




UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS POR FERMENTACIÓN



Biorrefinería – Bioproductos

Biorrefinería: Procesamiento sinérgico **sostenible** de la **biomasa** para obtener un **espectro de productos comercializables** (ingredientes alimenticios y piensos, productos químicos, productos farmacéuticos, materiales) **y energía** (biocombustibles, electricidad, calor)*.

Bioproductos: Productos derivados de la biomasa (plantas, algas, árboles, residuos orgánicos vegetales, animales, cultivos de microalgas y otros microorganismos, etc.) que **no se destinan a la alimentación** (animal, ni humana) y **que sustituyen a materiales derivados de fuentes fósiles.**

Productos comerciales producidos utilizando **microorganismos:**

- Bioplásticos y otros biopolímeros
- Surfactantes
- Biosolventes
- Biolubricantes
- Biocombustibles
- Enzimas
- Productos farmacéuticos
- Cosméticos

Ventajas del uso de microorganismos utilizando residuos

➤ Impactos ambientales:

- ✓ Menos residuos tóxicos
- ✓ Menos emisiones GEI por incineración de residuos
- ✓ Reducción en el consumo de energía fósil
- ✓ Reducción de residuos biomásicos por uso de MP
- ✓ Desarrollo tecnológico

➤ Impactos sociales:

- ✓ Contribución al desarrollo forestal por la MP
- ✓ Aumento de la sostenibilidad
- ✓ Mejora de la imagen de la industria química.

➤ Impactos económicos:

- ✓ Utilización de residuos y subproductos
- ✓ Contribución al desarrollo rural y forestal
- ✓ Creación de empleo y mantenimiento de la producción
- ✓ Ahorros en los residuos
- ✓ Innovación y productos con prestaciones superiores
- ✓ Posibles beneficios por operación “verde”



Building Blocks derivados de azúcares

➤ 12 químicos **Building Blocks** producidos vía **biológica o química***:

✓ Ácidos 1,4 succínico, fumárico y málico

✓ Ácido 2,5 furandicarboxílico

✓ Ácido 3 hidroxipropiónico

✓ Ácido aspártico

✓ Ácido glucárico

✓ Ácido glutámico

✓ Ácido itacónico

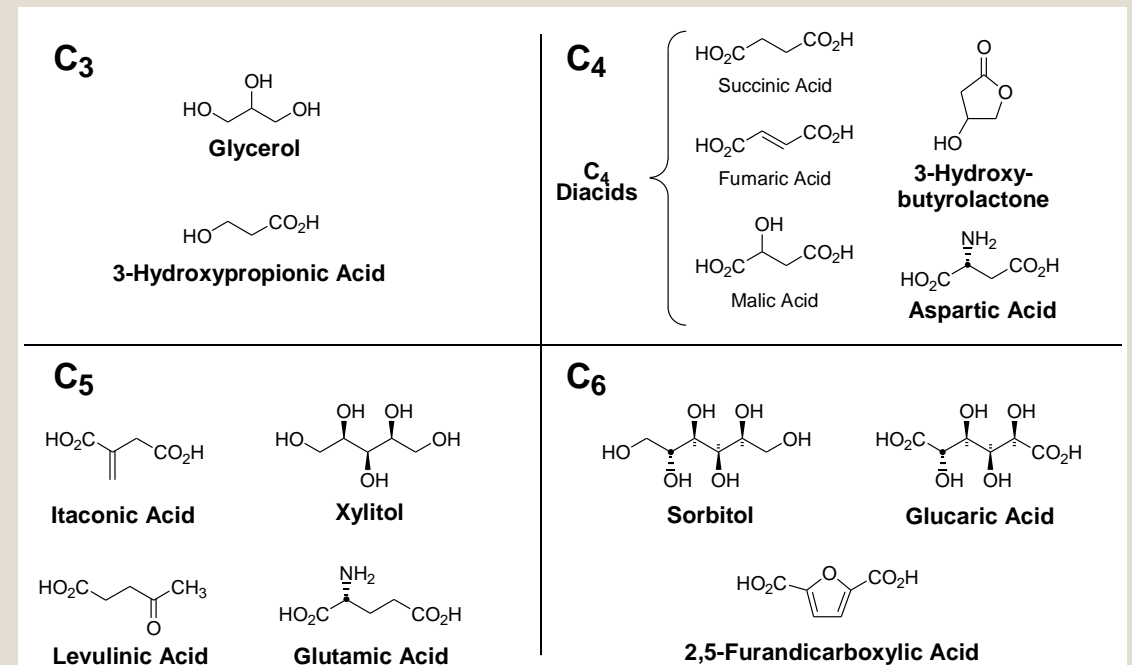
✓ Ácido levunílico

✓ 3-hidroxibutirolactona

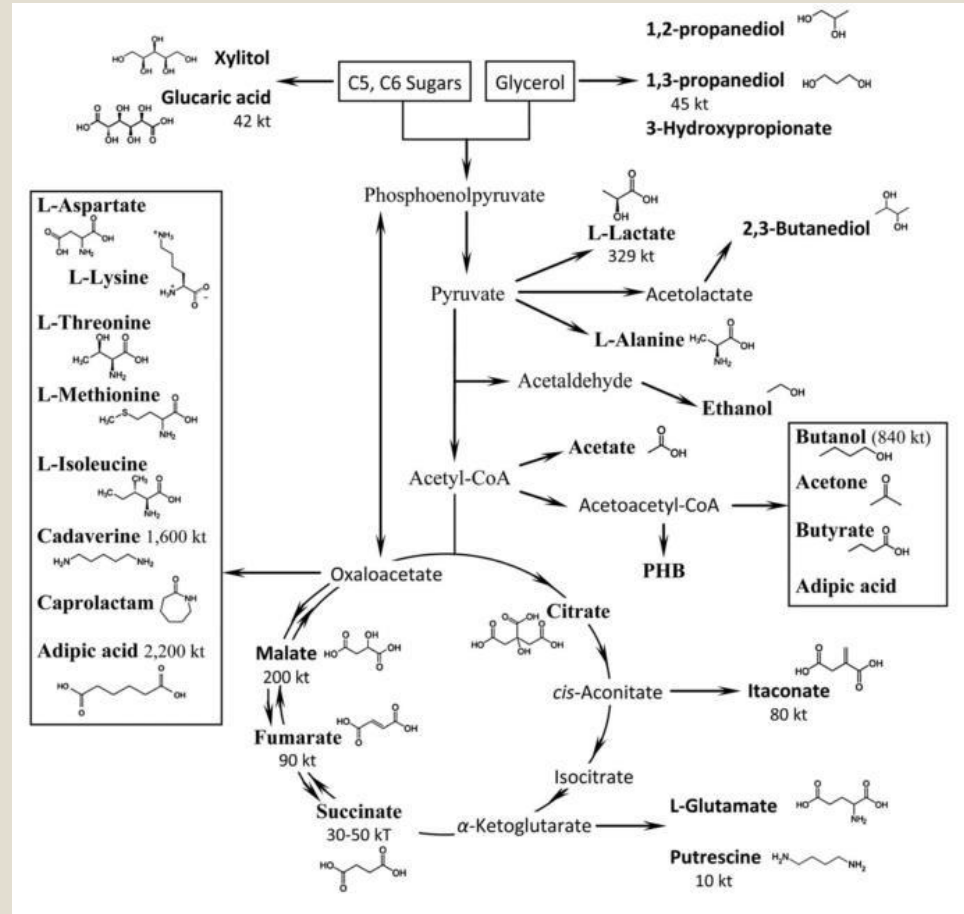
✓ Glicerol

✓ Sorbitol

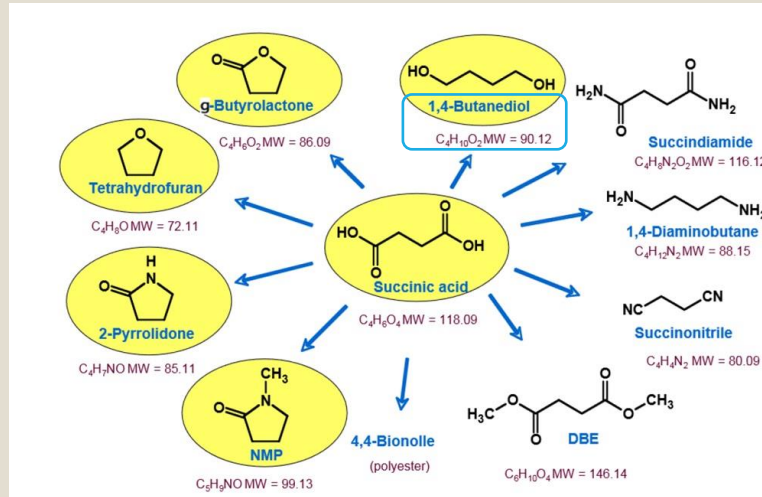
✓ Xilitol/arabinol



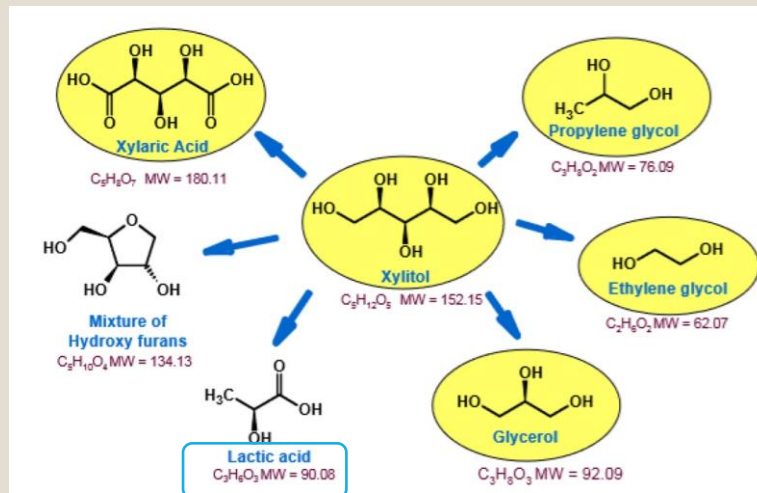
Building Blocks derivados de azúcares



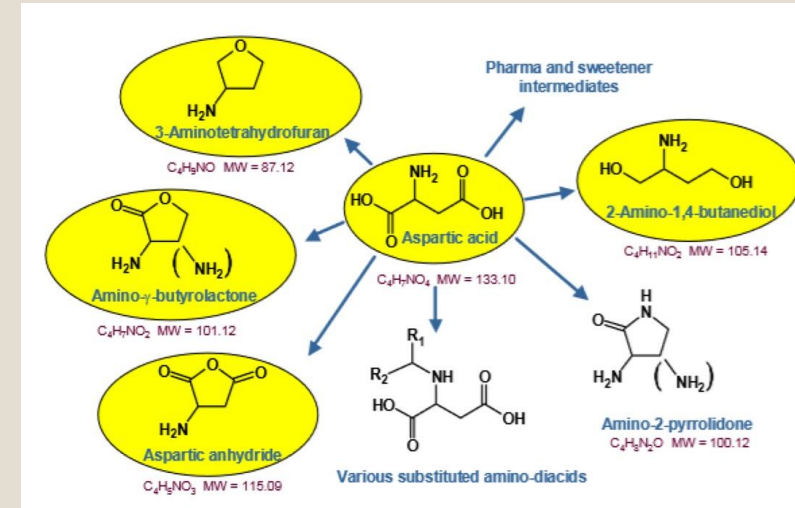
Building Blocks derivados de azúcares



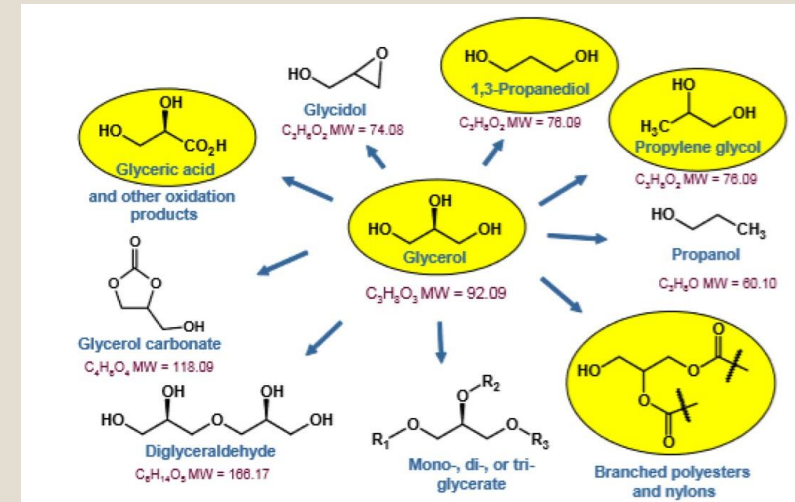
Myriant, LCY Biosciences (BioAmber), BASF, Reverdia, Succinity



Thomson Biotech, ZuChem

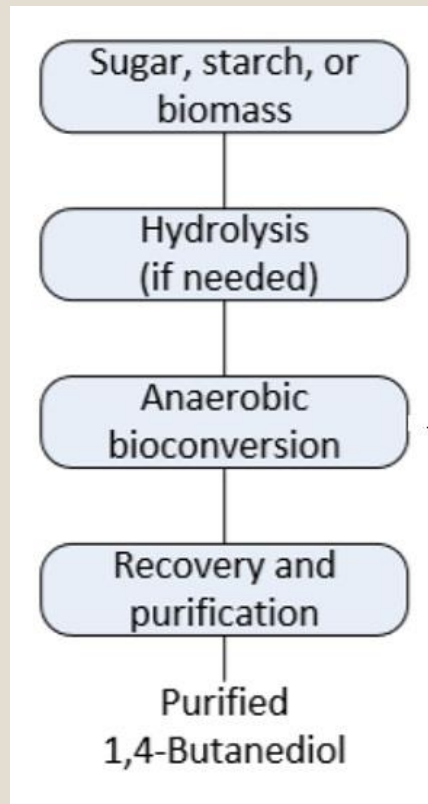


Flexible Solution Int.

