecuación 18, y la productividad del bioetanol ($P_{P/t}$) (gL⁻¹h⁻¹) se calculó como la relación entre la concentración de etanol obtenido dividida por el tiempo empleado para la hidrólisis y la fermentación, como se muestra en la ecuación 19.

$$R_{P/T} (\%) = \frac{\text{Producción de bioetanol } (\frac{g}{L})}{\text{producción de bioetanol teórico } (\frac{g}{L})} * 100 \quad \text{Ec. 18}$$

$$P_{P/T} (\%) = \frac{\text{Producción de bioetanol } (\frac{g}{L})}{\text{tiempo } (t)} \quad \text{Ec. 19}$$

3.3 Resultados y discusión

3.3.1. Materia prima, microorganismos y enzimas

3.3.1.1 Caracterización del sustrato

La composición química del aserrín (% sobre material seco) fue de 40,90% de glucanos, 7,45% xilanos, 2,58% galactanos, 14,80% mananos, 0,77% arabinanos y 29,20% lignina. La composición de las pulpas de soda-etanol se muestra en la Tabla 3. Dependiendo de la condiciones, este tratamiento permitió la extracción de una gran cantidad de lignina (especialmente en el experimento 3), aumentando el acceso de las enzimas al material. Los resultados fueron similares a los de Schenck *et al* (Schenck *et al.* 2013), quienes utilizaron pino nórdico (*Pinus sylvestris*) pretratado bajo condiciones similares obteniendo un bajo contenido de lignina en las pulpas después del pretratamiento alcalino (1,6% a 4,1%).

Tabla 3. Composición Química de la Fracción Sólida Obtenida por el Pretratamiento con Soda-Etanol

Pulpa	G (%sms)	X (%sms)	G (%sms)	M (%sms)	L (%sms)	%D
1	67,35	9,71	1,23	7,38	10,18	82,6
2	73,51	8,64	0,73	7,58	7,04	88,8
3	80,18	7,20	0,29	8,40	3,67	94,9

%sms: % sobre madera seca; G: Glucanos; X: Xilanos; G: Galactanos; M: Magnanos; L:Lignina; %D: % Deslignificación

3.3.1.2 Caracterización de la cepa de hongos levaduriformes *Saccharomyces cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181)

La observación macromorfológica es relevante para identificar el fenotipo de la colonia de cepas para predecir los rendimientos de bioetanol. Reyes *et al.* (2013) estudiaron la producción de etanol a través de dos fenotipos de colonias de *Saccharomyces cerevisiae* y observaron que las colonias lisas producían un mayor contenido de etanol que las rugosas (Reis *et al.* 2013). La observación de colonias reactivadas de *Saccharomyces cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181) desarrolladas en agar glucosa Sabouraud a una temperatura de 28 °C mostró colonias blancas, lisas, cremosas y brillantes, de elementos de levadura ovaladas, algunas monogemadas, sin pseudomicelio o verdadera formación de micelio y blastoconidios monogemados. Se supone que estas cepas suaves son eficientes para la producción de bioetanol.

3.3.2 Estrategia de hidrólisis y fermentación separada (SHF)

3.3.2.1 Hidrólisis enzimática

La Figura 20 muestra los rendimientos de hidrólisis enzimática y la concentración de glucosa equivalente en el líquido (en el eje secundario) frente al tiempo. Contrastando estos datos con la composición química de cada pulpa, la influencia del contenido de lignina y glucanos fue notable sobre el rendimiento de la hidrólisis enzimática. Comparado con la pulpa 1, la pulpa 3 presentó el mayor porcentaje de HE en menor tiempo, obteniendo el 100% de HE en 48 h, lo que confirma que el contenido de lignina perjudica el acceso del complejo enzimático al material y, por lo tanto, la digestibilidad de la celulosa.

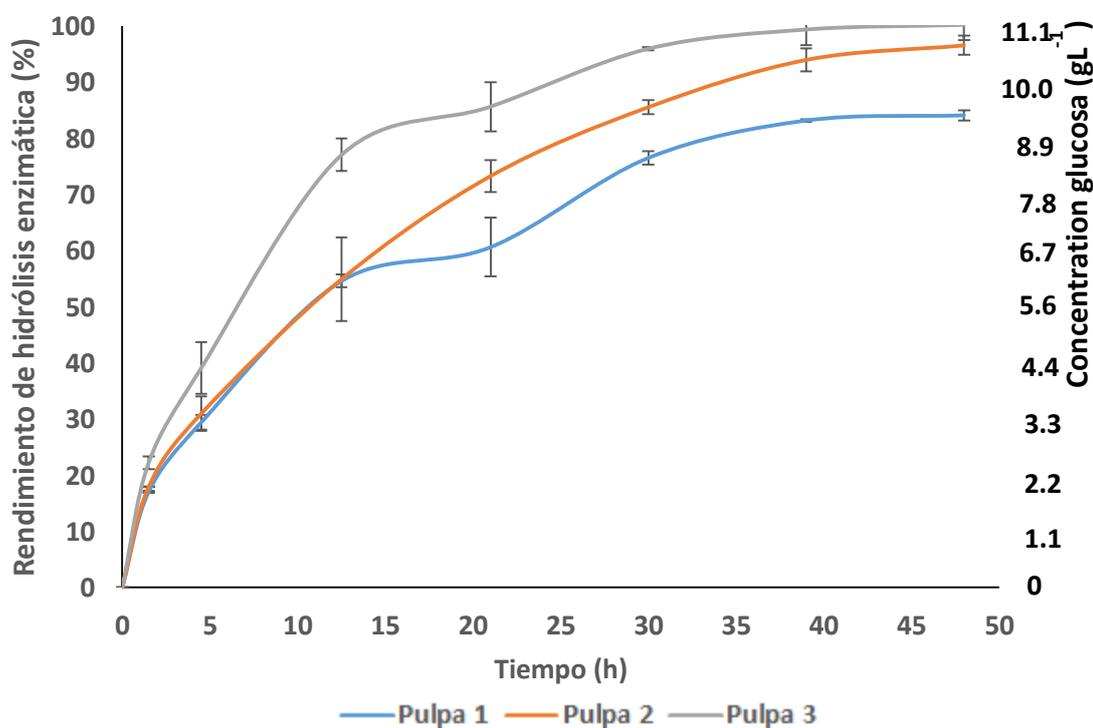


Figura 20. Rendimientos de hidrólisis enzimática para las pulpas de soda-etanol con tres composiciones químicas diferentes (siendo la pulpa 1 la que tiene mayor contenido de lignina y menor contenido de glucano)

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Kruyeniski (2017) (Kruyeniski 2017), quien logró un rendimiento de hidrólisis enzimática del 91,1% usando una mezcla de aserrín de *Pinus elliotii* y *Pinus taeda* pretratado con soda-etanol (50 gL^{-1} de NaOH, 35/65 etanol/agua durante 60 min a una temperatura de $170 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Kruyeniski (2017) utilizó un complejo de celulasas de *Trichoderma reesei* y celobiosa de *Aspergillus niger* (ambos proporcionada por Sigma Aldrich). En otro trabajo, los autores reportaron modelos de regresión comparando los tratamientos alcalinos y los tratamientos ácidos, concluyendo que los

pretratamientos que promueven una alta remoción de lignina aumentan el rendimiento de hidrólisis enzimática (Kruyeniski *et al.* 2019).

3.3.2.2 Parámetros del modelo pseudo-homogéneo de Michaelis-Menten

Aplicando la metodología propuesta por Li *et al.* (2004) (Li *et al.* 2004), se graficaron los valores de glucosa (gL^{-1}) obtenidos en la hidrólisis enzimática frente al tiempo (h) al 1% de consistencia como base de cálculo (Fig. 20). En la etapa inicial de la reacción ($t \rightarrow 0, G \rightarrow 0$), los azúcares totales formados pueden despreciarse, de modo que la ecuación 16 puede ser simplificada, como se muestra en la ecuación 20,

$$\frac{dG}{dt} t \rightarrow 0 = \frac{kE_0 G_\infty}{K_M + 0,9G_\infty} \quad \text{Ec. 20}$$

La tasa inicial $(dG / dt)_{t \rightarrow 0}$ se determinó como la tasa de producción media de glucosa durante el período de reacción inicial hasta 1,5 h. Siguiendo la metodología propuesta por Li *et al.* (2004), se determinó G_∞ para los experimentos 1, 2 y 3, que fueron 6.73 gL^{-1} , 7.75 gL^{-1} , y $9,51 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente, en 21 h. La determinación gráfica de k y K_M es presentado en la Figura. 21 para una concentración inicial de enzima (E_0) de 0.476 gL^{-1} .

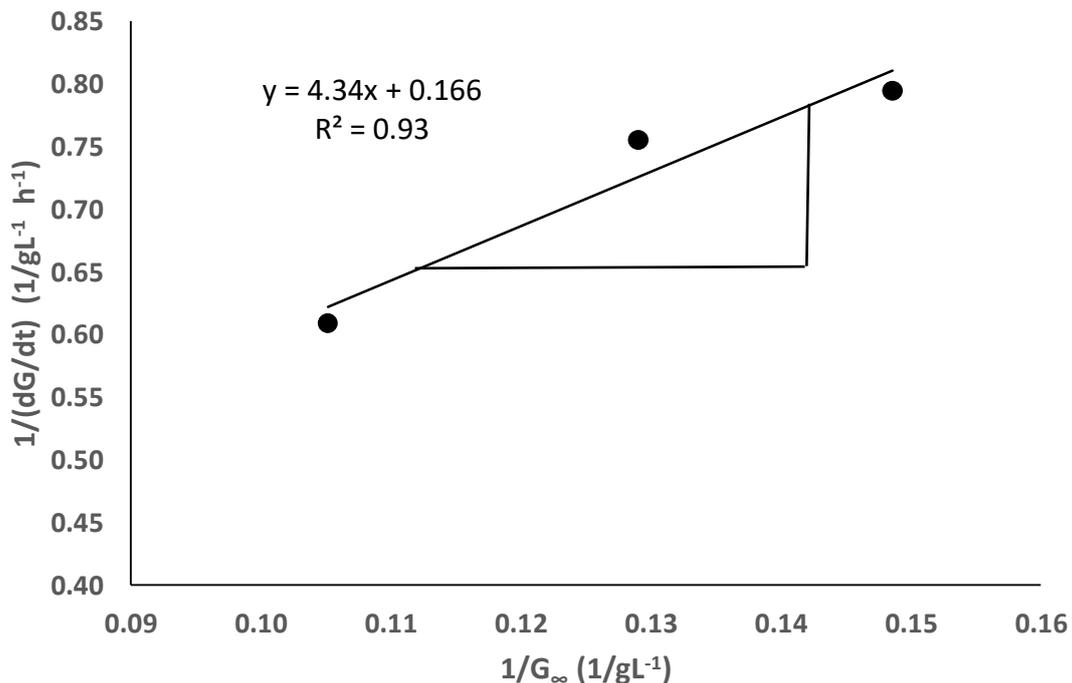


Figura 21. Determinación de K_M y k

Finalmente, se graficó $1 / (dG / dt)t \rightarrow 0$ vs. $1 / G_{\infty}$ para obtener la pendiente y el intercepto para determinar los valores de K_M y k , que fueron de 23.5 gL^{-1} y $11,4 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

El valor de K_M da una idea de la afinidad de la enzima por la celulosa. A menor K_M (mayor afinidad), el complejo enzima-celulosa es estable. Por el contrario, si el K_M es grande, el complejo enzima-sustrato es inestable, lo que indica una baja afinidad por el sustrato. La K_M reportada por Albernas-Carvajal *et al.* (2015) (Albernas-carvajal *et al.* 2015), aproximadamente $217,49 \text{ gL}^{-1}$, usando las enzimas celulólicas Novozymes Cellic® Ctec2 y β -glucosidasa con código NS50010 fue muy superior a la K_M obtenida en el presente trabajo (una K_M de $23,5 \text{ gL}^{-1}$), lo que significó que el complejo enzimático tuvo una mejor afinidad con el sustrato empleado.

Para las reacciones enzimáticas en general, Lehninger (1981) establece que cuando $[S]$ es mucho menor que K_M (el valor de $[S]$ es 10 gL^{-1} de glucanos en este trabajo), la tasa de reacción es de primer orden en relación con el sustrato, que se asumió en el desarrollo de este modelo y da una medida de su adecuación.

Para determinar la constante de inhibición de K_I , la ecuación. 21 se integra bajo la condiciones iniciales y finales ($G = G_0$ en $t = 0$ y $G = G_t$ en $t = t$, respectivamente), obteniendo las Ecs. 22 y 23,

$$\frac{t}{0.9(G-G_0)} = \beta \frac{\ln[(G_{\infty}-G_0)/(G_{\infty}-G)]}{0.9(G-G_0)} - \gamma \quad \text{Ec 21}$$

$$\beta = \frac{K_M}{kE_0} \frac{1}{K_I} G_{\infty} + \frac{K_M}{kE_0} \quad \text{Ec. 22}$$

$$\gamma = \frac{1}{0.9} \frac{K_M}{kE_0} \frac{1}{K_I} - \frac{1}{kE_0} \quad \text{Ec. 23}$$

Para las tres pulpas, K_I se calculó a través del algoritmo de mínimos cuadrados no lineales (solver) utilizando los parámetros k y K_M determinados gráficamente, hasta que se logró el error absoluto promedio más bajo. Los valores de K_I obtenidos para las pulpas 1, 2 y 3 fueron de $2,9 \text{ gL}^{-1}$, 3.1 gL^{-1} , y $6,6 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente. La concordancia del modelo con los datos experimentales es presentada en la figura 22.

El K_I resultante es comparable con el valor obtenido por Albernas-Carvajal *et al.* (2015) (Albernas-carvajal *et al.* 2015), quienes obtuvieron un K_I de 32.64 gL^{-1} al emplear un modelo pseudo-homogéneo de Michaelis-Menten para la hidrólisis enzimática de bagazo pretratado. Li *et al.* (2004) estudiaron la cinética de hidrólisis enzimática de varias pulpas tratadas con irradiación ultrasónica continua y Celulasa (Meicelase) de *Trichoderma viride*,

obteniendo un K_i valor de $0,704 \text{ gL}^{-1}$. Este comportamiento demostró que el valor de K_i era independiente de las variables operativas pero cambiaba cuando se cambiaba la enzima o el sustrato, por lo que se debe repetir todo el procedimiento.

En comparación con las constantes encontradas por Li *et al.* (2004) (Li *et al.* 2004) utilizando NUKP (pulpa kraft sin blanquear de un árbol de coníferas), la reacción en este trabajo fue lenta. La razón de esto es que la constante k es más alta, y tanto K_i como K_M son más bajos, lo que produce un dG/dt más bajo.

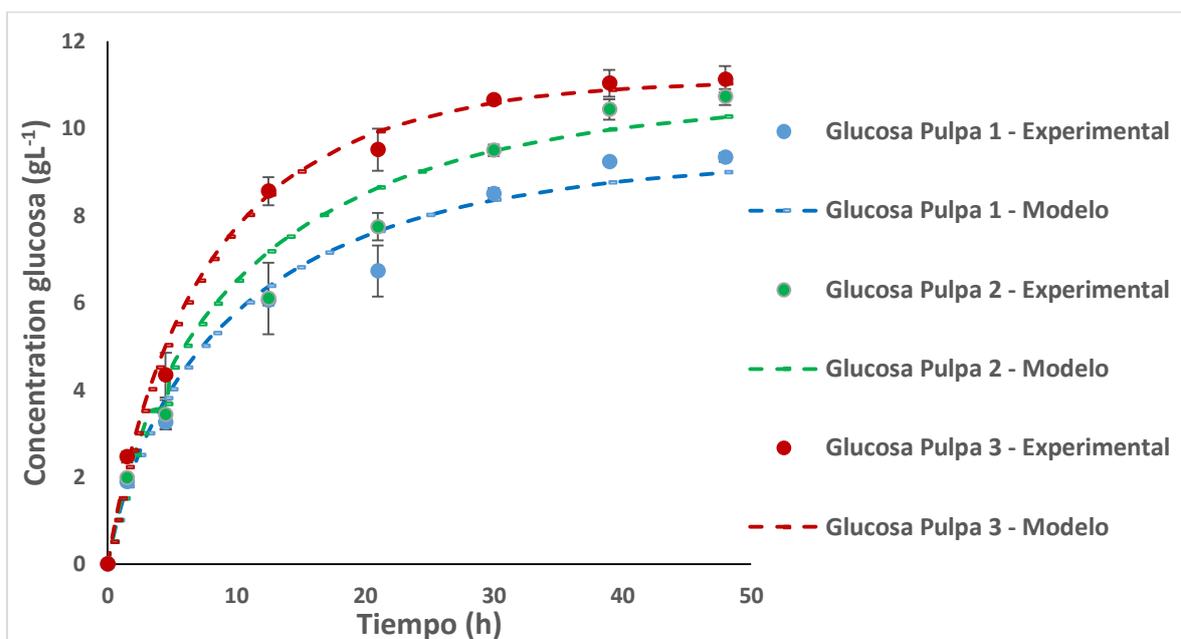


Figura 22. Concentración de glucosa de la hidrólisis enzimática de las pulpas 1, 2, 3 (los datos experimentales están representados por puntos y las predicciones teóricas por líneas).

La constante de equilibrio K se definió para predecir la concentración total de azúcares reductores T a partir de los datos de glucosa modelados obtenidos para cada pulpa a partir de los datos de concentraciones totales de azúcares reductores y glucosa, como se muestra en la ecuación 24.

$$K = \frac{G}{T-G} \quad \text{Ec. 24}$$

donde K es la constante de equilibrio, G es la concentración de glucosa (gL^{-1}), y T es el total de azúcares reductores (gL^{-1}).

Reorganizando la ecuación, K se puede obtener de la pendiente de la línea de datos experimentales de las concentraciones de glucosa y azúcares reductores totales (figura 23), como se muestra en la ecuación 25,

$$\frac{G}{T} = \frac{K}{K+1}$$

Ec. 25

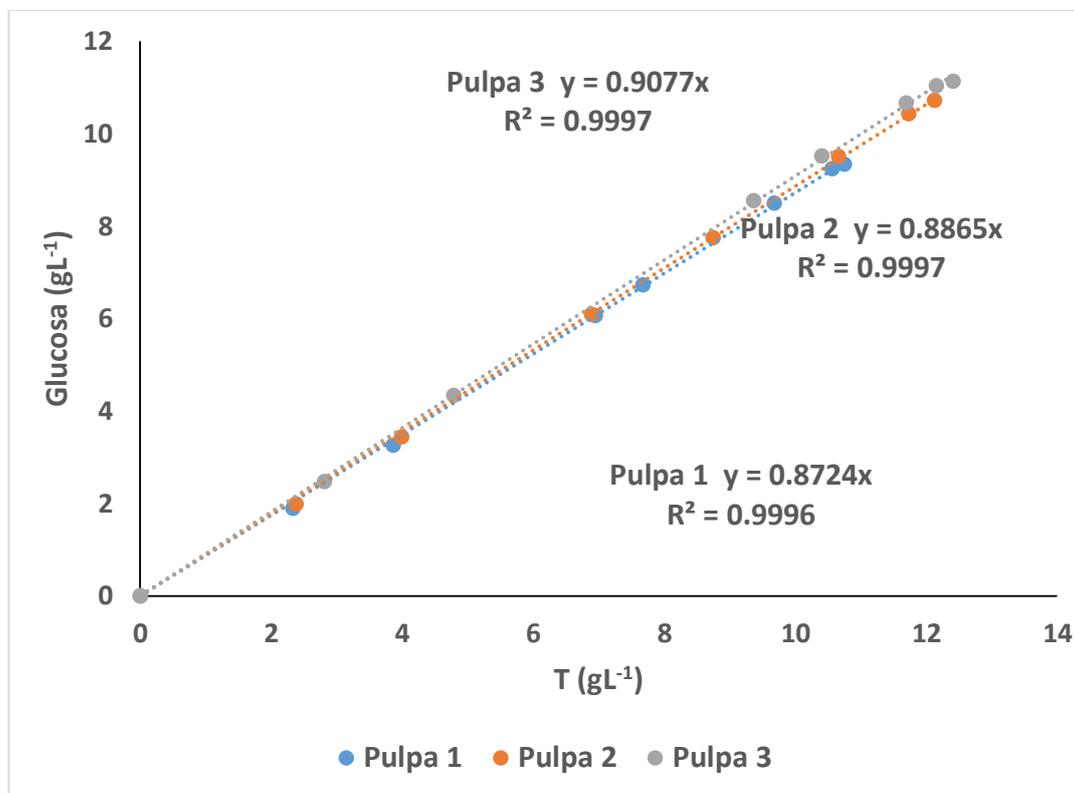


Figura 23. Determinación de la constante de equilibrio K

En la tabla 4 se muestra un resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para las tres pulpas

Tabla 4. Parámetros cinéticos para la sacarificación y contenido de lignina de las pulpas

Pulpas	K (h^{-1})	K_M (gL^{-1})	K_I (gL^{-1})	K	Lignina (%sms)
1	11,4	23,5	2,9	6,8	10,18
2	11,4	23,5	3,1	7,8	7,04
2	11,4	23,5	6,6	9,8	3,67

Nota: % sms es el % sobre madera seca

El contenido de lignina insoluble en la pulpa muestra una correlación negativa significativa con la constante de inhibición K_I ($R^2 = 0,801$) y la constante de equilibrio K ($R^2 = 0,972$). El aumento de la constante de equilibrio y la disminución del contenido de lignina

implica un aumento de la glucosa con respecto a los azúcares reductores totales para cada tiempo de hidrólisis. Además, esto concuerda con el aumento de la constante de inhibición.

3.3.3 Fermentación

La pulpa 3 fue elegida para los experimentos de fermentación SHF debido a su rendimiento óptimo de sacarificación. Se obtuvo una concentración máxima de bioetanol ($3,40 \text{ gL}^{-1} \pm 0,21 \text{ gL}^{-1}$) a las 13 h, muy cercana a la concentración teórica de bioetanol (Tabla 5). Los rendimientos de bioetanol alcanzados son comparables con los resultados obtenidos por Kruyeniski (2017) (Kruyeniski 2017) utilizando aserrín de *Pinus elliottii* pretratado con soda-AQ (a una temperatura de 170 °C durante 140 minutos con 55,2 g/L de NaOH, 0,1% de AQ y RLM 5/1) con *Saccharomyces cerevisiae* (rendimiento de etanol del 84,1%). Cotana *et al.* (2014) (Cotana *et al.* 2014) también alcanzaron rendimientos entre 80,8% y 96,1% vía SHF utilizando pino con explosión con vapor, empleando Cellic® Ctec2 y *Saccharomyces cerevisiae*.

Bahmani *et al.* (2016) (Bahmani *et al.* 2016) informaron rendimientos de etanol de aproximadamente 22,1% a partir de la hidrólisis enzimática de aserrín de pino pretratado con un proceso de digestión anaeróbica. Tian *et al.* (2016) (Tian *et al.* 2016) obtuvieron un rendimiento del 46,6% utilizando *Pinus strobus* L., pretratado con una solución de electrolito orgánico, vía SHF, utilizando Cellic®Ctec2 y *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 5. Rendimiento de bioetanol a través de la estrategia de hidrólisis y fermentación por separado (SHF) aplicada a la pulpa 3

Estrategia SHF	Tiempo (h)		
	13	20	24
Concentración de bioetanol (g l^{-1})	$3,40 \pm 0,21$	$3,23 \pm 0,17$	$3,23 \pm 0,21$
CV (%)	6,3	5,3	6,4
$Y_{P/T}$ (%)	89,3	84,8	84,8
Productividad de bioetanol ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,26	0,16	0,13

Nota: Concentración de glucosa inicial es $7,46 \text{ (g l}^{-1}\text{)}$; bioetanol teórico es $3,81 \text{ (g l}^{-1}\text{)}$; $Y_{P/T}$ (%) es el rendimiento de fermentación; y CV (%) es el coeficiente de variación

3.3.4 Rendimiento de bioetanol mediante la estrategia de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)

Durante el proceso SSF, la glucosa liberada por el complejo enzimático durante la hidrólisis es metabolizada directamente a etanol por las levaduras, consumiendo glucosa del medio, produciendo una disminución en la inhibición del producto final, una reducción del tiempo total del proceso y mayores productividades de etanol (Mendes *et al.* 2020).

