



Evaluación de pre-tratamientos biológicos y térmicos previos a la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma, para la producción de azúcares fermentables

Ing. Qca. Lilia Carolina Rojas Pérez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá D.C., Colombia

2011

Evaluación de pre-tratamientos biológicos y térmicos previos a la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma, para la producción de azúcares fermentables

Ing. Qca. Lilia Carolina Rojas Pérez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería Química

Director:
Ing. Qco. M. Sc. D. Eng. Mario Enrique Velásquez Lozano

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Bogotá D.C., Colombia

2011

A Dios, a mi mamá y a mi familia;
porque son mi roca y mi fortaleza.

Agradecimientos

Al proyecto “Hidrólisis de residuos lignocelulósicos derivados de la explotación de la palma de aceite hasta azúcares fermentables” financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS y ejecutado por la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá en convenio con la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

A Colciencias y el programa Jóvenes Investigadores e Innovadores Virginia Gutiérrez de Pineda año 2009.

A Yineth Piñeros, mi codirectora, una mujer excepcional y una profesional integral, gracias por su apoyo, dedicación y amistad.

A Mario Enrique Velásquez Lozano, director del presente proyecto por su apoyo y orientaciones académicas.

A la Universidad Nacional de Colombia y a la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

Al investigador Ignacio Ballesteros Perdices del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas “CIEMAT” porque en tan solo dos semanas con su amabilidad me aclaro conceptos importantísimos para llevar a buen término esta investigación.

Resumen

La industria de palma de aceite en Colombia, primera en producción en Latino América y cuarta a nivel mundial, genera cerca de 11,6 a 15% de fibra prensada respecto a la carga inicial de los frutos procesados, residuo que presenta una estructura compleja compuesta de lignina, hemicelulosa y celulosa; haciéndolo susceptible de ser procesado para la obtención de diversos productos biotecnológicos de alto valor agregado. En este trabajo se evaluaron los ensayos para la obtención de azúcares fermentables a partir de la fibra prensada de palma, realizando un pre-tratamiento biológico en combinación con agua caliente. En el primero de ellos se evaluó la fermentación en estado sólido del hongo *P. ostreatus* en medio de cultivo Kirk a la cuarta semana de tratamiento y en el segundo pre-tratamiento se evaluó un diseño de superficie de respuesta variando la temperatura, tiempo y carga-concentración de sólidos; encontrándose un punto máximo a los 213° C, 1.6 min y 3.3 g de sólidos/100 mL de solución, para la producción de azúcares fermentables (glucosa más xilosa) obtenidos tanto en la fracción sólida como líquida. Después se evaluó la combinación de estos dos pre-tratamientos encontrándose: un porcentaje de sacarificación de 55,4 gramos de glucosa en la hidrólisis enzimática/100 gramos de glucosa potencial en la fibra pre-tratada y el parámetro más relevante: el rendimiento global de azúcares fermentables de 37,8 gramos/100 gramos de materia prima; los resultados hallados ratifican el potencial de este residuo para la producción de azúcares aplicando la combinación de los dos pre-tratamientos: biológico seguido por agua caliente, los cuales presentan ventajas ambientales y económicas.

Palabras clave: fibra prensada de palma, pre-tratamiento biológico, pre-tratamiento agua caliente, hidrólisis enzimática, azúcares fermentables.

Abstract

The oil palm industry in Colombia, first in production in Latin America and fourth worldwide, generates about 11.6 to 15% of wallboard over the initial load of processed fruits, this residue has a complex structure lignin, hemicellulose, cellulose and is liable to be prosecuted for obtaining various biotech products with high added value. In this work we assessed the trials for obtaining fermentable sugars from palm pressed fiber, making a pre-biological treatment in combination with hot water. In the first of which was evaluated in solid state fermentation of the fungus *P. ostreatus* in culture medium Kirk to the fourth week of treatment and the second pre-treatment was assessed a response surface design by varying the temperature, time and load-solids concentration, finding a peak at 213 ° C, 1.6 min and 3.3 g of solids/100 mL of solution, maximizing the production of fermentable sugars (glucose plus xylose) obtained in both solid and liquid fraction. Then evaluated the combination of these two pre-treatments were found: a percentage of saccharification of 55.4 grams of glucose in the hydrolysis enzymatic of glucose/100 grams fiber potential in pre-treated and the most important parameter, the overall yield of fermentable sugars as 37.8 grams/100 grams of raw material on the findings confirm the potential of this residue for the production of sugars using a combination of the two treatments: biological, followed by hot water, which have environmental benefits and economic.

Keywords: palm press fiber, biological treatment, liquid hot water treatment, enzymatic hydrolysis, fermentable sugars.

CONTENIDO

Resumen	3
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES.....	15
2.1 Palma de aceite.....	15
2.2 Fibra prensada de palma	17
2.3 Materiales celulósicos.....	19
2.3.1 Celulosa.....	20
2.3.2 Hemicelulosa	22
2.3.3 Lignina.....	24
2.4 Descripción del proceso de producción de azúcares fermentables a partir de lignocelulósicos.....	26
2.5 Pre-tratamientos.....	27
2.5.1 Pre-tratamientos térmicos	28
2.5.1.1 Pre-tratamiento con agua caliente	29
2.5.2 Pre-tratamientos biológicos.....	31
2.5.2.1 Hongos de la podredumbre blanda.....	32
2.5.2.1.1 Hongos de la podredumbre parda.....	32
2.5.2.1.2 Hongos de la podredumbre blanca	32
2.5.2.2 Fermentación en estado sólido (FES).....	33
2.6 Hidrólisis enzimática (HE).....	33
2.6.1 Tipo de sustratos.....	35
2.6.2 Actividad celulasa.....	35
2.6.3 Inhibición de la actividad celulasa por el producto-final	35
2.7 Inhibidores del proceso de crecimiento de microorganismos	36
2.8 Aplicaciones industriales de los residuos lignocelulósicos.	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1 Materia prima.....	40
3.2 Caracterización.....	40
3.2.1 Extraíbles o extractivos.....	41

3.2.2	Lignina.....	42
3.2.3	Cenizas	42
3.2.4	Carbohidratos estructurales	43
3.3	Pre-tratamiento con agua caliente.....	43
3.3.1	Esquema del pre-tratamiento con agua caliente.....	43
3.3.2	Diseño experimental para el pre-tratamiento con agua caliente	45
3.4	Pre-tratamiento biológico.....	45
3.4.1	Ensayo preliminar pre-tratamiento biológico	45
3.4.2	Pre-tratamiento biológico variando la relación C/N	48
3.5	Hidrólisis enzimática (HE).....	49
3.6	Cuantificación de inhibidores de fermentación.....	49
3.6.1	Ácido acético.....	49
3.6.2	Derivados del furano y compuestos fenólicos	50
3.7	Cuantificación de azúcares reductores.....	50
3.8	Cuantificación de sólidos solubles y pH, después del pre-tratamiento con agua caliente	51
3.9	Caracterización y cuantificación líquido post-hidrólisis (hidrolizado ácido-HA).....	51
4.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	52
4.1	Caracterización de la materia prima.....	52
4.2	Análisis elemental.....	53
4.3	Pre-tratamiento con agua caliente.....	54
4.3.1	Fracción líquida: caracterización de sólidos solubles y pH.....	54
4.3.2	Fracción sólida: caracterización del material pre-tratado	55
4.3.3	Caracterización del hidrolizado ácido (HA).....	56
4.3.4	Porcentaje de sacarificación, rendimiento y rendimiento global	57
4.3.4.1	De glucosa	57
4.3.4.2	De xilosa	59
4.3.4.3	Rendimiento global de azúcares fermentables	60
4.3.5	Inhibidores de crecimiento de microorganismos.....	61
4.3.6	Análisis superficie de respuesta.....	62
4.3.6.1	Rendimiento global de azúcares	62
4.3.6.2	Rendimiento global de glucosa más Inhibidores de crecimiento de microorganismos	64

4.4	Pre-tratamiento biológico.....	65
4.4.1	Ensayo preliminar	65
4.4.1.1	Caracterización del material pre-tratado.....	65
4.4.2	Porcentaje de sacarificación	67
4.4.2.1	Rendimiento de glucosa y xilosa	68
4.4.2.2	Rendimiento global de azúcares	70
4.4.3	Ensayo variando la relación C/N.....	71
4.4.3.1	Caracterización del material pre-tratado.....	71
4.4.3.2	Porcentaje de sacarificación	73
4.4.3.3	Rendimiento de glucosa y xilosa	73
4.4.3.4	Rendimiento global de azúcares fermentables	75
4.5	Combinación de pre-tratamiento agua caliente con biológico.....	75
5.	CONCLUSIONES.....	78
6.	RECOMENDACIONES.....	80
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	81
	Anexo I Determinación de lignina y carbohidratos estructurales (NREL).....	86
	Anexo II Ficha técnica Celluclast® 1.5L.....	102
	Anexo III Ficha técnica NS50010	104
	Anexo IV Determinación de azúcares reductores (Método DNS).....	112
	Anexo V Análisis elemental.....	114
	Anexo VI Análisis estadístico.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1 Diagrama esquemático de la extracción de aceite de palma. FFB: racimos de los frutos frescos, EFB: racimos de los frutos vacíos, PPF: fibra de palma prensada, PKS: cáscara del palmiste, PKC: torta de palmiste, PKO: aceite de palmiste (Gutiérrez et al., 2008 modificado)..... 16

Figura 2-2 Productos, sub-productos y residuos obtenidos durante el procesamiento del aceite de palma. Las formas con bordes continuos corresponden a las aplicaciones actuales de productos y subproductos. Las formas con bordes discontinuos corresponden a posibles aplicaciones. *Gasf*: gasificación, *Pyr*: pirólisis, *FPyr*: pirólisis rápida, *Comp*: compostaje, *SSF*: fermentación en estado sólido, *SRf*: reformado de vapor, 18

Figura 2-3 Estructura vegetal y composición de los residuos lignocelulósicos (Sánchez C., 2008, modificado)..... 19

Figura 2-4 Estructura básica de la celulosa. a) Composición de la cadena de celulosa. b) Disposición de las cadenas de celulosa, mostrando los puentes de hidrógeno inter e intramoleculares que estabilizan la estructura. (Lucas et al, 2001, pág. 16)..... 21

Figura 2-5 Organización de la celulosa observada a distintos niveles (Lucas et al, 2001, pág. 17)..... 22

Figura 2-6 Monómeros precursores de la molécula de lignina.....25

Figura 2-7 Principales grupos y tipos de enlaces presentes en la lignina. (Lucas et al, 2001, pág. 26) 26

Figura 2-8 Descripción esquemática del proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de materiales lignocelulósicos (Girio et al, 2010, modificado)..... 27

Figura 2-9 La elección del pre-tratamiento afecta a todas las operaciones relacionadas con la bio-refinería. Hecho que juega un papel central, porque el pre-tratamiento atañe al diseño y a la viabilidad económica de una biorefinería lignocelulósica (da Costa Sousa et al., 2009). 28

Figura 2-10 Rangos típicos para diferentes pre-tratamientos con agua como función de la temperatura y presión. (A) Auto hidrólisis, LHW; (B) Condiciones subcríticas; (C) Condiciones supercríticas. Líneas que representan el diagrama de fase para el agua. (Girio et al, 2010)..... 30

Figura 2-11 Representación esquemática de los sitios de actuación de las distintas enzimas celulolíticas, glucosa	34
Figura 2-12 Reacciones que ocurren durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Los derivados de los compuestos furanos y fenólicos pueden reaccionar a partir de algunos materiales poliméricos.....	37
Figura 2-13 Etapas generalizadas del proceso de bioconversión de residuos lignocelulósicos (Sánchez, 2008, modificado)	39
Figura 3-1 Fibra prensada de palma.....	40
Figura 3-2 Esquema metodológico para la realización de los extraíbles en soxhlet previo a caracterización del material	41
Figura 3-3 Montaje de Soxhlet para extracción con etanol	41
Figura 3-4 Esquema metodológico para la caracterización de lignina en la biomasa	42
Figura 3-5 Esquema metodológico para la caracterización de contenido de cenizas en la biomasa	42
Figura 3-6 Esquema metodológico para identificar las fracciones obtenidas después del pre-tratamiento con agua caliente	43
Figura 3-7 Esquema metodológico para la realización del pre-tratamiento con agua caliente	44
Figura 3-8 Esquema del reactor de alta presión empleado para el pre-tratamiento con agua caliente	44
Figura 3-9 Montaje para realizar el pre-tratamiento con agua caliente.....	44
Figura 3-10 Esquema metodológico para la realización del pre-tratamiento biológico....	46
Figura 3-11 Hongo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> esporulado luego de 6 días de incubación	46
Figura 3-12 Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> en semilla comercial	46
Figura 3-13 A Vista de una bolsa inoculada con semilla de <i>P. ostreatus</i> sobre fibra prensada de palma, después de 3 días de pre-tratamiento	47
Figura 3-13 B Vista de la fibra pre-tratada con <i>P. ostreatus</i> después de las cuatro semanas de tratamiento	48
Figura 3-13 C Vista de la fibra pre-tratada con <i>Phanerochaete chrysosporium</i> después de las cuatro semanas de tratamiento.....	48
Figura 3-14 Esquema metodológico para la realización de la hidrólisis enzimática	49