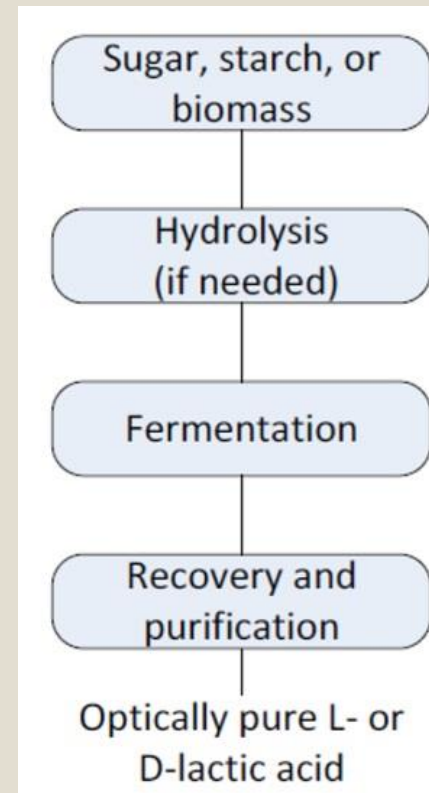


ETH Zurich

Building Blocks derivados de azúcares

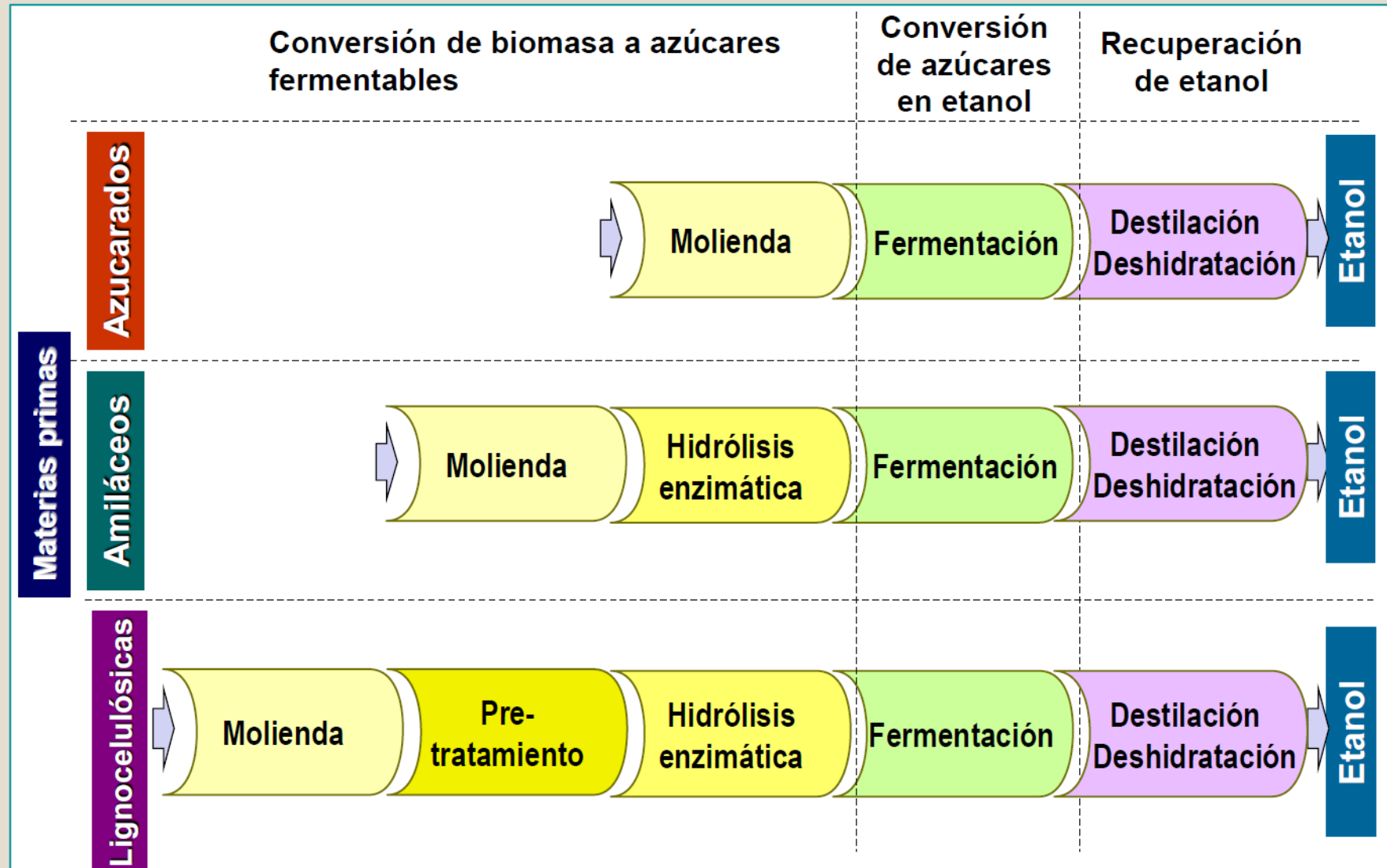


Producción de polímeros, disolventes, herbicidas, productos químicos



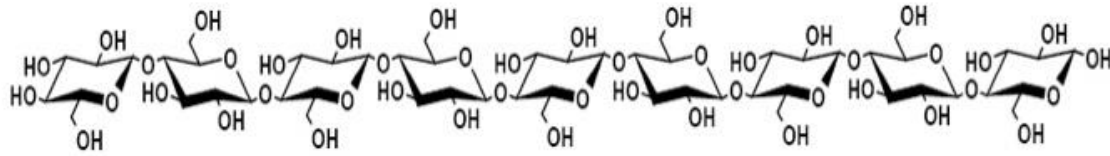
Acidulante, aromatizante, buffer, conservantes en alimentos, biopolímero PLA

Bioetanol

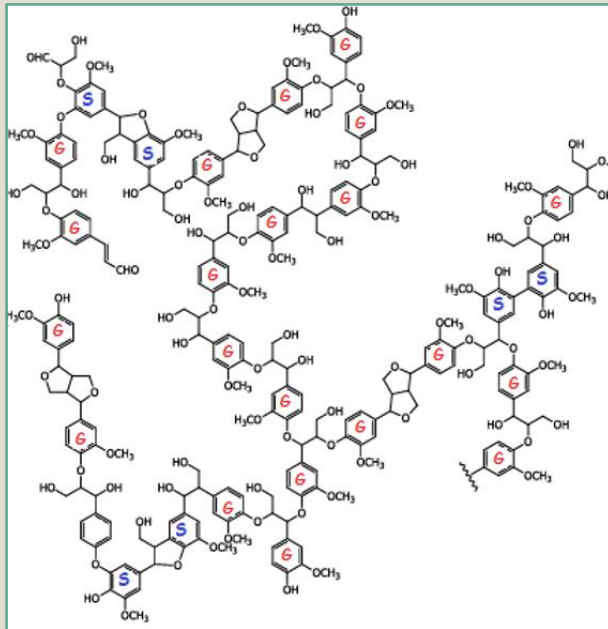


Proceso de obtención de etanol a partir de diferentes tipos de materiales.

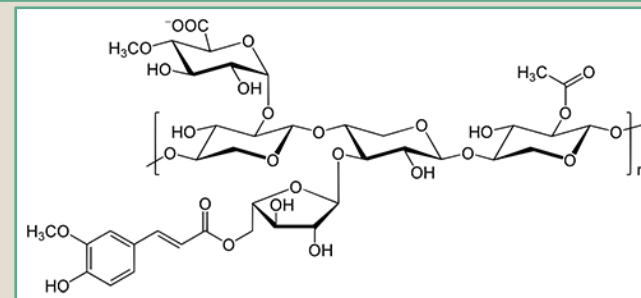
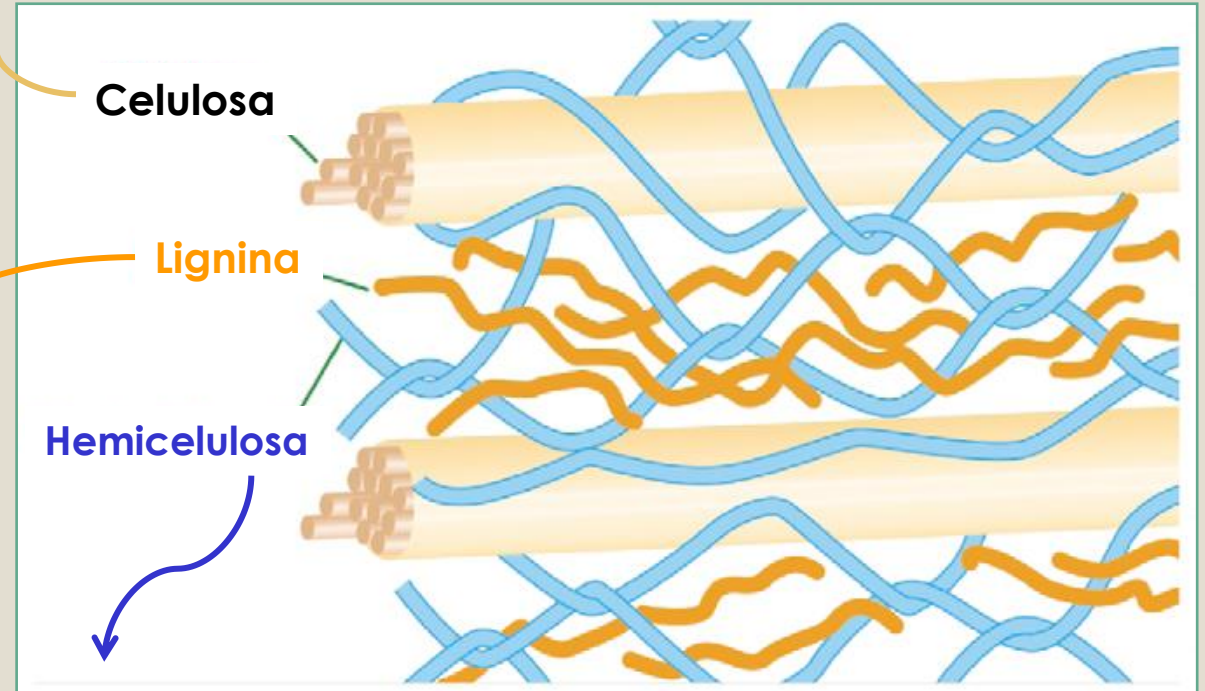
Eucalipto - Componentes



Polímero de compuestos aromáticos (**guayacilo G**, **siringilo S** y **hidroxifenil H**)



Heteropolímero ramificado de pentosas (**xilosa**, **arabinosa**), hexosas (glucosa, manosa, galactosa), con **alto grado de acetilación**.