Los resultados que se muestran en la Tabla 6 son comparables con los de Valenzuela *et al.* (2016) (Valenzuela *et al.* 2016), quienes alcanzaron un rendimiento de bioetanol del 80,2% utilizando pino radiata con un pretratamiento organosolv (utilizando una relación de 50:50% v/v de etanol a agua, 1,1% p/p de H₂SO₄, a una temperatura de 189 °C para 8 min), utilizando un proceso SSF en condiciones similares y los mismos microorganismos. Del mismo modo, Araque *et al.* (2008) (Araque *et al.* 2008) alcanzaron un rendimiento de bioetanol del 99,5% utilizando la estrategia SSF con chips de pino radiata con un pretratamiento organosolv de acetona-agua (a una temperatura de 195 °C durante 5 min a un pH de 2,0 en una relación acetona:agua de 1:1).

Tabla 6. Rendimientos de bioetanol de las pulpas 1, 2 y 3 a través de la estrategia de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)

(SSF)	Tiempo (h)					
	4	15	21	26	49	72
Bioetanol teórico (gL ⁻¹)	5,68	5,68	5,68	5,68	5,68	5,68
Etanol producido en la pulpa 1 (gL ⁻¹)	1,78 ± 0,12	2,84 ± 0,30	3,60 ± 0,40	4,27 ± 0,01		5,25 ± 0,24
Y _{P/T} (%)	31,30	49,90	63,40	75,20	89,40	92,50
P _{P/t} (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0,44	0,19	0,18	0,16	0,10	0,07
Glucosa equivalente (gL ⁻¹)	3,48	5,56	7,05	8,36	9,94	10,27
Etanol producido en la pulpa 2 (gL ⁻¹)	1,78 ± 0,07	3,26 ± 0,35	3,54 ± 0,19	4,46 ± 0,11		5,65 ± 0,17
Y _{P/T} (%)	31,40	57,40	62,40	78,50	87,90	99,50
P _{P/t} (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0,44	0,22	0,17	0,17	0,10	0,08
Glucosa equivalente (gL ⁻¹)	3,48	6,38	6,93	8,73	9,77	11,06
Etanol producido en la pulpa 3 (gL ⁻¹)	1,79 ± 0,18	4,50 ± 0,49	4,70 ± 0,24	4,82 ± 0,08		5,68 ± 0,04
Y _{P/T} (%)	31,50	79,20	82,80	84,80	98,90	100
P _{P/t} (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0,45	0,30	0,23	0,19	0,12	0,08
Glucosa equivalente (gL ⁻¹)	3,50	8,81	9,20	9,43	11,00	11,12

Note: $Y_{P/T}$ (%) is el Rendimiento de fermentación

El rendimiento de etanol de la Pulpa 3 fue del $100\% \pm 0,7\%$, que fue aproximadamente un 10% mayor que el rendimiento de etanol obtenido mediante la estrategia SHF ($89,3\% \pm 0,8\%$), a pesar de que estos últimos experimentos se realizaron en condiciones óptimas de temperatura y pH tanto para las enzimas como para el microorganismo. Las concentraciones a las 72 h oscilaron entre $5,25$ y $5,68 \text{ gL}^{-1}$, cercanas a las concentraciones teóricas, con rendimientos del $92,5\%$, $99,5\%$ y 100% para las pulpas 1, 2 y 3, respectivamente.

Para evaluar el desempeño del complejo enzimático utilizado en el proceso SSF, debido a que trabaja a una temperatura inferior ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) a la temperatura óptima del proceso de sacarificación (SAC), se aplicó el modelo obtenido para el proceso SAC, utilizando el parámetro de la glucosa equivalente.

Las concentraciones equivalentes de glucosa se calcularon a partir de los datos de concentración de etanol (Tabla 7). La figura 24 presenta los datos experimentales y del modelo. La Tabla 7 muestra los resultados experimentales y los predichos por el modelo después de 48 h y 72 h de tratamiento.

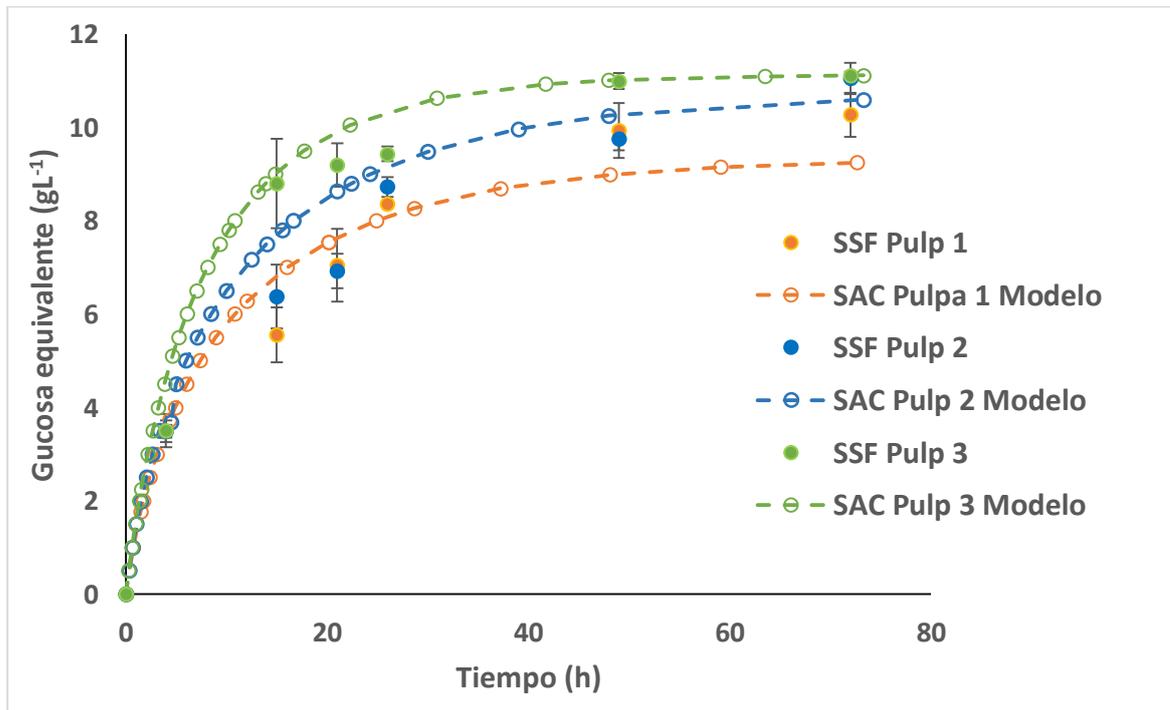


Figura 24. Concentración de glucosa en la sacarificación (los datos experimentales están representados por puntos y las predicciones teóricas por líneas) Nota: SAC es el proceso de sacarificación

Tabla 7. Glucosa equivalente experimental para SSF y los datos del modelo de la concentración de glucosa de la sacarificación a las 48 h y 72 h

Glucosa SSF (gL ⁻¹)	Experiencia 48 (h)	Modelo 48 (h)	Error (%)	Experiencia 72 (h)	Modelo 72 (h)	Error (%)
1	9,94	9,01	-9,40	10,27	9,25	10,00
2	9,77	10,28	5,30	11,06	10,60	-4,10
3	11,00	11,02	0,20	11,12	11,12	0,00

La Figura 24 muestra que el modelo obtenido para el proceso SAC puede ser utilizado para el proceso SSF, ya que predice los datos experimentales con un buen ajuste. También indicó que en las condiciones estudiadas, el complejo enzimático no presenta un menor rendimiento. Los errores obtenidos al aplicar este modelo, medidos a las 48 y 72 h, fueron inferiores al 10% (tabla 8).

3.3.5 Hidrólisis y fermentación en separado (SHF) vs. Sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF)

La estrategia SHF tiene varias ventajas. En primer lugar, los procesos de hidrólisis y fermentación se pueden realizar en condiciones óptimas de pH y temperatura, entre otros (Robak and Balcerek 2018). Además, la sacarificación a la temperatura óptima requiere una carga enzimática más baja que el proceso SSF (Ishizaki and Hasumi 2014). Además, para la estrategia SHF, la fermentación se logra en un caldo líquido que facilita la transferencia de masa y el reciclaje de la levadura después de la fermentación (mediante filtración o centrifugación) (Galbe *et al.* 2011).

Sus desventajas son el aumento de contaminantes y el efecto de productos de inhibición (Robak and Balcerek 2018). El complejo utilizado (Cellic® Ctec 2) tiene una alta proporción de enzima β -glucosidasa, asegurando la hidrólisis de celobiosa y pequeños oligosacáridos (Verdecía and Serrat 2008). El uso de complejos celulolíticos con mayor actividad de β -glucosidasa aumenta el rendimiento de la hidrólisis debido a que la celobiosa inhibe el complejo celulolítico más que la glucosa (Arismendy Pabón, Ana María *et al.* 2020).

La fermentación de alta gravedad (VHG) es una alternativa para optimizar la producción de bioetanol cuando se utiliza la estrategia SHF. La fermentación de alta gravedad es un proceso altamente concentrado en el que las células de levadura están expuestas a una alta presión osmótica al comienzo del proceso de fermentación, provocada por las altas concentraciones de azúcar y la acumulación de etanol. La acumulación de etanol, junto con altos niveles de otros subproductos tóxicos de la fermentación, se vuelve letal para las células

de levadura en fermentación, por lo que las cepas de levadura utilizadas deben seleccionarse cuidadosamente para superar las diferentes tensiones impuestas durante este proceso (Æ and Xu 2007).

Como sustratos se pueden utilizar melaza de caña de azúcar, almidón y materiales lignocelulósicos (Balat and Balat 2009; Mussatto *et al.* 2010). La principal ventaja de la tecnología VHG es la producción de una concentración de etanol muy alta (generalmente superior al 15% v/v). Este enfoque reduce el costo de la etapa de destilación, que se considera una de las principales limitaciones en la industria del bioetanol. Se ha informado que VHG (al 19%) reduce el consumo de vapor a menos de 1 kg de vapor por kg de bioetanol. Sin embargo, cuando se combina con la separación por membrana (pervaporación del 25% del caldo del fermentador), se logra un ahorro de aproximadamente el 20% y se reduce considerablemente el riesgo de inhibición en el fermentador (Kang *et al.* 2014).

Sin embargo, el proceso simultáneo parece la alternativa más factible y rentable para producir bioetanol debido a las ventajas en la reducción de productos inhibitorios y el uso de un solo reactor para todo el proceso, disminuyendo los costos de inversión (Olofsson *et al.* 2008a). Los monómeros de azúcar liberados durante la sacarificación son inmediatamente fermentados por los microorganismos, lo que reduce el riesgo de contaminación microbiana (Robak and Balcerek 2018). En otras palabras, la glucosa se fermenta instantáneamente en bioetanol, independientemente de los parámetros óptimos de temperatura y pH tanto para el proceso de hidrólisis como para el de fermentación (Wyman *et al.* 1992).

3.4 Conclusión

El tipo y condiciones del pretratamiento aplicado al aserrín de pino influyeron en el desempeño de la hidrólisis enzimática debido a la reducción del contenido de lignina, lo que mejoró considerablemente la accesibilidad de las enzimas al material, mejorando la digestibilidad de la celulosa.

La pulpa más deslignificada (contenido de lignina del 3%) presentó la mayor hidrólisis enzimática con una producción de glucosa de 11,1 (gL⁻¹) en 48 h.

El modelo cinético aplicado demostró una buena concordancia con los datos experimentales. El valor de la constante de Michaelis-Menten para este complejo sustrato-enzima resultó ser $K_M = 23.5 \text{ gL}^{-1}$, lo que indicó que el complejo enzimático tenía una buena afinidad con el sustrato empleado. La constante de inhibición (K_I) para la pulpa 1, 2 y 3 fue de 2.9 gL⁻¹, 3.1gL⁻¹ y 6.6 gL⁻¹, respectivamente, denotando el desempeño satisfactorio del complejo enzimático utilizado para llevar a cabo el proceso de sacarificación.

Para la experiencia llevada a cabo en esta sección (producción de bioetanol de 2G), se obtuvieron altos rendimientos de bioetanol utilizando esta especie de pino altamente

recalcitrante pretratado mediante un tratamiento de deslignificación alcalina, empleando la estrategia SSF. Además, el complejo enzimático utilizado mostró un buen desempeño en el proceso SSF, a pesar de utilizar una temperatura inferior (37 °C) a la óptima para el proceso de sacarificación.

Usando 30.0 FPUg⁻¹ de sustrato y 1% de celulosa hidrolizable a una temperatura de 37 °C, un pH de 5.0, las concentraciones promedio de bioetanol obtenidas vía SSF fueron 92,5%, 99,5% y 100% para las pulpas 1, 2 y 3, respectivamente.

CAPITULO 4. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL 2G

4.1 Objetivos

Se realizaron experiencias empleando la estrategia SSF con el fin de evaluar la producción de bioetanol de 2G variando carga enzimática y temperatura como se observa en la figura 25. Con los datos obtenidos, se analizaron mediante diseños experimentales factoriales con puntos centrales para evaluar la influencia combinada de la carga enzimática, la temperatura y el tiempo en los rendimientos de bioetanol con el fin de lograr optimizar estos parámetros en el proceso SSF.

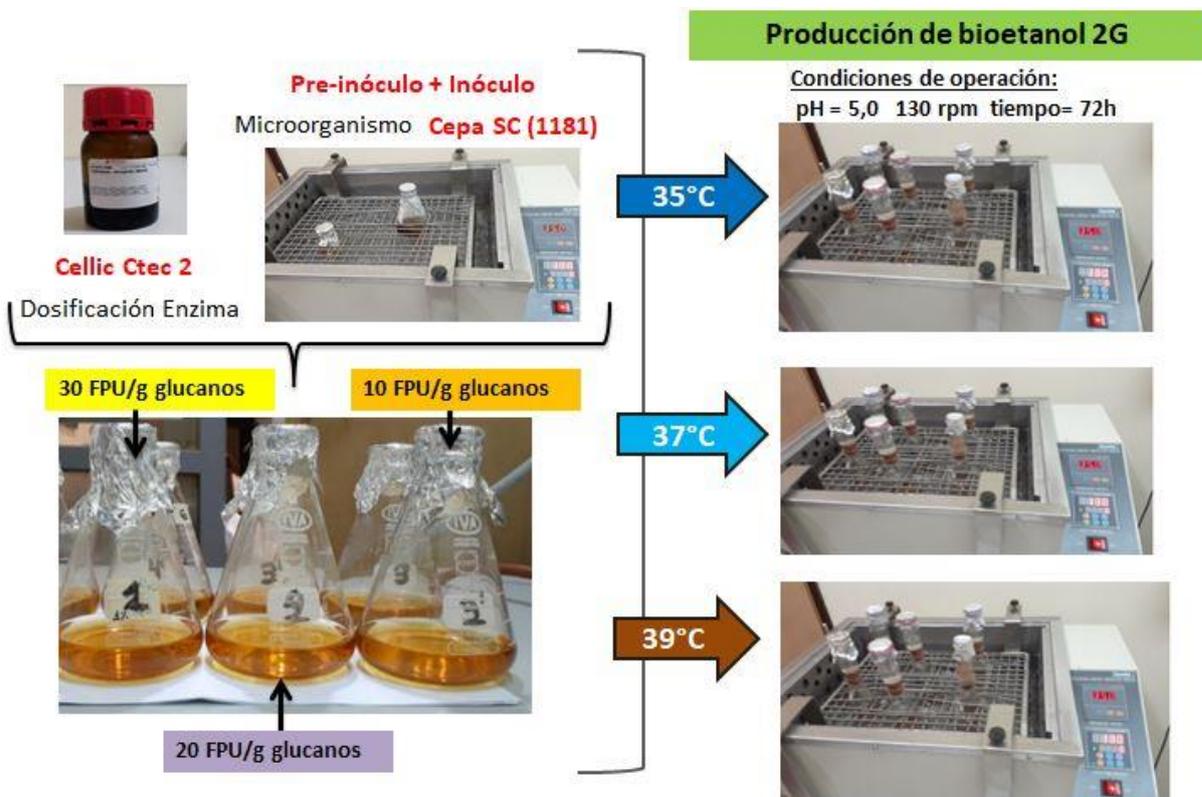


Figura 25. Esquema SSF para la producción de bioetanol 2G variando dosificación de carga enzimática y temperatura.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1. Materia prima, microorganismos y enzimas

La materia prima fue una mezcla de aserrín industrial de *Pinus elliottii* y *Pinus taeda* proporcionado por un aserradero local (Misiones, Argentina), sometido a un pretratamiento soda-etanol (Mendes *et al.* 2019). Se eligieron las siguientes condiciones de operación para obtener una alta designificación: relación licor-madera (L:M) de 5,4:1, temperatura máxima de

170 °C, tiempo a temperatura máxima de 60 min, relación EtOH:H₂O 35:65% v/v, NaOH 23,3% sobre masa de madera seca, a 140 min. Después del pretratamiento, la pulpa se lavó minuciosamente (Mendieta *et al.* 2021).

Las enzimas comerciales Cellic® CTec2 (Novozymes) fueron proporcionadas por Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina) para la hidrólisis enzimática. La cepa *Saccharomyces cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181), aplicada para el proceso de fermentación, fue donada por el Instituto de Modelación e Innovación Tecnológica IMIT (UTN-CONICET), Resistencia, Argentina.

4.2.2 Caracterización del Sustrato y Fracción Líquida del Proceso de Fermentación

La composición química de la materia prima se determinó en trabajos previos (Imlauer *et al.* 2021). El aserrín de pino y las pulpas (sustrato) se caracterizaron según los estándares NREL (Laboratorio Nacional de Energía Renovable) Golden, Colorado, EE. UU., que incluyen sólidos totales y humedad (NREL/TP-510-42621) (Sluiter *et al.* 2008), y carbohidratos estructurales y lignina (NREL/TP- 510-42618) (Sluiter *et al.* 2004). Se utilizó un HPLC (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.), con una columna SHODEX SP810 y las condiciones de operación: agua destilada como eluyente, 0,6 mL/min, 85 °C, y detector de índice de refracción.

La cuantificación de glucanos, xilanos, mananos, galactanos y arabinanos en el sólido fue calculado multiplicando las concentraciones de azúcar por los factores estequiométricos de hidrólisis. Es decir, 0,88 (132/150) para azúcares de cinco carbonos (xilosa y arabinosa) y 0,90 (162/180) para azúcares con seis carbonos (glucosa, manosa y galactosa).

La glucosa y el etanol se determinaron mediante cromatografía líquida HPLC (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.), utilizando una columna AMINEX-HPX97H (BIO-RAD, Laboratorios Bio-Rad, Inc. Argentina). Las condiciones cromatográficas fueron: 4 mM de H₂SO₄ como eluyente, un flujo de 0,6 mL/min, 35 °C de temperatura, y detectores de índice de refracción y de arreglo de diodos.

Las concentraciones de levadura se determinaron en experimentos SSF mediante la medición directa de la absorbancia a 600 nm (espectrofotómetro UV-1800, Shimadzu Corporation, Kioto, Japón). Se siguió el protocolo NREL/TP-510-42630 del Laboratorio Nacional de Energías Renovables, incluido el desarrollo de la curva de calibración. La muestra obtenida es el sobrenadante después de decantar la pulpa. La referencia fue la absorbancia medida a 600 nm de una muestra de caldo de fermentación sin levadura ni pulpa.

4.2.3 Preparación del pre-inóculo e inóculo

Se utilizaron 100 mL de medio líquido YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) para el pre-inóculo e inóculo bajo las siguientes concentraciones: 10 gL⁻¹ de extracto de levadura, 20 gL⁻¹ de peptona y 20 gL⁻¹ de dextrosa proporcionados por el estándar para la estrategia SSF (NREL/TP-510-42630) (Dowe and McMillan 2008). Se complementó con micronutrientes: 5 gL⁻¹ de fosfato de potasio, 1,5 gL⁻¹ de cloruro de amonio y 0,65 gL⁻¹ de sulfato de magnesio heptahidratado, según el protocolo empleado para la estrategia SSF (Mendieta *et al.* 2021). Primero, 2 ml de La levadura *Saccharomyces cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181) en 10 mL del medio líquido YPD se incubaron hasta una densidad óptica de 0,8 (condiciones pre-inóculo). Luego, el pre-inoculo se incorporó a 90 mL del medio líquido YPD y se incubó a una densidad óptica de aproximadamente 0,7 (condición de inóculo). La densidad óptica se determinó espectrofotométricamente a 600 nm, siguiendo el estándar para la estrategia SSF (NREL/TP-510-42630) (Dowe and McMillan 2008). Los procesos de pre-inóculo e inóculo duraron 24 h en un baño térmico a 180 rpm y 37 °C (Mendieta *et al.* 2021). El control de precisión de la temperatura del baño térmico fue +/-0,1 °C.

4.2.4 Estrategia de sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF)

El material sólido fue hidrolizado enzimáticamente y posteriormente fermentado con *Saccharomyces cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181) según NREL-LAP 510-42630 (Dowe and McMillan 2008).

El proceso SSF, se realizó en matraces Erlenmeyer de 200 mL utilizando celulosa hidrolizable al 2% (porcentaje de materia seca) suspendida en 50 mL de citrato de sodio 0,1 M (pH 5), 40 mL de agua destilada, 10 mL de inóculo, 0,028 mL de surfactante Tween 80, 0,5 gL⁻¹ de extracto de levadura, 1 gL⁻¹ de peptona (un total de 100 mL) y se colocaron en un baño térmico agitado a 130 rpm. Se utilizaron trampas de aire para evitar la entrada de oxígeno al sistema así como permitir la liberación del CO₂ producido por la levadura. Se tomaron muestras cada 4 h durante las 16 h iniciales y a los 24, 48 y 72 h.

4.2.5 Diseños experimentales

Los datos obtenidos fueron analizados mediante diseños experimentales factoriales con puntos centrales para evaluar la influencia combinada de la carga enzimática, la temperatura y el tiempo en el rendimiento de bioetanol. Los diseños factoriales permiten comprender los efectos de las variables independientes sobre una variable dependiente. En un diseño factorial 3², hay tres variables independientes, cada una con dos niveles de variación. Un punto central añadido incorpora un nivel más que permite definir modelos de ecuaciones de superficie como diseños de superficie de respuesta. Estos modelos matemáticos basados en

datos experimentales representan cómo los cambios en las variables afectan la respuesta de interés. La combinación de estas ecuaciones permite encontrar los niveles de las variables que optimizan la respuesta deseada. Para la construcción de modelos, es fundamental trabajar con variables transformadas. La transformación de variables ayuda a cumplir con los requisitos estadísticos y evita problemas de correlación, si existen.

Las variables seleccionadas fueron: carga enzimática (FPU g⁻¹ glucanos), Temperatura (°C) y Tiempo (h) . La consistencia se mantuvo baja para eliminar su influencia en el sistema. El tiempo en el modelo completo varió de 0 h a 72 h. Dados los resultados (diferencias en las formas de las curvas), se decidió dividir el diseño en dos, abarcando tiempos de 0 h a 24 h (Modelo I) y de 24 a 72 h (Modelo II). La Tabla 8 muestra el esquema de variables. Se usó un software Statgraphics centurión (The Plains, VA, EE. UU.) para evaluar los resultados del diseño experimental en un 95% nivel de confianza.

Tabla 8. Las condiciones de las variables operacionales en la estrategia SSF.