Figura 4-1	Gráfico de Probabilidad normal para Rendimiento Azúcares.....	63
Figura 4-2	Gráfico de Efectos principales para Rendimiento Azúcares.....	63
Figura 4-3	Superficie de respuesta estimada para el rendimiento global de azúcares	64
Figura 4-4	Superficie de respuesta estimada maximizando el rendimiento global de glucosa y minimizando la producción de inhibidores	65
Figura 4-5	Contornos de superficie de respuesta estimados maximizando el rendimiento global de glucosa y minimizando la producción de inhibidores	65
Figura 4-6	Lignina residual en función del tiempo de tratamiento.....	66
Figura 4-7	Rendimiento de glucosa en la hidrólisis enzimática a través del tiempo.....	67
Figura 4-8	Rendimiento global de glucosa en función del tiempo	69
Figura 4-9	Rendimiento global de xilosa en función del tiempo	69
Figura 4-10	Rendimiento global de azúcares fermentables en función del tiempo	70
Figura 4-11	Lignina residual en función del tiempo.....	72
Figura 4-12	Rendimiento de glucosa en la hidrólisis enzimática en función del tiempo...	73
Figura 4-13	Rendimiento global de glucosa en función del tiempo.....	74
Figura 4-14	Rendimiento global de xilosa en función del tiempo.....	74
Figura 4-15	Rendimiento global de azúcares en función del tiempo	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 2-1 Composición promedio de dos residuos sólidos obtenidos de la extracción del aceite de palma, proveniente de Malasia (Gutiérrez et al., 2008 modificado).....	18
Tabla 3-1 Azúcares estructurales y tiempo de retención detectados en la fibra prensada de palma	43
Tabla 3-2 Diseño experimental de superficie de respuesta para fibra prensada de palma, tomando como factores carga expresada como la masa de sólidos (g)/100 mL de solución, temperatura y tiempo de tratamiento.....	45
Tabla 3-3 Composición del medio Mandels.....	47
Tabla 3-4 Composición del medio Kirk	47
Tabla 3-5 Inhibidores de fermentación y su respectivo tiempo de retención	50
Tabla 4-1 Contenido de extraíbles en la fibra prensada de palma en base seca, luego de protocolo Soxhlet	52
Tabla 4-2 Composición de la fibra prensada de palma.....	52
Tabla 4-3 Análisis elemental a la fibra prensada de palma (en base seca)	53
Tabla 4-4 Porcentaje de sólidos solubles y pH después del pre-tratamiento.....	54
Tabla 4-5 Recuperación total gravimétrica (en % de la materia prima), composición del filtrado y de los sólidos insolubles después del pre-tratamiento con agua caliente (% de la materia pre-tratada), según técnica adaptada del protocolo NREL.	55
Tabla 4-6 Porcentaje de azúcares obtenidos en el líquido de pre-tratamiento después de post-hidrólisis.....	56
Tabla 4-7 Porcentaje de sacarificación, rendimiento de glucosa y rendimiento global de glucosa en la hidrólisis enzimática	58
Tabla 4-8 Rendimiento global de xilosa (% sobre la materia prima) y porcentaje de recuperación de xilosa (g de xilosa recuperados respecto a la teórica).....	59
Tabla 4-9 Rendimiento global y porcentaje de recuperación de azúcares fermentables con respecto a la materia prima	60
Tabla 4-10 Concentración de inhibidores de crecimiento de microorganismos.....	62
Tabla 4-11 Porcentaje de recuperación gravimétrica de sólidos y composición de cenizas a través del tiempo	67

Tabla 4-12 Caracterización de las fracciones de celulosa y hemicelulosa a través del tiempo.....	68
Tabla 4-13 Porcentaje de recuperación y composición del material pre-tratado variando la relación C/N.....	72
Tabla 4-14 Caracterización del material original y el material pre-tratado con la combinación (biológico más agua caliente) en el punto máximo.....	76
Tabla 4-15 Porcentaje de sacarificación, rendimiento de glucosa y xilosa, rendimiento global de azúcares para el pre-tratamiento en combinación o no en el punto óptimo	77

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la producción de azúcares fermentables enfrenta una crisis socio-energética ya que estos derivan exclusivamente del sector alimenticio. Una alternativa atractiva es la producción a partir de materiales lignocelulósicos, ya que estos no compiten directamente con los alimentos destinados al consumo humano y animal y, permite aprovechar grandes cantidades de biomasa que generan los procesos agroindustriales. La industria de palma de aceite en Colombia, primera en producción en Latino América y cuarta a nivel mundial, genera cerca de 11.6 a 15% de fibra prensada de palma respecto a la carga inicial de los frutos procesados (García, et al, 1997). Los materiales lignocelulósicos presentan estructuras complejas compuestas de lignina, hemicelulosa y celulosa, siendo matrices resistentes al ataque microbiano debido a la interacción entre sus componentes y a la cristalinidad de la celulosa. Por esta razón, el proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de estas materias primas comprende dos etapas: pre-tratamiento e hidrólisis.

En el pre-tratamiento sea físico, químico, térmico o biológico, se busca aumentar el área superficial, reducir la cristalinidad de la celulosa y disociar el complejo celulosa-lignina. Esta operación favorece la exposición del sustrato a la segunda etapa del proceso, la hidrólisis, la cual puede ser ácida o enzimática. Dentro de los pre-tratamientos que incrementan la digestibilidad de la biomasa lignocelulósica se encuentran los siguientes: mecánicos, térmicos (explosión con vapor y agua caliente), ácidos, alcalinos, de oxidación y combinaciones de estos (Hendriks et al, 2008). Además, existe el pre-tratamiento biológico que usa hongos o bacterias deslignificadoras tales como el *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus*; a través, de la acción de enzimas ligninasas y peroxidasas (Kumar et al., 2009). Este último pre-tratamiento requiere un bajo consumo de energía, bajo costo de capital, sin necesidad de productos químicos, presentando condiciones ambientales suaves, además de reducción en la concentración de inhibidores de fermentación (Alvira et al, 2009), sin embargo, para que sea eficaz en cuanto al rendimiento asociado a los costos,

manejo medioambiental y tiempos de residencia dentro del proceso, debe ser usado en combinación con otros pre-tratamientos.

Dentro de la segunda etapa del proceso, la hidrólisis, puede ser ácida o enzimática. La primera de ellas presenta mayores rendimientos de producto expresado como glucosa obtenida, pero muestra inconvenientes operativos tales como corrosión de equipos y costos asociados a la disposición ambiental de los residuos. Por el contrario, el empleo de complejos enzimáticos no presenta las dificultades mencionadas en la hidrólisis ácida. A partir de estas características de las etapas, surge una pregunta de investigación: ¿cuál puede ser el proceso que combine pre-tratamientos biológicos con agua caliente para facilitar la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma hasta azúcares fermentables?

En este trabajo se planteó llevar a cabo un proceso previo a la hidrólisis enzimática de la fibra prensada de palma hasta azúcares fermentables, que combinará pre-tratamientos biológicos con agua caliente. Para esto se caracterizó la fibra prensada de palma en su contenido de lignina, hemicelulosa y celulosa, se estableció una combinación de pre-tratamiento biológicos con agua caliente previo a la hidrólisis enzimática, se identificaron compuestos inhibidores del proceso de crecimiento de microorganismos en los líquidos obtenidos en los pre-tratamientos y finalmente se evaluó el grado de hidrólisis sobre el material pre-tratado para obtener azúcares fermentables.

Investigaciones previas han estudiado el pre-tratamiento con agua caliente, donde se ha optimizado variables de producción tales como: temperatura y tiempo de residencia en materiales como paja de trigo; la reacción la llevaron a cabo en temperaturas de 170, 195 y 220° C y tiempos de residencia de 0, 20 y 40 min; encontrándose recuperaciones para los azúcares derivados de la hemicelulosa del orden de 43,6% y un rendimiento de hidrólisis enzimática del 79.8% (Pérez et al, 2008). En cuanto al pre-tratamiento biológico, investigaciones de la Universidad Jorge Tadeo Lozano han logrado deslignificación del 43.1% de raquis de palma (Ospina y Piñeros, 2007). En otro trabajo se observó el potencial

del pre-tratamiento biológico utilizando *Phanerochaete chrysosporium* sobre tallos de algodón en cultivo sumergido y en cultivo en estado sólido, con un porcentaje del 19.4% y 35.5% de degradación de la lignina (Shi et al, 2008). Finalmente, se ha reportado que el 90% de los carbohidratos presentes en la fibra prensada pueden ser liberados luego de un pre-tratamiento de deslignificación con vapor (Yojiro et al, 1990), ratificando el potencial que presentan estos residuos agroindustriales para la producción de azúcares fermentables, que posteriormente pueden ser empleados por microorganismos para la producción de productos de alto valor agregado.

Debido a las grandes cantidades de biomasa generadas por la industria de la palma de aceite a nivel nacional, es necesario desarrollar la investigación planteada, ya que esta biomasa es quemada en las calderas provocando daños al medio ambiente (emisiones de dióxido de carbono) y en el caso de la fibra prensada de palma, es dispuesta en campo, provocando proliferación de plagas. La utilización adecuada de esta biomasa de características lignocelulósicas, permitiría el desarrollo de nuevos procesos para la producción de glucosa y xilosa, presentando opciones de valor agregado a los residuos de una industria colombiana tan importante como la de palma de aceite.

2. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES

2.1 Palma de aceite

La palma de aceite es una planta tropical propia de climas cálidos que crece en tierras por debajo de los 500 metros sobre el nivel del mar. Su origen se ubica en el golfo de Guinea en el África occidental. De ahí su nombre científico, *Elaeis guineensis Jacq.*, y su denominación popular: palma africana de aceite.

La expansión del cultivo en Colombia ha mantenido un crecimiento sostenido. A mediados de la década de 1960 existían 18.000 hectáreas en producción y hoy existen más de 360.000 hectáreas (a 2010) en 73 municipios del país distribuidos en cuatro zonas productivas (Fedepalma, 2010):

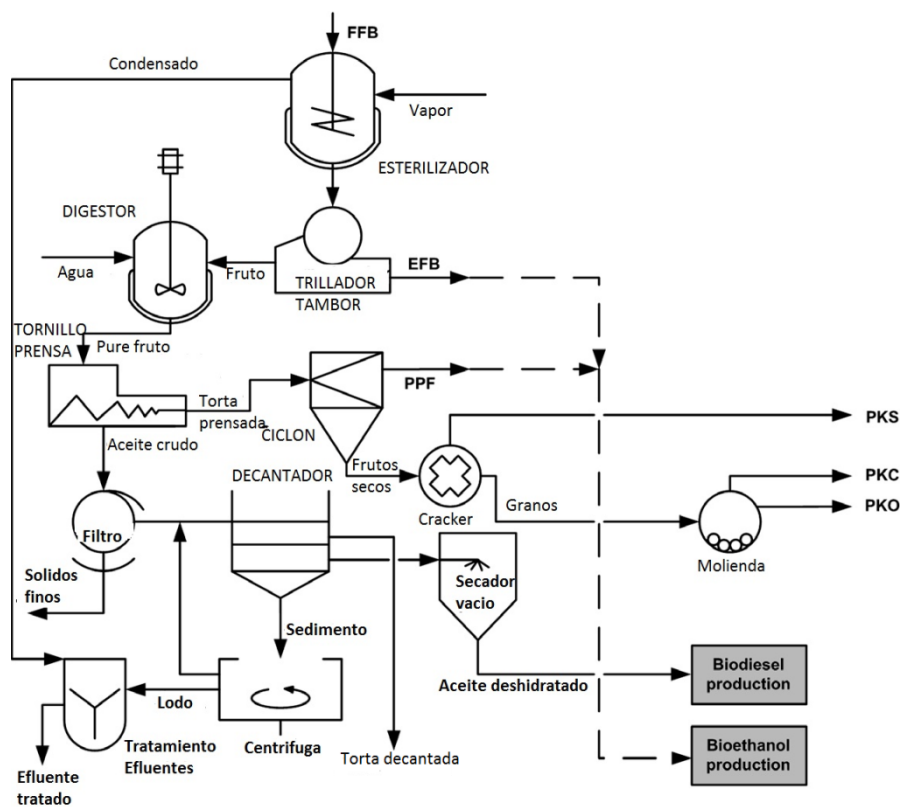
- Norte - Magdalena, Norte del Cesar, Atlántico, Guajira
- Central - Santander, Norte de Santander, sur del Cesar, Bolívar
- Oriental - Meta, Cundinamarca, Casanare, Caquetá
- Occidental – Nariño

Los departamentos que poseen más área sembrada en palma de aceite son en su orden son: Meta, Cesar, Santander, Magdalena, Nariño, Casanare, Bolívar, Cundinamarca y Norte de Santander. Colombia es el primer productor de palma de aceite en América Latina y el cuarto en el mundo.

El procesamiento de la palma de aceite, se ilustra en la Figura 2-1, los racimos con los frutos frescos son tratados térmicamente con vapor en un autoclave horizontal de contacto directo, a 140 °C por 50 min, la esterilización inactiva las enzimas (lipolíticas) que causan el desdoblamiento del aceite y afloja los frutos. Los racimos son alimentados a un tambor rotatorio (desfrutador), el tambor gira sobre un eje central con los racimos que golpean los barrotes y producen el desprendimiento de los frutos. De este proceso se generan los racimos o tusas vacías o raquis (17.7-26.1% de la carga inicial). Posteriormente los frutos

se transportan a los digestores ó cilindros verticales provistos de agitación a baja revolución donde se adiciona agua a 80° C; allí se liberan las nueces para la extracción del aceite de palmiste y la masa de los frutos pasa al proceso de prensado mecánico. La masa sólida que resulta de la prensa se llama fibra prensada y constituye el segundo residuo lignocelulósico principal (11.6-15% de la carga inicial). Finalmente, el aceite pasa al proceso de decantación y clarificación. En Colombia, la generación de residuos lignocelulósicos de palma de aceite es de aproximadamente siete millones de toneladas al año.

Figura 2-1 Diagrama esquemático de la extracción de aceite de palma. FFB: racimos de los frutos frescos, EFB: racimos de los frutos vacíos, PPF: fibra de palma prensada, PKS: cáscara del palmiste, PKC: torta de palmiste, PKO: aceite de palmiste (Gutiérrez et al., 2008 modificado).



Por otra parte Abdul et al., 2002, reportan que en promedio, por cada tonelada de racimos de frutos frescos (FFB) procesados, se producen 200 Kg de racimos de frutos vacíos (EFB),

670 Kg de efluente de aceite de palma (POME), 120 Kg de fibra del mesocarpio, 70 Kg de cascara y 30 Kg de torta de los granos de palma (PKC).