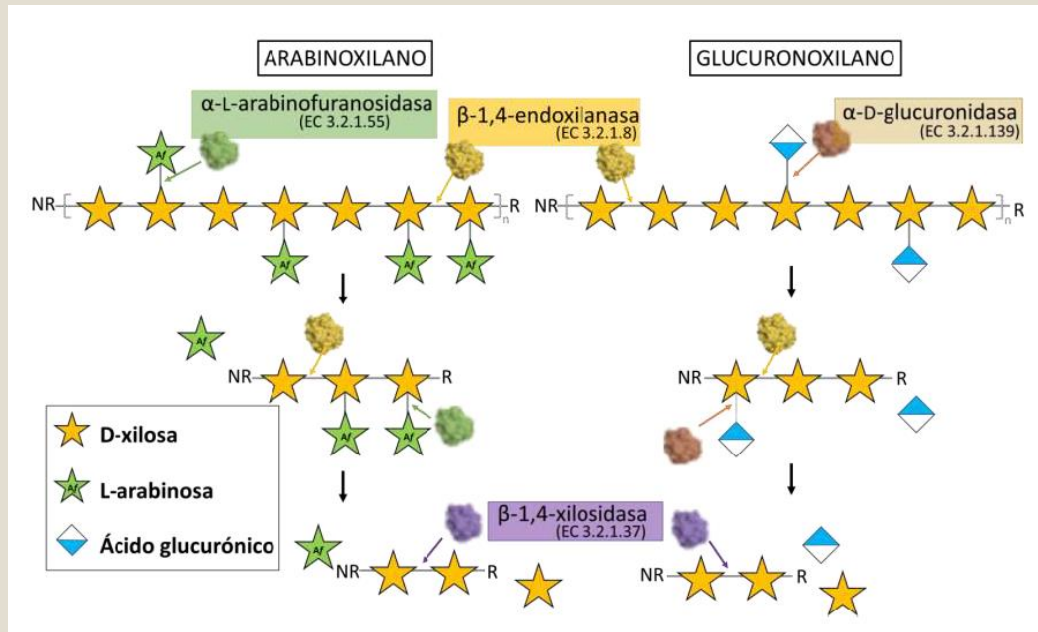
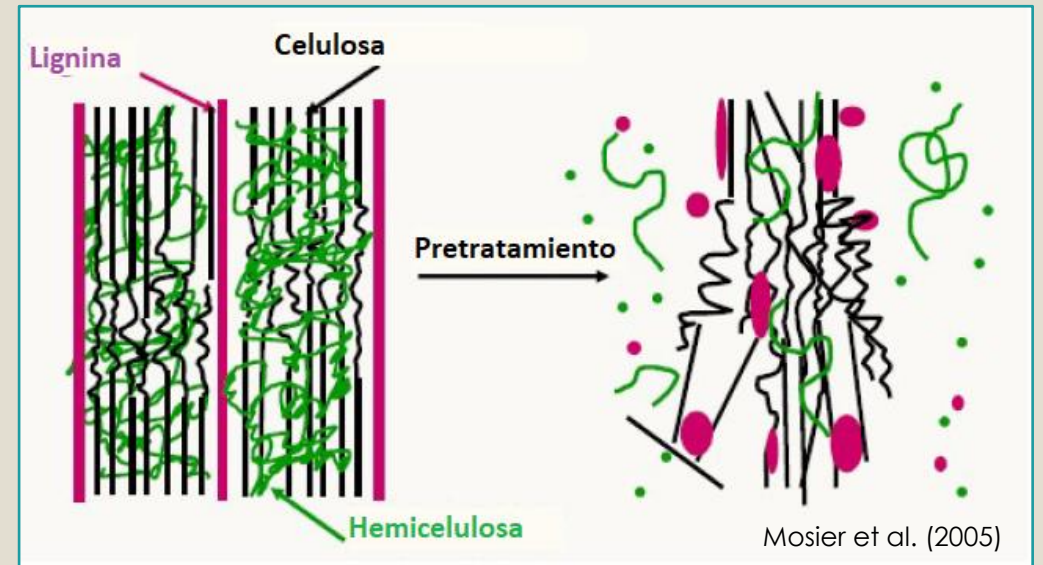
Pared celular

Pretratamiento/hidrólisis enzimática



Objetivo:

- ✓ **fraccionamiento** del material
- ✓ aumentar **digestibilidad enzimática**
- ✓ evitar formación de **inhibidores**

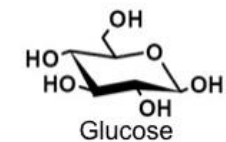
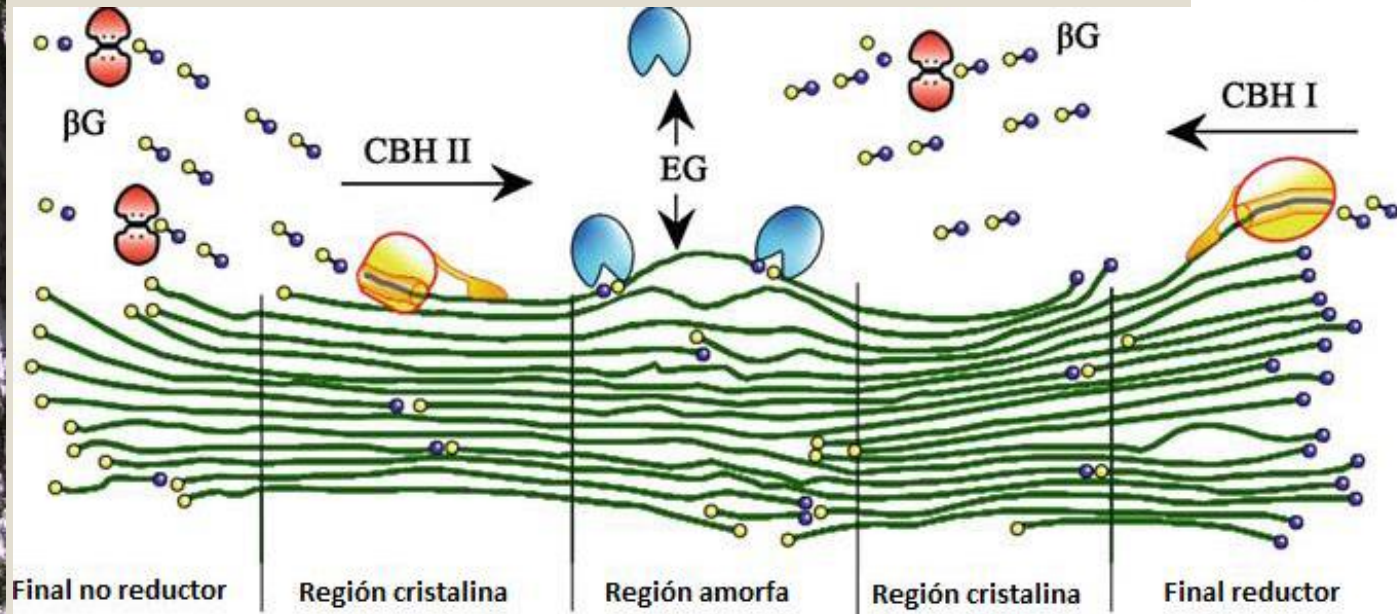
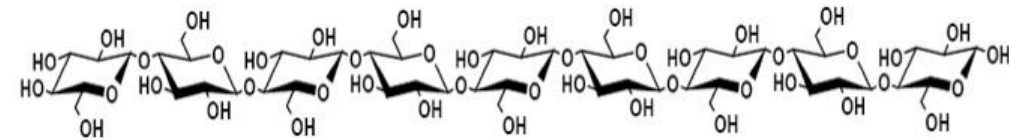


- **Hemicelulasas:**

- ✓ Endoxilanasas
- ✓ acetilxilanoesterasa
- ✓ β -xiloxidasa
- ✓ α -arabinofuranosidasa
- ✓ α -glucoronidasa, entre otras

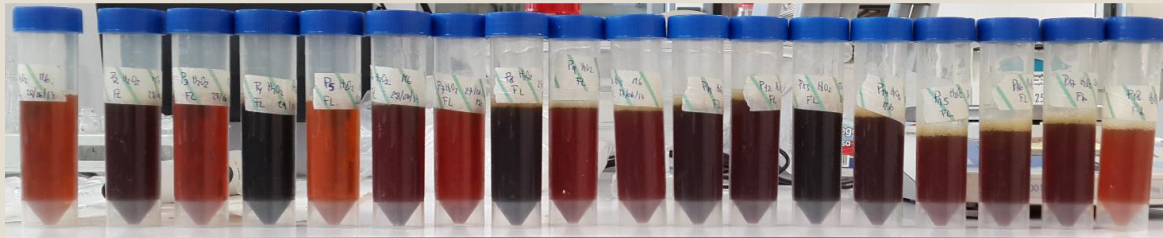
Hidrólisis enzimática

- Complejo enzimático **celulasas**:
- ✓ **Exo β -1,4 glucanasas** (CBH I, CBHII), liberan celobiosa y glucosa de la ruptura de la cadena de celulosa por sus extremos
- ✓ **Endo β -1,4 glucanasas** (EG), rompen la cadena de celulosa, principalmente zonas amorfas
- ✓ **β -glucosidasa** (β G), catalizan la hidrólisis de la celobiosa liberando glucosa



Hidrólisis enzimática requiere la degradación de la lignina

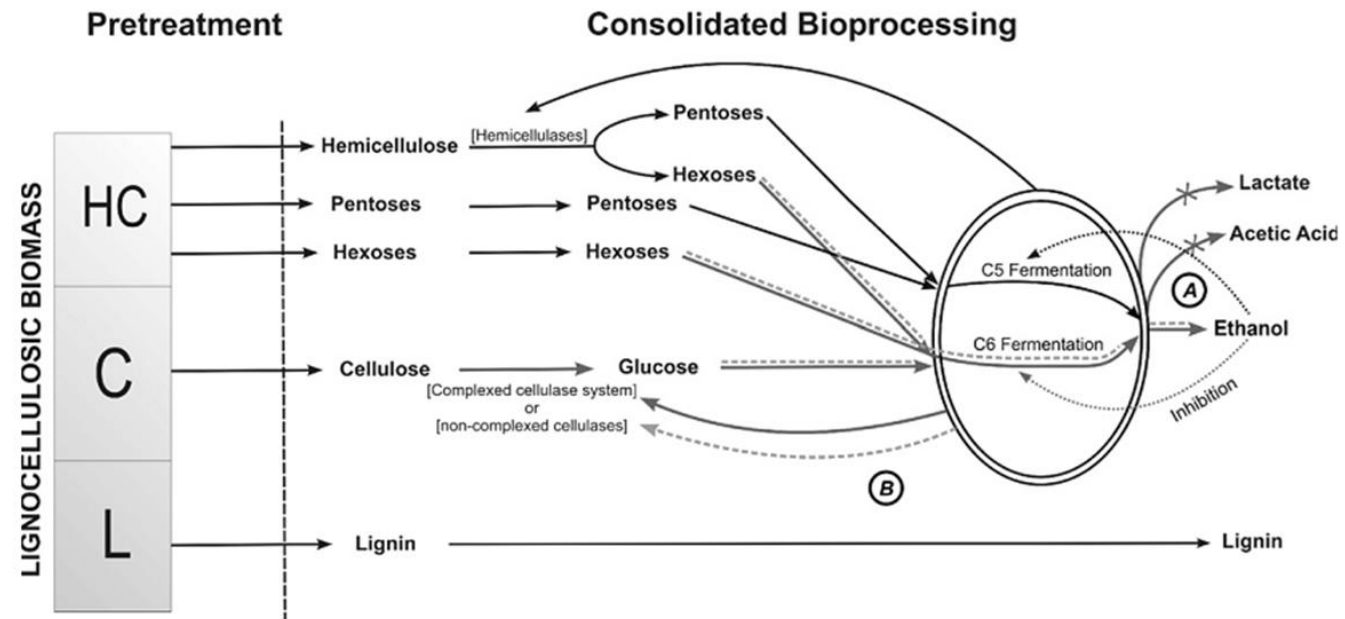
- La presencia de **lignina** es un factor **inhibidor** de las **enzimas** hemicelulolíticas y celulolíticas:
- ✓ La lignina proporciona una **barrera física** que limita la accesibilidad de las celulasas y hemicelulasas al sustrato.
- ✓ Las **celulasas** son **adsorbidas** de forma **inespecífica** por la lignina.
- ✓ La lignina puede **inhibir** directamente las enzimas. Depende del **tipo** y **distribución** de la **lignina** en la biomasa.
- ✓ Existen **enzimas degradadoras** de la **lignina**: lacasas, lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa
- ✓ También se puede utilizar otra **proteína** como la seroalbúmina bovina (BSA) para que se adsorba a la lignina en lugar de la celulasas o un **tensoactivo** que reduzca su adsorción (polivinilpirrolidona, polietilenglicol, Tween)