Factor	+1	0	-1
A= Carga enzimática (FPU g ⁻¹ glucanos)	30	20	10
B= Temperatura (°C)	39	37	35
Modelo completo = tiempo (h)	72		4
Modelo I C = Tiempo (h)	24	16	8
Modelo II C = Tiempo (h)	72	48	24

La variable de respuesta fue el rendimiento SSF ($Y_{P/T}$), calculado mediante la ecuación 26 (Mendieta *et al.* 2021)

$$Y_{P/T} = \frac{\text{Etanol producido } \frac{g}{L}}{0,51 \text{ glucosa en el material } \frac{g}{L}} * 100 \quad \text{Ec. 26}$$

4. 3 Resultados y discusión

4.3.1 Caracterización del sustrato

En la tabla 9 se muestra la composición química del aserrín y de la pulpa soda-etanol (% sobre madera seca). El rendimiento de pulpa fue del 40,5% y la deslignificación del 94,9%, por lo que el pretratamiento resultó en la extracción de una alta cantidad de lignina, lo que aumenta el acceso de las enzimas al material. Además, las enzimas pueden unirse a

sustancias reactivas y no reactivas como la lignina, que pueden absorber enzimas de manera irreversible, disminuyendo su actividad (Xue *et al.* 2012). Los resultados fueron similares a los obtenidos por otros autores, quienes alcanzaron bajos contenidos de lignina en una pulpa alcalina utilizando condiciones similares para pino nórdico (*Pinus sylvestris*) (1,6% a 4,1%) (Schenck *et al.* 2013).

Tabla 9. Composición química del aserrín de pino y de la pulpa soda-etanol

Composición química	Glucanos (% sms*)	Xilanos (% sms)	Galactanos (% sms)	Mananos (% sms)	Arabinanos (% sms)	Lignina (% sms)
Aserrín de pino	40,9	7,5	2,6	14,8	0,8	29,2
Pulpa soda-etanol	80,2	7,2	0,3	8,4	-	3,7

* sms: % sobre madera seca.

4.3.2 Caracterización de la cepa de hongos levaduriformes *Saccharomyces cerevisiae* IMR 1181 (SC 1181) y enzimas Cellic Ctec 2

Para la optimización de la producción de bioetanol 2G, se realizaron experiencias empleando la misma conservación de cepa de hongos levaduriformes y complejo enzimático utilizado en trabajos anteriores para la producción de bioetanol.

4.3.3 Estrategia de sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF)

4.3.3.1 Producción de bioetanol 2G

En la producción de bioetanol 2G a través de la estrategia SSF, la glucosa liberada por el complejo enzimático durante la hidrólisis se metaboliza directamente a etanol por las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. La glucosa se consume continuamente del medio, disminuyendo la inhibición del producto final. Por lo tanto, se obtiene una reducción del tiempo total de proceso y mayores rendimientos de etanol (Cheng *et al.* 2017). La Tabla 10 proporciona los rendimientos promedio de bioetanol 2G obtenidos experimentalmente al variar la carga enzimática y la temperatura. En SSF, la hidrólisis enzimática de la fracción sólida controla el rendimiento de producción total de etanol (Olofsson *et al.* 2008b).

Tabla 10. Resultados de los rendimientos de bioetanol obtenidos mediante la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) de una pulpa soda-etanol de aserrín de pino (bioetanol teórico 11,36 gL⁻¹).

T (°C)	Tiempo	4	8	12	16	24	48	72
Carga enzimática = 30 FPU g ⁻¹ Glucanos								
35 °C	Etanol producido (gL ⁻¹)	1,27	3,35	4,02	5,37	5,69	n.d.	9,21

	$Y_{P/T}$ (%)	11,11	29,51	35,36	47,28	50,06	n.d.	81,00
	$P_{P/T}$ ($\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,32	0,42	0,34	0,34	0,24	n.d.	0,13
	Concentración de levadura (gL^{-1})	n.d.	1,85	1,93	2,94	3,73	3,66	3,80
37 °C	Etanol producido (gL^{-1})	1,34	1,74	1,85	5,70	4,92	8,28	9,07
	$Y_{P/T}$ (%)	11,82	15,35	16,32	43,27	50,20	72,87	79,82
	$P_{P/T}$ ($\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,34	0,22	0,15	0,36	0,21	0,17	0,13
	Concentración de levadura (gL^{-1})	1,54	1,78	1,88	2,75	3,24	3,63	3,73
39 °C	Etanol producido (gL^{-1})	2,62	4,13	5,15	6,81	7,22	7,93	8,08
	$Y_{P/T}$ (%)	23,07	36,36	45,38	59,92	63,51	69,83	71,1
	$P_{P/T}$ ($\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,66	0,52	0,43	0,43	0,30	0,17	0,11
	Concentración de levadura (gL^{-1})	1,21	2,16	2,32	2,93	3,34	3,48	3,48
Carga enzimática = 20 FPU g^{-1} glucanos								
35 °C	Etanol producido (gL^{-1})	1,75	2,37	3,05	3,66	4,12	n.d.	5,87
	$Y_{P/T}$ (%)	12,7	20,86	26,82	32,20	36,26	n.d.	51,63
	$P_{P/T}$ ($\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,44	0,30	0,25	0,23	0,17	n.d.	0,08
	Concentración de levadura (gL^{-1})	n.d.	1,77	2,03	2,09	3,26	3,94	3,99
37 °C	Etanol producido (gL^{-1})	0,61	1,72	3,20	3,98	4,56	4,83	5,98
	$Y_{P/T}$ (%)	5,37	15,13	28,19	35,06	40,13	42,53	52,61
	$P_{P/T}$ ($\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,15	0,22	0,27	0,25	0,19	0,10	0,08
	Concentración de levadura (gL^{-1})	1,45	1,63	1,88	2,07	3,10	3,69	3,95
39 °C	Etanol producido (gL^{-1})	1,75	3,01	3,91	5,15	4,96	5,57	5,55
	$Y_{P/T}$ (%)	15,41	26,46	34,38	45,34	43,63	48,99	48,84
	$P_{P/T}$ ($\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,44	0,38	0,33	0,32	0,21	0,12	0,08
	Concentración de levadura (gL^{-1})	1,15	2,11	2,13	2,78	3,03	3,67	3,81
Carga enzimática = 10 FPU g^{-1} glucanos								
35 °C	Etanol producido (gL^{-1})	0,57	1,19	1,25	1,87	2,41	n.d.	2,62
	$Y_{P/T}$ (%)	5,04	9,50	11,89	16,41	21,18	n.d.	23,07
	$P_{P/T}$ ($\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,14	0,15	0,10	0,12	0,10	n.d.	0,04
	Concentración de levadura (gL^{-1})	n.d.	0,88	1,06	1,40	2,89	3,43	3,77
37 °C	Etanol producido (gL^{-1})	0,00	0,46	1,48	1,74	2,09	3,03	3,82
	$Y_{P/T}$ (%)	0,00	4,06	13,03	15,31	18,41	26,69	33,59
	$P_{P/T}$ ($\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,00	0,06	0,12	0,11	0,09	0,06	0,05
	Concentración de levadura (gL^{-1})	0,65	1,61	0,99	1,39	2,45	3,21	3,85
39 °C	Etanol producido (gL^{-1})	1,02	1,61	1,91	2,45	2,36	2,22	2,00
	$Y_{P/T}$ (%)	9,02	14,11	16,77	21,56	20,79	19,52	17,62

$P_{P/T}$ ($\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,26	0,20	0,16	0,15	0,10	0,05	0,03
Concentración de levadura (gL^{-1})	0,62	1,88	1,37	1,14	2,71	3,31	3,74

N.d: no determinado

Los resultados demuestran que la variación de la carga enzimática juega un papel fundamental en la producción de bioetanol ya que altas cargas enzimáticas generan mayores concentraciones de levadura. Por ejemplo, con 30 FPU g^{-1} de glucanos a las 16 h, las concentraciones de levadura oscilaron entre 2,75 y 2,94 gL^{-1} . Sin embargo, utilizando 10 FPU g^{-1} de glucanos, es posible obtener concentraciones de levadura entre 1,14 y 1,40 gL^{-1} a las 16 h. Esta diferencia influye notoriamente en el rendimiento de bioetanol.

Comparando rendimientos a las 72 h para las tres temperaturas y cargas enzimáticas, es notorio el incremento con el cambio de carga. Sin embargo, el incremento no es uniforme. Con cargas enzimáticas bajas (10 a 20 FPU g^{-1} glucanos), los porcentajes son del 124% (35 °C), 57% (37 °C) y 177% (39 °C), mientras que con cargas superiores (20 a 30 FPU g^{-1} de glucanos), son 57% (35 °C), 52% (37 °C) y 46% (39 °C). Otros estudios encontraron resultados similares al variar la carga de enzimas, con una fuerte correlación positiva entre la carga de enzimas y el rendimiento de etanol (Linde *et al.* 2007; Xue *et al.* 2012).

El análisis de productividad también muestra que 37 °C produce los mejores resultados. La productividad aumenta en un 25% al cambiar de 35 °C a 37 °C para 10 FPU g^{-1} de glucanos, pero no hay cambios para 20 y 30 FPU g^{-1} de glucanos. Sin embargo, al subir la temperatura de 37 °C a 39 °C, hay una disminución de la productividad para 10 y 30 FPU g^{-1} (valores extremos) y no hay cambios para 20 FPU g^{-1} de glucanos.

El principal interés de esta serie de trabajos es el aprovechamiento del aserrín de pino para la obtención de bioproductos, entre ellos el etanol. La evaluación involucró el efecto de la temperatura, la carga enzimática y el tiempo en este sustrato en particular a una baja concentración de celulosa hidrolizable (CH). En el trabajo anterior con el mismo sustrato, a 37 °C con 30 FPU g^{-1} de glucanos y 1% de CH, se logró una concentración de etanol de 5,68 g/L (100% de rendimiento) (Mendieta *et al.* 2021). En este trabajo, la concentración teórica máxima (2% CH) fue de 11,36 g/L. A las 72 h, 81% fue el rendimiento máximo obtenido en condiciones óptimas (es decir, 9,21 g/L de etanol). La diferencia de rendimiento se debe a la mayor concentración que, aunque todavía baja, ya muestra dificultades de agitación con el sistema de laboratorio utilizado.

La temperatura produce incrementos mucho más pequeños, pero a 37 °C parece la mejor opción. Cuando se usa *Saccharomyces cerevisiae*, el rango habitual del proceso SSF es de 35 a 37 °C, mientras que la temperatura de operación de la levadura aproximadamente es de (30 a 32 °C) y la temperatura óptima de trabajo para el proceso de hidrólisis enzimática es 50 °C (Barboza- Devos and Colla 2022).

Dada la recalcitrancia de las maderas blandas, la obtención de altos rendimientos de etanol implica un alto requerimiento de carga enzimática (Stephen *et al.* 2012). El inconveniente es que las enzimas componen el mayor costo de hidrólisis, por lo que es necesario reducirlo para que la hidrólisis enzimática sea económicamente factible (Xue *et al.* 2012).

Algunas alternativas son el reciclaje de la enzima (Xue *et al.* 2012) y el uso de levaduras de fermentación de celobiosa (por ejemplo, *Brettanomyces clausulani*) (Olofsson *et al.* 2008b), entre otras.

4.3.4 Diseño experimental

4.3.4.1 Modelo completo

El análisis del diseño completo dio como resultado el modelo representado por la Ecuación 25 (en variables transformadas, $R^2 = 93.5$).

$$Y_{P/T} \text{ Modelo completo} = 43.5 + 18.3 \cdot Ez + 17.5 \cdot t + 5.90 \cdot T^2 - 3.46 \cdot T \cdot t + 11.5 \cdot Ez \cdot t - 18.34 \cdot t^2 \quad \text{Ec. 25}$$

don
de

T: temperatura; t: tiempo; Ez: carga enzimática.

El ajuste de la ecuación para los rendimientos de fermentación (observados vs. predichos por el modelo) se muestra en la Figura 26.

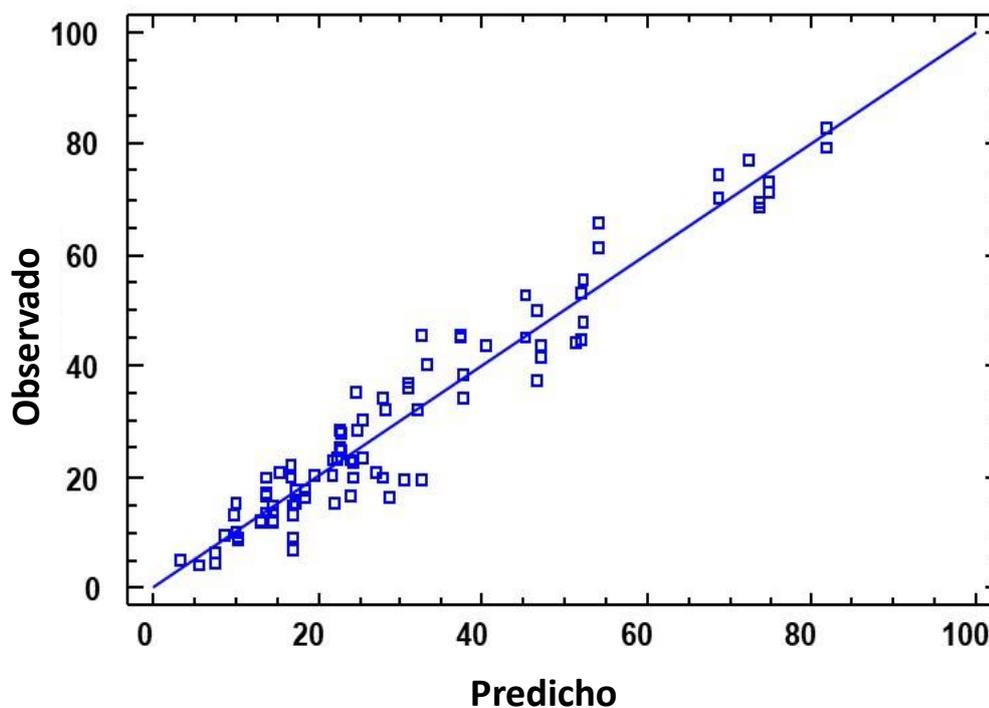


Figura 26. Rendimiento de bioetanol observado versus predicho por la Ecuación 25

El modelo indica que la temperatura tiene una influencia menor. Además, la interacción primaria implica tiempo. Esta interacción muestra que el efecto de la temperatura en el sistema es mucho más fuerte en tiempos altos, lo que evidencia que el proceso requeriría un ajuste de temperatura en algún punto intermedio.

El tiempo muestra una tendencia cuadrática, lo que significa que la producción se detiene antes de las 72 h Sin embargo, los datos experimentales muestran rendimientos máximos al final de la reacción, lo que indica que el modelo falla en tiempos altos. Para comprender mejor el proceso, se decidió dividir el diseño completo en dos modelos separados (tiempos cortos y largos).

4.3.4.2 Modelo I

Para tiempos bajos, la ecuación del modelo ajustado para la variable respuesta Y_{PT} (%) en variables transformadas ($R^2 = 96.3$) involucra los tres factores (carga enzimática, temperatura y tiempo) y sus interacciones, mostrando una forma cuadrática (Ecuación (27)).

$$Y_{PT \text{ Modelo I}} (\%) = 32.3 + 14.8 \times Ez + 3.80 \times T + 8.90 \times t + 1.87 \times Ez \times T + 2.93 \times Ez \times t + 4.65 \times T^2 - .97 \times t^2 \quad \text{Ec. 27}$$

La Figura 27 representa el modelo de rendimiento obtenido con la estrategia SSF, con variaciones de la carga enzimática entre 10–30 FPU g^{-1} glucanos, en un tiempo 8–24 h a una temperatura de 39 °C.

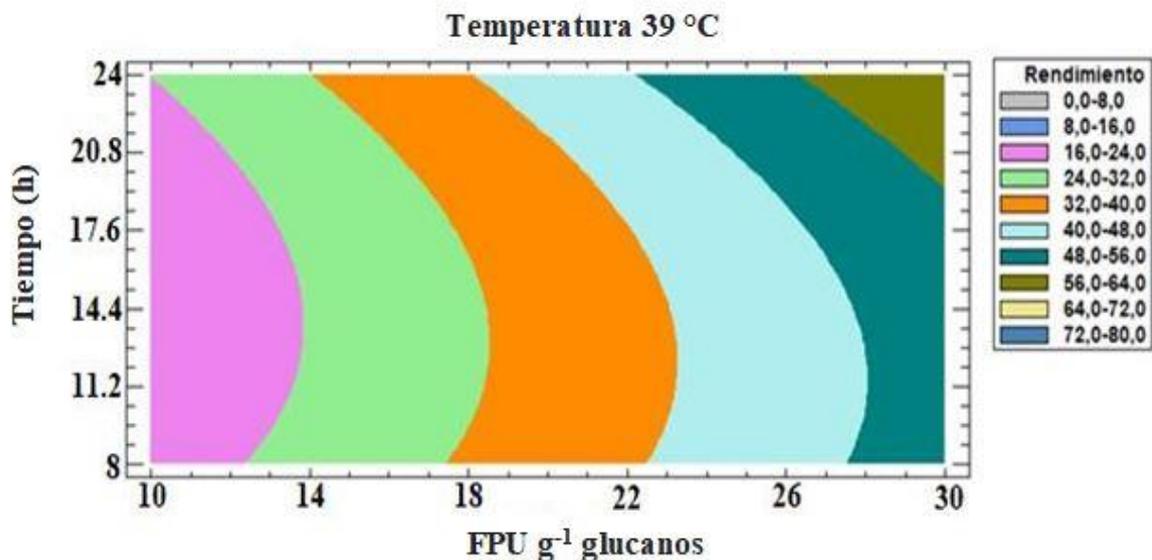


Figura 27. Contorno de superficie de respuesta estimada del Modelo I (39 °C).

Para realizar su función de manera eficiente en un tiempo relativamente corto, tanto la enzima como la levadura requieren que los parámetros del proceso estén en sus condiciones óptimas. Como la enzima trabaja a $T = 50\text{ °C}$, y la levadura soporta un máximo de $T = 39\text{ °C}$, el rendimiento máximo encontrado por el diseño experimental corresponde al límite superior (+1) para los tres factores, es decir con una carga enzimática de 30 FPU g^{-1} glucanos, 39 °C de temperatura durante 24 h.

En las primeras horas del proceso (antes de las 24 h), la enzima requiere sus condiciones óptimas para despolimerizar la celulosa en monómeros de glucosa lo más rápido posible para que la levadura pueda convertirla en moléculas de etanol.

Los valores de rendimiento de fermentación calculados por el modelo se ajustan a los valores experimentales (Figura 28). Es decir, los rendimientos de fermentación obtenidos por el modelo y experimentalmente en 24 h son de (63,2 y 63,5) %, respectivamente, con una carga enzimática de 30 FPU g^{-1} de glucanos y a 39 °C .

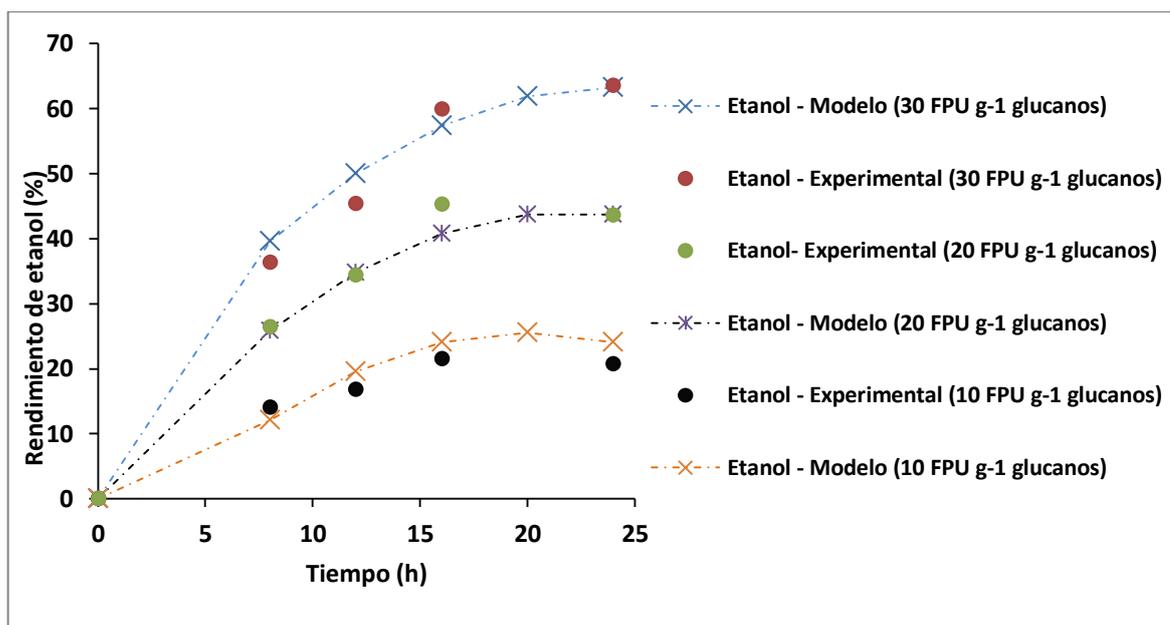


Figura 28. Rendimientos de fermentación experimentales y teóricos (calculados con el Modelo I) a 39 °C

4.3.4.3 Modelo II

Este modelo se obtuvo utilizando la estrategia SSF por períodos prolongados (24 h, 48 h y 72 h). Todos los factores e interacciones estudiados influyen significativamente en la

variable respuesta $Y_{P/T}$ (%). El modelo ajustado con variables transformadas ($R^2 = 95.8$) se presenta en la Ecuación (28).

$$Y_{P/T \text{ Modelo II}} (\%) = 45.2 + 22.7 \times Ez + 5.56 \times t + 5.15 \times Ez \times t - 3.41 \times T \times t \quad \text{Ec. 28}$$

La Figura 29 muestra la representación del modelo de rendimiento de fermentación en la estrategia SSF con variaciones de la carga enzimática entre 10–30 FPU g^{-1} de glucanos y temperaturas entre 35–39 °C a las 72 h.

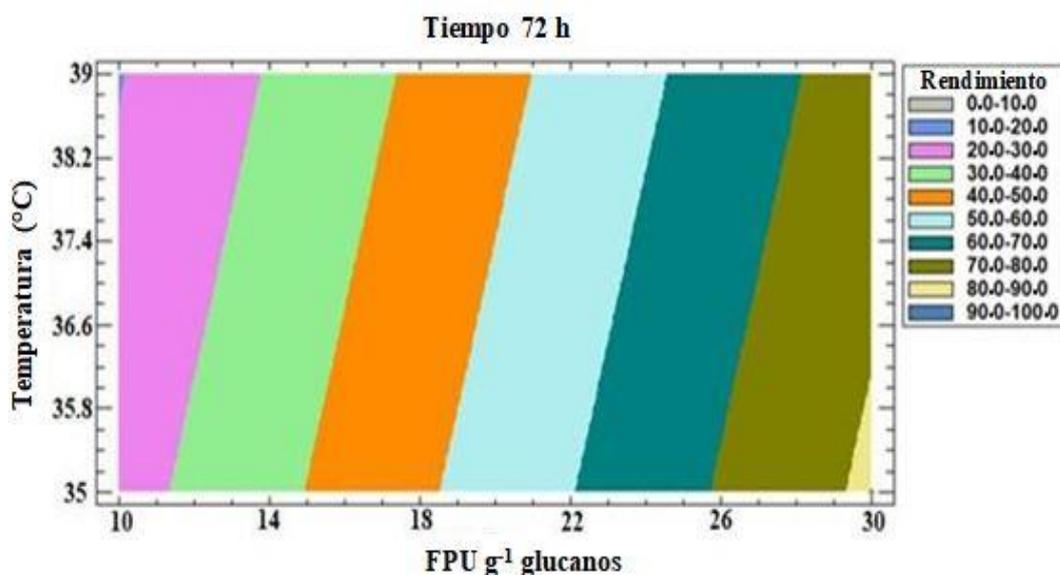


Figura 29. Contorno de la superficie de respuesta estimada del Modelo II (72h)

Como se ve en la Ecuación (28), luego de las 24 h iniciales, la temperatura no tiene un efecto significativo en el rendimiento del proceso de fermentación (solo actúa a través de una leve interacción con el tiempo), por lo que tanto la enzima como la levadura no requieren de temperaturas óptimas de trabajo para llevar a cabo su función. Sin embargo, los resultados son ligeramente mejores en el límite inferior de temperatura ($-1 = 35$ °C).