2.2 Fibra prensada de palma

El proceso de extracción del aceite de palma lleva a la formación de muchos sub-productos y residuos que tienen un potencial económico. Estos productos, sub-productos y residuos se ilustran en la Figura 2-2 junto con sus aplicaciones actuales y potenciales. Los racimos de frutos vacíos “EFB”, por sus siglas en inglés, son el residuo sólido que es producido en mayor cantidad. Su composición se muestra en la Tabla 2-1 acorde a los datos de Abdul Aziz et al, 2002 y Wan et al, 2004. Debido a su alto contenido de humedad, este material no es apropiado como combustible. Por esta razón, se usa frecuentemente como abono. El compostaje ha sido sugerido como una opción para producir abono de alta calidad de los EFB. La utilización de los EFB como sustrato para el cultivo de setas por fermentación en estado sólido, también se ha propuesto. En este caso, no se requieren tratamientos previos al material (Gutiérrez et al, 2008). Además, el material que queda después de la cosecha de setas presenta mejores propiedades fertilizantes. Por otro lado, la fibra resultante de la separación del prensado de la torta: fibra prensada de palma, “PPF” por sus siglas en inglés; tiene un importante contenido de complejo lignocelulósico y un menor contenido de humedad, véase Tabla 2-1. El aceite retenido en la fibra hace que este material sea una buena fuente de combustible sólido. Cuando en las instalaciones del procesamiento de la palma se produce tanto vapor de proceso como electricidad, la cantidad total de PPF se somete a combustión. Sin embargo, si solo se produce vapor, el 70% de los PPF se quedan sin uso y se convierten en residuo (Prasertsan et al., 1996). De esta manera la biomasa contenida en los EFB y PPF puede ser utilizada para la producción de azúcares fermentables. Algunos estudios reportan que estos residuos contienen 0.69 g de azúcares fermentables/g de material seco para los racimos vacíos, mientras que para la fibra el valor es de 0.42, valores prometedores para la producción de etanol, una de las posibles aplicaciones entre otras (Bic-Biocentrum-DTU 2006).

Figura 2-2 Productos, sub-productos y residuos obtenidos durante el procesamiento del aceite de palma. Las formas con bordes continuos corresponden a las aplicaciones actuales de productos y subproductos. Las formas con bordes discontinuos corresponden a posibles aplicaciones. *Gasf*: gasificación, *Pyr*: pirólisis, *FPyr*: pirólisis rápida, *Comp*: compostaje, *SSF*: fermentación en estado sólido, *SRf*: reformado de vapor, *WGS*: reacción agua-gas, *FTS*: síntesis Fischer-Tropsch, *PT*: pre tratamiento, *CH*: hidrólisis celular, *Fm*: fermentación, *Trans*: transesterificación, *CC*: craqueo catalítico, *HA*: síntesis alcohol superiores (Gutiérrez et al., 2008 modificado)

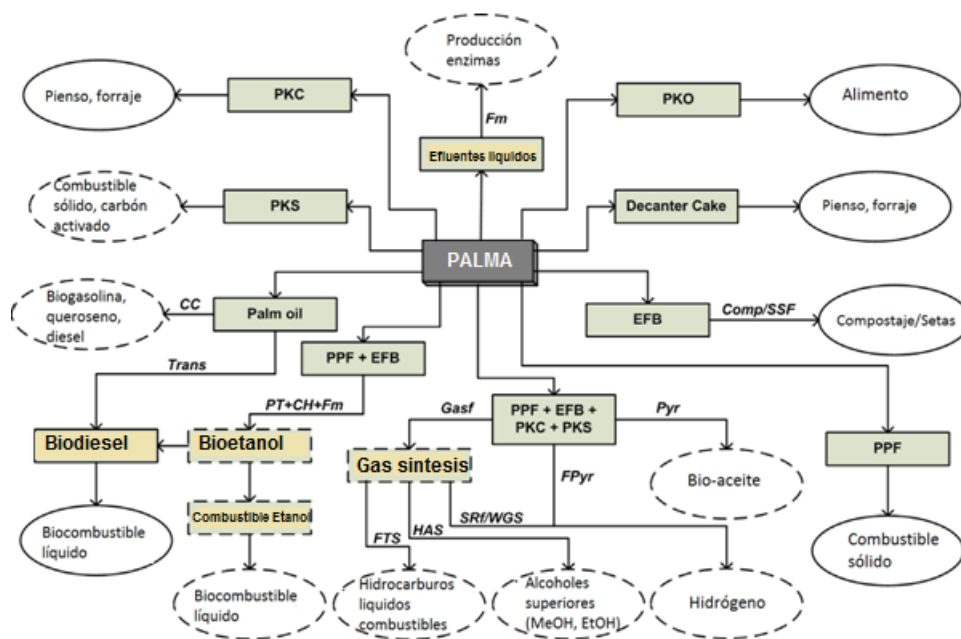


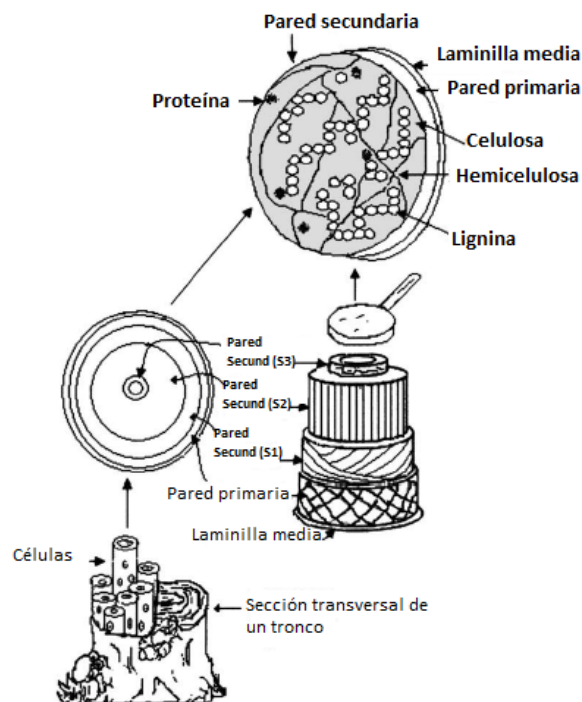
Tabla 2-1 Composición promedio de dos residuos sólidos obtenidos de la extracción del aceite de palma, proveniente de Malasia (Gutiérrez et al., 2008 modificado)

Componente	Contenido % (p/p)	
	EFB “raquis”	PPF “fibra prensada”
Celulosa	15,47	24
Hemicelulosa	11,73	14,4
Lignina	7,14	12,6
Cenizas	0,67	3
Aceite	-	3,48
Otros	-	2,52
Humedad	65	40

2.3 Materiales celulósicos

Las paredes de las células vegetales contienen tres tipos de capas, Figura 2-3: lámina media, es la primera formada durante la división celular, compuesta principalmente por pectina. La pared primaria, formada después de la lámina media, compuesta por un esqueleto de microfibrillas de celulosa incorporados en un gel de compuestos pépticos y hemicelulosa. La pared secundaria es rígida, compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa se dispone en el interior de la madera, formando estructuras cristalinas, unidas por zonas amorfas. La celulosa y la hemicelulosa están unidas entre sí por la lignina (laminilla) la cual le da consistencia y rigidez a la planta. La lignina se sitúa formando una capa externa alrededor de las fibras, y dicha capa externa se une a la existente en las demás fibras por medio de enlaces covalentes y de puente de hidrógeno. La lignina está presente en capas de la pared celular (secundaria) que junto con la hemicelulosa forman una matriz amorfa en la que las fibras de celulosa se incrustan y protegen contra la biodegradación (Fengel et al., 1989).

Figura 2-3 Estructura vegetal y composición de los residuos lignocelulósicos (Sánchez C., 2008, modificado)



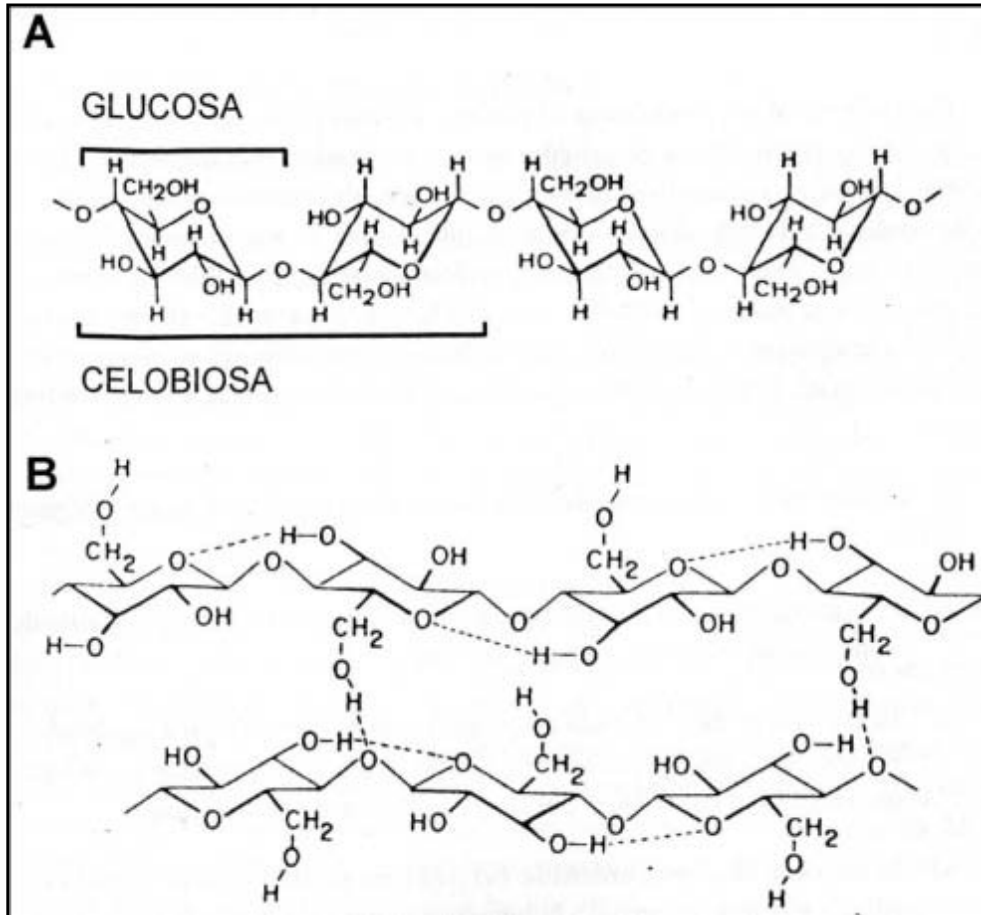
La celulosa es probablemente el compuesto biológico de naturaleza polimérica más abundante en la naturaleza. Es un componente fundamental de la pared de las células vegetales, donde se encuentra íntimamente asociada con otros polisacáridos, tales como hemicelulosas y pectinas, y con la lignina. Por otra parte, la celulosa es un componente abundante en los residuos agrícolas y de la manufactura de productos madereros. Además, representa entre un 40 y un 60% del total de los residuos sólidos municipales, residuos que corrientemente se queman, entierran o abandonan y raramente se incorporan al ciclo industrial.

Los materiales celulósicos tienen un uso extensivo, bien en forma lignificada, como la madera, o bien en estado más o menos puro, como por ejemplo la celulosa del papel, fibras y material textil. Todo ello, junto al hecho de que la celulosa sea, por otra parte, el material de desecho predominante en la agricultura; principalmente en forma de tallos, troncos o cáscaras, justifica la abundancia de este material entre los residuos tanto de la actividad humana como en la naturaleza. Sin embargo, y a pesar de su natural abundancia, sólo una insignificante proporción de este material ha sido explotado con fines comerciales, debido fundamentalmente a problemas técnicos.

2.3.1 Celulosa

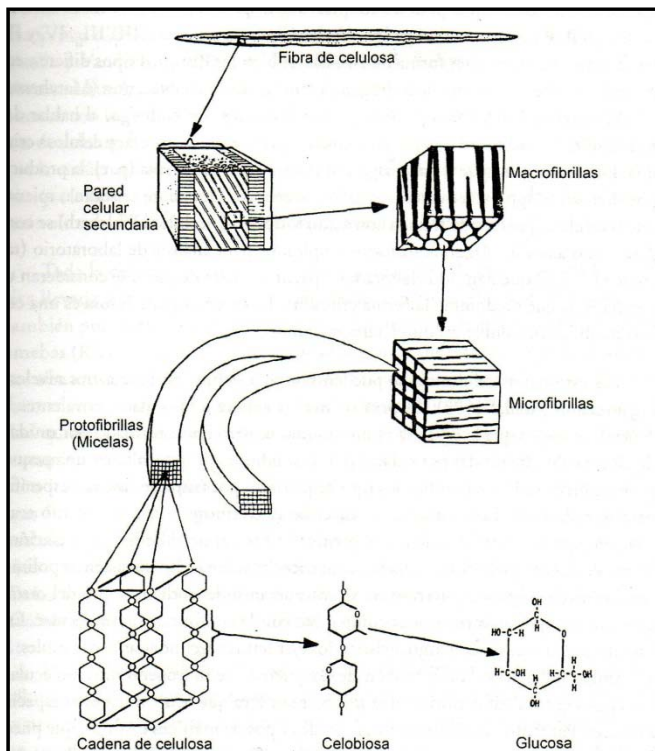
La celulosa es un homopolímero de cadena lineal formado por moléculas de glucosa unidas por enlace 1,4- β -glucosídicos. Las moléculas contiguas de glucosa están giradas 180° una con respecto a la otra. Esto hace que cada dos moléculas de glucosa contiguas; o lo que es lo mismo, una unidad de celobiosa, constituyan una unidad repetitiva. Todas las moléculas de glucosa presentan una conformación en silla y, debido a la configuración beta, todos los grupos hidroxilo están en posición ecuatorial (Figura 2-4a). Esto explica por qué la celulosa presenta una estructura en capas, donde las cadenas sencillas en una capa se unen por puentes de hidrógeno intermoleculares y las capas se unen entre sí por enlaces de tipo Van der Waals (Figura 2-4b).

Figura 2-4 Estructura básica de la celulosa. **a)** Composición de la cadena de celulosa. **b)** Disposición de las cadenas de celulosa, mostrando los puentes de hidrógeno inter e intramoleculares que estabilizan la estructura. (Lucas et al, 2001, pág. 16)



Dependiendo de su procedencia, el grado de polimerización o número de unidades de glucosa por molécula de celulosa varía aproximadamente desde 1.000 hasta 10.000. La unidad organizativa más simple, resultante de la combinación de moléculas de celulosa, es la protofibrilla o microfibrilla elemental, que posee un diámetro entre 3-10 nm siendo visible al microscopio electrónico. Las protofibrillas se reúnen en un haz, denominado microfibrilla, cuyo diámetro varía entre 20-40 nm. Las microfibrillas se agrupan formando una macrofibrilla, que es visible al microscopio óptico. La asociación de macrofibrillas origina la fibra de celulosa (Figura 2-5).