Procesos consolidados

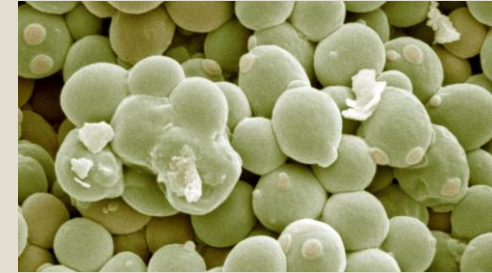


C.A. Cardona, Ó.J. Sánchez / Bioresource Technology 98 (2007) 2415–2457



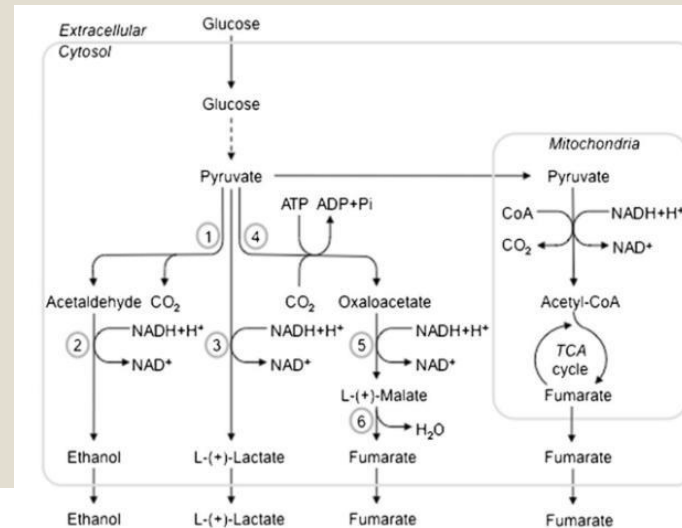
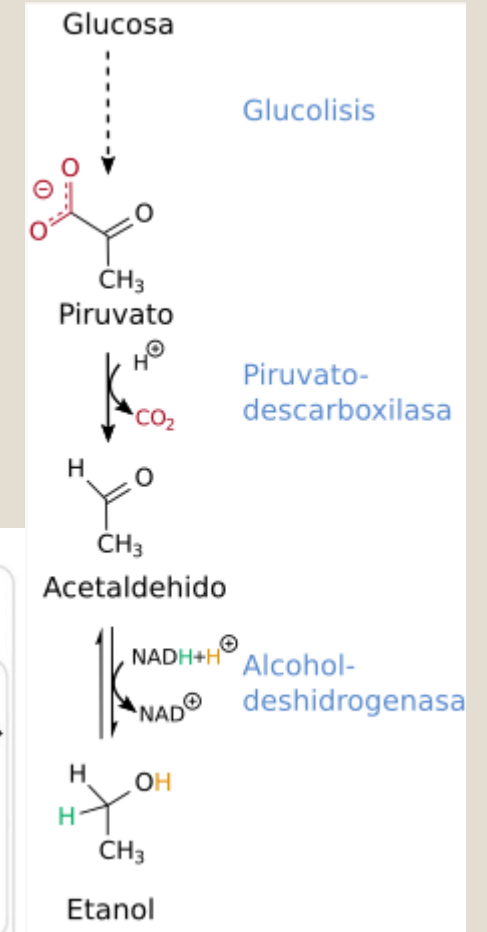
Microorganismos

- **Condiciones** deseables para los **microorganismos**:
 - ✓ robustos
 - ✓ estables genéticamente
 - ✓ con tolerancias a altas concentraciones de sustrato (ej. glucosa)
 - ✓ con tolerancias a altas concentraciones de producto (ej. Etanol)
 - ✓ resistentes a la presencia de inhibidores (ácido acético, HMF, furfural, fenoles)
 - ✓ tolerancia a trabajar a bajos pH
 - ✓ que tengan altos rendimientos de formación del producto rápidamente
 - ✓ fáciles de separar del medio
- Para la producción de **etanol**:
 - ✓ **S. cerevisiae** industriales: PE-2 y CAT-1 (Fermentec, Brasil), Ethanol Red (Fermentis, Francia) y Thermosac (Lallemand Specialties Inc., USA).
 - ✓ Pocas bacterias fermentar azúcares a etanol cumpliendo estas condiciones. Una bacteria conocida por su alto rendimiento y productividad de etanol es **Zymomonas mobilis**, que fermenta glucosa, sacarosa y fructosa

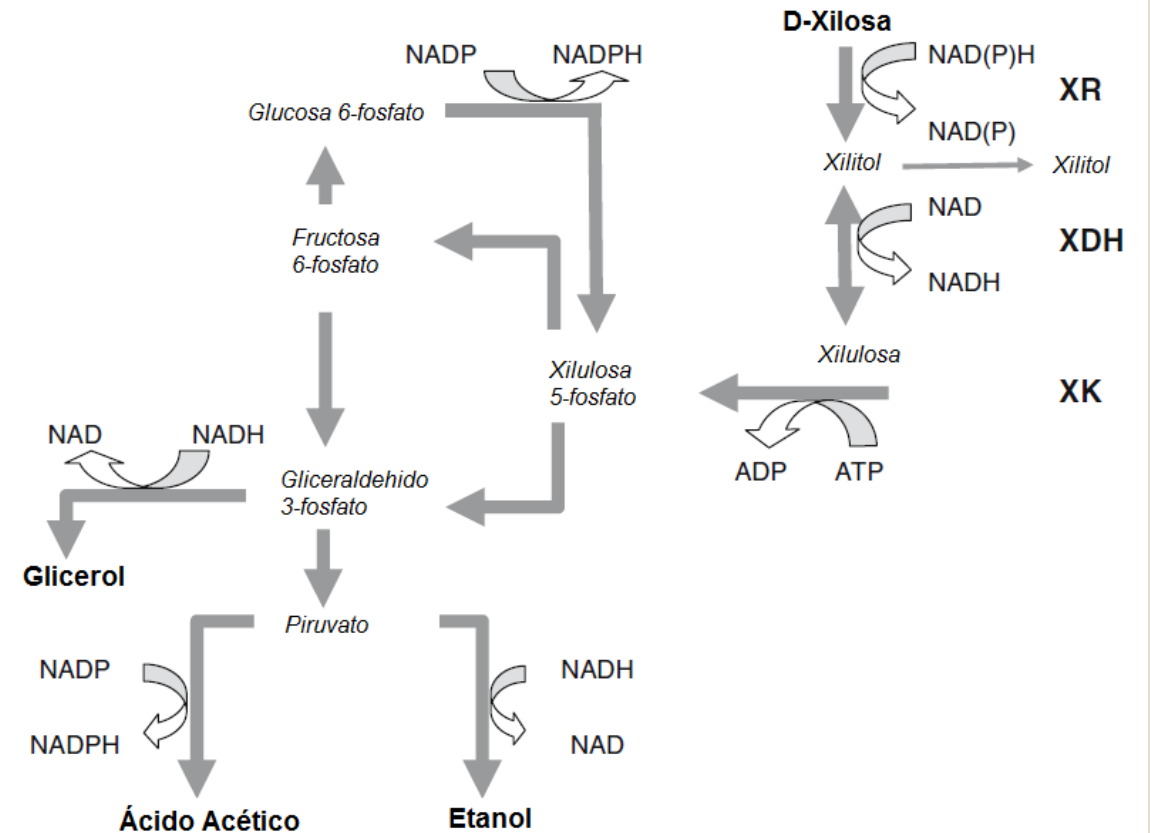
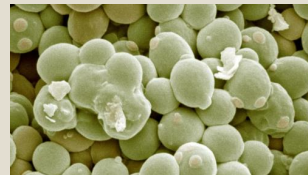
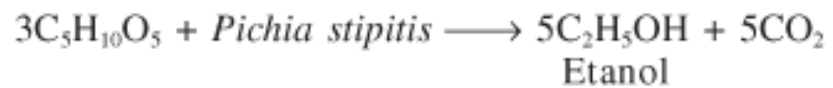
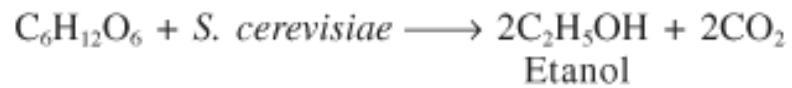
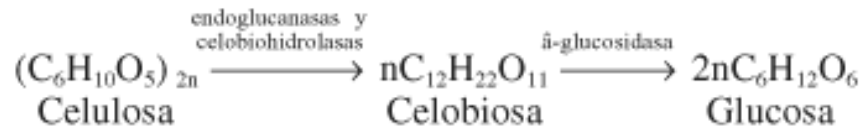
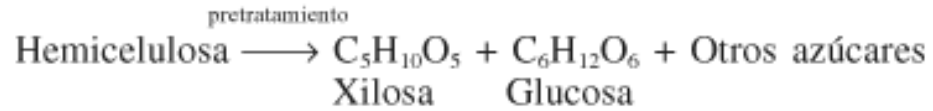


Fermentación

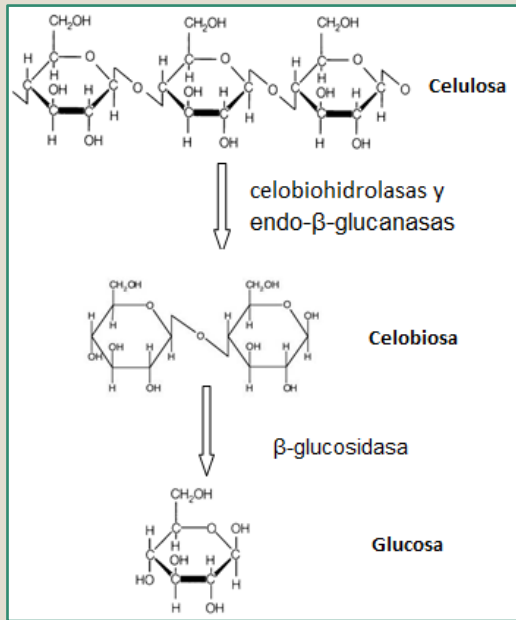
- La fermentación o **metabolismo fermentativo** es un proceso catabólico de **oxidación incompleta**, que no requiere oxígeno (**anaeróbico**), y cuyo producto final es un compuesto orgánico.
- Estrategia usada por el microorganismo para obtener **energía**.
- La fermentación consiste en un proceso de glucólisis y que al carecer de oxígeno como receptor de los electrones sobrantes del NADH producido, emplea para ello una sustancia orgánica que deberá reducirse para **reoxidar el NADH a NAD⁺**, obteniendo finalmente un derivado del sustrato inicial que se oxida.
- De acuerdo a la **sustancia obtenida** al final del **proceso de fermentación**, podemos clasificarlo en:
 - ✓ Fermentación alcohólica
 - ✓ Fermentación láctica
 - ✓ Fermentación acética
 - ✓ Fermentación butírica
 - ✓ Fermentación butanodiólica
 - ✓ Fermentación propiónica