La carga enzimática máxima es necesaria para maximizar la despolimerización de la celulosa en monómeros de glucosa, con el mejor rendimiento a las 72 h de reacción ($+1 = 30$ FPU g^{-1} glucanos).

Durante 72 h, el rendimiento de fermentación teórico obtenido por el Modelo II es de 81,9%, mientras que el valor experimental es de 81,0%, con una carga enzimática de 30 FPU g^{-1} de glucanos a 35 °C.

Los valores de rendimiento de fermentación calculados por el modelo se ajustan a los valores experimentales (Figura 30). Es decir, los rendimientos de fermentación obtenidos por el modelo y experimentalmente en 72 h son de 81,9 y 81,0%, respectivamente, con una carga enzimática de 30 FPU g⁻¹ de glucanos y a 35 °C.

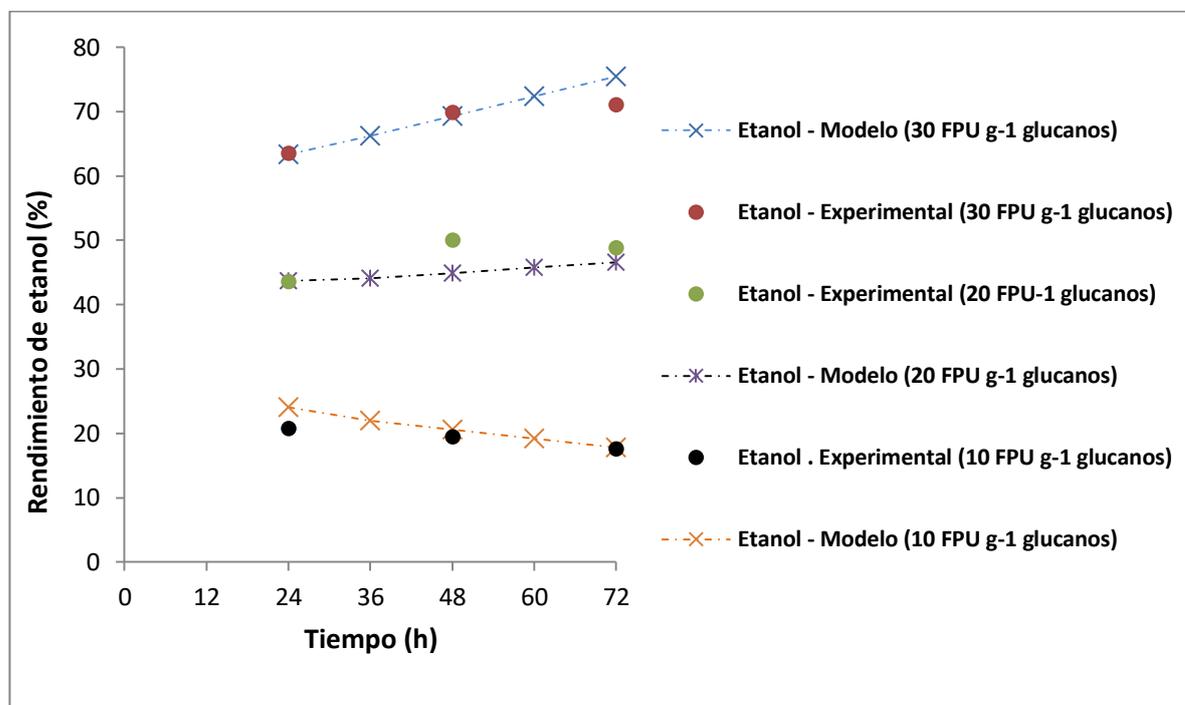


Figura 30. Rendimientos de fermentación experimentales y teóricos (calculados con el Modelo II) a 35°C

4.4 Conclusión

La pulpa de pino soda-etanol es un sustrato adecuado para la producción de bioetanol 2G. Dada la baja consistencia de la pulpa, se obtuvieron buenos rendimientos de bioetanol para esta especie de pino altamente recalcitrante utilizando la estrategia SSF.

La carga de enzimas y la temperatura definen el nivel de fermentación al final de la reacción. El complejo enzimático mostró un buen desempeño en el proceso SSF a pesar de usar temperaturas más bajas que las óptimas (35–39 °C) para el proceso de sacarificación.

Los valores de rendimiento de fermentación calculados se ajustan a los valores experimentales, estableciendo la validez de los modelos obtenidos. Los valores óptimos de rendimiento de fermentación fueron 63,2% y 81,9% para los Modelos I (tiempos cortos) y II (tiempos largos), respectivamente. Las mejores condiciones encontradas por los diseños experimentales fueron 30 FPU g⁻¹ glucanos, 39 °C y 24 h para el Modelo I, y 30 FPU g⁻¹ glucanos, 35 °C y 72 h para el Modelo II.

El aserrín de pino es un recurso abundante. Es voluminoso, húmedo y en general disperso geográficamente, lo cual complica su uso como recurso energético. Se demostró que el procesamiento de soda-etanol es un pretratamiento adecuado para esta biomasa recalcitrante. El principal interés de esta serie de trabajos realizados en el capítulo 3 y 4, es el uso de aserrín de pino pretratado con soda-etanol para la obtención de bioetanol. Este estudio permite definir condiciones adecuadas para cada lapso del procesamiento de SSF, que se pueden ajustar para lograr la máxima producción de bioetanol.

Los resultados obtenidos permiten definir las mejores condiciones de trabajo para el estudio de cambio de escala, el cual se realizará a una consistencia de pulpa del orden de 12,5% (10% de CH). Por otro lado, es necesario evaluar varias perspectivas en futuras investigaciones para reducir los costos de producción de bioetanol 2G, como es el reciclaje de las enzimas.

CAPITULO 5. PRODUCCIÓN DE BIOETILENO 2G

5.1 Objetivo

Para el proceso de deshidratación (figura 31), el objetivo fue evaluar la temperatura en la cual se logra la mayor conversión de etanol y selectividad de etileno, empleando bioetanol 2G y etanol comercial (como referencia) con catalizadores comerciales. Estas experiencias se desarrollaron en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas (CINDECA), ubicado en la ciudad de La Plata, bajo el permanente acompañamiento del Dr. Gerardo Santori.

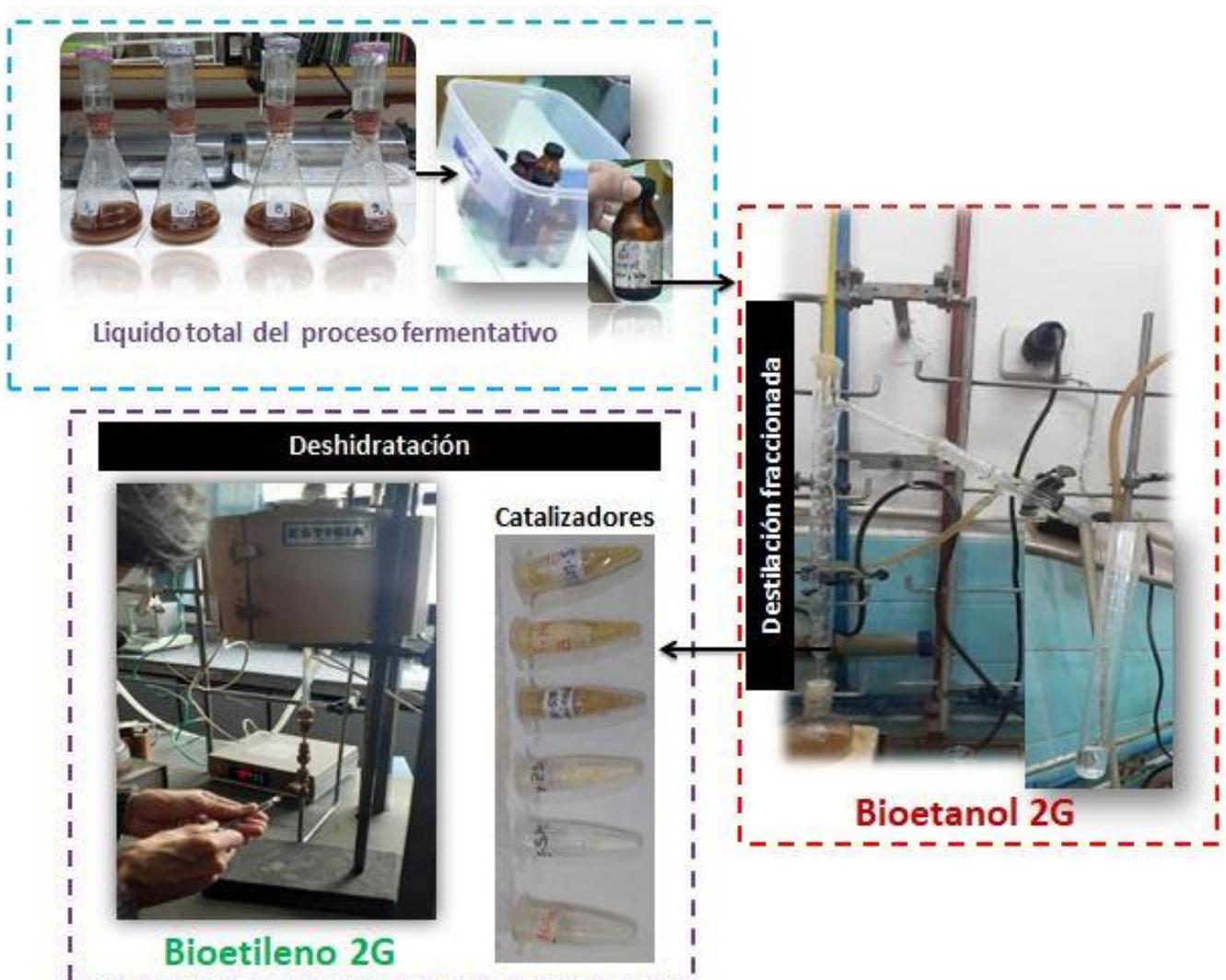


Figura 31. Esquema de la producción del bioetileno de 2G

5.2 Materiales y métodos

El bioetanol producido en la estrategia SSF se recuperó por destilación fraccionada como se muestra en la figura 32.

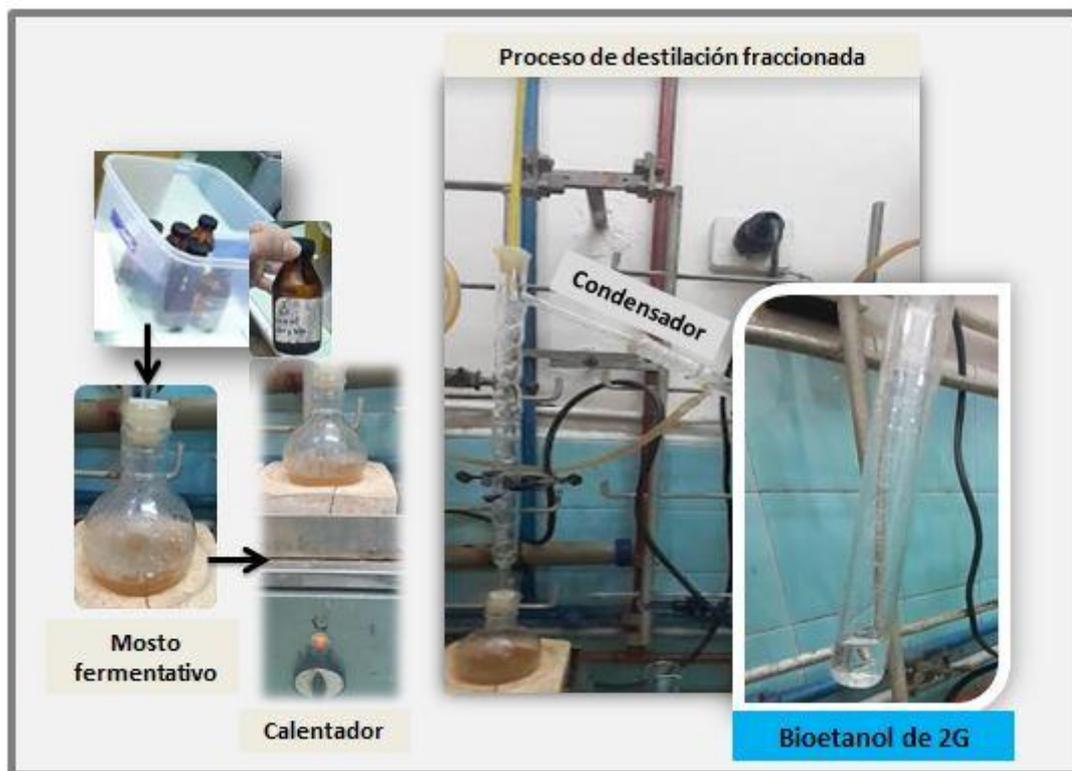


Figura 32. Proceso de recuperación del bioetanol de 2G por destilación fraccionada

Para el proceso de deshidratación, se empleó el bioetanol de 2G y etanol comercial (como referencia) con catalizadores comerciales $Y-Al_2O_3$, zeolitas ZSM-5 (SiO_2/Al_2O_3) = 23 molar, YCBV-500 (SiO_2/Al_2O_3) = 5,2 molar como se observa en la figura 33. También se usaron zeolitas protonadas (HZSM-5 y HYCBV-500) con un tratamiento de calcinación y las siguientes condiciones de operación: $T=550\text{ }^{\circ}C$, $t=2h$, $2\text{ }^{\circ}C/min$. La dosificación del catalizador fueron: 400 mg, 200 mg y 100 mg. El objetivo del tratamiento de calcinación en las zeolitas es transformar la zeolita comercial que presenta amonio ($NH_4-ZSM-5$) en forma de protón mediante una calcinación a $550\text{ }^{\circ}C$ durante 2 horas, alcanzando una rampa de calentamiento de $2\text{ }^{\circ}C/min$, de la misma manera se realizó con la zeolita YCBV-500 (Vie and Spangsberg 2011).



Figura 33. Catalizadores empleados en el proceso de deshidratación

5.2.1 Caracterización de los catalizadores

5.2.1.1 Técnica de desorción de piridina por FTIR para determinación de sitios ácidos

Para la caracterización de los catalizadores, zeolitas (YCBV-500, y ZSM-5) y las zeolitas protonadas (HZSM-5 y HYCBV-500), se empleó la técnica de desorción de piridina por FTIR en un espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet IS10, con el fin de evaluar la determinación de sitios activos. Para ello, se prepararon pastillas autoconsistentes del material puro entre 14 y 59 mg. Luego, se colocaron dentro de una celda con ventanas de CaF_2 conectada a una línea de vacío y se mantiene a $400\text{ }^\circ\text{C}$ y 10^{-4} Torr por 6 h. Se procede a realizar lecturas de fondos (desorción de agua). Posteriormente, las pastillas se ponen en contacto con piridina (3 Torr) a temperatura ambiente durante 12 horas. Finalizado ese periodo, se desorbe la molécula sonda durante 1 h a 10^{-4} Torr a 250, 350 y $400\text{ }^\circ\text{C}$, realizándose las lecturas en cada caso. Los sitios ácidos fueron identificados teniendo en cuenta los picos (alrededor de 1545 para Brønsted y 1455 para Lewis). Para la cuantificación se utilizó el área una vez restados los fondos.

Cuando la molécula de piridina (Py) adsorbida interacciona con un centro ácido Brønsted (B) se produce la protonación de la base, dando lugar al catión piridinio (PyH^+), esta especie presenta una banda característica a 1550 cm^{-1} en el espectro FTIR. Mientras que, cuando la interacción tiene lugar en un centro ácido Lewis (L), la piridina queda coordinada al

centro ácido por donar un par electrónico al átomo metálico (PyL), observándose en este caso una banda característica a 1450 cm^{-1} .

5.2.1.1 Sortometría de nitrógeno (método BET) para determinación de área superficial y geometría de poros

Para la caracterización de los catalizadores zeolitas (YCBV-500, y ZSM-5) y las zeolitas protonadas (HZSM-5 y HYCBV-500), se empleó Sortometría de nitrógeno mediante isothermas de (adsorción/desorción) por el método de BET para la determinación de propiedades texturales (área superficial y geometría de poro).

La sortometría de nitrógeno se realizó con un equipo Micromeritics ASAP 2020, en el Centro Científico Tecnológico (CCT) de Santa Fe. Previo a la adsorción, las muestras se evacuaron a 423 K y 10^{-5} Pa de vacío durante 8 h . Luego, se registraron las isothermas de adsorción-desorción a 77 K en una presión relativa oscila entre 10^{-3} y $0,975$. El volumen total de poros se midió según la regla de Gurvich en el $P/P^{\circ} = 0,975$, y el área superficial se estimó con el modelo BET.

5.2.2 Caracterización de bioetanol y productos de reacción

La cuantificación del etanol y de los productos de reacción (etileno y dimetileter) se realizó por cromatografía de gases empleando un Shimadzu GCMS QP5050A (figura 34), equipado con una columna capilar PE-Elite-Wax ($30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,5\text{ micrones}$) y un detector FID.



Figura 34. Cromatógrafo de gases (Shimadzu GCMS QP5050A) para cuantificar etanol y productos de reacción (etileno y dimetileter)

5.2.3 Proceso de deshidratación de bioetanol de 2G

Para la reacción de deshidratación de etanol (figura 35), se utilizó un reactor convencional de lecho fijo que consiste en un tubo de cuarzo de 6 mm de diámetro externo, provisto de un horno calefactor (marca Estigia), un controlador de temperatura (marca Ferca) y un sistema de toma de muestra gaseosa mediante un septum a la salida del mismo. El equipo consta de una alimentación de nitrógeno mediante una válvula on-off y una válvula reguladora de caudal (ambas marca Swagelock). El nitrógeno se hace burbujear en un reactor de vidrio (marca Buchiglass) conteniendo el etanol a una temperatura de 25 °C. La salida del mismo se acopla al reactor de lecho fijo mediante una conexión con un tubo de poliamida de 6 mm de diámetro externo. La reacción fue estudiada desde 150 °C y hasta 400 °C, con una masa de catalizador entre 100 mg y 400 mg y un caudal total entre 20 y 60 cm³/min.



Figura 35. Esquema del proceso de deshidratación de bioetanol para la producción de bioetileno

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Caracterización de los catalizadores

Para la caracterización de las zeolitas se empleó la técnica desorción de piridina por FTIR para determinar la cuantificación de sitios activos (Brönsted y Lewis) y la sortometría de nitrógeno (método BET) para determinación de área superficial y geometría de poros.

5.3.1.1 Técnica de desorción de piridina por FTIR para determinación de sitios ácidos

Las zeolitas son aluminosilicatos en los que la sustitución isomórfica de silicio (Si^{4+}) por aluminio (Al^{3+}) genera una carga negativa en la red cristalina. La carga negativa generada puede compensarse por un protón o por cationes metálicos u orgánicos. En el caso de que los cationes de compensación sean protones, se generan centros de tipo ácido Brönsted (Wright and Lozinska 2011). Los centros ácidos protónicos (H^+) se generan directamente por la calcinación de las zeolitas sintetizadas empleando agentes directores de estructura orgánicos. En este trabajo se emplearon zeolitas ZSM-5 ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 23$ molar, YCBV-500 ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 5,2$ molar y también se usaron zeolitas protonadas (HZSM-5 y HYCBV-500) con un tratamiento de calcinación con el fin de generar centros ácidos protónicos (H^+), cationes de tipo ácido Brönsted, empleando las siguientes condiciones de operación: $T=550\text{ }^\circ\text{C}$, $t=2\text{h}$, $2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

Para la técnica desorción de piridina por FTIR, se realizaron las mediciones sobre 4 muestras (ZSM-5, YCBV-500, HZSM-5 y HYCBV-500). En la tabla 11 se detalla la cuantificación de los sitios ácidos de Brönsted y Lewis expresados en unidades de mmol/g (mili mol de piridina por gramo de catalizador) a 250, 350 y 400 $^\circ\text{C}$. Las mediciones de cada ensayo se realizaron por duplicado.

Tabla 11. Propiedades ácidas de las muestras de zeolitas comerciales, antes y después del tratamiento de calcinación

Muestras	Acidez Brönsted (mmol Py g^{-1})			Acidez Lewis (mmol Py g^{-1})		
	250 $^\circ\text{C}$	350 $^\circ\text{C}$	400 $^\circ\text{C}$	250 $^\circ\text{C}$	350 $^\circ\text{C}$	400 $^\circ\text{C}$

YCBV-500	0,301	0,220	0,160	0,100	0,097	0,092
HYCBV-500	0,258	0,016	0,108	0,101	0,080	0,068
ZSM-5	0,545	0,386	0,323	0,013	0,008	0,008
HZSM-5	0,321	0,272	0,231	0,049	0,050	0,044

Los sitios ácidos fuertes de Brönsted y Lewis son los sitios que quedan a 400 °C, en particular, zeolitas originales tienen mayor cantidad de sitios ácidos Brönsted que Lewis. Los sitios ácidos de Brönsted juegan un papel vital para la activación del bioetanol a hidrocarburos (en particular bioetileno), ya que son considerados como los principales sitios activos requeridos para la reacción de deshidratación (Madeira *et al.* 2009). En la tabla 11 se observa que en las dos zeolitas originales (ZSM-5 y YCBV-500), hay mayores sitios ácidos de Brönsted que Lewis a 400 °C, favoreciendo la reacción. Denise Fan *et al.* (Fan *et al.* 2013b) comentan que a 300 °C, la HZSM-5 puede alcanzar un nivel de conversión de etanol del 98 % y una selectividad de etileno del 95%. La principal desventaja de la HZSM-5 es su acidez, que reduce su estabilidad y resistencia a la coquización (Fan *et al.* 2013b). Si observamos la tabla 11, tanto para la zeolita YCBV-500 como la ZSM-5, el tratamiento de calcinación aplicado en ambas (HYCBV-500 y HZSM-5) permitió disminuir sus propiedades ácidas, favoreciendo su estabilidad para lograr mayor conversión de etanol y rendimiento de etileno, obteniendo 96,6% rendimiento de etileno y 96,6% de conversión de etanol a 290 °C empleando HZSM-5, en comparación de la zeolita ZSM-5 sin calcinar, que obtuvo un 95,62% de rendimiento de etileno y un 95,6% de conversión de etanol pero a una temperatura de 420 °C. Lo mismo ocurrió con zeolita HYCBV-500 tratada, que arrojó un 97,70% rendimiento de etileno y un 96,66% de conversión de etanol a 440 °C, en comparación con la zeolita YCBV-500 sin calcinar, que presentó un 95,7% de rendimiento de etileno y un 95,7% de conversión de etanol a 470 °C, quedando demostrado que el tratamiento de calcinación favoreció la deshidratación de etanol empleando menores temperaturas de reacción. Otros autores como Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2008) y Ramesh *et al.* (Ramesh *et al.* 2010) encontraron como solución que la modificación con fósforo en la zeolita HZSM-5 permite reducir la acidez, obteniendo una alta selectividad de etileno (99,8%), al mismo tiempo que aumentaba la capacidad antioquizante. Estos resultados fueron compensados con la temperatura de reacción, ya que eran necesarias temperaturas de 300 °C o superiores. La modificación del lantano fue reportada por Mao *et al.* (Le Van Mao *et al.* 1989) y Ouyang *et al.* (Ouyang *et al.* 2009) (2009) para mejorar la capacidad catalítica a bajas

temperaturas. Así, Zhan et al. (Hu et al. 2010) investigaron las propiedades de la HZSM-5 modificada con lantano-fósforo. La zeolita HZSM-5 comercial se impregnó con H_3PO_4 y $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, se agitó y evaporó, luego se secó y calcinó para producir La-P-HZSM-5 de diferentes composiciones. La más favorable de las composiciones fue 0,5% La-2 % P-HZSM-5, que alcanzó una selectividad de etileno del 99,9% con una conversión de etanol del 100% a 240 °C.