Figura 2-5 Organización de la celulosa observada a distintos niveles (Lucas et al, 2001, pág. 17)



Los aspectos más importantes de la estructura física de la celulosa son:

1. Las cadenas poliméricas de la celulosa natural muestran diferentes grados de ordenamiento unas con respecto de otras.
2. La fracción menos ordenada del polímero no muestra ninguna regularidad, y se conoce como “región amorfa” siendo fácilmente penetrable por solventes, enzimas, o reactivos, y, por tanto, es fácilmente hidrolizable.
3. La fracción altamente ordenada del polímero se conoce como “región cristalina”, y es muy resistente a la penetración por solventes, enzimas y reactivos.

2.3.2 Hemicelulosa

Mientras que la celulosa es un homopolímero lineal con muy poca variación de una especie a otra, las hemicelulosas son heteropolisacáridos altamente ramificados y generalmente no cristalinos. Contienen azúcares tales como pentosas (D-xilosa, L-arabinosa), hexosas (D-

galactosa, L-galactosa, D-manosa, L-ramnosa, L-fucosa) y ácidos urónicos (ácido D-glucurónico). A su vez, estos residuos pueden contener diversas modificaciones, tales como acetilaciones o metilaciones.

Los azúcares tipo C6 son fácilmente fermentables a etanol, pero los microorganismos normalmente usados en la industria para obtener alcohol etílico no son capaces de metabolizar los azúcares de cinco átomos de carbono. A diferencia de la celulosa, la cual siempre tiene la misma estructura y composición, las de la hemicelulosa pueden variar ampliamente entre especies de plantas. Las cadenas poliméricas individuales contienen de 50 a 100 unidades monoméricas de azúcares. Debido a que las cadenas de hemicelulosa no son lineales, tienen ramificaciones laterales y no tienen estructura regular, este polímero no es cristalino y es fácilmente hidrolizado.

La hemicelulosa está presente en la pared celular de las plantas y en ella forma un gel acuoso en el cual están embebidas las microfibrillas de celulosa. La corta extensión de las cadenas que incrementan la solubilidad de las hemicelulosas y la posición expuesta de las mismas en la superficie de las microfibrillas, explicaría porque este polímero está entre los primeros componentes de la pared celular atacados por los hongos causantes de pudrición (Zabel et al, 1992).

En las maderas blandas, provenientes de gimnospermas, los componentes más abundantes de la hemicelulosa son el galactoglucomanano y el arabinoglucuronoxilano. El primero está integrado mayoritariamente por unidades de manosa anhidra y en el segundo predominan las unidades de xilosa anhidra. Por este motivo la hidrólisis de la hemicelulosa de maderas blandas rinde mayoritariamente a manosa y xilosa.

En las maderas duras (provenientes de angiospermas), el componente principal de la fracción hemicelulosa es el O-acetil-4-metilglucurono- β -D-xilano. Por hidrólisis se obtiene básicamente xilosa, ácido acético y ácido metilglucurónico en una relación molar aproximada de 10:7:1 respectivamente. El azúcar más importante que compone estas maderas es la xilosa.

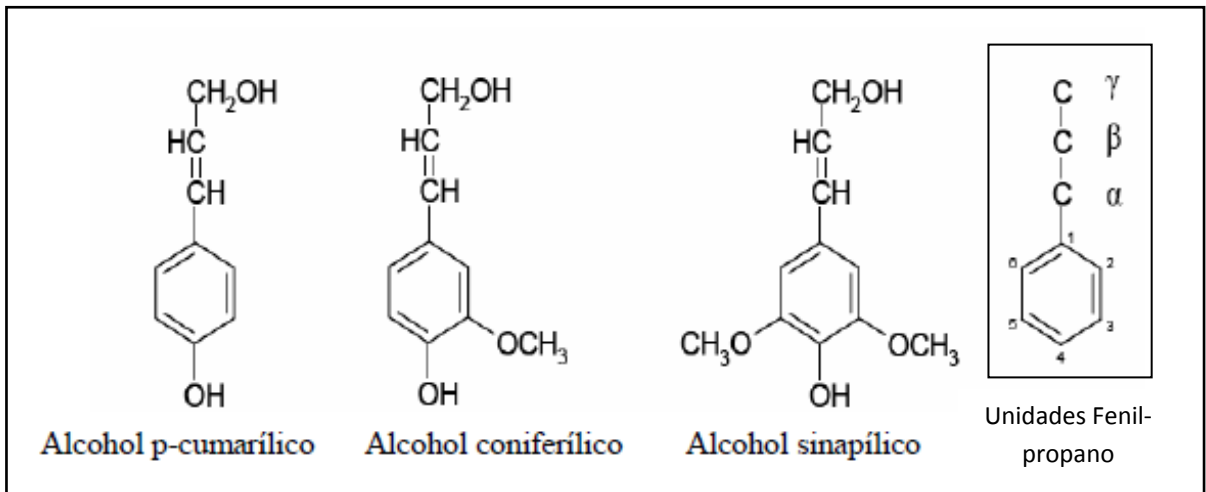
2.3.3 Lignina

El término lignina deriva del latín *lignum*, que significa madera, y define al material cementante presente entre las paredes celulares de los tejidos leñosos de los vegetales. Más que definir a un compuesto homogéneo, este término se refiere a un conjunto de sustancias todas ellas con propiedades químicas muy similares, pero con diferente tamaño molecular, llegando a exceder los 100.000 d.

Gran parte de la actividad fotosintética de las plantas se dedica a la conversión del anhídrido carbónico en lignina, llegando esta a constituir aproximadamente el 40% de la energía solar almacenada en los tejidos vegetales. Por consiguiente, juega un papel muy destacado en el ciclo del carbono. De hecho, la lignina es el polímero aromático renovable de origen natural más abundante en la naturaleza, representando una de las reservas más importantes de carbono orgánico junto con la celulosa y la hemicelulosa. Se estima que cada año se generan (gracias a la fotosíntesis) entre 10^{11} y 10^{12} toneladas. La lignina constituye entre un 15 y un 36% del contenido de los materiales lignocelulósicos.

La lignina es el componente más destacado de los tejidos leñosos en los órganos de conducción y sostén. Este polímero se encuentra en la pared celular de la mayoría de las plantas (gimnospermas y angiospermas), helechos, y algunos hongos, predominando en los tejidos vasculares, está formada por polimerización al azar de unidades radicales de alcohol sinapílico, *p*-cumarílico y coniferílico, unidades que se pueden observar en la Figura 2-6. En la pared celular, está asociada íntimamente con hemicelulosas, formando una matriz que rodea a las fibrillas de celulosa altamente ordenadas.

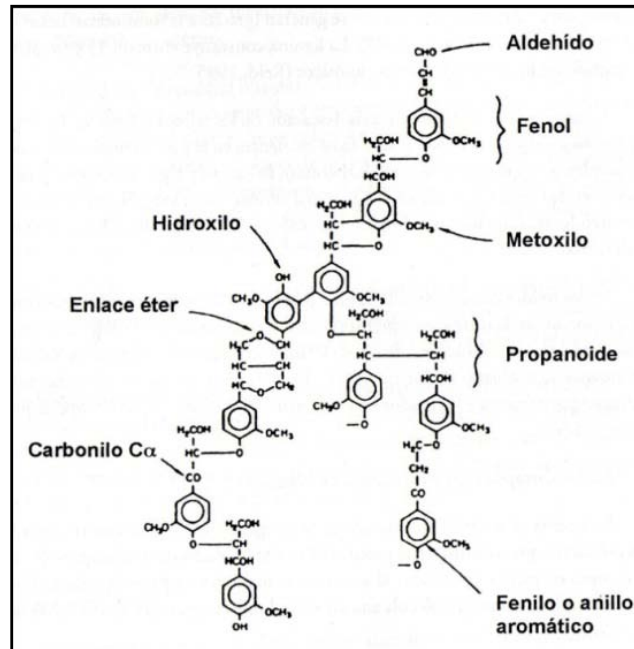
Figura 2-6 Monómeros precursores de la molécula de lignina.



En los tejidos conductores, la lignina desempeña importantes funciones como la de proporcionar la dureza e impermeabilidad necesarias para la conducción de agua y sales minerales y proteger a los polisacáridos celulosa y hemicelulosa del ataque enzimático microbiano. En definitiva, su presencia en las paredes celulares proporciona a los tejidos una vida más larga por ser un elemento difícilmente degradable.

La lignina es un polímero aromático heterogéneo, a diferencia de la mayoría de los polímeros que constituyen la pared celular. Las unidades de fenilpropano (C₉) que la componen están entrelazadas al azar mediante diferentes tipos de enlace (Figura 2-7) formando una macromolécula amorfa e insoluble en agua. Durante el proceso de polimerización tienen lugar también una serie de reacciones secundarias que provocan el entrecruzamiento de la lignina con las hemicelulosas.

Figura 2-7 Principales grupos y tipos de enlaces presentes en la lignina. (Lucas et al, 2001, pág. 26)

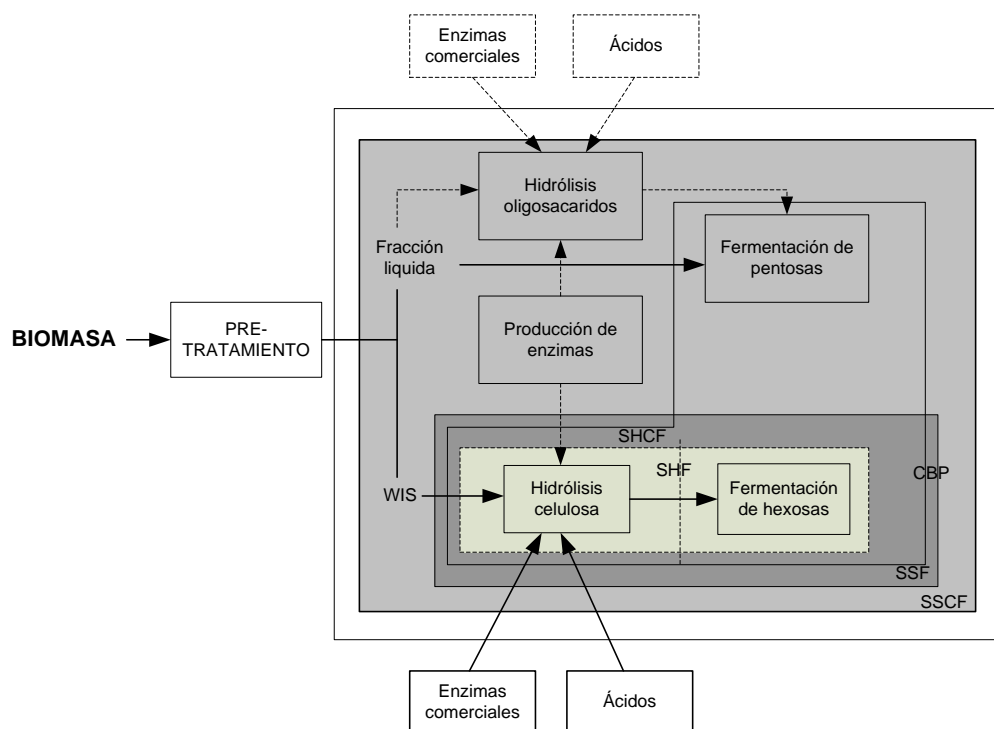


2.4 Descripción del proceso de producción de azúcares fermentables a partir de lignocelulósicos

Como se observa en la Figura 2-8, el proceso de obtención de azúcares fermentables, en la mayoría de los casos empieza con un tratamiento previo donde se producen sólidos insolubles en agua (WIS), con contenido de celulosa y lignina, y una fracción líquida compuesta de hemicelulosa. La hemicelulosa queda más o menos intacta, dependiendo del pre- tratamiento, posteriormente esta fracción se hidroliza hasta monosacáridos, pero la hidrólisis no se puede realizar perfectamente porque aun la fracción está integrada por los oligosacáridos, los cuales requieren de una hidrólisis más antes de la fermentación. La celulosa es hidrolizada por las celulasas y se convierte en glucosa. El proceso en el que la hidrólisis de la celulosa y la fermentación se realicen por separado, se designa como hidrólisis y fermentación por separado (SHF). El proceso en el cual la fracción de las pentosas se fermenta junto con la fracción de las hexosas después de una hidrólisis por separado, se denomina hidrólisis por separado y co-fermentación (SHCF). Cuando la hidrólisis de la celulosa se realiza en simultáneo con el proceso de fermentación, se denomina sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). Cuando SSF incluye la co-

fermentación de la glucosa y xilosa, es decir, con toda la mezcla “slurry” (WIS y la fracción de líquido) se denomina sacarificación simultánea y co-fermentación (SSCF). Por último, el bio-proceso consolidado cuando las enzimas se generan durante el proceso, en una producción enzimática in situ y la hidrólisis junto con la fermentación de todos los azúcares se realiza en un solo paso, se denomina (CBP), (Girio et al, 2010).

Figura 2-8 Descripción esquemática del proceso de obtención de azúcares fermentables a partir de materiales lignocelulósicos (Girio et al, 2010, modificado)



2.5 Pre-tratamientos

Para una conversión biológica eficiente de la celulosa en azúcares fermentables, es importante modificar las características físicas y propiedades químicas de la pared celular de las plantas, esto se puede hacer a través de una etapa de pre-tratamiento. Diferentes tratamientos previos tienen diferentes composiciones químicas y formas de interacción con los componentes de la pared celular de los vegetales. Además, hay una extensa variedad de materiales lignocelulósicos, que van desde los pastos hasta maderas blandas y maderas duras, que también tienen diferentes propiedades físicas y químicas. Por esta razón existe

una interdependencia entre el pre-tratamiento, el tipo de sustrato, y la forma en que finalmente se procesa. Por otra parte, es evidente que la elección del tratamiento también afectará las propiedades fisicoquímicas de la biomasa pre-tratada. Estas propiedades también influirán sobre los procesos aguas abajo, en cuanto a la selección de enzimas microbianas, pre-acondicionamiento, utilización de los subproductos, manejo de residuos y la recuperación de etanol si este fuera el producto (Figura 2-9). En consecuencia, la elección del pre-tratamiento tiene un impacto económico en cada uno de las siguientes etapas en una biorefinería. Estos aspectos hacen que el pre-tratamiento sea la unidad de operación primaria que define la plataforma-biológica para la transformación de biomasa lignocelulósica a azúcares y posteriormente a combustibles y productos químicos. (da Costa Sousa et al., 2009)

Figura 2-9 La elección del pre-tratamiento afecta a todas las operaciones relacionadas con la bio-refinería. Hecho que juega un papel central, porque el pre-tratamiento atañe al diseño y a la viabilidad económica de una biorefinería lignocelulósica (da Costa Sousa et al., 2009).