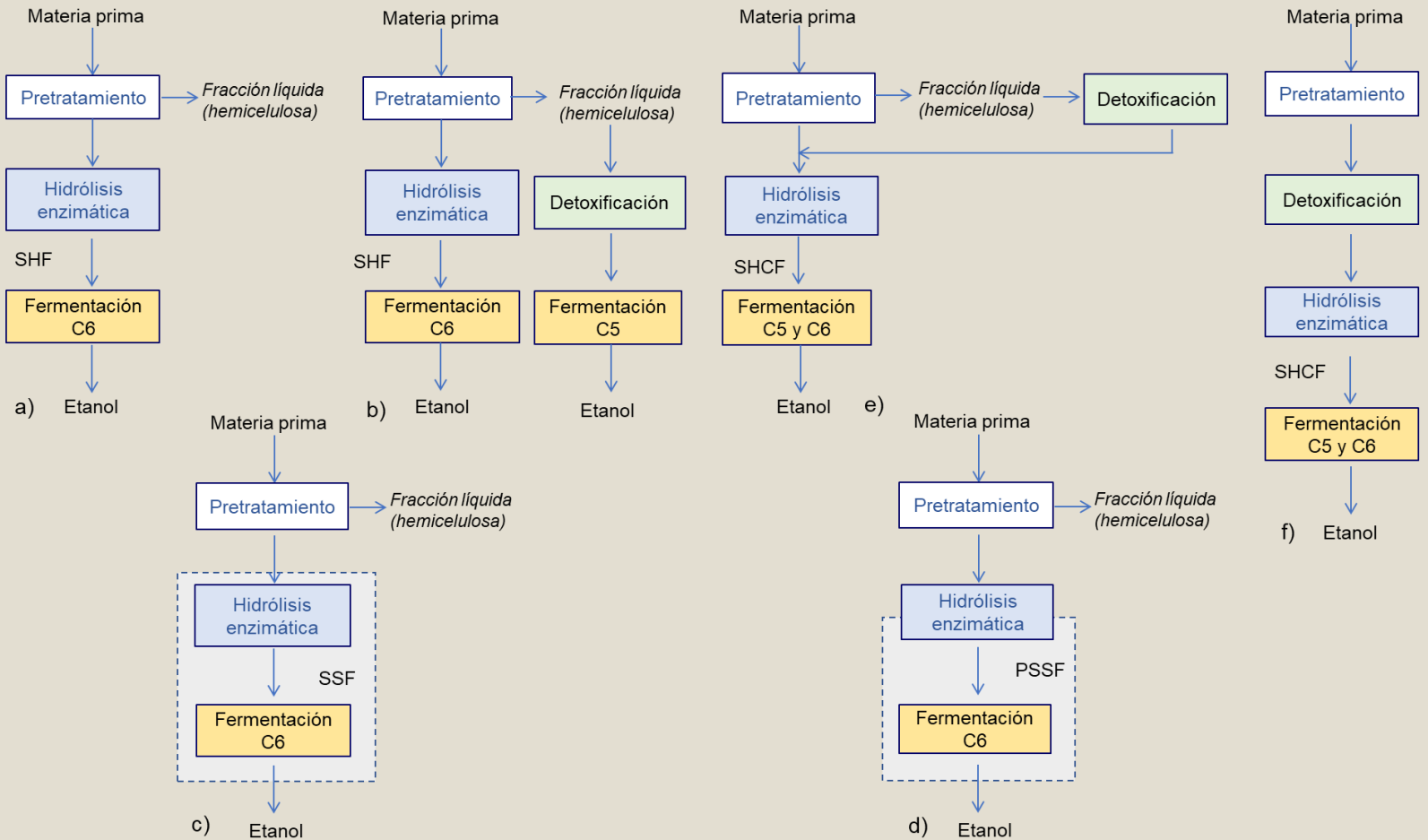
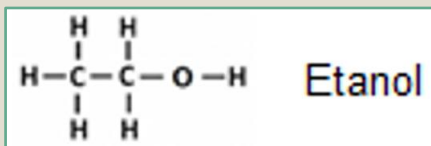
Hidrólisis enzimática – Estrategias de sacarificación y fermentación



Hidrólisis enzimática – Estrategias de sacarificación y fermentación

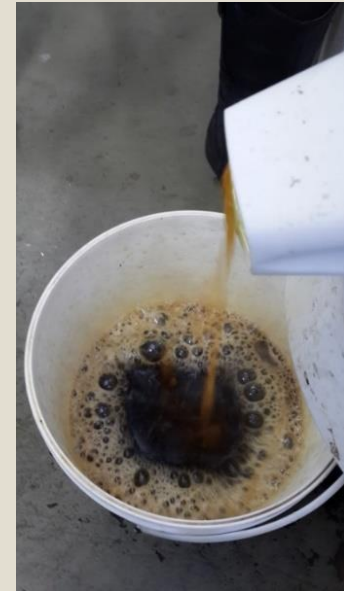


Microorganismo

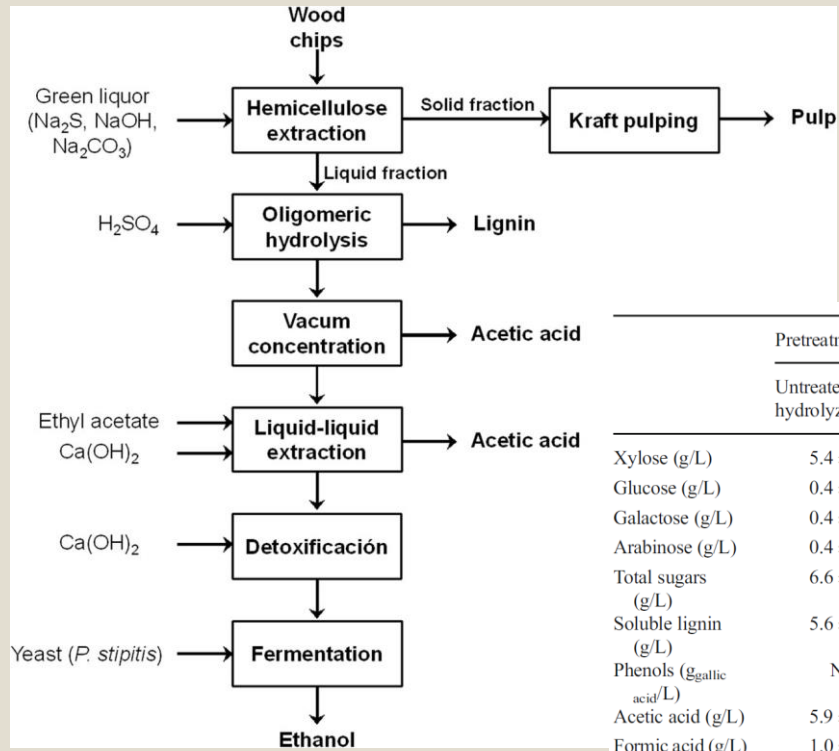


Detoxificación de hidrolizados

- El método empleado para detoxificar depende de la tolerancia del microorganismo a utilizar
- La **detoxificación** de los **hidrolizados**:
 - ✓ requiere equipos adicionales
 - ✓ produce residuos
 - ✓ Se producen pérdidas de azúcares
- **Métodos** de detoxificación:
 - ✓ Biológicos (laccasa)
 - ✓ Físicos: evaporación
 - ✓ Químicos: carbón activado, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, acetato de etilo



Detoxificación de hidrolizados



	Pretreatment		
	Untreated hydrolyzate	Concentrated hydrolyzate	Concentrated hydrolyzate after ethyl acetate extraction
Xylose (g/L)	5.4 ± 0.1	39.0 ± 0.8	37.2 ± 0.6
Glucose (g/L)	0.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1
Galactose (g/L)	0.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1
Arabinose (g/L)	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Total sugars (g/L)	6.6 ± 0.4	45.1 ± 1.0	43.2 ± 1.0
Soluble lignin (g/L)	5.6 ± 0.1	19.3 ± 0.1	11.4 ± 0.1
Phenols (g _{gallic acid} /L)	ND	2.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Acetic acid (g/L)	5.9 ± 0.1	13.5 ± 0.3	4.6 ± 0.1
Formic acid (g/L)	1.0 ± 0.1	4.5 ± 0.5	2.7 ± 0.3

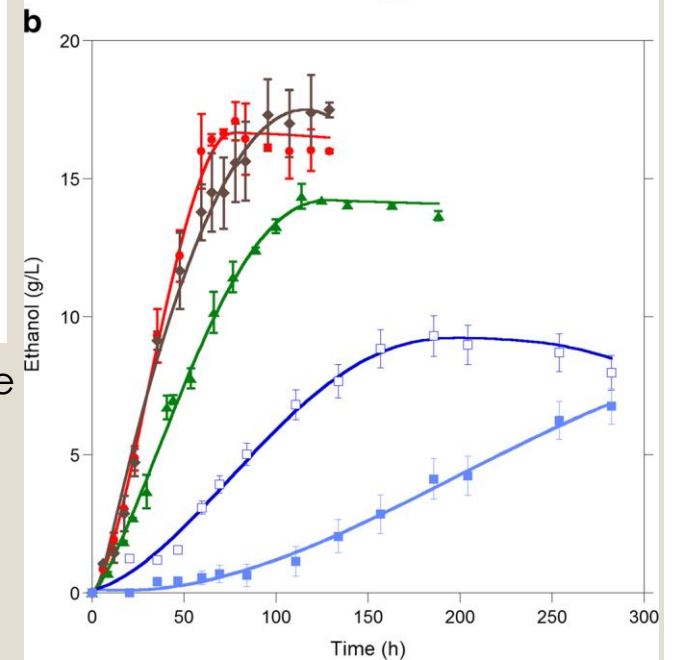
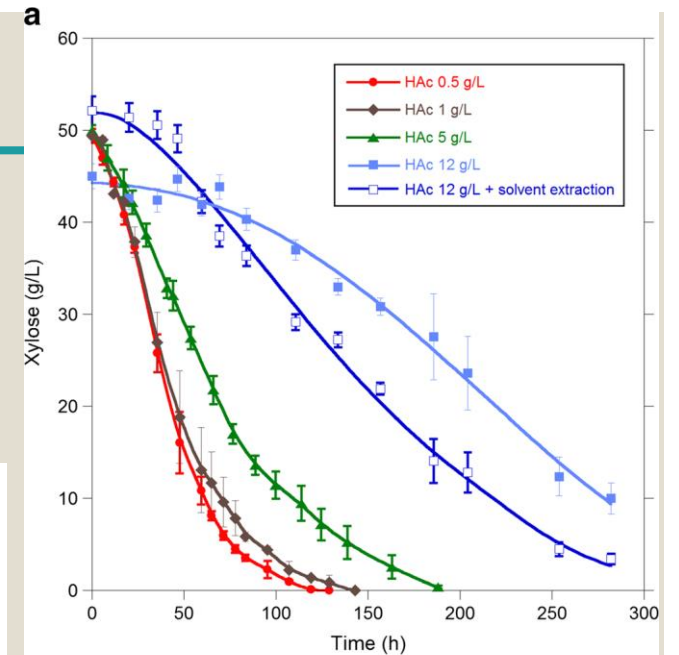
Mannose was not detected
 ND not detected

liquid liquid extraction with ethyl acetate in a single stage: solvent to hydrolyzate ratio of 3 (v/v), pH 2.5 ± 0.1, room temperature.

Biomass Conv. Brief.
 DOI 10.1007/s13399-016-0218-6
 ORIGINAL ARTICLE

Bioethanol production from *Eucalyptus grandis* hemicellulose recovered before kraft pulping using an integrated biorefinery concept

Mairan D. Guignon¹ · Florencia Cebreiros¹ · María N. Cabrera² · Mario D. Ferrari¹ · Claudia Larco¹



Fermentación

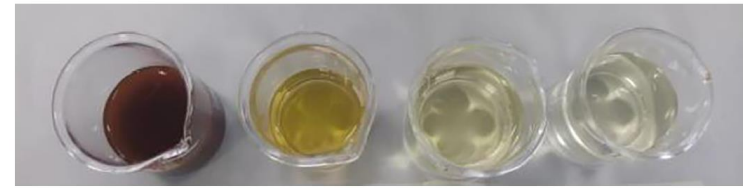
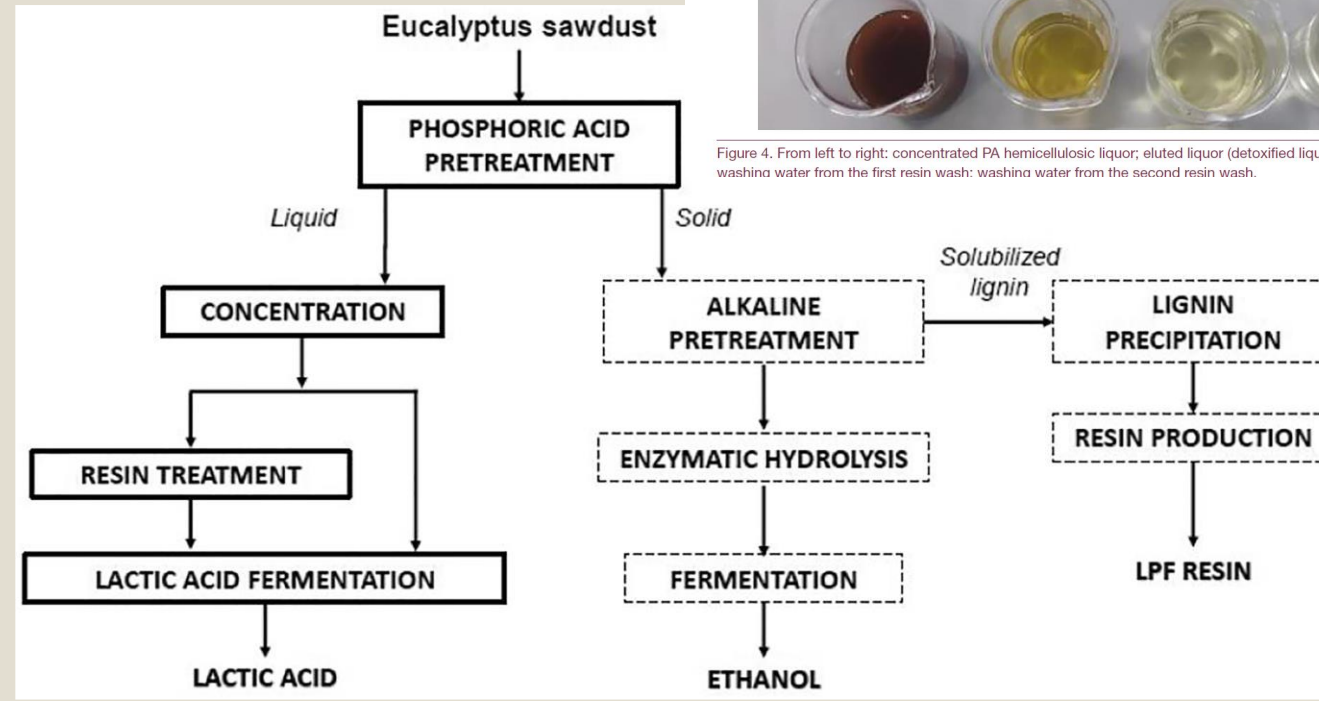


Figure 4. From left to right: concentrated PA hemicellulosic liquor; eluted liquor (detoxified liquor) from XAD-4 resin (3:1); washing water from the first resin wash; washing water from the second resin wash.