Otro factor importante a tener en cuenta en las zeolitas es la relación $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$, cuanto mayor sea la relación $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$, menor número de centros ácidos Brönsted tendrá la red, pero su fortaleza ácida será mayor por el efecto de aislamiento de los grupos AlO_4^- (Franco 2015). Esto se ve reflejado en ambas zeolitas. Si observamos la zeolita original (YCBV-500), frente a la zeolita protonada (HYCBV-500), hay menor número de centros ácidos Brönsted en la muestra protonada frente a la muestra original (0,108 y 0,160, respectivamente), favoreciendo la conversión de bioetanol a bioetileno. De la misma manera ocurre con la zeolita original ZSM-5 y la muestra protonada (HZSM-5), (0,323 y 0,232), respectivamente.

Otro factor importante en las zeolitas es la adsorción selectiva molecular que puede realizarse dependiendo de la hidrofobicidad/hidrofilicidad. Generalmente, las zeolitas con baja relación $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ son más hidrófilas por la interacción dipolar con los campos electrostáticos localizados entre los cationes de compensación de carga y las cargas negativas en la red (Rodríguez 2014). En el caso contrario, las zeolitas con mayor relación $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$, incluso puramente silíceas, presentan mayor hidrofobicidad. Por esta razón, la zeolita ZSM-5 ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 23$ molar) presenta mejores conversiones de bioetanol y selectividad de bioetileno, ya que presenta mayor capacidad de repeler las moléculas de agua, permitiendo una deshidratación más rápida del bioetanol frente a la zeolita YCBV-500 ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 5,2$ molar).

El mecanismo de deshidratación de etanol para formar etileno mediante un catalizador ácido se representa como la figura 36. La zeolita ácida primero protona el grupo hidroxilo, que sale como una molécula de agua. La base conjugada de la misma luego desprotona al grupo metilo y el hidrocarburo se reorganiza en etileno. La reacción es endotérmica y, debido a esto, la temperatura de reacción óptima es bastante alta, entre 300 y 500 °C. El mantenimiento de la temperatura de reacción constituye gran parte del costo de energía en la aplicación industrial de la reacción, ya que las reacciones competitivas en éter dietílico o acetaldehído se favorecen fuera del rango de temperatura y, por lo tanto, disminuyen el rendimiento de etileno, esta disminución se puede observar en las figuras 42, 43, 44 y 45, a temperatura menores a 300 °C. El etanol se deshidrata en el intermediario dimetil éter (DME) y luego este se deshidrata hasta formar el producto objetivo (etileno).

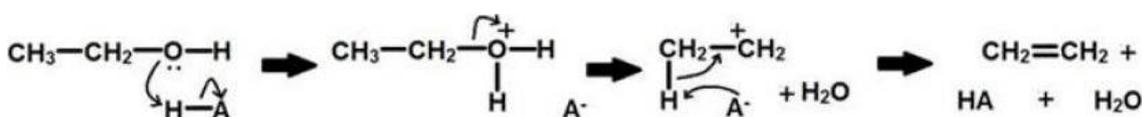


Figura 36. Mecanismo de deshidratación de etanol a etileno mediante una zeolita ácida

5.3.1.2 Sortimetría de nitrógeno (método BET) para determinación de área superficial y geometría de poros

Con esta herramienta de caracterización podemos determinar las isothermas de adsorción, que se definen como la relación general entre la cantidad de gas adsorbido por un sólido a temperatura constante, como función de la presión del gas. También pueden definirse como la relación en equilibrio entre la cantidad de gas adsorbido y la presión del gas a temperatura constante. Mediante el estudio de isothermas de adsorción y desorción de N_2 de la zeolita original (YCBV-500 y ZSM-5) y las muestras protonadas (HYCBV-500 y HZSM-5), se pudo observar que corresponden a isothermas del tipo I, características de estructuras microporosas (figuras 37 y 38, respectivamente). Este tipo de isothermas se obtiene cuando $p/p_0 < 1$ and $c > 1$ en la ecuación BET, donde p/p_0 es el valor de presión parcial y c es la constante BET, la cual está relacionada con la energía de adsorción de la primera monocapa y varía de sólido a sólido (van Koningsveld *et al.* 1990). Los materiales microporosos, con diámetros de poro menores a 2 nm, presentan este tipo de isoterma.

Es importante tener en cuenta la importancia de la estructura de poros y el área superficial, ya que los poros suficientemente anchos permiten el pasaje de reactivos y productos, y a su vez, la velocidad de conversión de reactivos es directamente proporcional al área superficial específica. Se puede observar en la tabla 12 que tanto el área superficial BET, la superficie externa, el área de microporo, como su volumen, son valores muy similares para la muestra de zeolita antes y luego de ser calcinada (YCBV-500 y HYCBV-500). Sin embargo, para la zeolita ZSM-5 original y la muestra protonada HZSM-5, hay un aumento en la superficie BET como en la superficie externa, la zeolita original (ZSM-5) presenta $225,8512 \text{ m}^2/\text{g}$ y con el tratamiento de calcinación (HZSM-5), aumentó la superficie de BET a $245,2207 \text{ m}^2/\text{g}$. Lo mismo ocurre con la superficie externa, la muestra original (ZSM-5) presenta $37,8429 \text{ m}^2/\text{g}$ y la muestra con el tratamiento de calcinación (HZSM-5) presenta un aumento a $74,1937 \text{ m}^2/\text{g}$, esto nos da un indicio que el tratamiento empleado para protonar a la zeolita contribuyó a un aumento del área superficial del catalizador y del área de la superficie externa, lo que se ve reflejado en los resultados del rendimiento de bioetileno: con la zeolita HZSM-5, la conversión de etanol alcanzó un 96,6%, selectividad de etileno 100% a una temperatura 290 °C), mientras que con la zeolita original ZSM-5, la conversión de etanol es de 95,6%, selectividad de etileno 100% a una temperatura de 420 °C, quedando demostrado que el tratamiento de calcinación favoreció la reacción de deshidratación permitiendo una conversión más rápida de reactivo (etanol) a etileno empleando menor temperatura, con lo que implica a mayor escala de producción, una disminución en el costo del proceso.

Tabla 12. Propiedades físicas de las muestras de zeolitas comerciales antes y después del tratamiento de calcinación.

Muestra	S _{BET} (m ² /g)	S _{EXT} (m ² /g)	V _{MP} (cm ³ /g)	A _{MP} (m ² /g)
YCBV-500	381,2908	50,9945	0.2088	330,2963
HYCBV-500	374,1556	51,7829	0,2041	322,3728
ZSM-5	225,8512	37, 8429	0,1202	171,0270
HZSM-5	245,2207	74,1937	0,1126	188,0082

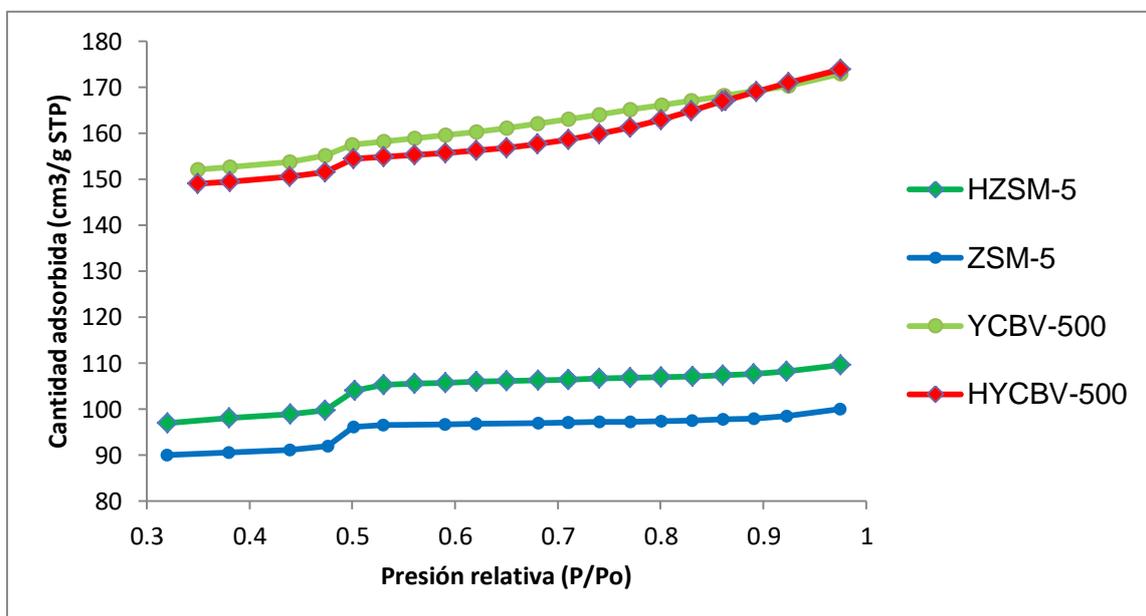


Figura 37. Isothermas de desorción de las muestras de zeolitas comerciales, antes y después del tratamiento de calcinación.

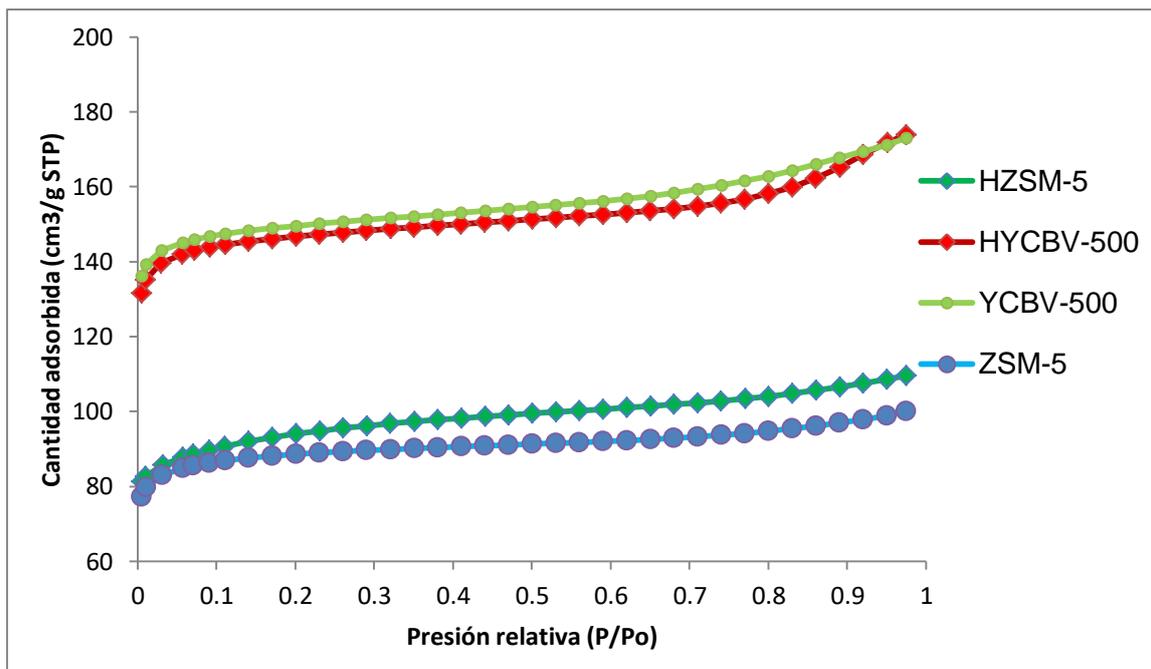


Figura 38. Isotermas de adsorción de las muestras de zeolitas comerciales, antes y después del tratamiento de calcinación.

5.3.2 Proceso de deshidratación. Caracterización de etanol (como referencia), bioetanol y productos de reacción

En la producción de etileno comercial y bioetileno de 2G, ocurre un proceso de deshidratación del etanol y el bioetanol de 2G mediante una absorción de energía, en donde se requieren altas temperaturas de reacción para obtener el producto objetivo (etileno y bioetileno) (Yakovleva *et al.* 2016a). Es muy importante tener en cuenta la temperatura para obtener selectivamente el producto porque el etileno es generado como producto principal a temperaturas cercanas a 300 °C, pero el éter se obtiene como subproducto principal por debajo de 300 °C, con cantidades relativamente pequeñas de acetaldehído (Zhang and Yu 2013), además de ciertos hidrocarburos como etano, butileno, metano, propileno y gases como CO₂, CO y H₂ (Galvita V. V. *et al.* 2001). No obstante, la mayor parte del mecanismo de la reacción de deshidratación del etanol considera principalmente sólo la formación de etileno y éter.

La tabla 13 proporciona las conversiones de etanol comercial (usado como referencia) y selectividades de etileno con una dosificación de 400 mg para cada catalizador empleado.

Tabla 13. Resultados conversión de etanol y selectividad de etileno

R _{ETILENO} (%)	X (%)	T _{REACCIÓN} (°C)
--------------------------	-------	----------------------------

Catalizadores			
Y-Al ₂ O ₃	98,5	98,5	395
YCBV-500	95,7	95,7	470
ZSM-5	95,6	95,6	420
HZSM-5	96,6	96,6	290
HYCBV-500	97,7	96,7	440

X(%): % Conversión de etanol

Según Madeira y colaboradores (Madeira *et al.* 2009), la transformación del etanol en compuestos de hidrocarburos requiere sitios ácidos de Brønsted como los principales sitios activos en los catalizadores de zeolita y que la transformación ocurra por etapas. El etanol primero se deshidrata para formar etileno directamente o DEE dependiendo de la fuerza de los sitios ácidos de Brønsted. La formación de etileno requiere sitios ácidos más fuertes que la formación de DEE. Sin embargo, Nguyen y Le Van Mao (Nguyen and Le Van Mao 1990) demostraron que la temperatura de reacción también juega un papel importante. Según estos autores, a temperaturas de 250 a 270 °C, el etanol sufre una transformación inicial en DEE seguida de una deshidratación posterior en etileno. Si observamos las gráficas 39, 40, 41, para la producción de etileno empleando Y-Al₂O₃, ZSM-5, HZSM-5, YCBV-500, HYCBV-500, a temperatura menores a 300 °C, el etanol se deshidrata en el intermediario DEE y luego este se deshidrata hasta formar el producto objetivo (etileno).

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten confirmar las conclusiones bibliográficas, denotando que la temperatura juega un papel importante en la reacción, como así también la relación SiO₂/Al₂O₃. Cuanto mayor es la relación zeolita HZSM-5 (SiO₂/Al₂O₃ = 23 molar) frente a HYCBV-500 (SiO₂/Al₂O₃ =5,2 molar), mayor es la fortaleza ácida por efecto del aislamiento de los grupos AlO₄⁻, y por lo tanto, se favorece la conversión de etanol a menor temperatura de reacción, dando 96,6% de conversión de etanol y 96,6% de rendimiento de etileno a una temperatura de reacción de 290 °C con la zeolita HZSM-5. Para la zeolita HYCBV-500, la conversión de etanol es de 96,7% con 97,7 % de rendimiento de etileno, pero a una temperatura cercana a los 400 °C. Otro factor importante que favorece la reacción de deshidratación es la relación de hidrofobicidad en las zeolitas. La zeolita original ZSM-5 y la muestra tratada, que presentan mayor relación SiO₂/Al₂O₃, son más hidrofóbicas, permitiendo una deshidratación más rápida del bioetanol, con lo que se puede observar en la tabla de resultados. El tratamiento de calcinación mejoró notablemente el área superficial y el tamaño del microporo. El área superficial de la zeolita original (ZSM-5 es de 225,8512 m²/g y el tamaño de microporo es de 171,0270 m²/g, mientras que para la zeolita protonada (HZSM-5) aumentó a 245,2207 m²/g y 188,0082 m²/g, respectivamente.

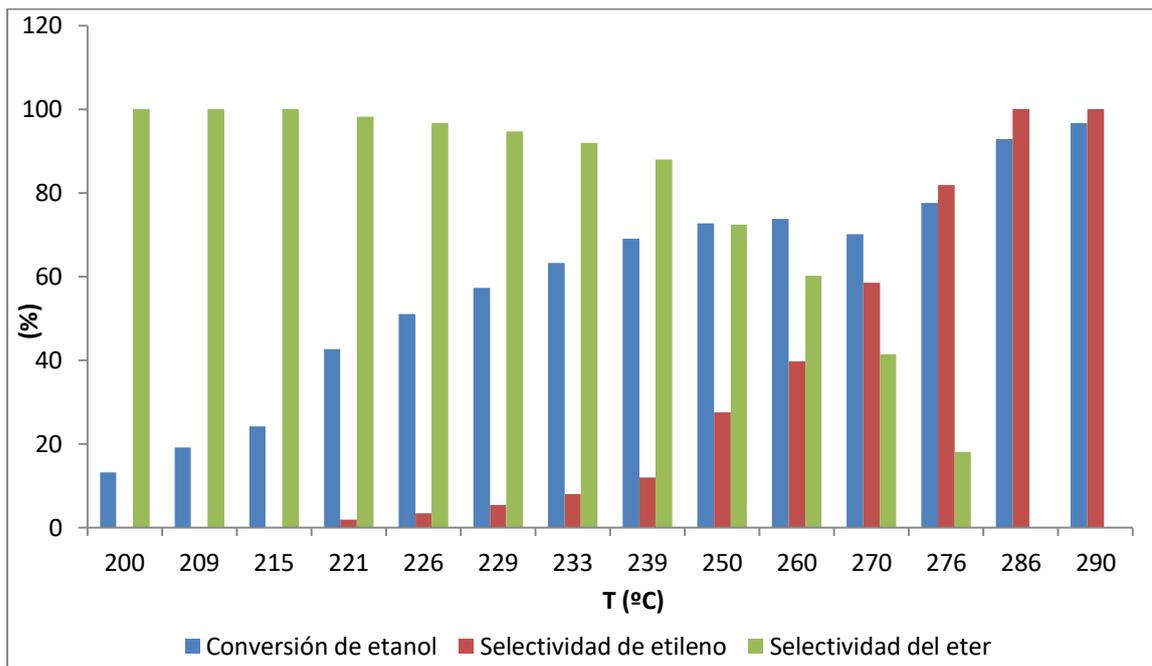


Figura 39. Mecanismo de deshidratación de etanol empleando HZSM-5 como catalizador.

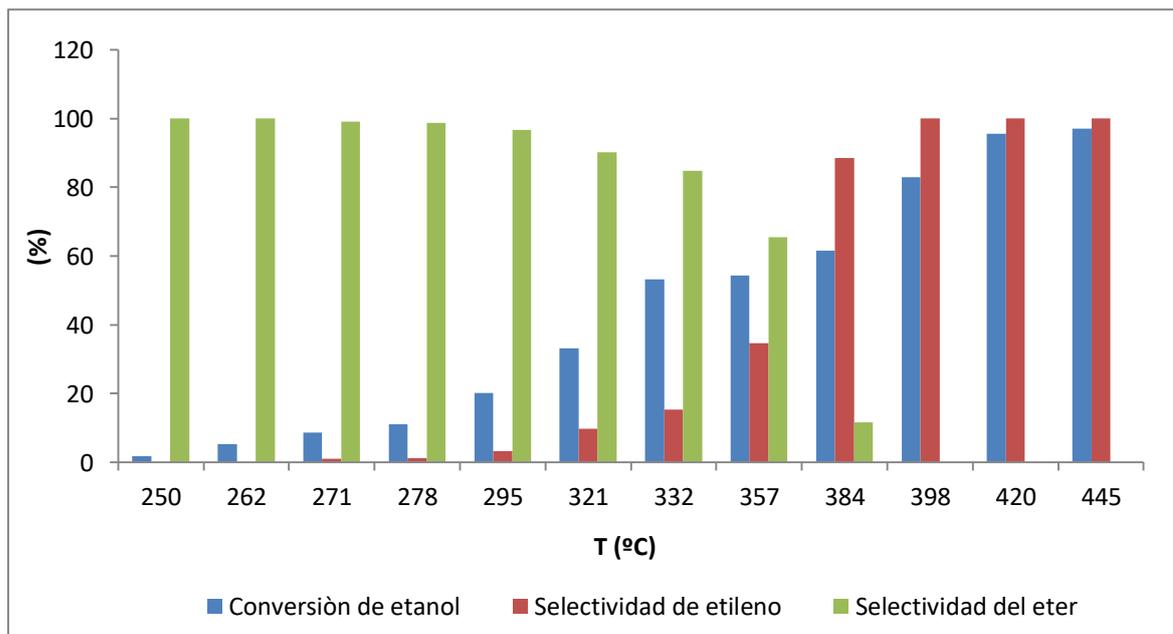


Figura 40. Mecanismo de deshidratación de etanol empleando ZSM-5 como catalizador

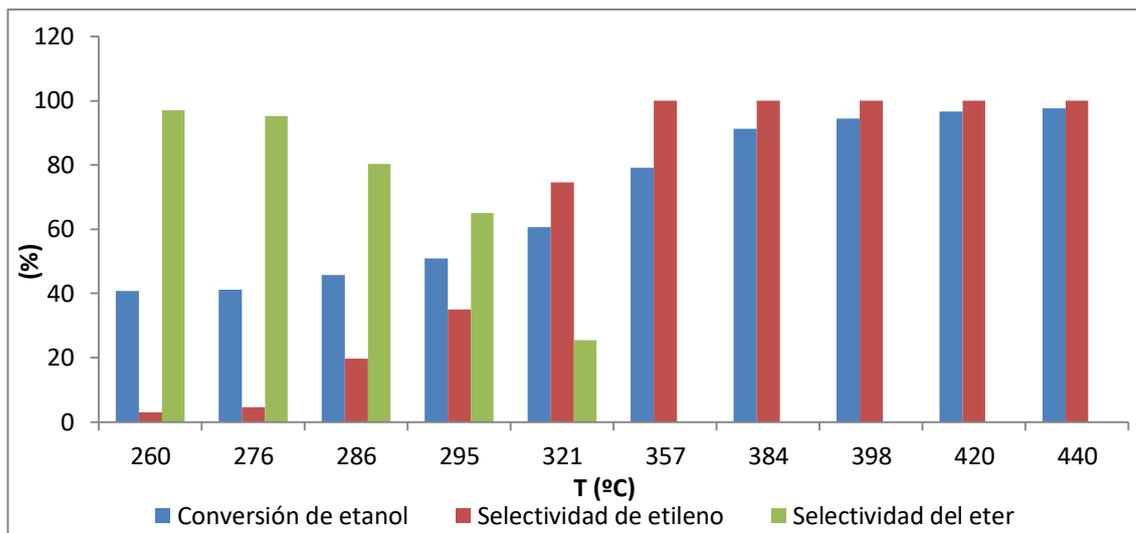


Figura 41. Mecanismo de deshidratación de etanol empleando HYCBV-5 como catalizador

Es importante destacar que la zeolita protonada HZSM-5 obtuvo una conversión de bioetanol del 96,6% y 96,6% de rendimiento de etileno a la temperatura más baja (290 °C), que los otros catalizadores empleados para la reacción y esto permite comprobar que el factor de hidrofobicidad, a relación $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$, la fortaleza ácida en Brönsted y la temperatura de reacción juegan un papel importante para favorecer la reacción de deshidratación.

El resultado obtenido con la menor temperatura de reacción empleando zeolita protonada HZSM-5, es comparable con los resultados obtenidos por Inaba *et al.* (Inaba *et al.* 2006), las zeolitas con alta acidez son más selectivas a la formación de hidrocarburos superiores, mientras que las zeolitas de baja acidez son muy selectivo al etileno. Los autores emplearon dos zeolitas H-ZSM-5 con relaciones $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ de 29 y 40 para la conversión de etanol a 400 °C utilizando 0,4 g de carga de catalizador. El catalizador H-ZSM-5, menos ácido ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 40$), produjo la mayor conversión de etanol frente a la del catalizador H-ZSM-5 más ácido ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 29$), (96,4% y 92,2%, respectivamente). Sin embargo, el primer catalizador fue principalmente selectivo para etileno (97,6%), produciendo solo 1,7% de olefinas C_3^+ .