2.5.1 Pre-tratamientos térmicos

Durante estos pre-tratamientos la biomasa lignocelulósica se calienta. Si la temperatura se incrementa por encima de los 150-200° C, parte de la biomasa lignocelulósica, primero la hemicelulosa y en poco tiempo después la lignina, comienza a ser soluble. Los compuestos producidos principalmente son compuestos fenólicos y tienen en algunos casos efectos

inhibitorios o tóxicos sobre las bacterias, hongos y levaduras. Estos compuestos de la lignina soluble pueden ser muy reactivos, si no son removidos rápidamente, pueden condensarse como precipitados sobre la biomasa.

2.5.1.1 Pre-tratamiento con agua caliente

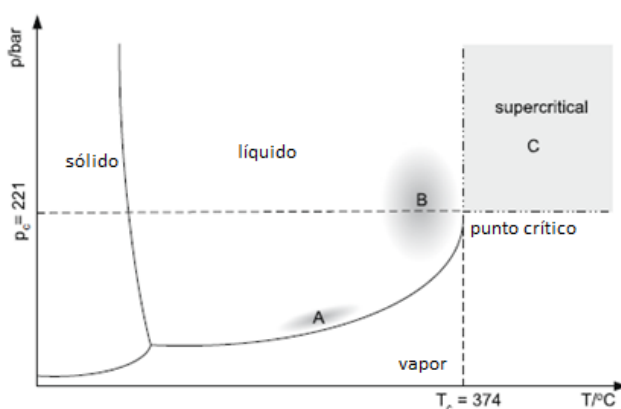
El objetivo de este pre-tratamiento es solubilizar la fracción de la hemicelulosa como oligosacáridos líquidos solubles (Sheng et al., 2010) para hacer a la celulosa más asequible y evitar la formación de inhibidores. Entre las ventajas que presenta este pre-tratamiento se encuentra que no emplea ningún catalizador, pero es necesario utilizar presión para mantener el agua en estado líquido a temperaturas elevadas. Se ha reportado que tiene un gran potencial para remover la hemicelulosa, mientras que minimiza la hidrólisis de la celulosa y las reacciones de degradación de azúcares. Por ejemplo, se ha demostrado que remueve hasta el 80% de la hemicelulosa y mejora la digestibilidad enzimática de materias primas herbáceas pre-tratadas tales como la fibra de maíz (Mosier et al., 2005), bagazo de caña de azúcar (Láser et al., 2002) y paja de trigo (Pérez et al., 2008). Sin embargo, la deslignificación completa no es posible, debido a la re-condensación de componentes solubles procedentes de la lignina.

En general, el pre-tratamiento con agua caliente es atractivo por el ahorro en los costos potenciales: no requiere ningún efecto de catalizador y presenta bajo costo en la construcción del reactor debido a un bajo potencial de la corrosión (Alvira et al, 2008). Además de que usar agua pura en vez de ácido reduce los riesgos en términos de costos, seguridad de la planta y sostenibilidad ambiental (Sheng et al., 2010).

El proceso de autohidrólisis utiliza agua caliente comprimida (presión por encima del punto de saturación). Las temperaturas de operación por lo general oscilan entre 150 y 230 °C (Garrote et al., 1999a) y el tiempo de reacción puede variar desde unos segundos hasta horas, dependiendo de la temperatura (Figura 2-10). La autohidrólisis tiene un mecanismo similar a la hidrólisis con ácido diluido. Ambos presentan iones hidronio que catalizan el proceso. Los catalizadores en la autohidrólisis son iones hidronio generados in situ por autoionización de agua y ácido acético resultante de los sustituyentes de aceto de la hemicelulosa, la que después ha tenido una mayor contribución a la hidrólisis (Carrasco,

1989). También se ha sugerido que los ácidos urónicos también puede contribuir a la formación de iones hidronio (Conner, 1984), pero su papel en la hidrólisis aún no está completamente entendido. A través de la autohidrólisis se ha obtenido un alto grado de recuperación de la hemicelulosa en el rango de 55-84%, junto con bajos niveles de inhibidores de los subproductos, (Garrote y Parajo, 2002).

Figura 2-10 Rangos típicos para diferentes pre-tratamientos con agua como función de la temperatura y presión. (A) Auto hidrólisis, LHW; (B) Condiciones subcríticas; (C) Condiciones supercríticas. Líneas que representan el diagrama de fase para el agua. (Girio et al, 2010)



La celulosa y lignina no se ven significativamente afectados, la obtención de celulosa y la fase sólida rica en lignina, junto con una fracción líquida con una concentración relativamente baja de inhibidores, presenta un potencial alto de sustrato para cultivos microbiológicos. Debido a que los niveles del pH son cercanos a la neutralidad, los problemas de corrosión se reducen, y los pasos del reciclaje y la eliminación de ácido no se hacen necesarios. Esto reduce tanto los costos en capital, como los costos operativos, con consecuencias beneficiosas para el medio ambiente en comparación con otras tecnologías hidrolíticas. El principal inconveniente de este proceso cuando se utiliza el líquido para fermentarlo hasta etanol es que la hemicelulosa solubilizada aparece principalmente en forma de oligómeros, los cuales no se pueden fermentar (Allen et al., 2001b; Carvalheiro et al., 2004; Garrote et al. 1999b).

2.5.2 Pre-tratamientos biológicos

La estructura peculiar de la lignina requiere la participación de celulosomas especializados para su degradación. A diferencia de las restantes moléculas biológicas, la lignina solo puede ser degradada por determinados microorganismos, conocidos como ligninolíticos. Los principales organismos que descomponen la lignina pertenecen al grupo de los hongos. Estos degradan los polímeros de la madera, incluyendo los componentes de la lignina, mediante la secreción de enzimas extracelulares (Lucas et al, 2001).

En el proceso del pre-tratamiento biológico, los microorganismos de la podredumbre blanca, café y blanda son usados para degradar la lignina y hemicelulosa en los materiales de desperdicio. Los de la podredumbre café principalmente atacan la celulosa, mientras que lo de la podredumbre blanca y blanda lo hacen tanto a la celulosa como la lignina. Los hongos de la podredumbre blanca son los más efectivos basidiomicetos para el pre-tratamiento biológico de materiales lignocelulósicos. Hatakka (1983) estudió el pre-tratamiento de paja de trigo por 19 hongos de la podredumbre blanca y encontró que el 35% del trigo fue convertido en azúcares reductores por *Pleurotus ostreatus* en cinco semanas. Una conversión similar fue obtenida en el pre-tratamiento por *Phanerochaete sordida* 37 y *Pycnoorus cinnabarinus* 115 en cuatro semanas (Sun et al., 2002).

Las ventajas de la deslignificación biológica sobre otros métodos incluyen las leves condiciones de reacción, mayor rendimiento por producto y pocas reacciones laterales, menos demanda de energía y menos resistencia en el reactor a la presión y la corrosión. La lignina es degradada por muchas enzimas fúngicas: lignina peroxidasa, Mn-peroxidasa y lacasa (mono-fenol oxidasa). La degradación de la lignina por estas enzimas depende de la cepa del hongo, la accesibilidad de la enzima a la lignina, las condiciones de cultivo y el diseño del reactor (Lee, 1997). Sin embargo, la velocidad de hidrólisis en la mayoría de los procesos de pre-tratamiento biológico es muy baja (Sun et al., 2002)

2.5.2.1 Hongos de la podredumbre blanda

Algunos géneros de ascomicetos y deuteromicetos como *Aspergillus* o *Fusarium* provocan un reblandecimiento de los tejidos de la madera que va acompañado de una pérdida significativa de peso. Dichos hongos se desarrollan preferentemente en las paredes de las células vegetales. Este tipo de degradación, conocida como “podredumbre blanda”, generalmente tiene lugar en angiospermas con un alto porcentaje de humedad, y se caracteriza por la degradación preferente de la fracción de polisacáridos, incluyendo las celulosas y hemicelulosa. La lignina es atacada en mucho menor grado, observándose algunas desmetoxilaciones y roturas de los anillos aromáticos. (Lucas et al, 2001).

Cuando el contenido en lignina de la pared vegetal es superior al 20%, solo algunos basidiomicetos son capaces de iniciar el ataque. Dependiendo del patrón de degradación que provocan sobre la madera, se habla de hongos de la podredumbre parda y hongos de la podredumbre blanca.

2.5.2.1.1 Hongos de la podredumbre parda

La podredumbre parda se ocasiona principalmente por basidiomicetos. En las maderas blandas, estos hongos degradan los carbohidratos de la pared celular, dejando la lignina prácticamente intacta. Ésta queda como un acúmulo pardusco. Este grupo de hongos solo provocan cambios limitados en la lignina, tales como desmetilación de grupos metoxilo, hidroxilaciones, y una oxidación limitada de las cadenas laterales. (Lucas et al, 2001)

2.5.2.1.2 Hongos de la podredumbre blanca

El 90% de los hongos capaces de atacar la madera de un modo eficaz pertenecen a este grupo. La podredumbre blanca implica la degradación de los diferentes polímeros de la madera (celulosa, hemicelulosa y lignina), a la que confieren una consistencia fibrosa o esponjosa. Dependiendo de la especie, la degradación de los carbohidratos y la lignina puede ocurrir de forma simultánea, si bien algunos casos se observa una degradación más temprana de la lignina. Entre los hongos que producen este tipo de podredumbre hay que distinguir a su vez dos grupos: los que degradan simultáneamente la celulosa y la lignina y los que solo degradan la lignina. Entre los primeros se encuentra *Phanerochaete*

chryso sporium y entre los segundos los hongos del genero *Pleurotus*. La degradación de la lignina implica una serie de cambios oxidativos, que conducen a una progresiva despolimerización y liberación de compuestos de bajo peso hasta CO₂ y H₂O. La degradación de la lignina conlleva a la acumulación de celulosa y hemicelulosa dando lugar a un color blanco al que deben su nombre. (Lucas et al, 2001)

2.5.2.2 Fermentación en estado sólido (FES)

La fermentación en estado sólido ha sido ampliamente aplicada en la industria de alimentos. Las FES son llevadas a cabo con microorganismos que crecen en medios de cultivo nutritivos impregnados al sustrato sólido con poco agua o libres de esta. Las ventajas principales que presenta esta fermentación son: bajos contenidos de humedad, alta superficie de área interfacial relacionado con el volumen del líquido, simula el ambiente de crecimiento natural para el microorganismo, medios de cultivo simples y disponibilidad del sustrato (Wang et al., 2007).

2.6 Hidrólisis enzimática (HE)

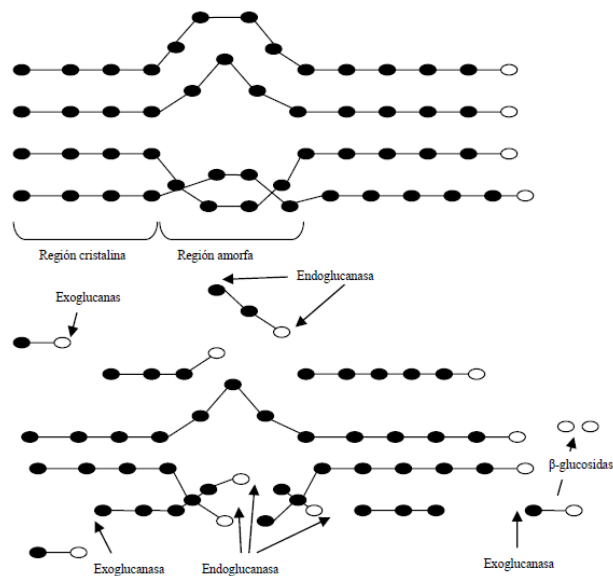
Los primeros estudios llevados a cabo acerca del modo de ataque de los hongos sobre la celulosa y las enzimas celulolíticas elaborados por ellos pusieron de manifiesto que, si bien son numerosos los hongos capaces de degradar la celulosa en la naturaleza, son muy pocos los que producen actividad celulolítica libre en los filtrados de los cultivos con capacidad para atacar a la celulosa insoluble. Estas observaciones condujeron al concepto de enzima múltiple, precediendo en muchos años al aislamiento de las endo y exo-glucanasas reconocidas hoy. Según estas teorías los verdaderos organismos celulolíticos son organismos que producen dos o más enzimas. El primero, llamado C₁, ataca la celulosa nativa para romper los agregados y producir cadenas lineales de unidades de anhidro glucosa. Estas cadenas son más tarde atacadas por una segunda enzima C_x, (β -1,4 glucanasa) que las hidroliza al disacárido celobiosa. La celobiosa podría entonces ser asimilada directamente al interior de la célula, o bien ser convertida en glucosa por la β -glucosidasa antes de la asimilación. (Lucas et al, 2001)

Posteriormente se observó que los complejos celulolíticos eran capaces de llevar a cabo tres tipos básicos de reacciones. Estos tres tipos de enzimas se clasifican hoy día de acuerdo con su modo de acción de la siguiente manera:

- a) Exo- β -1,4 glucanasa o β -1,4-glucano celobiohidrolasa, comúnmente conocida como celulosa C₁.
- b) Endo- β -1,4-glucanasa o β -1,4-glucanohidrolasa, también conocida como CMCase o celulosa C_x.
- c) Beta-1,4-glucosidasa.

En la Figura 2-11 se muestran de forma esquemática los sitios de ataque de las principales enzimas celulolíticas. Las endoglucanasas atacarían las regiones amorfas de la celulosa, liberando extremos de cadena para el ataque de las exoglucanasas. Estas liberarían residuos de celobiosa. Las β -glucosidasas actuarían sobre los extremos libres y sobre la celobiosa, liberando moléculas de glucosa. Su acción sobre la celobiosa es muy importante, ya que este disacárido inhibe la actividad de endoglucanasas y exoglucanasas cuando se acumula en el medio. Por consiguiente, la actividad β -glucosidasa es en la mayoría de los casos el factor limitante de la velocidad del proceso de hidrólisis.

Figura 2-11 Representación esquemática de los sitios de actuación de las distintas enzimas celulolíticas, glucosa ○



Los factores que afectan la hidrólisis enzimática de la celulosa incluyen entre otros: el tipo de sustrato, la actividad celulasa y las condiciones de reacción: temperatura, pH, así como otros parámetros.