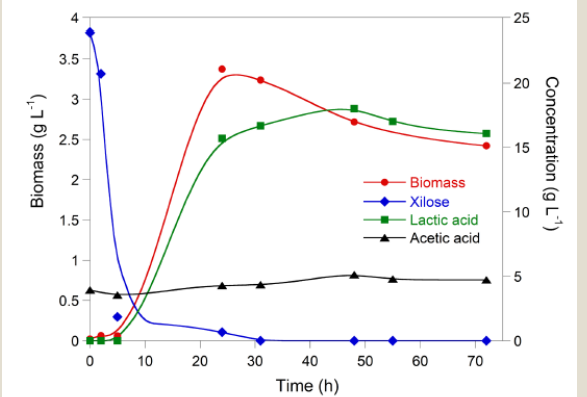
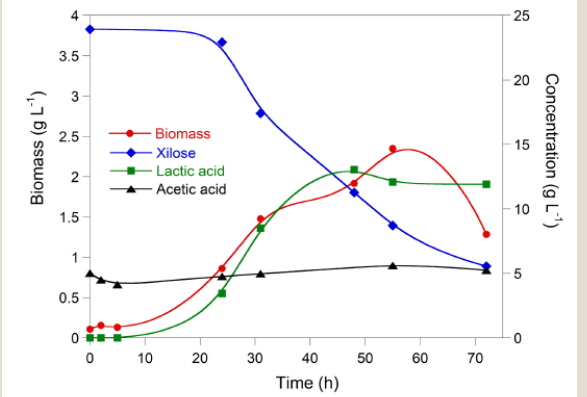
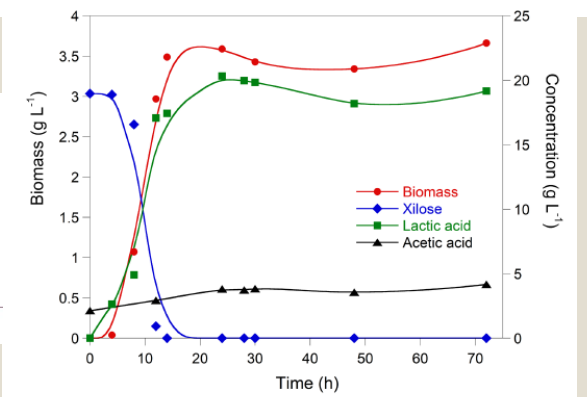


Figure 5. Biomass, xylose, L-lactic acid, and acetic acid concentrations profile during fermentation of *W. coagulans* DSM 2314 in bioreactor at 55 °C, pH7, 150rpm under anaerobiosis in (a) XMRS media, (b) concentrated nondetoxified liquor-based media, and (c) concentrated detoxified liquor-based media.

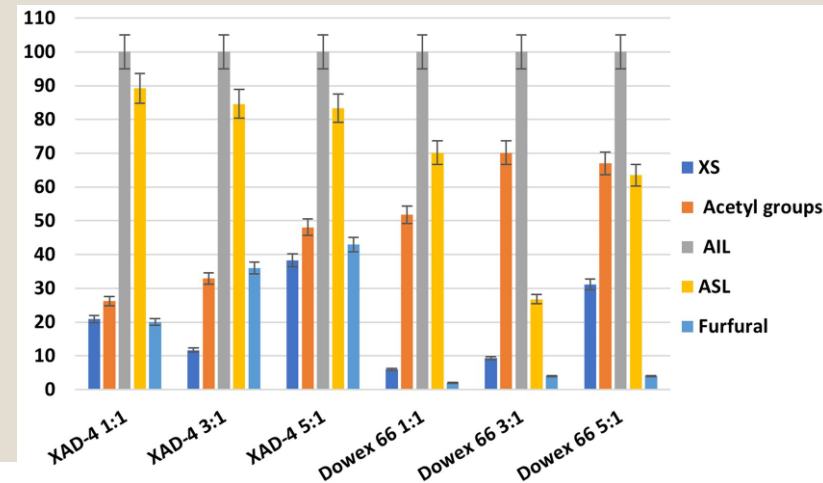
Original Article



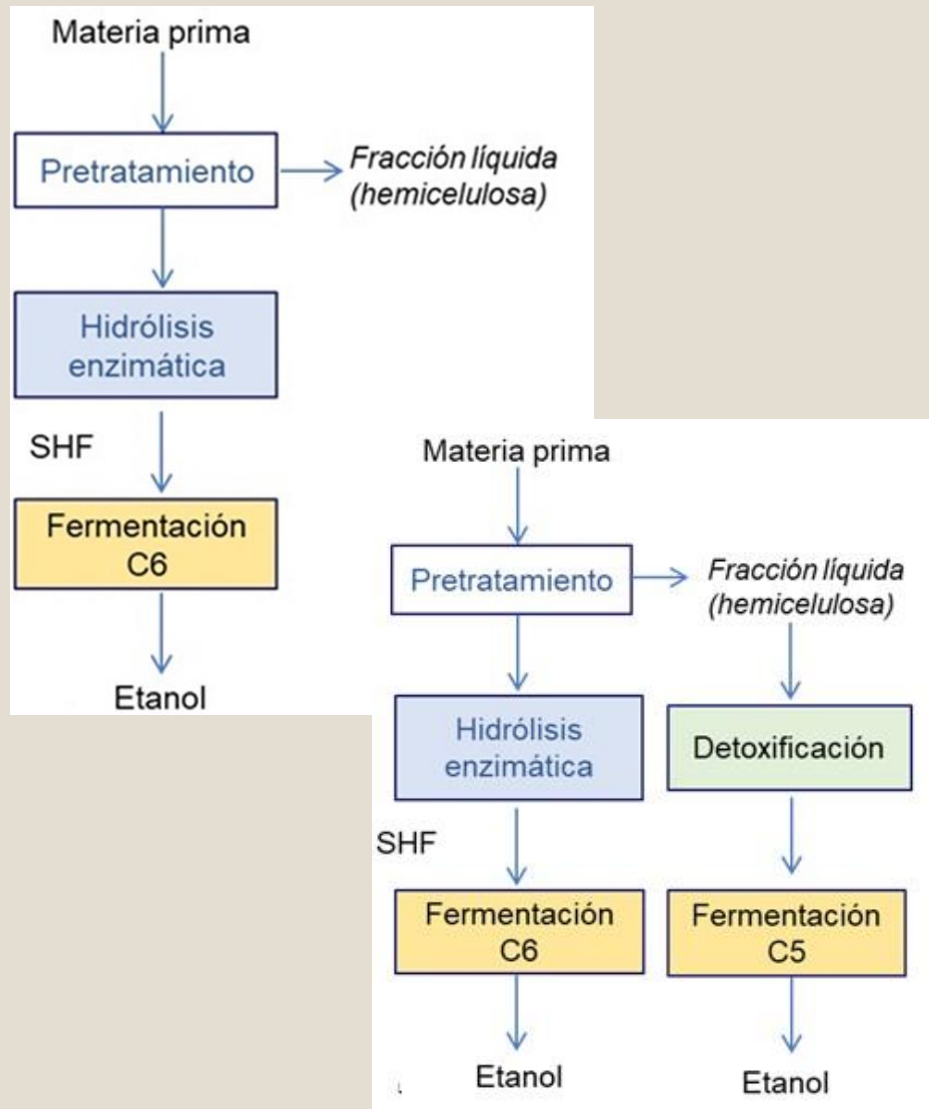
Purification of xylosaccharides from eucalyptus residues for L-lactic acid production by *Weizmannia coagulans*

Maria-Noel Cabrera, Forest Processes Engineering Group, Chemical Engineering Institute, Faculty of Engineering, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
 Eugenia Vila, Alberto Liguori, Bioprocess Engineering Department, Chemical Engineering Institute, Faculty of Engineering, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
 Constanza D'Andrade, Forest Processes Engineering Group, Chemical Engineering Institute, Faculty of Engineering, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
 Santiago Moure, Forest Processes Engineering Group, Chemical Engineering Institute, Faculty of Engineering, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, Bioprocess Engineering Department, Chemical Engineering Institute, Faculty of Engineering, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
 Mairan Guigou, Florencia Cebreiros, Bioprocess Engineering Department, Chemical Engineering Institute, Faculty of Engineering, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
 Juan Martín Rodao, Forest Processes Engineering Group, Chemical Engineering Institute, Faculty of Engineering, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
 Laura Cameasca, Mario Daniel Ferrari, Claudia Laro, Bioprocess Engineering Department, Chemical Engineering Institute, Faculty of Engineering, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Received April 19 2024; Revised June 9 2024; Accepted June 14 2024;
 View online at Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com);
 DOI: 10.1002/bbb.2662; Biofuels, Bioprod. Bioref. (2024)

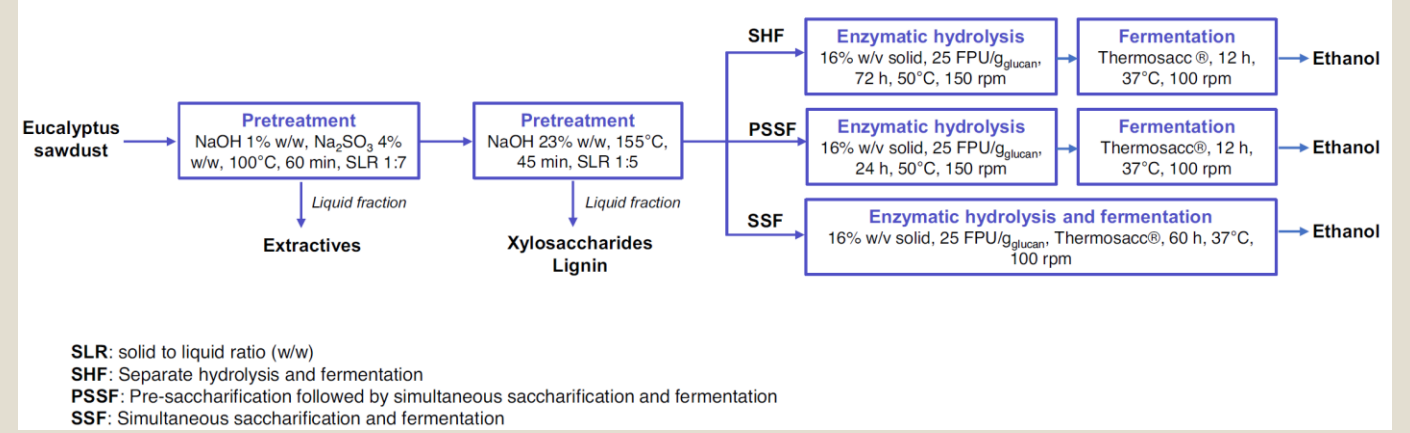


Hidrólisis enzimática – Estrategias de sacarificación y fermentación



- **SHF** (Separate Hydrolysis and Fermentation): **Hidrólisis enzimática y fermentación** se dan en forma consecutivas y separadas
- EL sustrato celulósico se **hidroliza** a glucosa a temperaturas cercanas a **50°C** con agitación continua y luego se filtra para separar los sólidos suspendidos.
- Se **fermenta** a **(30 - 32°C)** si se trabaja con levaduras.
- **Ventaja:** ambas etapas (sacarificación y fermentación) se realizan a temperatura y agitación óptimas.
- **Desventajas:** mayor tiempo de producción, puede ocurrir inhibición debido a altas concentraciones de glucosa cuando se trabaja con altas cargas de sólidos.