5.3.2.1 Efecto de la masa de catalizador en la reacción de deshidratación de etanol

Para evaluar cómo influye la dosificación del catalizador en la conversión de etanol a etileno, se utilizó el catalizador que mejor resultado obtuvo a menor temperatura de reacción, variando en 100 mg, 200 mg y 400 mg de HZSM-5.

En la figura 42 se observan los resultados de la influencia en la conversión de etanol variando la dosificación de HZSM-5 y en la figura 43 los resultados de la influencia del rendimiento de etileno variando la dosificación de HZSM-5. Para una temperatura de 312 °C, utilizando 400 mg y 200 mg se obtiene la misma conversión de etanol (100%) y un rendimiento

de etileno de 100%, mientras que empleando 100 mg la conversión de etanol disminuyó rápidamente a 62,6% y también el rendimiento de etileno a 44,6%, quedando demostrado que la masa del catalizador influye el rendimiento de etileno cuando se emplean menos de 200 mg del mismo.

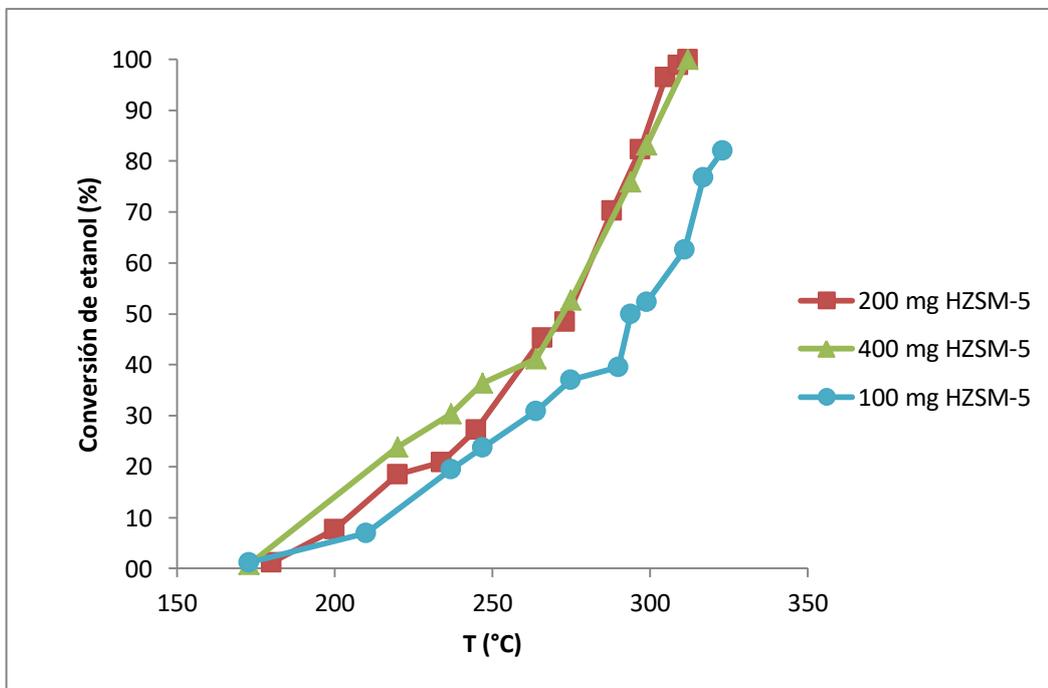


Figura 42. Influencia de la conversión de etanol variando la dosificación de HZSM-5

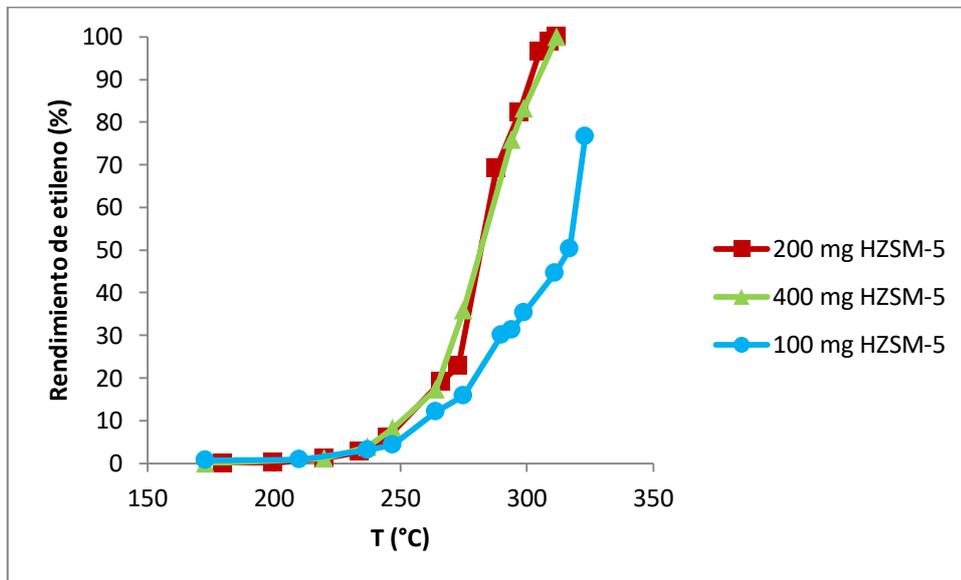


Figura 43. Influencia del rendimiento de etileno variando la dosificación de HZSM-5

5.3.2.2 Efecto de la concentración del reactivo en la obtención del producto objetivo

Para evaluar el rol de la concentración del reactivo en el mecanismo de deshidratación para la obtención de etileno se utilizó el catalizador (HZSM-5), con el que mejor resultado se obtuvo a menor temperatura de reacción,, empleando etanol al 96% y al 53 % con una dosificación de catalizador de 400 mg y 200 mg.

En la figura 44 se observan los resultados de la influencia en la conversión de etanol variando la concentración del mismo en 96% y 53%, empleando una dosificación de HZSM-5 de 400 mg y 200 mg y en la figura 45, los resultados de la influencia del rendimiento de etileno variando la concentración de etanol en 96% y 53%, empleando dosificación de HZSM-5 de 400 mg y 200 mg.

Para una concentración del 96% de etanol en el proceso de deshidratación, se obtiene aproximadamente la misma conversión de etanol empleando 400 mg y 200 mg de HZSM-5, es decir 100%, de conversión de etanol y un rendimiento de etileno del 100% a 312 °C empleando 400 mg y 200 mg de HZSM-5. Sin embargo, si comparamos el etanol al 53% en el proceso de deshidratación, se obtiene una conversión del 82,2% y un 81,7% de rendimiento de etileno a 295 °C empleando 400 mg de HZSM-5, mientras que para una dosificación de 200 mg de HZSM-5, se logra 58,9% de conversión de etanol y 51,9 % de rendimiento de etileno a 298 °C. Con 200 mg de HZSM-5 y 53% de concentración de etanol inicial, se logra un 91,7 % de conversión de etanol y 91,9% de rendimiento de etileno recién a una temperatura cercana a los 320 °C. Es decir, a menor dosificación del catalizador y menor concentración de reactivo, la conversión de etanol disminuye puesto que requiere mayor temperatura para que se pueda eliminar por completo las moléculas de agua iniciales en el etanol,

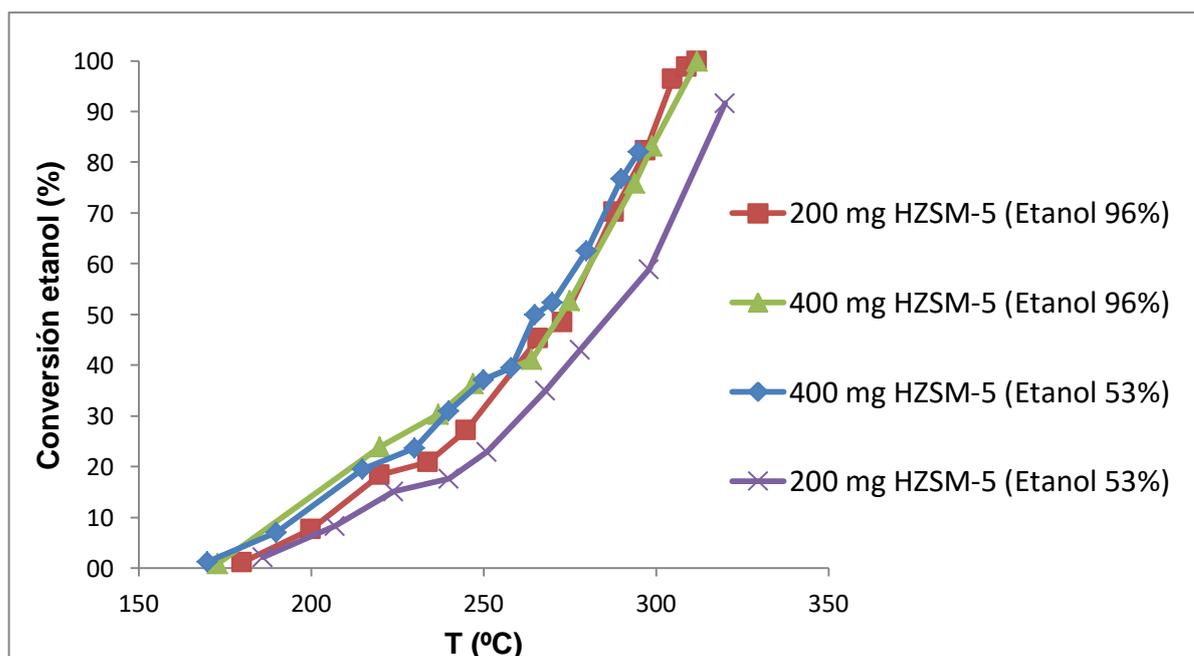


Figura 44. Conversión de etanol a diferentes concentraciones

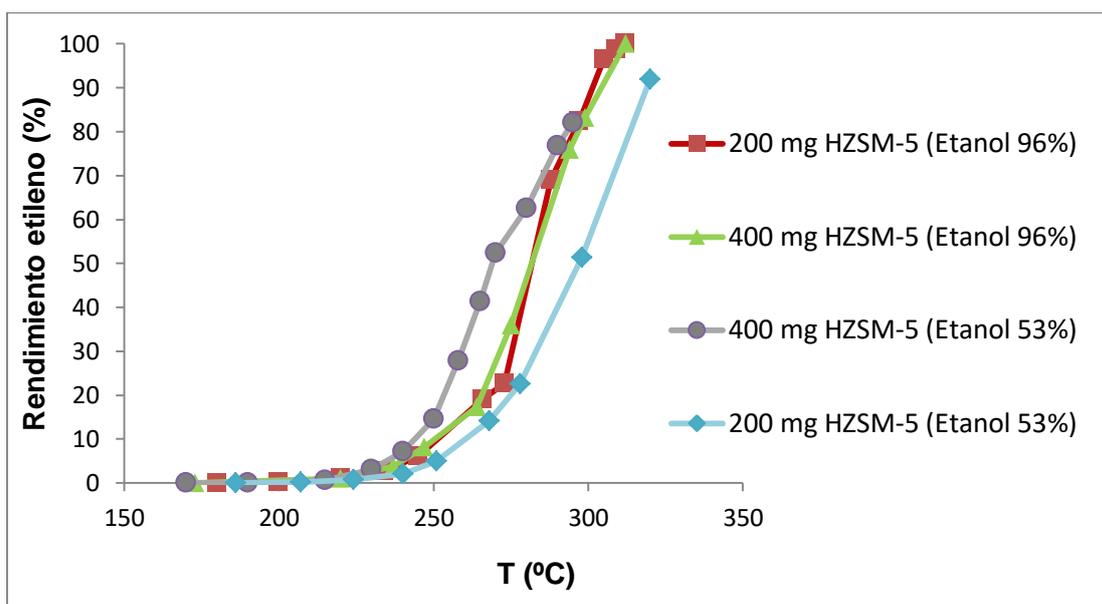


Figura 45. Rendimiento de etileno variando la concentración de etanol

En la figura 46 se observa el rendimiento de bioetileno y en la figura 47 la conversión del bioetanol empleando las zeolitas protonadas (HYCBV-500 y HZSM-5). concluirse observa claramente que con la zeolita HZSM-5 obtiene un 94,6% de rendimiento de bioetileno a una temperatura de 372 °C, mientras que al emplear la zeolita HYCBV-500 se obtiene un 85,5% de rendimiento de bioetileno a una temperatura de 473 °C, quedando demostrado que la zeolita HZSM-5 es el mejor catalizador empleado en estas experiencias para el proceso de deshidratación de bioetanol, porque a menor temperatura de reacción, logra obtener alta conversión de bioetanol y selectividad de bioetileno.

Si comparamos la deshidratación de etanol comercial empleando HZSM-5 con una dosificación de 400 mg a 290 °C, se obtiene un 76,8% de rendimiento de etileno, mientras que para la deshidratación de bioetanol empleando las mismas condiciones de dosificación de catalizador y temperatura de reacción, se logra un 75,8% de rendimiento de bioetileno, quedando demostrado que la concentración a la que se encuentra el reactivo influye en el rendimiento del producto objetivo, porque se requiere una mayor temperatura de reacción para eliminar las moléculas de agua, lo que implica esta cuestión a mayor escala de producción, un aumento en el costo del proceso.

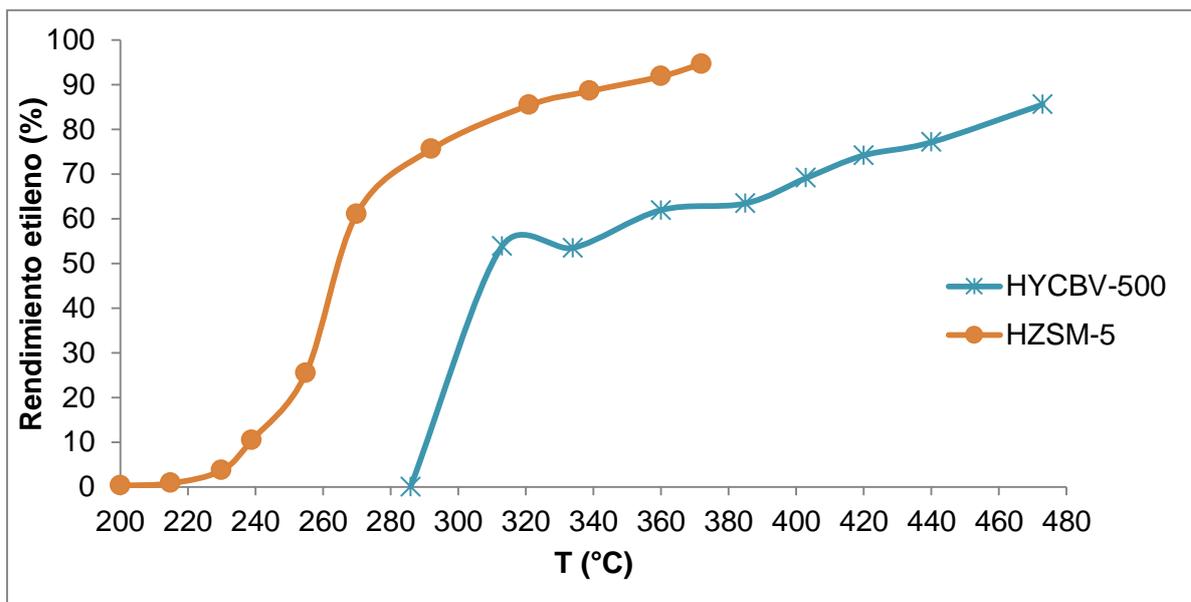


Figura 46. Rendimiento de bioetileno empleando las zeolitas protonadas con una dosificación de 400 mg

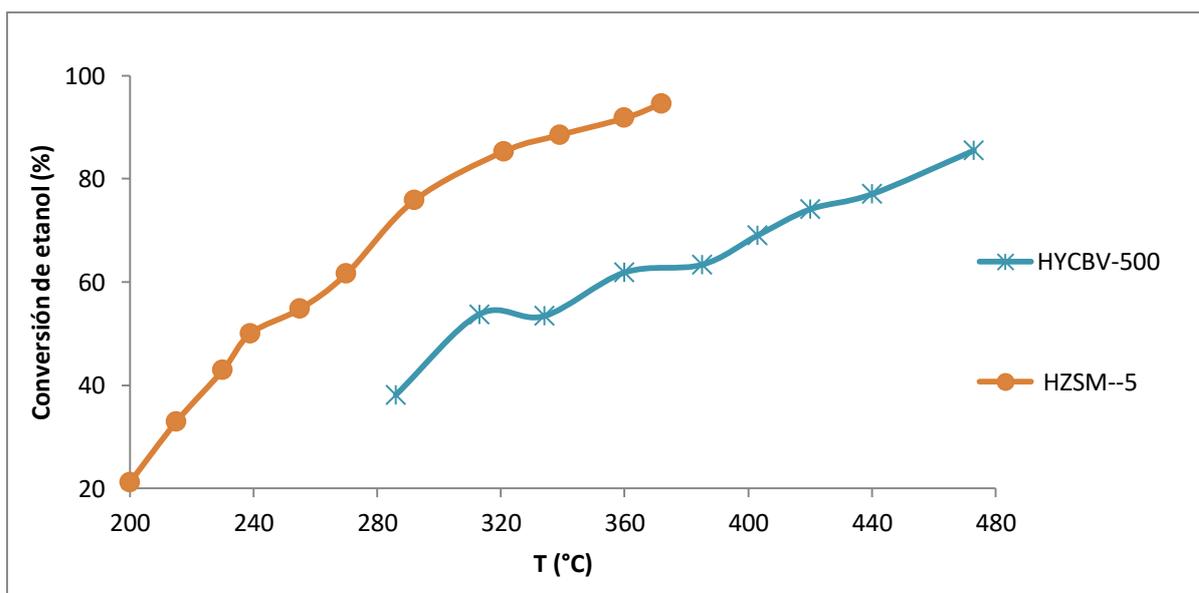


Figura 47. Conversión de bioetanol empleando las zeolitas protonadas con una dosificación de 400 mg

5.4 Conclusión

En el proceso para la producción de bioetileno a partir de aserrín de pino, se realizaron experiencias con etanol comercial como referencia.

En el proceso de deshidratación con etanol comercial, el catalizador que obtuvo mayor selectividad de etileno y conversión de etanol a menor temperatura es el catalizador

protonado HZSM-5, a $T = 295\text{ }^{\circ}\text{C}$, se obtuvo un 96,6% de conversión de etanol y 100% de selectividad de etileno.

Para las experiencias de producción de etileno, (empleando etanol comercial al 96%) evaluando la dosificación de catalizador, se utilizó el catalizador protonado (HZSM-5) a 400mg, 200mg y 100 mg. Como resultado, se obtuvo que a una temperatura de $312\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando 400 mg y 200 mg, se obtiene la misma conversión de etanol (100%) y un rendimiento de etileno de 100%, mientras que empleando una dosificación de 100 mg de catalizador, la conversión de etanol disminuyó rápidamente a 62,6% y el rendimiento de etileno a 44,6%, quedando demostrado que la masa del catalizador influye en el rendimiento de etileno cuando se emplea menos de 200 mg del mismo.

De los resultados obtenidos para la producción de etileno empleando etanol comercial y bioetanol de 2G, es evidente que la cantidad de agua que contiene el etanol de entrada afecta notoriamente el mecanismo de deshidratación, requiriendo mayor temperatura para lograr mayores conversiones de etanol y selectividad de etileno. Con etanol comercial a una concentración del 96%, se obtiene aproximadamente la misma conversión de etanol empleando 400 mg y 200 mg de HZSM-5, es decir 100% de conversión de etanol y un rendimiento de etileno del 100% a $312\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, para una concentración del 53% de etanol en el proceso de deshidratación, empleando 400 mg de HZSM-5, se obtiene una conversión del 82,2% de etanol y un 81,7% de rendimiento de etileno a $295\text{ }^{\circ}\text{C}$ y para una dosificación de 200 mg de HZSM-5 (etanol 53%), se logra 58,9% de conversión de etanol y 51,9 % de rendimiento de etileno a $298\text{ }^{\circ}\text{C}$, quedando demostrado que a menor dosificación del catalizador y teniendo menor concentración de reactivo, la conversión de etanol disminuye, puesto que requiere mayor temperatura para que se puedan eliminar por completo las moléculas de agua iniciales presentes en el etanol. Es decir, con 200 mg de HZSM-5 y 53% de concentración de etanol inicial, se logra un 91,7% de conversión de etanol y 91,9% de rendimiento de etileno recién a una temperatura cercana a los $320\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Usando el catalizador protonado HZSM-5 se logró 94,6 % de conversión de etanol y 100% de selectividad de etileno a $372\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con el catalizador HYCBV-500, 85,5% de conversión y 100% de selectividad de etileno a $473\text{ }^{\circ}\text{C}$.

CAPITULO 6. CONCLUSIÓN GENERAL

La sacarificación y fermentación simultánea ($Y_{P/T}$ (%) = 100) es más eficiente que el proceso separado $Y_{P/T}$ (%) = 84,8, y que la pulpa con el menor contenido de lignina produce la máxima conversión de glucosa en etanol.

En la estrategia SSF, en las primeras horas del proceso (30 FPU g^{-1} glucanos, 39 °C, 24 h, modelo I), la enzima requiere de sus condiciones óptimas para despolimerizar la celulosa en monómeros de glucosa lo más rápido posible para que la levadura pueda convertirla en moléculas de etanol. Por el contrario, a tiempos largos (30 FPU g^{-1} glucanos, 35 °C, 72 h, modelo II), tanto la enzima como la levadura no requieren condiciones de temperatura óptimas para llevar a cabo su función. Sin embargo, la carga enzimática máxima es necesaria para maximizar la despolimerización de la celulosa en monómeros de glucosa, con el mejor rendimiento a las 72 h de reacción.

En la deshidratación de etanol con catalizadores comerciales $Y-Al_2O_3$, zeolitas ZSM-5 (SiO_2/Al_2O_3) = 23 molar, YCBV-500 (SiO_2/Al_2O_3) = 5,2 molar y zeolitas protonadas (HZSM-5 y HYCBV-500), la zeolita protonada HZSM-5 obtuvo mayor conversión de etanol (96,6%) y selectividad de etileno (100%) a menor temperatura 286 °C. Además, con una alta concentración de etanol (96%), y una dosificación de catalizador menor a 200 mg, el rendimiento de etileno disminuye notoriamente. Sin embargo, a menor concentración de etanol (53%), se requiere una dosificación de catalizador alta (400 mg), y mayor temperatura de reacción para eliminar las moléculas de agua.

Para la producción de bioetileno 2G, utilizando un proceso SSF, con 2% de celulosa hidrolizable se obtuvo un rendimiento de bioetanol del 81% y por mecanismo de deshidratación empleando catalizador protonado (HZSM-5) se logró 95% de conversión de bioetanol y 100 % selectividad de bioetileno a 372 °C.

CAPITULO 7. RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

- Ampliar la escala de bioetanol de 2G, evaluando los parámetros del proceso en una estrategia SSF.
- Emplear el complejo enzimático Cellic Ctec 3, en la estrategia SSF, con el fin de comparar con el complejo Cellic Ctec 2, la mayor producción de bioetanol.
- Analizar e investigar el reciclado del complejo enzimático, con el fin de reducir los costos del proceso.
- Analizar e investigar otros hongos levaduriformes que me permitan producir bioetanol a temperaturas cercanas a la temperatura óptima del proceso de hidrólisis enzimática para emplear la estrategia SSF.
- Analizar e investigar el proceso de purificación del bioetanol de 2G, con el fin de obtener una concentración mayor del mismo, cercana a la pureza del etanol comercial (96%).
- Analizar e investigar la impregnación de metales en catalizadores con el fin de aumentar la conversión de etanol a etileno empleando temperaturas menores a 300 °C.