2.6.1 Tipo de sustratos

La concentración del sustrato es uno de los principales factores que afectan el rendimiento y la velocidad inicial de la hidrólisis enzimática de la celulosa. A niveles bajos de sustrato, un incremento de la concentración del sustrato normalmente resulta en un incremento del rendimiento y la velocidad de reacción. Sin embargo, altas concentraciones de sustrato pueden causar inhibición por sustrato, lo cual sustancialmente baja la velocidad de la hidrólisis. El grado de la inhibición del sustrato depende de la relación total de sustrato/enzima.

2.6.2 Actividad celulasa

Incrementar la dosis de celulasa en el proceso, en cierta medida, puede mejorar el rendimiento y la velocidad de la hidrólisis, pero implicaría aumentar considerablemente el costo del proceso. La dosificación de 10 FPU (Unidades de actividad sobre Papel Filtro)/g celulosa se usa a menudo en estudios de laboratorio porque ofrece un perfil de hidrólisis con altos niveles de rendimiento de glucosa en un plazo razonable (48–72 h) a un costo razonable de enzima (Gregg y Saddler, 1995).

La hidrólisis enzimática de celulosa consiste de tres pasos: adsorción de la enzima celulasa sobre la superficie de la celulosa, biodegradación de la celulosa a azúcares fermentables, y la desorción de la celulasa. La actividad de la celulasa decrece durante la hidrólisis. La adsorción de la celulasa sobre la celulosa es responsable parcialmente de su desactivación.

2.6.3 Inhibición de la actividad celulasa por el producto-final

La actividad de la celulasa es inhibida por la celobiosa y, en menor medida por la glucosa. Varios métodos han sido desarrollados para reducir la inhibición, incluido el uso de altas concentraciones de enzimas, la adición de β -glucosidasas durante la hidrólisis, y la

eliminación de los azúcares durante la hidrólisis por ultrafiltración o simultánea sacarificación y fermentación (SSF).

Los microorganismos usados en la SSF actualmente son el hongo *T. reesei* y la levadura *S. cerevisiae*. La temperatura más adecuada para la SSF es alrededor de 38° C, lo cual es un promedio entre el mejor intervalo para la hidrólisis (45-50° C) y la fermentación (30° C) (Sun et al., 2002).

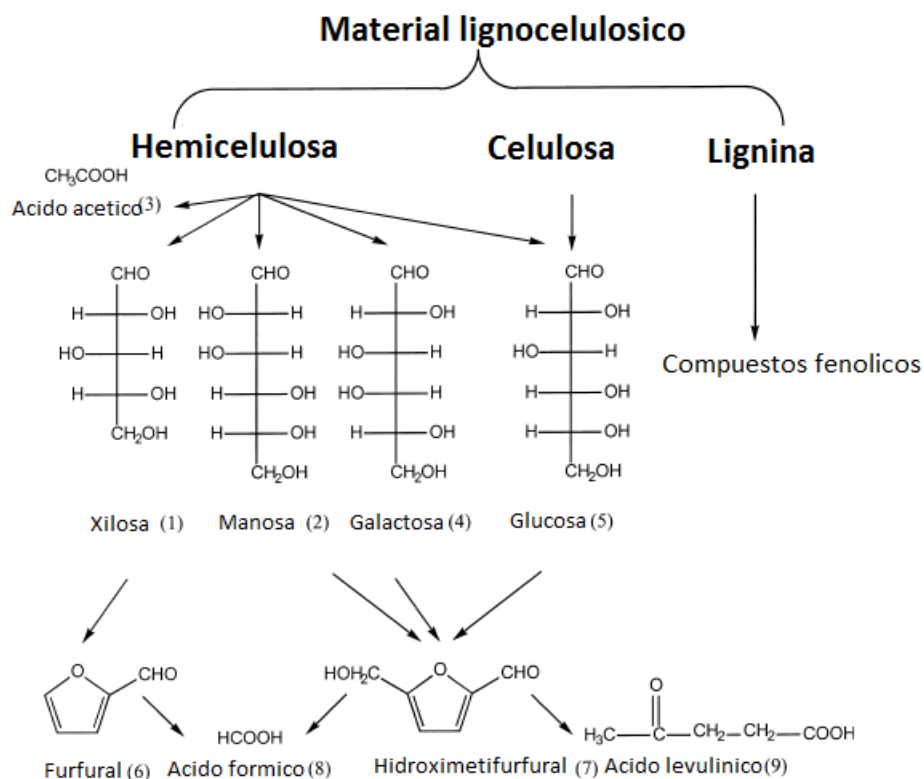
2.7 Inhibidores del proceso de crecimiento de microorganismos

Durante el pre-tratamiento de los materiales lignocelulósicos se forman y/o liberan una amplia gama de compuestos que inhiben a los microorganismos. Con base en su origen los inhibidores se dividen en tres grandes grupos: los ácidos débiles, los derivados de furanos y los compuestos fenólicos. Estos compuestos limitan el uso eficiente de los hidrolizados para la producción de diversos productos por fermentación.

Los procesos que involucran el tratamiento de lignocelulósicos a alta temperatura bajo condiciones ácidas inducen a la formación y liberación de un amplio grupo de compuestos.

Las principales vías de degradación son esquematizadas en la Figura 2-12. Cuando la hemicelulosa se degrada, se libera xilosa, manosa, ácido acético, galactosa y glucosa. La celulosa es hidrolizada a glucosa. A altas temperaturas y presiones la xilosa es degradada a furfural. Similarmente, 5-hidroximetilfurfural (HMF) es formado de la degradación de hexosas. El ácido fórmico se forma cuando el furfural y HMF se descomponen. El ácido levulínico es formado por la degradación del HMF. Los compuestos fenólicos son generados por la degradación parcial de la lignina y también se forman por la degradación de los carbohidratos (Palmqvist et al., 2000).

Figura 2-12 Reacciones que ocurren durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Los derivados de los compuestos furanos y fenólicos pueden reaccionar a partir de algunos materiales poliméricos (Palmqvist et al, 200)



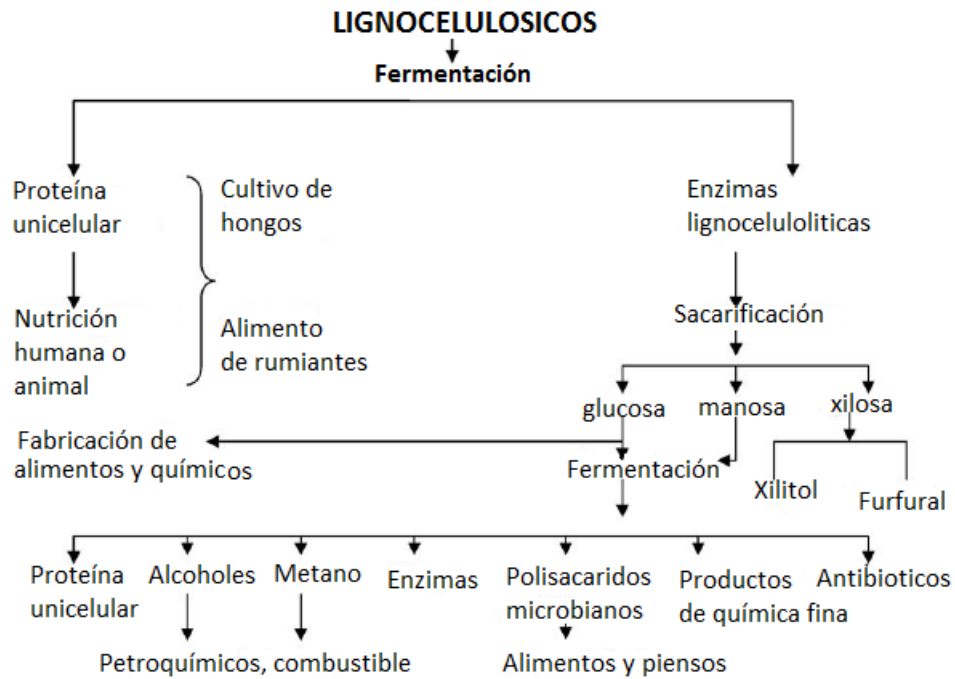
Durante el pre tratamiento, una parte de la lignina también se degrada originando una gran variedad de compuestos fenólicos (Larsson et al. 2000). Los derivados fenólicos incluyen el ácido 4-hidroxibenzoico, el siringaldehído y el ácido siríngico, el 4-hidroxibenzaldehído y los ácidos gentísico, salicílico y protocatéquico. Otros derivados fenólicos identificados tanto en maderas blandas como abeto (Larsson et al. 2000), como en maderas duras como el sauce (Oliva 2003), han sido la vainillina y el ácido vainíllinico. Otros compuestos reportados son el catecol, guayacol, hidroquinona (Palmqvist and Hahn- Hägerdal 2000a), aldehído coniferílico y ácido homovainíllinico (Larsson et al. 2000). También se pueden liberar ácidos grasos, terpenoides, esteroides y ceras, flavonoides, taninos, etc. (Ekman and Holmbom 2000) que a pesar de su baja concentración, también pueden actuar como inhibidores de los microorganismos empleados en la fermentación de los hidrolizados procedentes de materiales lignocelulósicos.

Los compuestos tóxicos pueden producir estrés fermentativo en los microorganismos, disminuyendo la eficiencia en el uso de los azúcares. Compuestos como el furfural pueden inhibir y afectar la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de biomasa/ATP; el hidroximetil furfural es menos tóxico para las células pero su efecto es similar al del furfural y causa un tiempo mayor en la fase “Lag” durante el crecimiento (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000b). Debe considerarse que el efecto sinérgico entre los diferentes compuestos tóxicos puede causar inhibición de la fermentación. Los compuestos fenólicos, resultantes de la degradación de la lignina causan una partición y pérdida de la integridad de la membrana celular, afectando su habilidad de asimilar azúcares y por lo tanto el crecimiento celular. Otros compuestos como el ácido acético, a pH bajo está disociado, es liposoluble y se difunde a través de la membrana plasmática, afectando el pH interno y dañando la célula.

2.8 Aplicaciones industriales de los residuos lignocelulósicos.

Muchos usos han sido sugeridos para la biodegradación de residuos lignocelulósicos; entre ellos: utilizarlos como materia prima para la producción de etanol, para la fabricación de papel, como abono para el cultivo de hongos comestibles, y como alimento directo para los animales. Un gran número de bio-productos de alto valor agregado tales como: ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas y una serie polisacáridos a partir de bacterias y hongos, tales como xantanos se producen por la fermentación de glucosa como sustrato base, Figura 2-13 (Sánchez, 2008).

Figura 2-13 Etapas generalizadas del proceso de bioconversión de residuos lignocelulósicos (Sánchez, 2008, modificado)



En conclusión el interés de la presente investigación es la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma pre-tratada en combinación con pre-tratamientos biológicos y agua caliente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

La materia prima que se uso fue fibra prensada de palma proveniente de una planta extractora de aceite de palma del municipio de Cumaral, Meta. Esta se adecuó lavándola para retirar polvo e impurezas en una relación de aproximadamente 2 L de agua por kg de material, posteriormente se seco en un secador de bandejas a 80° C durante 6 horas obteniéndose un material con una humedad final del 8,57%, medida en una balanza de humedad Mettler Toledo HB43-S Halogen Classic Plus a 105° C. La apariencia final de la fibra se puede observar en la Figura 3-1, la fibra es un material heterogéneo, compuesto no solamente por los residuos fibrosos del proceso de la extracción del aceite de palma, sino también por residuos de la cáscara de los frutos o cuescos y de los racimos vacios o raquis.

Figura 3-1 Fibra prensada de palma



3.2 Caracterización

La materia prima después de su adecuación se molió en un molino Cyclotec 1093 Sampler Tecator hasta un tamaño de partícula de 1 mm, después del proceso de molienda se determino la humedad de la fibra utilizando una balanza de humedad Mettler Toledo HB43-S Halogen Classic Plus a 105° C encontrándose un valor de 7,13%, con este material se procedió a realizar la siguiente caracterización.

3.2.1 Extraíbles o extractivos

Son aquellas sustancias presentes en las diferentes fibras vegetales, pero que no son carbohidratos, tales como ácidos grasos, terpenos, fenoles o resinas. Muchos de estos compuestos son solubles en agua o en disolventes orgánicos polares como metanol, etanol o acetona; algunos pueden llegar a ser utilizados por los hongos macromicetos (Hernández et al. 2006).

Para su cuantificación se realizó una extracción tipo Soxhlet a la fibra prensada primero con agua, seguido por etanol, para así cumplir con la especificación del protocolo de la National Renewable Energy Laboratory “NREL” (Sluiter et al. 2008) que requiere la materia prima libre de extraíbles, para el análisis posterior de lignina y carbohidratos estructurales. El procedimiento que se llevó a cabo se describe en la Figura 3-2 y se presenta en el esquema de la Figura 3-3.