Hidrólisis enzimática – Estrategias de sacarificación y fermentación



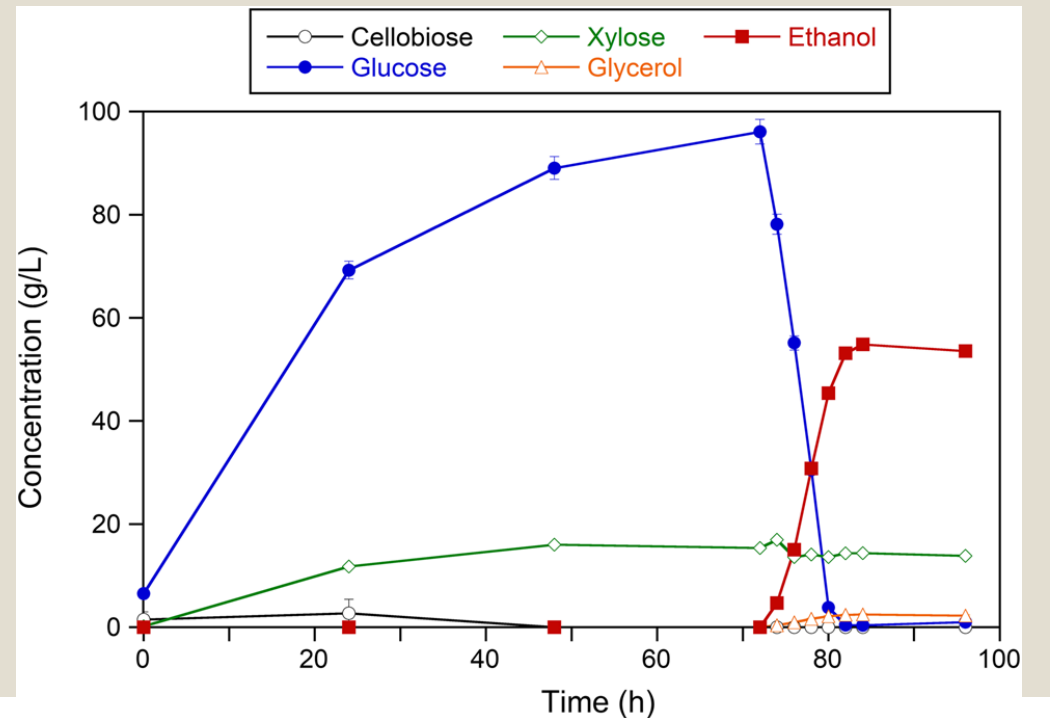
BioEnergy Research
<https://doi.org/10.1007/s12155-023-10619-1>



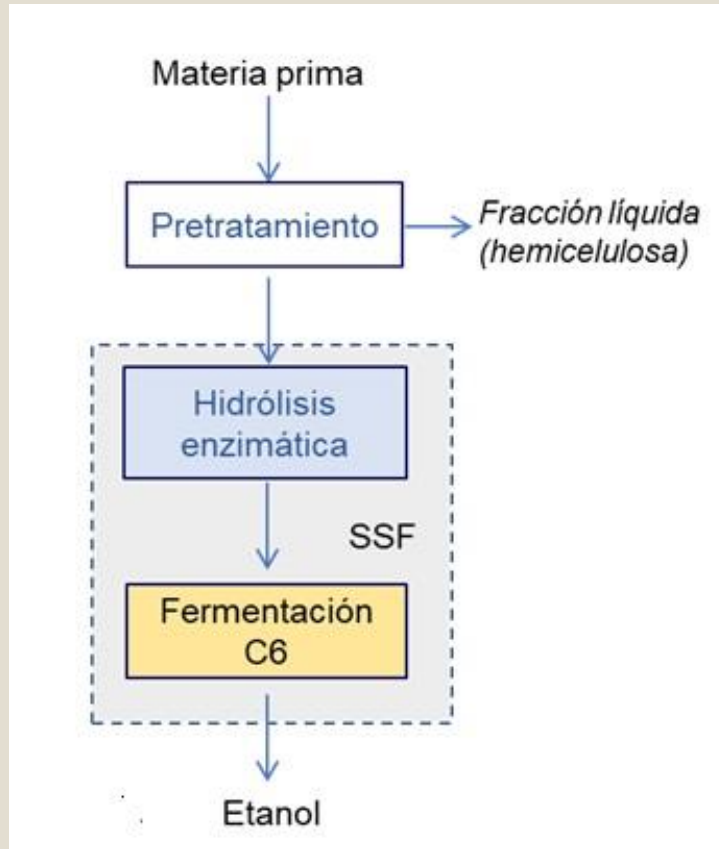
Ethanol Production from Eucalyptus Sawdust Following Sequential Alkaline Thermochemical Pretreatment with Recovery of Extractives

M. Guigou¹ · S. Moure^{1,2} · F. Bermúdez² · L. Clavijo² · M. N. Cabrera² · L. Xavier³ · M. D. Ferrari¹ · C. Lareo¹

Received: 29 December 2022 / Accepted: 23 May 2023

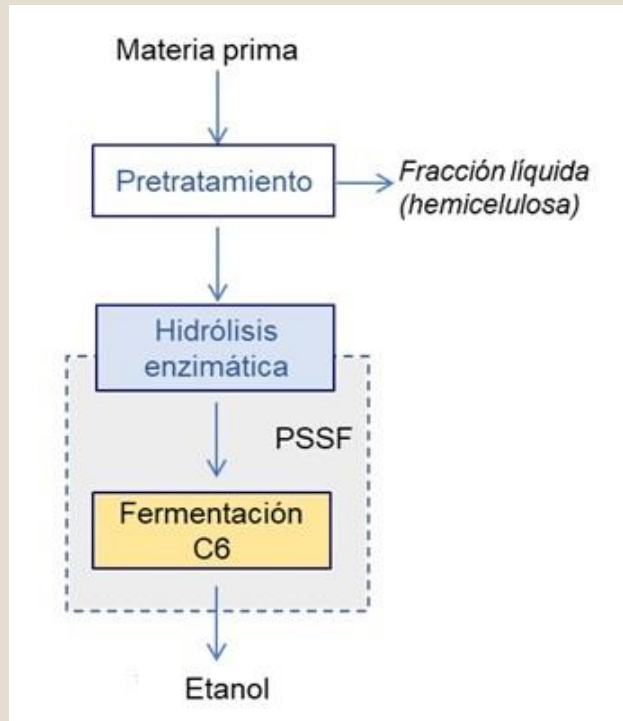


Hidrólisis enzimática – Estrategias de sacarificación y fermentación



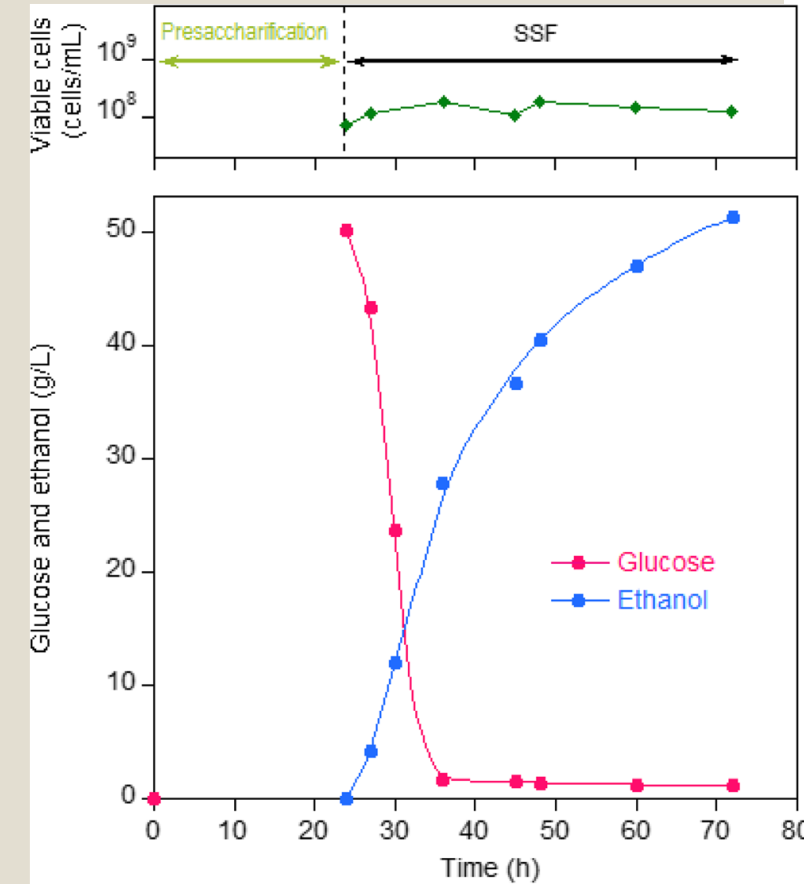
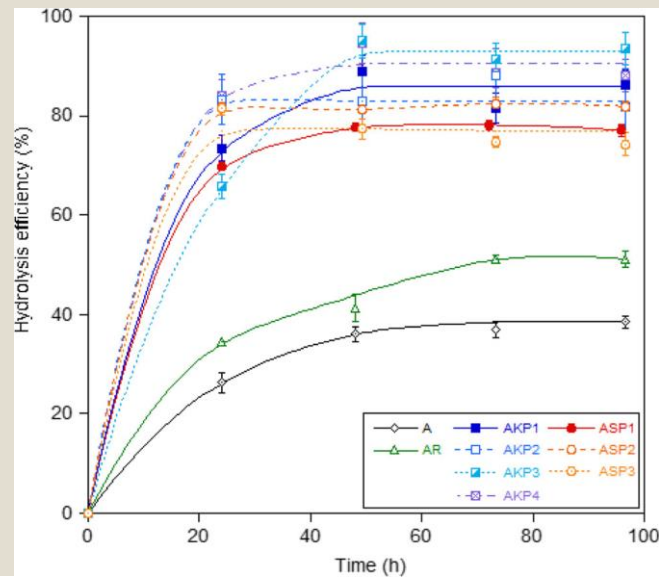
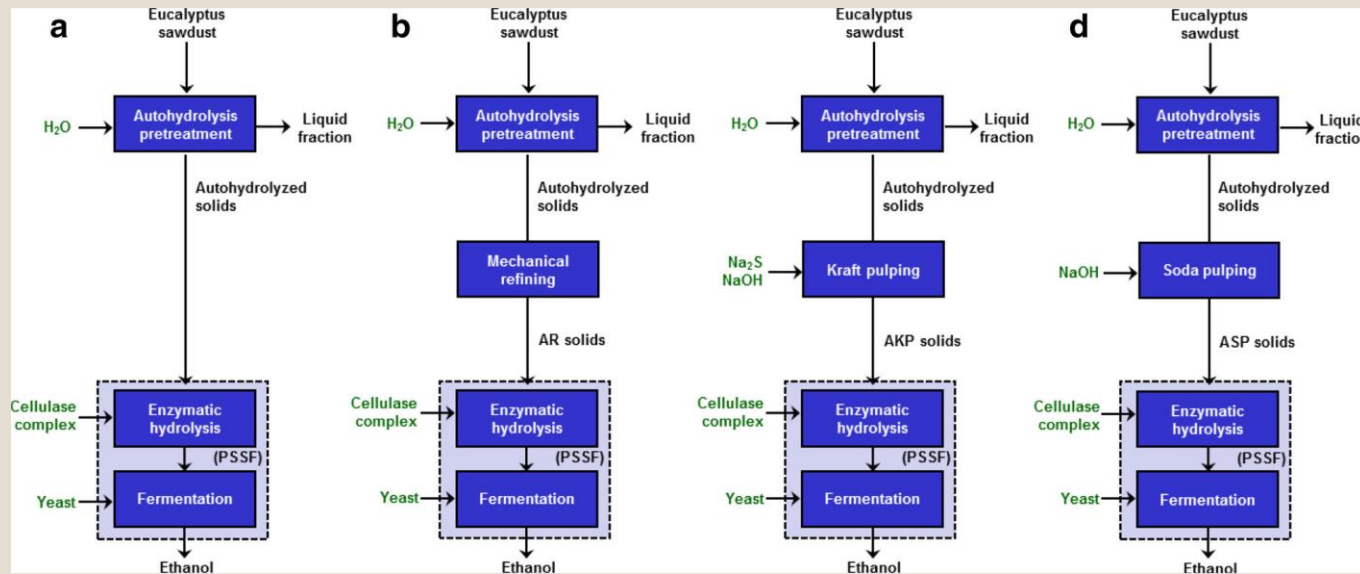
- **SSF** (Simultaneous Saccharification and Fermentation): **sacarificación y fermentación se realiza en una sola etapa**
- En la modalidad SSF, se debe lograr un compromiso entre las condiciones óptimas de hidrólisis y fermentación.
- **Ventajas:** bajan los costos y los riesgos de contaminación por usar un solo reactor y disminuyen gastos energéticos al trabajar a una inferior temperatura y aprovechar el calor metabólico liberado por los microorganismos al fermentar. Minimiza la inhibición por producto de la hidrólisis y aumenta la productividad
- **Desventajas:** No se trabaja en condiciones óptimas