BIBLIOGRAFÍA

- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., and Sebayang, A. H. (2016). "Second generation bioethanol production: A critical review," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Pergamon, 66, 631–653. DOI: 10.1016/J.RSER.2016.07.015
- Adney, B., and Baker, J. (2008). "Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 08/12/1996," (January).
- Æ, F. W. Æ. C. G., and Xu, C. Y. Æ. P. (2007). "Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation," 233–236. DOI: 10.1007/s10529-006-9220-6
- Argentina Innovadora (2020). Nucleo socio-productivo estrategico, Producción y procesamiento de recursos forestales. <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/recursos-forestales-doc.pdf>
- Albernas-carvajal, Y., Corsano, G., Garriga, L. M., and Herrero, R. S. (2015). "enzimática del bagazo pretratado," *AFINIDAD LXXII*, (570), 127–132.
- Alonso-Fariñas, B., Gallego-Schimd, A., Haro, P., and Azapagic, A. (2018). "Environmental assessment of thermo-chemical processes for bio-ethylene production in comparison with bio-chemical and fossil-based ethylene," *Journal of Cleaner Production*, 202, 817–829. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.08.147
- Alshammari, A., Kalevaru, V. N., Bagabas, A., and Martin, A. (2016). *Production of Ethylene and its Commercial Importance in the Global Market*. DOI: 10.4018/978-1-4666-9975-5.ch004
- Álvarez Godoy, E. (2017). "Extractivos del Árbol," *Ecoportal.net*, <https://www.ecoportal.net/temas-especiales/educacion-ambiental/extractivos_del_arbol/>.
- Araque, E., Parra, C., Freer, J., Contreras, D., Rodr, J., Mendonc, R., and Baeza, J. (2008). "Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* to ethanol," *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 214–219. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.08.006
- Araújo, W. A. (2016). "Ethanol Industry: Surpassing Uncertainties and Looking Forward," in: *Global Bioethanol: Evolution, Risks, and Uncertainties*, Elsevier Inc., 1–33. DOI: 10.1016/B978-0-12-803141-4.00001-0
- Area, M. C., and Park, S. W. (2017). "Bio-productos y bio-materiales a partir de la biorrefinería de residuos agro y forestoindustriales," in: *Panorama de la industria de celulosa y papel y materiales lignocelulósicos 2016*, M. C. Area and S. W. Park, eds., Universidad Nacional de Misiones (Unam), 120–151.
- Area, M. C., Vallejos, M. E., Bengoechea, D. I., Esteban, F. F., Paola, D. E., and Betiana, S. R. (2012a). *Biorrefinería a partir de residuos lignocelulósicos. Conversión de residuos a productos de alto valor.*, (M. C. Area and M. E. Vallejos, eds.), Editorial Académica Española.
- Area, M. C., Vallejos, M. E., Bengoechea, D. I., Esteban, F. F., Paola, D. E., and Betiana, S. R. (2012b). *Biorrefinería a partir de residuos lignocelulósicos. Conversión de residuos a productos de alto valor*, (M. C. Area and M. E. Vallejos, eds.), Editorial Académica Española.
- Arismendy, A. M., Felissia, F., Mendieta, C., Chamorro, E., and Area, M. C. (2020). "Improvement of bioethanol production from rice husks," *Cellulose Chemistry and*

Technology, 54(7–8), 689–698. DOI:
<https://doi.org/10.35812/CelluloseChemTechnol.2020.54.68>

- Arismendy Pabón, Ana María Felissia, F. E., Mendieta, C. M., Chamorro, E., and Area, M. C. (2020). "Improvement of bioethanol production from rice husks," *Cellulose Chemistry and Technology*, 54((7-8)), 689–698.
- Arora, A., Martin, E. M., Pelkki, M. H., and Carrier, D. J. (2013). "Effect of formic acid and furfural on the enzymatic hydrolysis of cellulose powder and dilute acid-pretreated poplar hydrolysates," *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 1(1), 23–28. DOI: 10.1021/sc3000702
- ASPAPEL. (2021). "La industria papelera mantiene el nivel de actividad y el empleo en el año de la pandemia y del periodo transitorio del Brexit | ," *Gabinete de Prensa ASPAPEL (Asociación Española de Fabricantes de Pasta, Papel y Cartón)*, 2020–2023.
- Azevedo, L., Posen, D., Griffin, M., and Matthews, S. (2015). "Changing the Renewable Fuel Standard to a Renewable Material Standard: Bioethylene Case Study," *Environmental Science & Technology*, 49, 93–102. DOI: 10.1021/es503521r
- Bahmani, M. A., Shafiei, M., and Karimi, K. (2016). "Anaerobic digestion as a pretreatment to enhance ethanol yield from lignocelluloses," *Process Biochemistry*, Elsevier Ltd, 51(9), 1–32. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.05.012
- Bajpai, P. (2016a). "Structure of Lignocellulosic Biomass," in: *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*, P. Bajpai, ed., Springer Singapore, 8–12. DOI: 10.1007/978-981-10-0687-6
- Bajpai, P. (2016b). "Structure of Lignocellulosic Biomass," in: *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*, P. Bajpai, ed., Springer, 7–12. DOI: 10.1007/978-981-10-0687-6
- Balat, M. (2011). "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway : A review," *Energy Conversion and Management*, Elsevier Ltd, 52(2), 858–875. DOI: 10.1016/j.enconman.2010.08.013
- Balat, M., and Balat, H. (2009). "Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel," *Applied Energy*, Elsevier Ltd, 86(11), 2273–2282. DOI: 10.1016/j.apenergy.2009.03.015
- Barboza- Devos, R. J., and Colla, L. M. (2022). "Bioresource Technology Reports Simultaneous saccharification and fermentation to obtain bioethanol : A bibliometric and systematic study," *Bioresource Technology Reports*, Elsevier Ltd, 17(August 2021), 100924.
- Becerra, J., Figueredo, M., and Cobo, M. (2017). "Thermodynamic and economic assessment of the production of light olefins from bioethanol," *Biochemical Pharmacology*, Elsevier B.V., 5(2), 1554–1564. DOI: 10.1016/j.jece.2017.02.035
- Brodin, M., Vallejos, M., Opedal, M. T., Area, M. C., and Chinga-Carrasco, G. (2017). "Lignocellulosics as sustainable resources for production of bioplastics – A review," *Journal of Cleaner Production*, 162, 646–664. DOI: doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.209
- Broeren, M. (2013). *Report-Production of Bio-ethylene (www.iea-etsap.org), IEA-ETSAP and IRENA Technology-Policy Brief 13*.
- Budzinski, M., and Nitzsche, R. (2016). "Comparative economic and environmental assessment of four beech wood based biorefinery concepts," *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 216, 613–621. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.05.111

- Cameron, G., Le, L., Nagulapalli, N., and Levine, J. (2012). "Process Design for the Production of Ethylene from Ethanol," *University of Pennsylvania Senior Design Report*, 39, 1–144.
- Capriles, C. H. De, Mata, S., and Middelveen, M. (1989). "Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years," *Mycopathologia*, 73–79.
- Cardona Alzate, C. A., and Sánchez Toro, O. J. (2006). "Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass," *Energy*, 31(13), 2111–2123. DOI: 10.1016/j.energy.2005.10.020
- Castillo, A., Castillo, A. A., Delgado, R. S., Hernández, E. G., Domínguez, M. M., Baeza, J. M. G., Cruz, A. A., García, R. C., Morales, A., Franco, P. J. H., Claverie, A. L., and Martínez, A. M. M. (2012). "Usos alternativos para aprovechar este subproducto agroindustrial , tal como la generación de fibras," 13(4), 140–150.
- Charles, N. (2002). "Oxygen Delignification as a Pretreatment for the Enzymatic," The university of British Columbia.
- Chemicals-Technology. (2020). "Greencol Taiwan Corporation Bio-MEG Plant, Taiwan."
- Chen, G., Li, S., Jiao, F., and Yuan, Q. (2007a). "Catalytic dehydration of bioethanol to ethylene over TiO₂/g-Al₂O₃ catalysts in microchannel reactors," *Catalysis Today*, 125(1–2), 111–119. DOI: 10.1016/j.cattod.2007.01.071
- Chen, G., Li, S., Jiao, F., and Yuan, Q. (2007b). "Catalytic dehydration of bioethanol to ethylene over TiO₂/γ-Al₂O₃ catalysts in microchannel reactors," *Catalysis Today*, 125(1–2), 111–119. DOI: 10.1016/j.cattod.2007.01.071
- Chen, L., Pelton, R. E. O., and Smith, T. M. (2016). "Comparative life cycle assessment of fossil and bio-based polyethylene terephthalate (PET) bottles," *Journal of Cleaner Production*, Elsevier Ltd, 137, 667–676. DOI: 10.1016/j.jclepro.2016.07.094
- Cheng, N., Koda, K., Tamai, Y., Yamamoto, Y., Takasuka, T. E., and Uraki, Y. (2017). "Optimization of simultaneous saccharification and fermentation conditions with amphipathic lignin derivatives for concentrated bioethanol production," *Bioresource Technology*, 232, 126–132. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.018
- Chu, Q., Li, X., Ma, B., Xu, Y., Ouyang, J., Zhu, J., Yu, S., and Yong, Q. (2012). "Bioethanol production: An integrated process of low substrate loading hydrolysis-high sugars liquid fermentation and solid state fermentation of enzymatic hydrolysis residue," *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 123, 699–702. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.118
- Cotana, F., Cavalaglio, G., Gelosia, M., Nicolini, A., Coccia, V., and Petrozzi, A. (2014). "Production of bioethanol in a second generation prototype from pine wood chips," *Energy Procedia*, Elsevier B.V., 45, 42–51. DOI: 10.1016/j.egypro.2014.01.006
- Das, P., Stoffel, R. B., Area, M. C., and Ragauskas, A. J. (2019). "Effects of one-step alkaline and two-step alkaline/dilute acid and alkaline/steam explosion pretreatments on the structure of isolated pine lignin," *Biomass and Bioenergy*, 120(January 2018), 350–358. DOI: 10.1016/j.biombioe.2018.11.029
- Donaldson, L. A., Wong, K. K. Y., and Mackie, K. L. (1988). "Ultrastructure of steam-exploded wood," *Wood Science and Technology*, 22, 103–114. DOI: 10.1007/BF00355846
- Dowe, N., and McMillan, J. (2008). *Technical report- SSF Experimental Protocols - Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation, (NREL/TP-510-42630), Laboratory Analytical Procedure (LAP)*.

- Endres, H.-J. (2017). "Bioplastics," in: *Biorefineries*, K. Wagemann and N. Tippkötter, eds., Springer Nature, Switzerland, 427–468. DOI: 10.1007/10_2016_75
- Erick, R., Gisela, M., Laura, T. L. P., and Triny, T. R. B. M. (2014). "Determinación de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica ; celulosa , hemicelulosa y lignina de la paja de trigo para su posterior pretratamiento biológico," (October).
- Fan, D., Dai, D. J., and Wu, H. S. (2013a). "Ethylene formation by catalytic dehydration of ethanol with industrial considerations," *Materials*, 6(1), 101–115. DOI: 10.3390/ma6010101
- Fan, D., Dai, D. J., and Wu, H. S. (2013b). "Ethylene formation by catalytic dehydration of ethanol with industrial considerations," *Materials*, 6(1), 101–115. DOI: 10.3390/ma6010101
- Feng, X., and Huang, R. Y. M. (1997). "Liquid Separation by Membrane Pervaporation: A Review," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 36(4), 1048–1066. DOI: 10.1021/ie960189g
- Flórez Pardo, L. M., López Galán, J. E., and Lozano Ramírez, T. (2018). "Saccharide Biomass for Biofuels, Biomaterials, and Chemicals," in: *Biomass and Green Chemistry*, S. Vaz Jr., ed., Springer International Publishing, Cham, 11–30. DOI: 10.1007/978-3-319-66736-2_2
- Franco, R. M. (2015). "Síntesis de nuevos tamices moleculares con diámetro de poro variable y aplicaciones catalíticas."
- Fu, N., Peiris, P., Markham, J., and Bavor, J. (2009). "A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures," *Enzyme and Microbial Technology*, 45(3), 210–217. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.04.006
- Galbe, M., Wallberg, O., and Zacchi, G. (2011). *Techno-Economic Aspects of Ethanol Production from Lignocellulosic Agricultural Crops and Residues, Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, Elsevier B.V. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00298-1
- Galvita V. V., Semin G. L., Belyaev V.D., Semikolenov V. A., P., T., and A., S. V. (2001). "Synthesis gas production by steam reforming of ethanol," *Applied Catalysis*, 220, 123–127. DOI: 10.1016/S0926-860X(01)00708-6
- Garbarino, G., Pampararo, G., Phung, T. K., Riani, P., and Busca, G. (2020). "Heterogeneous catalysis in (bio)ethanol conversion to chemicals and fuels: Thermodynamics, catalysis, reaction paths, mechanisms and product selectivities," *Energies*, 13(14), 1–20. DOI: 10.3390/en13143587
- García, R., Pizarro, C., Lavín, A. G., and Bueno, J. L. (2013). "Spanish biofuels heating value estimation . Part I : Ultimate analysis data," *Fuel*, (September). DOI: 10.1016/j.fuel.2013.08.048
- Ghose, T. K. (1987). "International Union of Pure Commission on Biotechnology, Measurement of Cellulase Activities," *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257–268. DOI: 10.1351/pac198759020257
- Global Market Insights. (2020). "Bio-Based Ethylene Market Size, Industry Analysis Report, Regional Outlook, Application Development Potential, Price Trend, Competitive Market Share & Forecast, 2020 - 2026."
- Gray, K. A., Zhao, L., and Emptage, M. (2006). "Bioethanol," *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(2), 141–146. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.02.035
- Gu, H., Zhang, J., and Bao, J. (2014). "Inhibitor analysis and adaptive evolution of

- Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues,” *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 157, 6–13. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.060
- Guarnizo, A., Martínez, P. N., and Sánchez, H. a. (2009). “Biomass and cellulose pretreatments for saccharification,” *Scientia et Technica*, 15(42), 284–289.
- Hackl, R., Harvey, S., Ng, D. K. S., Tan, R. R., Foo, D. C. Y., El-halwagi, M. M., and Wiley, J. (2015). “Design Strategies for Integration of Biorefinery Concepts at Existing Industrial Process Sites : Case Study of a Biorefinery Producing Ethylene from Lignocellulosic Feedstock as an Intermediate Platform for a Chemical Cluster,” in: *Process Design Strategies for Biomass Conversion Systems*, M. M. E.-H. Denny K. S. Ng, Raymond R. Tan, Dominic C. Y. Foo, ed., 77–102. DOI: 10.1002/9781118699140
- Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., and Zacchi, G. (2006). “Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today,” 24(12), 550–556. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.10.004
- Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., and Faaij, A. P. C. (2005). “Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term,” *Biomass and Bioenergy*, 28(4), 384–410. DOI: 10.1016/j.biombioe.2004.09.002
- Haro, P., Ollero, P., and Trippe, F. (2013). “Technoeconomic assessment of potential processes for bio-ethylene production,” *Fuel Processing Technology*, 114, 35–48. DOI: 10.1016/j.fuproc.2013.03.024
- Harsem, P., and Hackmann, M. (2013). *Report-Green building blocks for biobased plastics (www.fbr.wur.nl)*.
- Hu, Y., Zhan, N., Dou, C., Huang, H., Han, Y., Yu, D., and Hu, Y. (2010). “Selective dehydration of bio-ethanol to ethylene catalyzed by lanthanum-phosphorous-modified HZSM-5: Influence of the fusel,” *Biotechnology Journal*, 5(11), 1186–1191. DOI: 10.1002/biot.201000139
- Huang, F., and Ragauskas, A. J. (2012). “Dilute H₂SO₄ and SO₂ pretreatments of Loblolly pine wood residue for bioethanol production,” *Industrial Biotechnology*, 8, 22–30. DOI: 10.1089/ind.2011.0018
- Imlauer, C., Vergara, P., Area, M.C., Revilla, E., Felissia, F., Villar, J. C. (2019). “Fractionation of *Pinus radiata* wood by combination of steam explosion and organosolv delignification.” *Accepted. Maderas-Cienc Tecnol*, 3, 21.
- Imlauer, C. M., Area, M. C., Raffaelli, N., and Felissia, F. E. (2021). “Study on soda/ethanol delignification of pine sawdust for a biorefinery,” *Unpublished*.
- Inaba, M., Murata, K., Saito, M., and Takahara, I. (2006). “ETHANOL CONVERSION TO AROMATIC HYDROCARBONS OVER SEVERAL ZEOLITE CATALYSTS Megumu Inaba * , Kazuhisa Murata, Masahiro Saito and Isao Takahara,” 88(1), 135–142. DOI: 10.1556/RKCL.88.2006.1.18
- Ishizaki, H., and Hasumi, K. (2014). *Ethanol Production from Biomass, Research Approaches to Sustainable Biomass Systems*, Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-404609-2.00010-6
- Jiang, P., Mahmud, A., Meng, Y., Xu, M., Shui, T., Sun, C., and Wu, T. (2019). “Exergetic, economic and carbon emission studies of bio-olefin production via indirect steam gasification process,” *Energy*, Elsevier Ltd, 187, 115933. DOI: 10.1016/j.energy.2019.115933

- Ju, X., Engelhard, M., and Zhang, X. (2013). "An advanced understanding of the specific effects of xylan and surface lignin contents on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass," *Bioresource Technology*, 132, 137–145. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.049
- Kagymanova, A. P., Chumachenko, V. A., Korotkikh, V. N., Kashkin, V. N., and Noskov, A. S. (2011). "Catalytic dehydration of bioethanol to ethylene: Pilot-scale studies and process simulation," *Chemical Engineering Journal*, Elsevier B.V., 176–177, 188–194. DOI: 10.1016/j.cej.2011.06.049
- Kang, Q., Appels, L., Baeyens, J., Dewil, R., and Tan, T. (2014). "Energy-Efficient Production of Cassava-Based Bio-Ethanol," *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 05(12), 925–939. DOI: 10.4236/abb.2014.512107
- Kikuchi, Y., Hirao, M., Narita, K., Sugiyama, E., Oliveira, S., Chapman, S., Arakaki, M. M., and Cappra, C. M. (2013). "Environmental Performance of Biomass-Derived Chemical Production : A Case Study on Sugarcane-Derived Polyethylene," 46(4), 319–325. DOI: 10.1252/jcej.12we227
- Kim, K. H., and Hong, J. (2001). "Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis," *Bioresource Technology*, 77(2), 139–144. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00147-4
- Kniel, L., Winter, O., and Stork, K. (1980). "Ethylene: Keystone to the Petrochemical Industry," in: *Marcel Dekker*, New York. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Kruyeniski, J. (2017a). "Influencia del pretratamiento de residuos forestoindustriales sobre la producción de bioetanol ('In Spanish')," Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Misiones.
- Kruyeniski, J. (2017b). "Influence of pretreatment of forestry-industrial waste on bioethanol production," Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Misiones.
- Kruyeniski, J., Felissia, F. E., and Area, M. C. (2017). "Pretreatment soda-ethanol of pine and its influence on enzymatic hydrolysis," *Revista de Ciencia y Tecnología. ISSN: 1851-7587*, 19(28), 37–41.
- Kruyeniski, J., Ferreira, P. J., M.G., C., Felissia, F. E., and Area, M. C. (2019). "Physical and chemical characteristics of pretreated pine sawdust and its enzymatic hydrolysis," *Industrial Crops & Products journal*, Elsevier, 130, 528–536. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.12.075
- Li, C., Yoshimoto, M., Tsukuda, N., Fukunaga, K., and Nakao, K. (2004). "A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation," *Biochemical Engineering Journal*, 19(2), 155–164. DOI: 10.1016/j.bej.2003.12.010
- Lim, W. S., and Lee, J. W. (2013). "Influence of pretreatment condition on the fermentable sugar production and enzymatic hydrolysis of dilute acid-pretreated mixed softwood," *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 140, 306–311. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.04.103
- Limayem, A., and Ricke, S. C. (2012). "Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects," *Progress in Energy and Combustion Science*, Elsevier Ltd, 38(4), 449–467. DOI: 10.1016/j.peccs.2012.03.002
- Linde, M., Galbe, M., and Zacchi, G. (2007). "Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration," *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1100–1107. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.08.014

- Locane, J. J. (2019). "I. Materiales lignocelulósicos. Fundamentos," in: *Miradas locales en tiempos globales*, 23–96. DOI: 10.31819/9783954878840-003
- Luo, L., van der Voet, E., and Huppel, G. (2010). "Biorefining of lignocellulosic feedstock - Technical, economic and environmental considerations," *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 101(13), 5023–5032. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.109
- Madeira, F. F., Gnep, N. S., Magnoux, P., Maury, S., and Cadran, N. (2009). "Ethanol transformation over HFAU, HBEA and HMF1 zeolites presenting similar Brønsted acidity," *Applied Catalysis A: General*, 367(1–2), 39–46. DOI: 10.1016/j.apcata.2009.07.033
- Manfredi, A. P., Ballesteros, I., Sáez, F., Perotti, N. I., Martínez, M. A., and Negro, M. J. (2018). "Integral process assessment of sugarcane agricultural crop residues conversion to ethanol," *Bioresource Technology*, Elsevier, 260(February), 241–247. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.03.114
- Martínez, J. V. (2020). "Capítulo I Antecedentes y objetivos," in: *Biomasa lignocelulosa*, 17–26. DOI: 10.2307/j.ctv1228j94.5
- Matano, Y., Hasunuma, T., and Kondo, A. (2012). "Display of cellulases on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* for high yield ethanol production from high-solid lignocellulosic biomass," *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 108, 128–133. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.12.144
- Maupoey, P. F., Grau, A. M. A., Sorolla, A. M. A., and Baviera, J. M. B. (2001). "Introducción Al Secado De Alimentos Por Aire Caliente," *Introducción Al Secado De Alimentos Por Aire Caliente*, 211.
- McKendry, P. (2002). "Energy production from biomass (part 1): overview of biomass," *Bioresource Technol*, 83(1), 37–46. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00118-3
- Medina, C. E. G. (2021). "Aserrin-de-pino-en-la-ganaderia- alimentacion-de-animales-rumiantes," *Madera La Rola*, 1.
- Medvedeff, M. G., Mereles, B. E., Vedoya, M. C., and Chade, M. E. (2005). "Guía de trabajos prácticos. Posadas," Editorial Universitaria de Misiones.
- Mejía, L. (2016). "Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal, Celulasas de interés biotecnológico papelerero," *Carbohydrate Polymers*. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.06.031
- Melander, A. N., and Qvint, K. (2016). "Assessing the Sustainability of First Generation Ethanol for Bioethylene Production," Chalmers University of Technology.
- Mendes, C. V. T., Vergara, P., Carbajo, J. M., Villar, J. C., Rocha, J. M., and Carvalho, M. (2019). "Bioconversion of pine stumps to ethanol: Pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation," *Holzforschung*. DOI: 10.1515/hf-2018-0126
- Mendes, C. V. T., Vergara, P., Carbajo, J. M., Villar, J. C., Rocha, J. M. dos S., and Carvalho, M. da G. V. de S. (2020). "Bioconversion of pine stumps to ethanol: pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation," *Holzforschung*, 74(2), 212–216. DOI: 10.1515/hf-2018-0126
- Mendieta, C. M., Felissia, F. E., Arismendy, A. M., Kruyeniski, J., and Area, M. C. (2021). "Enzymatic hydrolysis and fermentation strategies for the biorefining of pine sawdust," *BioResources*, 16(4), 7474–7491.
- Mendieta, C. M., Kruyeniski, J., Felissia, F. E., and Area, M. C. (2022). "Modelling of the Simultaneous Saccharification and Fermentation for a Pine Sawdust Biorefinery,"

Fermentation, 8, 130.