Figura 3-2 Esquema metodológico para la realización de los extraíbles en soxhlet previo a caracterización del material

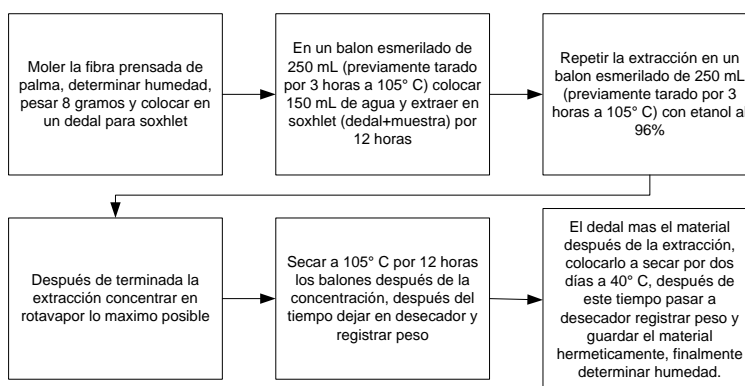
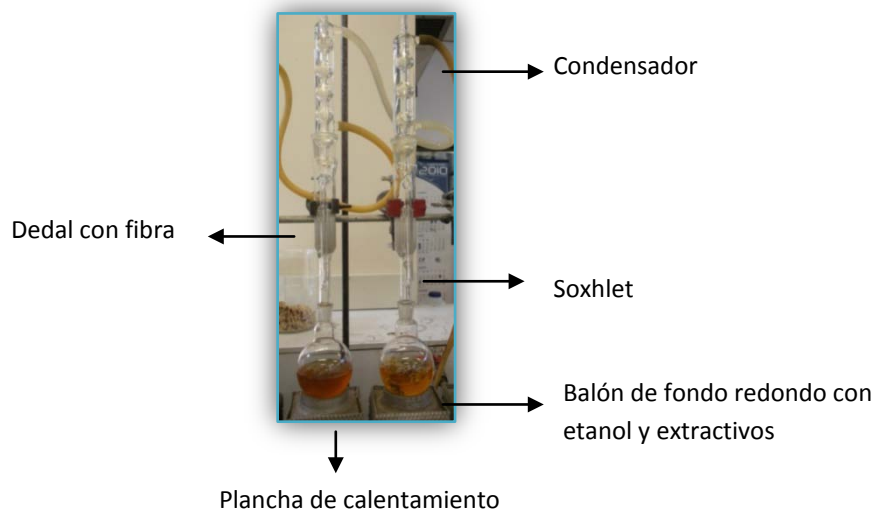


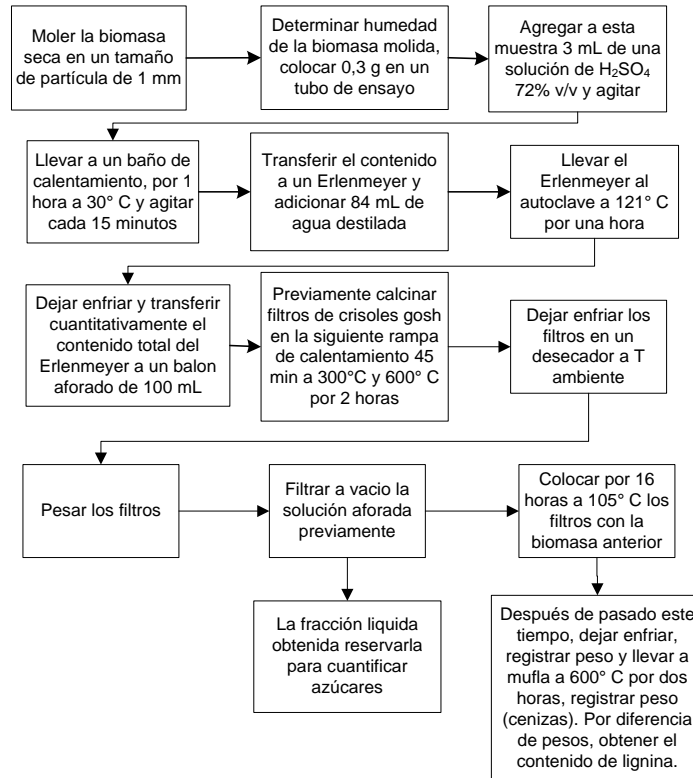
Figura 3-3 Montaje de Soxhlet para extracción con etanol



3.2.2 Lignina

La cuantificación de lignina se presenta en la Figura 3-4, esta metodología fue ajustado con base en protocolos de la National Renewable Energy Laboratory “NREL” véase Anexo I.

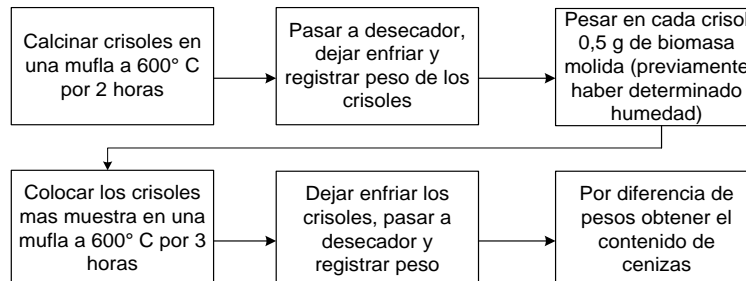
Figura 3-4 Esquema metodológico para la caracterización de lignina en la biomasa



3.2.3 Cenizas

En la Figura 3-5, se resume el procedimiento para la determinación de cenizas.

Figura 3-5 Esquema metodológico para la caracterización de contenido de cenizas en la biomasa



3.2.4 Carbohidratos estructurales

Se cuantificaron los azúcares estructurales por cromatografía líquida de alta eficiencia “HPLC” por sus siglas en inglés; de la fracción líquida obtenida en el proceso descrito para la determinación de lignina. Se emplearon como patrones reactivos grado analítico marca Sigma-Aldrich®, Tabla 3-1, utilizando un detector de índice de refracción, una columna Aminex HPX-87H marca Biorad, temperatura de la columna 65° C, fase móvil: solución de ácido sulfúrico 0,0005 M a un flujo de 0,6 mL/min.

Tabla 3-1 Azúcares estructurales y tiempo de retención detectados en la fibra prensada de palma

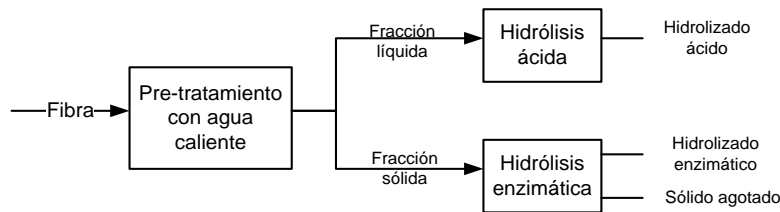
Azúcar	tiempo de retención (min)
Glucosa	9,01
Xilosa	9,54
Arabinosa	10,53

3.3 Pre-tratamiento con agua caliente

3.3.1 Esquema del pre-tratamiento con agua caliente

En la Figura 3-6 se presenta el esquema del proceso llevado a cabo para el pre-tratamiento con agua caliente, con el cual se pueden identificar las fracciones analizadas posteriormente.

Figura 3-6 Esquema metodológico para identificar las fracciones obtenidas después del pre-tratamiento con agua caliente



El esquema metodológico para realizar el pre-tratamiento con agua caliente se presenta en la Figura 3-7. El reactor de alta presión empleado y el montaje que se realizó se observan en las Figuras 3-8 y 3-9, respectivamente.

Figura 3-7 Esquema metodológico para la realización del pre-tratamiento con agua caliente

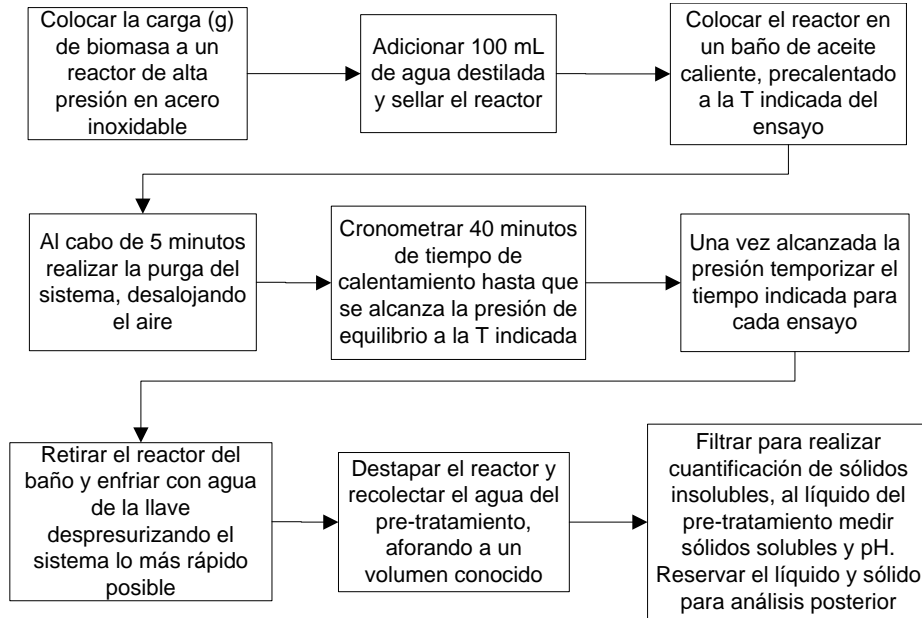


Figura 3-8 Esquema del reactor de alta presión empleado para el pre-tratamiento con agua caliente

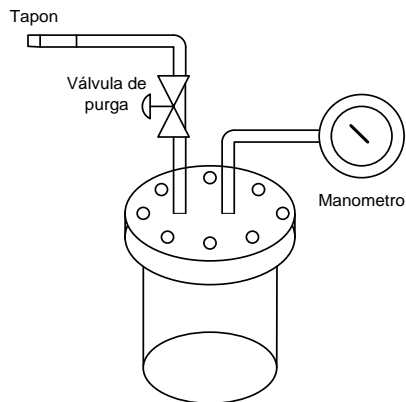


Figura 3-9 Montaje para realizar el pre-tratamiento con agua caliente



3.3.2 Diseño experimental para el pre-tratamiento con agua caliente

Se siguió una metodología de superficie de respuesta en un diseño central compuesto, factorial 2^3 con tres repeticiones en el punto central, según se observa en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2 Diseño experimental de superficie de respuesta para fibra prensada de palma, tomando como factores carga expresada como la masa de sólidos (g)/100 mL de solución, temperatura y tiempo de tratamiento

Carga sólidos (g/100 ml solución)	Temperatura (° C)	tiempo (min)
7,5	180	10
7,5	180	10
7,5	180	10
7,5	180	18,4
10	160	15
5	160	15
5	200	5
3,3	180	10
11,7	180	10
10	200	15
5	160	5
10	200	5
7,5	180	1,6
10	160	5
7,5	146,4	10
5	200	15
7,5	213,6	10

3.4 Pre-tratamiento biológico

3.4.1 Ensayo preliminar pre-tratamiento biológico

La experimentación correspondiente al pre-tratamiento biológico (Figura 3-10) consto de 48 ensayos. Se probaron dos hongos: *Phanerochaete chrysosporium* cepa ATCC 24725 (Figura 3-11) y *Pleurotus ostreatus* (Figura 3-12) el primero de ellos inoculado como suspensión de esporas ($1,42 \times 10^8$ esporas/mL) luego de cultivar el hongo en agar PDA por seis días a 30° C y el segundo inoculando las semillas de esta cepa comercial al 5% en peso. La fermentación en estado sólido se inicio con la adecuación del material a una humedad del 70% utilizando dos medios de cultivo: el primero de ello Mandels y el segundo Kirk (previamente preparados)

cuya composición se ilustra en las Tabla 3-3 y 3-4, respectivamente. Las bolsas con el material e inóculo (Figura 3-13) se incubaron a 30° C, se tomaron tres replicas semanales de cada condición durante cuatro semanas, analizando el grado de deslignificación y realizando la caracterización del material pre-tratado (cenizas y carbohidratos estructurales) y el porcentaje de sacarificación enzimática después de 72 horas.

Para la caracterización del material libre de extraíbles (protocolo descrito en el ítem 3.2.1 modificado a una hora de extracción en agua y etanol, respectivamente) en cuanto a su contenido de lignina, cenizas y carbohidratos estructurales se realizaron los protocolos descritos en el ítem 3.2.

Figura 3-10 Esquema metodológico para la realización del pre-tratamiento biológico

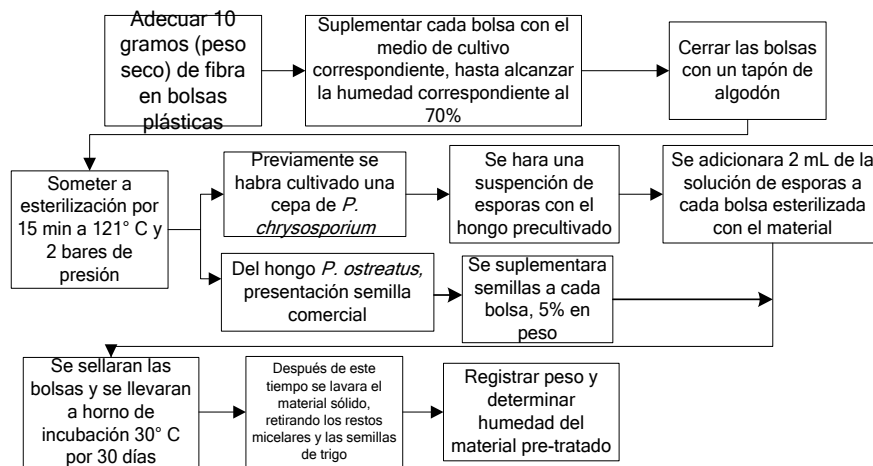


Figura 3-11 Hongo *Phanerochaete chrysosporium* esporulado luego de 6 días de incubación



Figura 3-12 Hongo *Pleurotus ostreatus* en semilla comercial



Tabla 3-3 Composición del medio Mandels

Compuesto	Concentración (g/L)
KH_2PO_4	2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,4
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0016
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0014
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,002
Urea	0,3
Extracto de levadura	0,25

Tabla 3-4 Composición del medio Kirk

Compuesto	Concentración (g/L)
KH_2PO_4	2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03
NaCl	0,06
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,006
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,006
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,006
CuSO_4	0,006
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,006
H_3BO_3	0,006
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006
Extracto de levadura	0,012
Diamonio tartrato	0,2
Tiamina	1 mg

Figura 3-13 A Vista de una bolsa inoculada con semilla de *P. ostreatus* sobre fibra prensada de palma, después de 3 días de pre-tratamiento

Figura 3-13 B Vista de la fibra pre-tratada con *P. ostreatus* después de las cuatro semanas de tratamiento



Figura 3-13 C Vista de la fibra pre-tratada con *Phanerochaete chrysosporium* después de las cuatro semanas de tratamiento



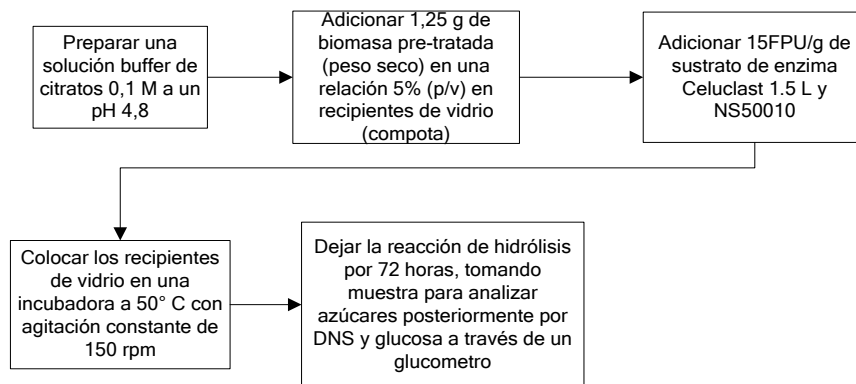
3.4.2 Pre-tratamiento biológico variando la relación C/N

Después de escogerse el hongo *P. ostreatus* y el medio de cultivo Kirk (como se analizara en el ítem 4.4.1 del Capítulo Resultados y análisis de resultados), se realizaron 18 ensayos variando la relación C/N como: propia el material (64,3), suplementada con 5g/L de glucosa (65,9) y con 10 g/L de glucosa (67,3) correspondiente al medio de cultivo. Se realizó seguimiento a la tercera y cuarta semana, caracterizando de nuevo el material en cuanto a su contenido de lignina, cenizas, azúcares estructurales e hidrólisis enzimática.