Hidrólisis enzimática – Estrategias de sacarificación y fermentación



- **PSSF:** se realiza la **hidrólisis enzimática** durante un **tiempo corto** y luego se inocula el microorganismo, para **continuar** con la **sacarificación y fermentación en forma simultánea**.
- El tiempo de hidrólisis enzimática en óptimas condiciones, depende del material y el pretratamiento realizado, generalmente son entre 12 y 48 h
- **Ventajas:** fluidificación previa de la mezcla sólido – líquido que favorece el manejo industrial y la inoculación. Aumenta productividad respecto a SSF

Hidrólisis enzimática – Estrategias de sacarificación y fermentación



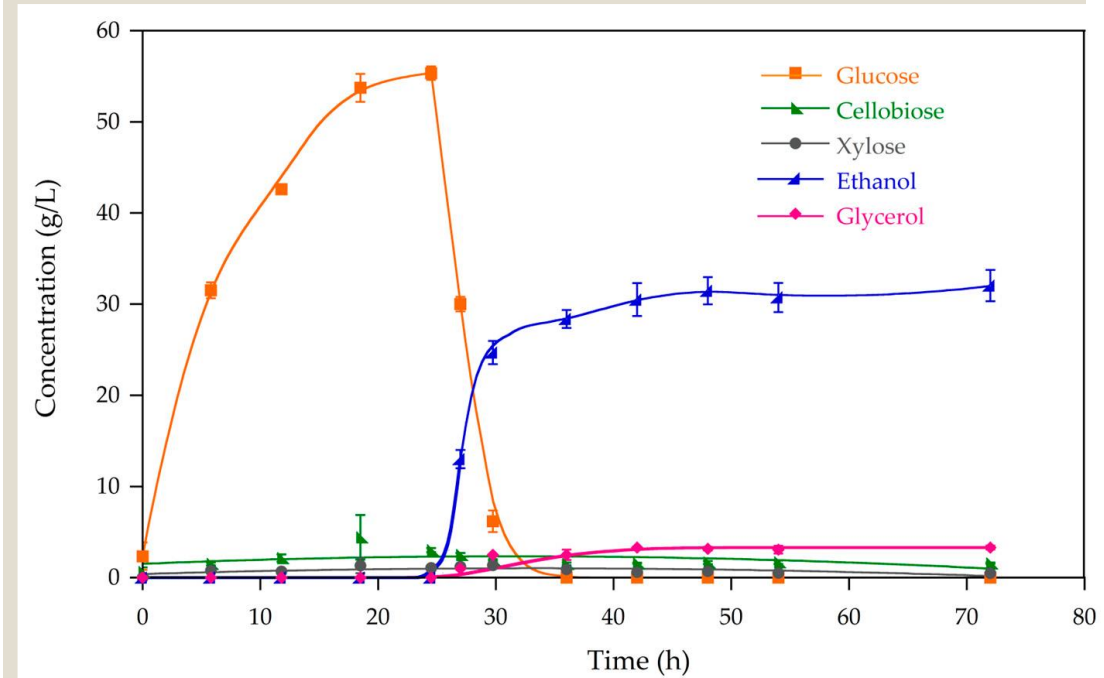
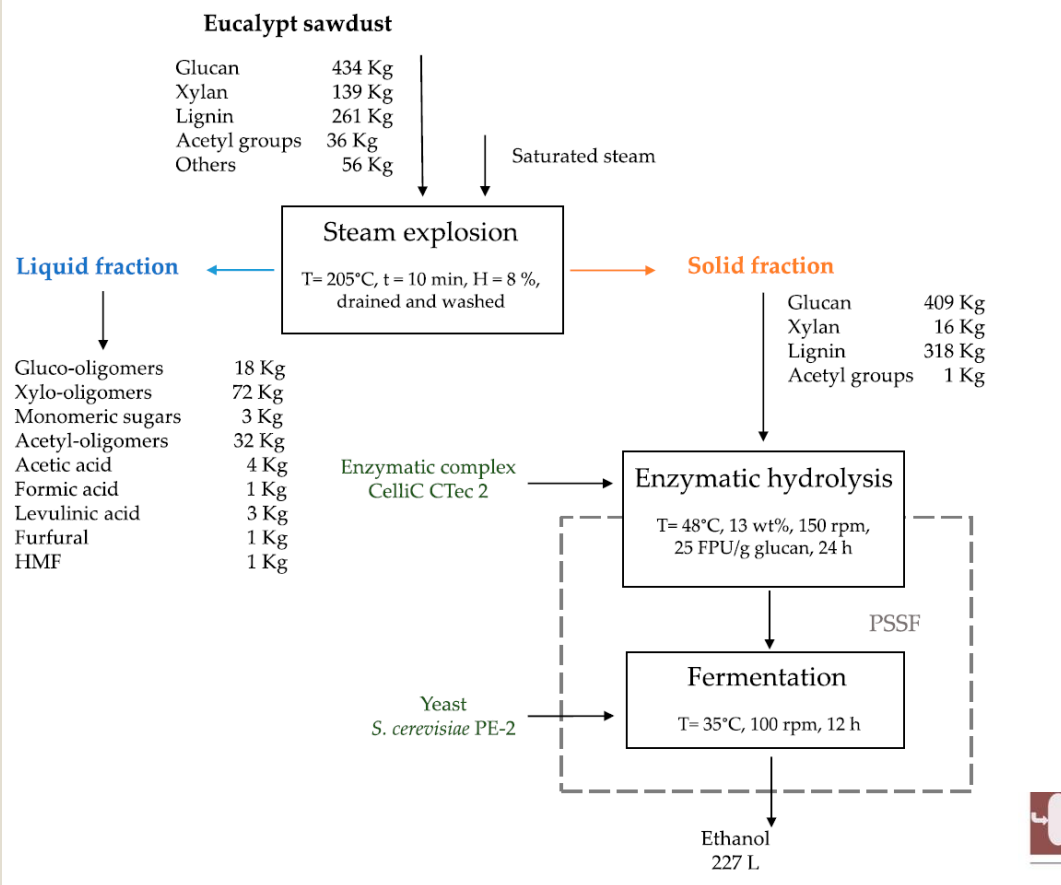
Combined pretreatments of eucalyptus sawdust for ethanol production within a biorefinery approach

**Mairan Guigou, María Noel Cabrera,
Mauricio Vique, Melissa Bariani,
Juan Guarino, Mario Daniel Ferrari &
Claudia Lareo**

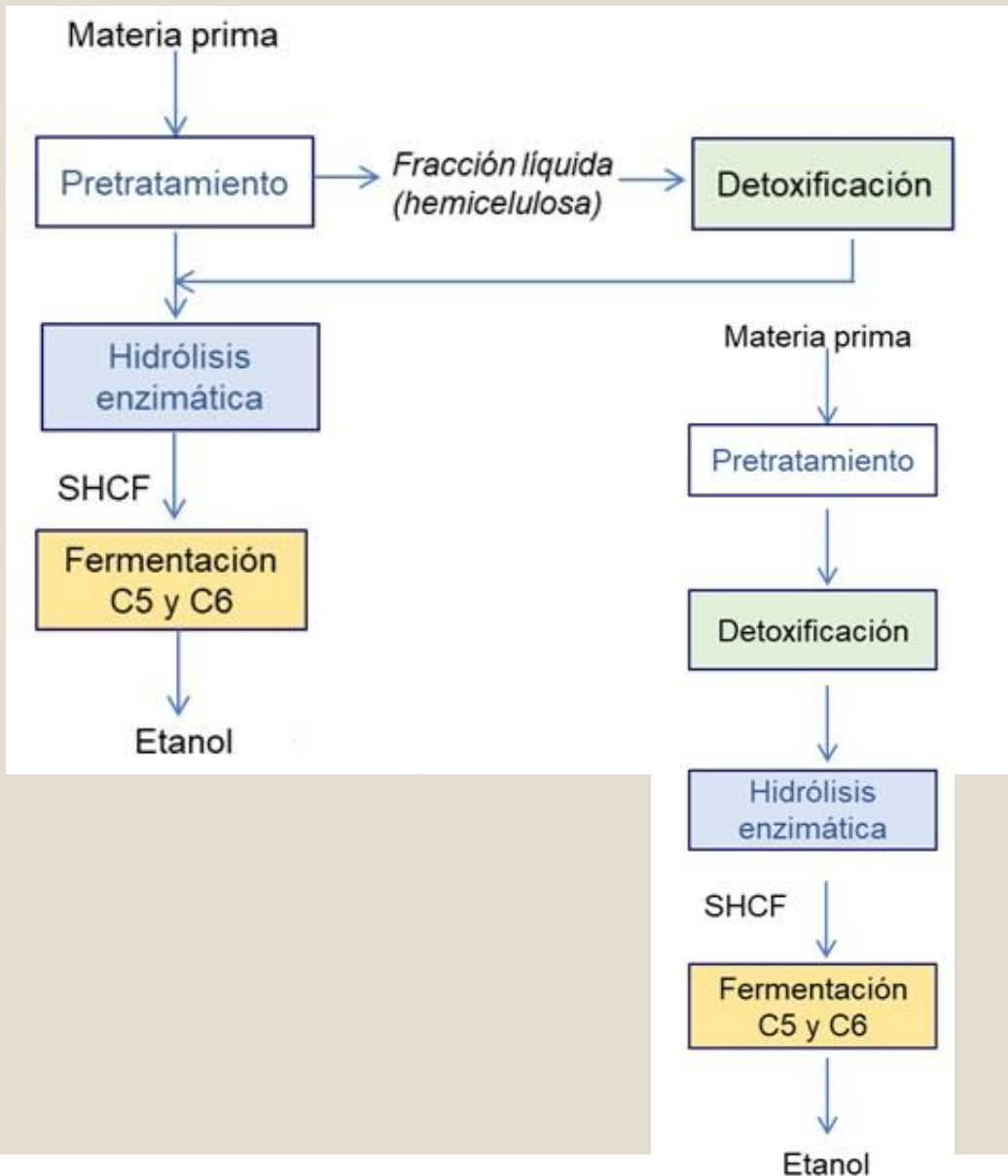
Biomass Conversion and Biorefinery
Processing of Biogenic Material for
Energy and Chemistry
ISSN 2190-6815
Biomass Conv. Bioref.
DOI 10.1007/s13399-018-0353-3



Hidrólisis enzimática – Estrategias de sacarificación y fermentación



Hidrólisis enzimática – Estrategias de sacarificación y fermentación



- **SHCF: presacarificación y co-fermentación**, donde en una primera etapa se da la **hidrólisis enzimática** y luego en la **fermentación** se utiliza un **microorganismo** que puede **co-fermentar** los azúcares **C5 y C6**.
- **Ventajas:** se incrementan los rendimientos de etanol al convertir tanto pentosas como hexosas a etanol simultáneamente.

Empresa	Ubicación	Capacidad (m ³ _{ETOH} /año)	Materia prima	Tecnología	Co-productos	Estado actual	Referencia
Chempolis	Finlandia	6300	Residuo de madera, paja, bagazo	formico®-technology	- Papel, - furfural, - HAC; ácido fórmico, - lignina libre de sulfuro, - xilosa	Operativa	https://chempolis.com/technologies-solutions/
Clariant	Alemania	1270	Paja de trigo, rastrojo de maíz, bagazo de caña	Tecnología sunliquid, fermentación C5 y C6		Operativa	https://www.chemicals-technology.com/projects/sud-chemie-ethanol/
Borregaard	Noruega	20000	Bagazo de caña, paja, madera, cultivos energéticos	Pretratamiento ácido con bisulfito de calcio	- Celulosa, - lignina - vainillina	Operativa	https://www.etipbioenergy.eu/images/Factsheet_Borregaard_final.pdf
GranBio	Brasil	60000	Bagazo de caña	Tecnología GP+ (termomecánica) y AVAP (usa SO ₂ y etanol)		Operativa	http://www.granbio.com.br/conteudos/bioflex-biocombustiveis/
New Energy Blue	EEUU	75780	Paja de trigo, tallos de maíz, bagazo de azúcar	Explosión con vapor	- Pellets de lignina para quemar - Melaza C5 para alimentación de ganado - Xilitol	Arranca 2026	http://ethanolproducer.com/articles/16437/new-energy-blue-buys-inbicons-low-carbon-fuel-technology https://newenergyblue.com/projects/
Grupo Anhui Guozhen y Chemtex	China	126750	Paja de trigo, rastrojo de maíz	Tecnología sunliquid, fermentación C5 y C6		En construcción	http://sugar-asia.com/china-achieves-commercial-cellulosic-ethanol-plants-with-global-technology/