- Mendieta, C. M., Vallejos, M. E., Felissia, F. E., Chinga-Carrasco, G., and Area, M. C. (2019). "Review: Bio-polyethylene from Wood Wastes," *Journal of Polymers and the Environment*, Springer US, (0123456789). DOI: 10.1007/s10924-019-01582-0
- Mika, L. T., Cséfalvay, E., and Németh, Á. (2018). "Catalytic Conversion of Carbohydrates to Initial Platform Chemicals: Chemistry and Sustainability," *Chemical Reviews*, 118(2), 505–613. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00395
- Min-hee, J. (2019). "Business Korea," *Ethylene Prices Plummet, Hitting a Low in 4 and Half Years*.
- Mohsenzadeh, A., Zamani, A., and Taherzadeh, M. J. (2017). "Bioethylene Production from Ethanol: A Review and Techno-economical Evaluation," *ChemBioEng Reviews*, 4(2), 75–91. DOI: 10.1002/cben.201600025
- Moon, S., Chae, H., and Park, M. B. (2019). "Dehydration of Bioethanol to Ethylene over H-ZSM-5 Catalysts : A Scale-Up Study," 1–12. DOI: 10.3390/catal9020186
- Morschbacker, A. (2009). "Bio-ethanol based ethylene," *Polymer Reviews*, 49(2), 79–84. DOI: 10.1080/15583720902834791
- Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimarães, P. M. R., Paulo, J., Silva, A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., Vicente, A., Domingues, L., and Teixeira, J. A. (2010). "Technological trends , global market , and challenges of bio-ethanol production," *Biotechnology Advances*, Elsevier Inc., 28(6), 817–830. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.001
- Nguyen, T. M., and Le Van Mao, R. (1990). "Conversion of ethanol in aqueous solution over ZSM-5 zeolites," *Applied Catalysis*, 58(1), 119–129. DOI: 10.1016/s0166-9834(00)82282-4
- Nitzsche, R., Budzinski, M., and Gröngröft, A. (2016). "Bioresource Technology Techno-economic assessment of a wood-based biorefinery concept for the production of polymer-grade ethylene , organosolv lignin and fuel," *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 200, 928–939. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.008
- Noller, H., and Thomke, K. (1979). "Transition states of catalytic dehydration and dehydrogenation of alcohols," *Journal of Molecular Catalysis*, 6(5), 375–392. DOI: 10.1016/0304-5102(79)85013-0
- Oliveira, C. C. N., Rochedo, P. R. R., and Program, E. P. (2019). "Bio-ethylene from sugarcane as a competitiveness strategy for the Brazilian chemical industry," 1–15. DOI: 10.1002/bbb.2069
- Olofsson, K., Bertilsson, M., and Lidén, G. (2008a). "A short review on SSF - An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks," *Biotechnology for Biofuels*, 1, 1–14. DOI: 10.1186/1754-6834-1-7
- Olofsson, K., Bertilsson, M., and Lidén, G. (2008b). "A short review on SSF - An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks," *Biotechnology for Biofuels*, 1(7), 1754–6834. DOI: 10.1186/1754-6834-1-7
- Olsson, L., and Hahn-Hägerdal, B. (1996). "Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates for ethanol production," *Enzyme Microb Technol*, 18(95), 312–331. DOI: 10.1016/0141-0229(95)00157-3
- Ouyang, J., Kong, Æ. F., and Su, Æ. G. (2009). "Catalytic Conversion of Bio-ethanol to Ethylene over La-Modified HZSM-5 Catalysts in a Bioreactor," 64–74. DOI:

10.1007/s10562-009-0047-3

- Palmqvist, E., and Hahn-Hägerdal, B. (2000). "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibitors and mechanism of inhibition," *Bioresource Technology*, 74(1), 25–33.
- Paysepar, H. (2018). "Production of monomeric aromatics /phenolics from hydrolysis lignin (HL) by catalytic fast pyrolysis and hydrothermal liquefaction," Western Ontario.
- Peirano, C., Bussio, D., and Varela, A. B. (2019). *PLAN ESTRATÉGICO FORESTAL Y FORESTO INDUSTRIAL ARGENTINA 2030*.
- Pineda-Pineda, J., Del Castillo, F. S., Ramírez-Arias, A., Castillo-González, A. M., Valdés-Aguilar, L. A., and Del Carmen Moreno-Pérez, E. (2012). "Aserrín de pino como sustrato hidropónico. I: Variación en características físicas durante cinco ciclos de cultivo," *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 18(1), 95–111.
- Plastics News. (2013). "Dow and Mitsui postpone sugarcane polymer plant."
- Prasad, S., Singh, A., and Joshi, H. C. (2007). "Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues," *Resources, Conservation and Recycling*, 50(1), 1–39. DOI: 10.1016/j.resconrec.2006.05.007
- Qi, J., Zhao, T., Xu, X., Li, F., and Sun, G. (2010). "Physicochemical properties and catalytic performance of a novel aluminosilicate composite zeolite for hydrocarbon cracking reaction," *China Petroleum Processing and Petrochemical Technology*, 5(1), 17–22.
- Ramesh, K., Jie, C., Han, Y., and Borgna, A. (2010). "Synthesis , Characterization , and Catalytic Activity of Phosphorus Modified H-ZSM-5 Catalysts in Selective Ethanol Dehydration," 4080–4090.
- Reis, V. R., Paula, A., Bassi, G., Carolina, J., and Ceccato-antonini, S. R. (2013). "Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation," *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1121–1131.
- Ren, T., Daniëls, B., Patel, M. K., and Blok, K. (2009). "Petrochemicals from oil, natural gas, coal and biomass: Production costs in 2030-2050," *Resources, Conservation and Recycling*, 53(12), 653–663. DOI: 10.1016/j.resconrec.2009.04.016
- Resch, M. G., Baker, J. O., and Decker, S. R. (2015). "Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass," *Technical Report NREL/TP-5100-63351, Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, (February), 1–9. DOI: 10.1016/j.jallcom.2018.03.019
- Ripamonti, D., Tripodi, A., Conte, F., Robbiano, A., Ramis, G., and Rossetti, I. (2021). "Journal of Environmental Chemical Engineering Feasibility study and process design of a direct route from bioethanol to ethylene oxide," *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Elsevier Ltd, 9(5), 105969. DOI: 10.1016/j.jece.2021.105969
- Robak, K., and Balcerek, M. (2018). "Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass," 56(2), 174–187. DOI: 10.17113/ftb.56.02.18.5428
- Rodríguez., M. H. (2014). "Empleo de cationes fosfonio como agentes directores de estructura (ADEs) en la síntesis de zeolitas. Tesis doctoral ITQ-UPV (2014)."
- Rossetti, I., Compagnoni, M., Finocchio, E., Ramis, G., Di, A., Millot, Y., and Dzwigaj, S. (2017). "Ethylene production via catalytic dehydration of diluted bioethanol : A step towards an integrated biorefinery," *Applied Catalysis B, Environmental*, Elsevier B.V., 210, 407–420. DOI: 10.1016/j.apcatb.2017.04.007

- Saha, B. C. (2003). "Hemicellulose bioconversion," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279–291. DOI: 10.1007/s10295-003-0049-x
- San Martín, C., Perez, C., and Briones, R. (1995). "Simultaneous Production of ethanol and kraft pulp from pine (*Pinus Radiata*) using steam explosion," *Bioresource Technology*, 53, 217–223.
- Sannigrahi, P., Miller, S. J., and Ragauskas, A. J. (2010). "Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine," *Carbohydrate Research*, Elsevier Ltd, 345(7), 965–970. DOI: 10.1016/j.carres.2010.02.010
- Santagata, C., Iaquaniello, G., Salladini, A., Agostini, E., Capocelli, M., and Falco, M. De. (2020). "Production of low-density poly-ethylene (LDPE) from chemical recycling of plastic waste : Process analysis," *Journal of Cleaner Production*, Elsevier Ltd, 253, 119837. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.119837
- Santos Meneses, T. M. (2018). "Autohidrólisis y deslignificación organosolv de madera de *Pinus radiata* para la recuperación de hemicelulosas y lignina con aprovechamiento de la fracción celulósica por vía enzimática," Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas.
- Schenck, A. Von, Berglin, N., and Uusitalo, J. (2013). "Ethanol from Nordic wood raw material by simplified alkaline soda cooking," *Applied Energy*, Elsevier Ltd, 102, 229–240. DOI: 10.1016/j.apenergy.2012.10.003
- Sheng, Q., Ling, K., Li, Z., and Zhao, L. (2013). "Effect of steam treatment on catalytic performance of HZSM-5 catalyst for ethanol dehydration to ethylene," *Fuel Processing Technology*, Elsevier B.V., 2–3. DOI: 10.1016/j.fuproc.2012.11.004
- Simacon. (2017). "Construyen-bloques-de- madera-con-hormigon-y-aserrin-de-pino," <https://www.eltterritorio.com.ar/noticias/2017/03/18/520743-construyen-bloques-de-madera-con-hormigon-y-aserrin-de-pino>, 1.
- Sjöström, E. (1993). "the Structure of Wood," in: *Wood Chemistry*, E. Sjöström, ed., Elsevier Inc., 1–20. DOI: 10.1016/C2009-0-03289-9
- Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., and Wolfe, J. (2008). "Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples," *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, (March), 3–5. DOI: NREL/TP-510-42621
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., and Crocker, D. (2004). *Technical report- Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass, (NREL/TP-510-42618), Laboratory Analytical Procedure (LAP), NREL (National renewable energy laboraty)*. DOI: NREL/TP-510-42618
- Smith, M. B., and March, J. (2007). "March's Advanced Organic Chemistry," in: *Reactions, mechanisms, and structure*, John Wiley & Sons, Inc., Canada, 425–752. DOI: 10.1002/9780470084960
- Srilekha Yadav, K., Naseeruddin, S., Sai Prashanthi, G., Sateesh, L., and Venkateswar Rao, L. (2011). "Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*," *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 102(11), 6473–6478. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.019
- Stephen, J. D., Mabee, W. E., and Saddler, J. N. (2012). "Will second-generation ethanol be able to compete with first-generation ethanol? Opportunities for cost reduction," *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6, 159–176. DOI: 10.1002/bbb

- Stoffel, R. B., Neves, P. V., Felissia, F. E., Ramos, L. P., Gassa, L. M., and Area, M. C. (2017). "Hemicellulose extraction from slash pine sawdust by steam explosion with sulfuric acid," *Biomass and Bioenergy*, 107, 93–101. DOI: 10.1016/j.biombioe.2017.09.019
- Sun, Y., and Cheng, J. (2002). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review," *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7
- Taherzadeh, M. J., and Karimi, K. (2007a). "Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review," *BioResources*, 2(4), 707–738.
- Taherzadeh, M. J., and Karimi, K. (2007b). *Enzyme-based {H}ydrolysis {P}rocesses for {E}thanol from {L}ignocellulosic {M}aterials: {A} {R}eview*, *BioResources*.
- Tanabe, K.; Misono, M.; Ono, Y.; Hattori, H. (1990). "Their Catalytic Properties," in: *New Solid Acids and Bases*, 2nd February, 364.
- Taylor, R., Natrass, L., Alberts, G., Robson, P., Chudziak, C., Bauen, A., Libelli, I. M., Lotti, G., Prussi, M., Nistri, R. (2015). (Report No. ENER/C2/423-2012/SI2.673791). *European Commission Directorate-General Energy*.
- Taylor, P., Matsuura, M., Sasaki, J., Murao, S., Matsuura, M., and Murao, S. (n.d.). "Studies on β -Glucosidases from Soybeans That Hydrolyze Daidzin and Genistin : Isolation and Characterization of an Isozyme Studies on fJ-Glucosidases from Soybeans That Hydrolyze Daidzin and Genistin : Isolation and Characterization of an Isozyme," (December 2014), 37–41. DOI: 10.1271/bbb.59.1623
- Tian, X., Rehmann, L., Xu, C. C., Fang, Z., Tian, X., and Xu, C. C. (2016). "Pretreatment of eastern white pine (*Pinus strobes* L.) for enzymatic hydrolysis and ethanol production by organic electrolyte solutions," *ACS (Sustainable Chemistry & Engineering)*, 2–30. DOI: 10.1021/acssuschemeng.6b00328
- Tripodi, A., Belotti, M., and Rossetti, I. (2019). "Bioethylene Production: From Reaction Kinetics to Plant Design," *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, research-article, American Chemical Society, 7, 13333–13350. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b02579
- Uasuf, A., and Hilbert, J. (2012). *El uso de la biomasa de Origen Forestal con destino a bioenergía en la Argentina*, Castelar, Buenos Aires.
- V., C., N., T., T, P., E., K., S., F., W., V., D., M., P., D. S., C., A., and N., N. (2014). "Procede de Deshydratation de L' Éthanol en Éthylene a Basse Consommation Énergétique."
- Valenzuela, R., Priebe, X., Troncoso, E., Ortega, I., Parra, C., and Freer, J. (2016). "Fiber modifications by organosolv catalyzed with H₂SO₄ improves the SSF of *Pinus radiata*," *Industrial Crops & Products*, Elsevier B.V., 86, 79–86. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.03.037
- Le Van Mao, R., Nguyen, T. M., and McLaughlin, G. P. (1989). "The bioethanol-to-ethylene (B.E.T.E.) process," *Applied Catalysis*, 48(2), 265–277. DOI: 10.1016/S0166-9834(00)82798-0
- Verdecía, J. M., and Serrat, M. (2008). "General technological aspects for the conversion to ethanol of the lignocellulosic biomass," *Tecnología Química*, 28(3), 63–70.
- Vie, U., and Spangsberg, M. (2011). "Utilization of biomass: Conversion of model compounds to hydrocarbons over zeolite H-ZSM-5." DOI: 10.1016/j.apcata.2011.01.040
- Wang, Z., Li, S., Wang, S., Liu, J., Zhao, Y., and Ma, X. (2021). "Coupling effect of bifunctional ZnCe@SBA-15 catalyst in 1,3-butadiene production from bioethanol," *Chinese Journal of Chemical Engineering*, Chemical Industry and Engineering Society of China. DOI:

10.1016/j.cjche.2021.02.025

- Wood, I. P., Cao, H. G., Tran, L., Cook, N., Ryden, P., Wilson, D. R., Moates, G. K., Collins, S. R. A., Elliston, A., and Waldron, K. W. (2016). "Comparison of saccharification and fermentation of steam exploded rice straw and rice husk," *Biotechnology for Biofuels*, BioMed Central, 9(1), 1–9. DOI: 10.1186/s13068-016-0599-6
- Wright, P. a., and Lozinska, M. (2011). *Basic concepts in zeolite acid-base catalysis. Zeolites and ordered porous solids: Fundamentals and applications.*
- Wu, C.-Y., and Wu, H.-S. (2017). "Ethylene Formation from Ethanol Dehydration Using ZSM-5 Catalyst," *ACS Omega*, 2(8), 4287–4296. DOI: 10.1021/acsomega.7b00680
- Wyman, C. E., Spindler, D. D., and Grohmann, K. (1992). "Simultaneous and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol," 3(5), 301–307. DOI: [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(92\)90001-7](https://doi.org/10.1016/0961-9534(92)90001-7)
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., and Ladisch, M. (2011). "Deactivation of cellulases by phenols," *Enzyme and Microbial Technology*, 48(1), 54–60. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2010.09.006
- Xiros, C., and Olsson, L. (2014). "ScienceDirect Comparison of strategies to overcome the inhibitory effects in high-gravity fermentation of lignocellulosic hydrolysates," *Biomass and Bioenergy*, Elsevier Ltd, 1–12. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.03.060
- Xue, Y., Jameel, H., and Park, S. (2012). "Strategies to recycle enzymes and their impact on enzymatic hydrolysis for bioethanol production," *BioResources*, 7(1), 602–615. DOI: 10.15376/biores.7.1.0602-0615
- Yakovleva, I. S., Banzaraktsaeva, S. P., Ovchinnikova, E. V., Chumachenko, V. A., and Isupova, L. A. (2016a). "Catalytic dehydration of bioethanol to ethylene," *Catalysis in Industry*, 8(2), 152–167. DOI: 10.1134/S2070050416020148
- Yakovleva, I. S., Banzaraktsaeva, S. P., Ovchinnikova, E. V, Chumachenko, V. A., and Isupova, L. A. (2016b). "Catalytic Dehydration of Bioethanol to Ethylene," 8(2). DOI: 10.1134/S2070050416020148
- Zhang, M., and Yu, Y. (2013). "Dehydration of ethanol to ethylene," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 52(28), 9505–9514. DOI: 10.1021/ie401157c
- Zhang, X., Wang, R., Yang, X., and Zhang, F. (2008). "Microporous and Mesoporous Materials Comparison of four catalysts in the catalytic dehydration of ethanol to ethylene," *Microporous and Mesoporous Materials*, Elsevier Inc., 116(1–3), 210–215. DOI: 10.1016/j.micromeso.2008.04.004
- Zheng, D. Q., Wu, X. C., Tao, X. L., Wang, P. M., Li, P., Chi, X. Q., Li, Y. D., Yan, Q. F., and Zhao, Y. H. (2011). "Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance," *Bioresource Technology*, Elsevier Ltd, 102(3), 3020–3027. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.09.122
- Zhu, M., Zhu, Z., and Li, X. (2011). "Bioconversion of paper sludge with low cellulosic content to ethanol by separate hydrolysis and fermentation," *African Journal of Biotechnology*, 10, 15072–15083. DOI: 10.5897/AJB11.1644
- Zimmermann, H., and Walzl, R. (2000). "Ethylene," in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, 1–58. DOI: 10.1002/14356007

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y EVENTOS

Mendieta, Carolina M.; Kruyeniski, J.; Felissia, Fernando E.; Area, María. C. Optimization of the simultaneous saccharification and fermentation strategy for 2g ethanol production in pine sawdust biorefinery. Ciadicyp 2022. Iberoamerican Congress on Pulp and Paper Research. Lugar: Girona; año: 2022

Mendieta, Carolina M.; Felissia, Fernando E.; Arismendy Ana M.; Kruyeniski Julia; Area, María C. Hidrólisis enzimática y estrategias de fermentación para una biorrefinería de aserrín de pino. 3ra Jornadas Científicas Instituto de Materiales de Misiones. Lugar: posadas; Año: 2021;

Mendieta, Carolina M.; Kruyeniski, Julia.; Felissia, Fernando E.; Area, María C. Kinetic Study of the Batch Enzymatic Hydrolysis of Soda-Ethanol Pulps from Pine Sawdust using the Michaelis-Menten Model. XXV Tecnicelpa - Conferência Internacional da Floresta, Pasta e Papel XI Ciadicyp año: 2021;

Mendieta, Carolina. M.; Kruyeniski, Julia.; Imlauer, Camila. M; Felissia, Fernando E.; Area, María C. Caracterización del Aserrín y Materiales Intermedios para la Obtención de Bioetanol de 2G. Caracterizar 2020. Caracterización de Materiales lugar: Buenos Aires; año: 2020;

Mendieta, Carolina M.; Kruyeniski, julia.; Felissia, Fernando. E.; Area, María. C. Producción de Bioetanol mediante Estrategias de Fermentación para una Biorrefinería de Pino 1° simposio Municipal de Investigación, Extensión y Desarrollo local lugar: Posadas; año: 2020;

Mendieta, Carolina M.; Felissia, Fernando E.; Chinga-Carrasco, Gary.; Vallejos, María. E.; Area, María C. Biopolyethylene from Wood wastes XII-Simposio Argentino de Polimero-Sap-2019 lugar: Buenos Aires; año: 2019;

Mendieta, Carolina M.; Arismendi, Ana M.; Felissia, Fernando E.; Area, María C. Obtaining 2G Bioethanol by SHF and SSF Strategies Congreso de Ingeniería y Ciencias Aplicadas en las tres Fronteras lugar: Foz de Iguazú; año: 2019;

Mendieta, Carolina M. Fabricación de Polietileno a partir de Aserrin de Pino. Encuentro de Becarios e Investigadores: Tendiendo Puentes entre la Investigación Básica y la Aplicada lugar: Corrientes; año: 2018;

ARTICULOS PUBLICADOS EN REVISTA INDEXADAS

Mendieta, C. M., Vallejos, M. E., Felissia, F. E., Chinga-Carrasco, G., and Area, M. C. (2019). "Review: Bio-polyethylene from wood wastes," *Journal of Polymers and the Environment* 28(1), 1-16. DOI: 10.1007/s10924-019-01582-0

Arismendy, A. M., Felissia, F. E., **Mendieta, C. M.**, Chamorro, E. R., and Area, C. M. (2020). "Improvement of bioethanol production from rice husks," *Journal Cellulose Chemistry and Tchnology* 54 (7-8), 689-698. DOI: 10.35812/CelluloseChemTechnol.2020.54.68

Mendieta, C. M., Cardozo, R. E., Felissia, F. E., Clauser, N. M., Vallejos, M. E., and Area, M. C. (2021). "Bioconversion of wood waste to bio-ethylene: A review," *BioResources* 16(2), 4411-4437. DOI: 10.15376/biores.16.2.Mendieta

Clauser, N. M., González, G., **Mendieta, C. M.**, Kruyeniski, J., Area, M. C., and Vallejos, M. E. (2021). "Biomass waste as sustainable raw material for energy and fuels," *Sustainability* 13(2), 794. DOI: 10.3390/su13020794

Mendieta, C.M.; Felissia, F.E.; Arismendy, A.M.; Kruyeniski, J.; Area, M.C. (2021). "Enzymatic hydrolysis and fermentation strategies for the biorefining of pine sawdust", *BioResources* 16(4), 7474–7491. DOI: 10.15376/biores.16.4.7474-7491

Mendieta, C.M.; Kruyeniski, J.; Felissia, F.E.; Area, M.C. (2022). "Modelling of the Simultaneous Saccharification and Fermentation for a Pine Sawdust Biorefinery", *Fermentation*, 8, 130. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Mendieta, C.M. ; Gonzalez, G.R. ; Vallejos, M. E.; Area, M. C. (2022). "Bio-polyethylene Furanoate (Bio-PEF) from Lignocellulosic Biomass Adapted to the Circular Bioeconomy", 17(4), 7313-7337. DOI: 10.15376/biores.17.4.Mendieta

ARTICULOS PUBLICADOS EN REVISTAS DE DIVULGACIÓN

Mendieta, C. M. (2020). "Bioetanol 2G a partir de las estrategias HFS y SFS" *El Papel* 213, 42-43.

Mendieta, C. M. (2020). "Obtención de biopolietileno 2G a partir de aserrín de pino", *El Papel* 214, 44.

Mendieta, C. M. (2021). "Producción de bioetileno a partir de la deshidratación de bioetanol 2G", *El Papel* 214, 43.

Mendieta, C. M.; Gonzalez, G. (2023). "Polietilénfuranoato (PEF): la alternativa biobasada del polietilentereftalato (PET)", *El Papel* 214, 40

CAPÍTULO DE LIBROS

Mendieta, Carolina. M., Kruyeniski, Julia., Vallejos, María. E.; Area, María. C. Chapter: Production and Uses of Bioethanol in an Integrated Biorefinery from Agro-and Forest-Industrial Waste. *Handbook of Biodiesel and Petrodiesel Fuels: Science, Technology, Health, and Environment* . **(Aceptado para publicación)**

Mendieta, Carolina. M., Kruyeniski, Julia., Vallejos, María. E.; Area, María. C. Chapter: Insights of enzymatic hydrolysis of carbohydrates from lignocellulosic biomass for alcohols. **(Proceso de revisión)**

FINANCIAMIENTO

El trabajo se enmarca en el proyecto "ELAC2015/T03-0715 Valorization of residual biomass for advanced 3D materials ValBio-3D", coordinado por la Dra. María Cristina Area, con participación de grupos de Noruega, Alemania, Finlandia, Perú y Chile (además del PROCYP, Argentina). Por medio de este proyecto se financió la adquisición del reactor de alta presión y temperatura.