3.5 Hidrólisis enzimática (HE)

Los sólidos insolubles pre-tratados fueron usados como sustrato para los experimentos de la hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática fue colocada en recipientes de vidrio sellados herméticamente con capacidad de 70 mL, cada uno contenía 25 mL de buffer citrato de sodio 0.1 M pH de 4.8 a 5% (p/v) de sustrato seco pre-tratado, incubado a 50° C y 150 rpm por 72 h. Las enzimas para la hidrólisis de la celulosa fueron: Celuclast® 1.5 L (Anexo II) con una actividad de 65 FPU/g, y NS50010® (Anexo III) con actividad β-glucosidasa de 590 IU/g. Las enzimas fueron proporcionadas por Novozymes Inc. Dinamarca y se cargaron a una relación de 15 FPU/g de sustrato. En la Figura 3-14, se presenta el esquema metodológico realizado.

Figura 3-14 Esquema metodológico para la realización de la hidrólisis enzimática



3.6 Cuantificación de inhibidores de fermentación

De las fracciones líquidas obtenidas después del pre-tratamiento con agua caliente se cuantificaron los inhibidores de fermentación por cromatografía líquida de alta eficiencia “HPLC”.

3.6.1 Ácido acético

La cuantificación del ácido acético se realizó a través de la misma columna Aminex-HPX-87H y las mismas condiciones de análisis de los azúcares, solamente que el ácido acético se revelaba a los 14,5 min.

3.6.2 Derivados del furano y compuestos fenólicos

Se emplearon como patrones reactivos grado analítico marca Sigma-Aldrich®, véase Tabla 3-5, utilizando un detector de UV a una longitud de onda de 270 nm, una columna Chromolith C18 marca Merck, temperatura de la columna 30° C, fase móvil compuesta por metanol (40%), ácido acético (1%) y agua (59%) a un flujo de 2 mL/min, gradiente de t=0 min 100% fase móvil, t=9 min 40% metanol y 60% fase móvil, t=10 min 40% metanol y 60% fase móvil y t=12 min 100% fase móvil.

Tabla 3-5 Inhibidores de fermentación y su respectivo tiempo de retención

Tipo	Inhibidor	tiempo de retención (min)
Derivados de los Furanos	5-Hidroximetilfurfural	2,61
	Furfural	3,11
Compuestos Fenólicos	Ácido 4-Hidroxibenzoico	4,52
	4 Hidroxibenzaldehído	5,35
	Ácido vainillínico	5,57
	Ácido siríngico	6,33
	Vainillina	6,45
	Siringaldehído	7,10
	Ácido para-cumárico	7,54
	Ácido ferúlico	8,13

3.7 Cuantificación de azúcares reductores

Cuantificar la formación del producto como azúcares reductores después del tiempo de hidrólisis se realizó a través del método analítico DNS, el cual consistió en hacer reaccionar las muestras hidrolizadas a diferentes diluciones con el ácido 3,5-dinitrosalicílico, relacionándose su concentración a través de la densidad óptica del color producido, en un espectrofotómetro a 540 nm, reportándose diferentes valores de absorbancias, los cuales finalmente se correlacionaran con la curva de calibración ajustada con concentraciones de glucosa conocidas, Anexo IV.

3.8 Cuantificación de sólidos solubles y pH, después del pre-tratamiento con agua caliente

Del líquido de pre-tratamiento con agua caliente se procedió a cuantificar los sólidos solubles, filtrando la solución en un papel de filtro Whatman. El porcentaje de sólidos solubles se midió al líquido filtrado a través de un refractómetro digital Pocket (0-70%). El pH del líquido de pre-tratamiento se midió en un peachimetro Mettler Toledo.

3.9 Caracterización y cuantificación líquido post-hidrólisis (hidrolizado ácido-HA)

Al líquido del pre-tratamiento se le realizó una post-hidrólisis ácida que consistió en hacer reaccionar 25 mL del líquido con 0,720 mL de H_2SO_4 al 97% a una temperatura de 121° C por media hora. Posteriormente se analizaron los carbohidratos estructurales liberados en el hidrolizado ácido, a través de HPLC.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Caracterización de la materia prima

En la Tabla 4-1 se muestran los resultados obtenidos para el contenido de extraíbles en agua y etanol y en la Tabla 4-2 la composición de la fibra prensada de palma, después de su caracterización.

Tabla 4-1 Contenido de extraíbles en la fibra prensada de palma en base seca, luego de protocolo Soxhlet

Extraíbles en	$\left(\frac{\text{g sólidos extraídos}}{100 \text{ g materia prima}}\right)$
Agua	4.9±0,5
Etanol	3.2±0,5

Tabla 4-2 Composición de la fibra prensada de palma

Componente	Porcentaje (%)
Extraíbles	8.1±0,5
Lignina	30.1±0,6
Cenizas	3.1±0,1
Celulosa	30.6±1,8
Hemicelulosa	26.0±2,9
Otros	1.2

Según la caracterización de la fibra prensada de palma Tabla 4-1, la fibra presenta un mayor contenido de extraíbles en agua (4.9) que en etanol (3.3); para un total de 8.1 g sólidos extraídos/100 g de materia prima, al compararlo con otros materiales como el cardo o abrojo “*Cynara cardunculus*” con un valor de 14.3 (Ballesteros et al., 2008) y el árbol de olivo con 15.4 g sólidos extraídos/100 g de materia prima (Cara et al., 2006) la fibra presenta un menor contenido de extractivos.

La variabilidad de los resultados obtenidos para la caracterización de las diferentes fracciones analizadas, Tabla 4-2, se obtuvieron en un intervalo de confianza del 95%, sin embargo para la fracción de la hemicelulosa (2.9) y celulosa (1.8) este límite no se logro obtener, esto posiblemente se debió a que estos dos componentes varían significativamente de una muestra a otra por la heterogeneidad intrínseca del material.

La materia prima presentó un alto contenido de lignina, 30.1%, comparado con el otro residuo principal de la explotación de la palma de aceite: los racimos vacíos del fruto o raquis que contienen aproximadamente un 20,4% y superior al valor del 21% reportado por Gutiérrez et al, 2008. Esta diferencia se podría deber a la alta heterogeneidad de la materia prima, que no solamente consta de los residuos fibrosos de la palma de aceite, sino también de los residuos de la cáscara de los frutos o cuescos y hasta de raquis.

La cantidad de celulosa (30.6%) es menor a la reportada por Gutiérrez, et al. (40%), véase Tabla 2-1. Los comparativos para el contenido de hemicelulosa son similares y tan solo presentan una diferencia de dos unidades, de igual manera para el caso de las cenizas. Respecto a lo reportado por ensayos realizados en Nibong Tebal, Malasia (Abdul et al., 2002) el producto proveniente del Meta presenta valores superiores para la hemicelulosa y las cenizas. La fibra prensada de palma cuenta con un contenido del 60,1% de carbohidratos en peso seco, lo cual hace de esta materia prima un sustrato adecuado para la producción de azúcares fermentables.

4.2 Análisis elemental

En cuanto al análisis elemental de la fibra prensada de palma, se solicitó el análisis externo al Laboratorio de Carbones de Ingeominas, Bogotá-Colombia y los resultados que allí se obtuvieron (Anexo V) bajo la norma ASTM D:5373-07(07) se presentan en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3 Análisis elemental a la fibra prensada de palma (en base seca)

Elemento	Porcentaje (%)
Carbono	47,6
Nitrógeno	0,7
Hidrogeno	6,2
Otros	45,5

La relación C/N propia del material corresponde a un valor de 64,3 y el contenido de nitrógeno en el material es de tan solo un 0,7%.

4.3 Pre-tratamiento con agua caliente

4.3.1 Fracción líquida: caracterización de sólidos solubles y pH

En la Tabla 4-4 se muestran las condiciones generales del ensayo ordenadas ascendentemente con respecto a la temperatura (la numeración dada a cada uno de los resultados facilita su lectura posterior), además se presenta la caracterización del líquido de pre-tratamiento en cuanto al contenido de sólidos solubles y pH.

Tabla 4-4 Porcentaje de sólidos solubles y pH después del pre-tratamiento

Ensayo	Condiciones			Sólidos solubles (g/100 g de materia prima)	pH
	T (° C)	Carga (g/100 mL)	tiempo (min)		
1	146,6	7,5	10	0,4	5,1
2	160	5	5	0,4	4,8
3	160	5	15	0,4	4,7
4	160	10	5	0,6	4,9
5	160	10	15	0,7	4,8
6	180	3,3	10	0,5	4,4
7	180	7,5	10	1,1	4,3
8	180	7,5	10	1,1	4,3
9	180	7,5	10	1,0	3,8
10	180	7,5	1,6	0,8	3,4
11	180	7,5	18,4	1,3	4,6
12	180	11,7	10	1,7	4,5
13	200	5	5	1,3	4,3
14	200	5	15	1,3	4,3
15	200	10	15	2,3	4,2
16	200	10	5	2,0	4,4
17	213,6	7,5	10	2,1	4,0

Se observa que el contenido de sólidos solubles vario entre 0.4 a 2.3 gramos/100 gramos de materia prima, el primer valor correspondió a la condición 160° C, 7.5 g/100 mL y 10 min, mientras que para el valor más alto correspondió a 200° C, 10 g/100 mL y 15 min, con lo cual la solubilización de los sólidos presentó una tendencia ascendente con el aumento en la temperatura; en cuanto al pH alcanzado se encontraron valores que variaron entre 3.4 a 5.1 con el valor más bajo para 180° C, 7.5 g/100 mL y 1.6 min y para

el límite superior de 146.6° C, 7.5 g/100 mL y 10 min. Se observó una tendencia descendente con el aumento de la temperatura, posiblemente debido a la formación de iones hidronio presentes en los ácidos que aparecen después del pre-tratamiento tales como: el ácido acético, el ácido 4-hidroxibenzoico, el ácido para-cumárico y el ácido ferúlico. Cabe anotar que el valor del pH toma importancia cuando se decide trabajar con toda la mezcla, slurry, formado por el líquido de pre-tratamiento más los sólidos insolubles; ya que a pHs bajos las levaduras o bacterias encargadas de la etapa de fermentación se inhiben en su desempeño.

4.3.2 Fracción sólida: caracterización del material pre-tratado

En la Tabla 4-5 se muestran los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de recuperación, caracterización del material pre-tratado en cuanto su contenido de lignina, cenizas, celulosa y hemicelulosa.

Tabla 4-5 Recuperación total gravimétrica (en % de la materia prima), composición del filtrado y de los sólidos insolubles después del pre-tratamiento con agua caliente (% de la materia pre-tratada), según técnica adaptada del protocolo NREL.

Ensayo	Recuperación (%)	Lignina (%)	Cenizas (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)
1	88,3	34,5	2,5	31,3	19,9
2	81,7	36,3	3,3	31,7	21,7
3	84,2	36,2	2,4	31,1	22,1
4	93,0	37,5	3,8	30,1	21,7
5	92,7	38,0	3,3	29,3	21,1
6	67,5	40,3	3,0	36,6	18,4
7	82,9	39,0	3,0	39,1	17,1
8	81,2	39,7	3,2	34,5	18,4
9	78,5	37,8	2,9	35,5	16,9
10	81,1	40,2	3,3	34,7	19,4
11	70,3	40,3	3,3	39,3	16,4
12	81,0	38,9	3,1	39,5	16,4
13	95,7	46,1	3,5	45,8	9,8
14	62,6	46,4	3,6	47,2	8,9
15	68,5	47,5	4,0	42,6	8,9
16	71,5	46,2	3,9	39,3	9,5
17	59,7	52,0	3,9	49,5	4,2

La recuperación gravimétrica del sólido vario entre valores del 60% al 96%. Como se esperaba, se detecto un decrecimiento de la recuperación total de los sólidos a medida que aumentó la temperatura. Aunque en el ensayo 13 se presentó en contraste el mayor porcentaje de recuperación debido posiblemente al efecto de la carga. A medida que aumento la temperatura, la solubilización, especialmente de la fracción de hemicelulosa se incrementa lo que se ratifica en el análisis de la composición de la fracción sólida y líquida, donde se presenta un decrecimiento del contenido de este parámetro en los sólidos y un aumento en el líquido. Los resultados de lo anterior se observa en la Tabla 4-5 y Tabla 4-6. Teniendo en cuenta que la primera fracción en solubilizarse es la hemicelulosa, el residuo sólido se va concentrando en los menos solubles: celulosa y lignina.

4.3.3 Caracterización del hidrolizado ácido (HA)

El contenido de azúcares producidos después de la hidrólisis ácida de los líquidos de pre-tratamiento se calculó como g de azúcar/100 g de materia prima.

Tabla 4-6 Porcentaje de azúcares obtenidos en el líquido de pre-tratamiento después de post-hidrólisis

$$\left(\frac{\text{g de azúcar}}{100 \text{ g de materia prima}} \right)$$

Ensayo	Glucosa	Xilosa	Arabinosa
1	0,9	0,7	0,1
2	0,7	1,3	0,1
3	0,8	2,0	0,2
4	0,6	1,0	0,1
5	0,7	1,4	0,2
6	0,8	7,8	0,4
7	0,4	7,3	0,3
8	0,5	7,0	0,3
9	0,3	6,9	0,3
10	0,5	4,7	0,3
11	0,4	9,5	0,3
12	0,4	10,0	0,4
13	0,5	18,1	0,3
14	0,4	18,5	0,2
15	0,4	14,6	0,1
16	0,4	9,8	0,1
17	0,4	15,3	0,1

Como se muestra en la Tabla 4-6 después de hidrolizar la fracción líquida obtenida en el pre-tratamiento, se alcanzan a recuperar porcentajes importantes principalmente de xilosa hasta valores de 18,5 g/100 de materia prima. En cuanto a la glucosa el máximo valor fue del 0,9%. Se infiere que a medida que aumenta la temperatura en el pre-tratamiento, la recuperación de la fracción de xilosa también aumenta. La recuperación de los xilanos es importante teniendo en cuenta su carácter de azúcar fermentable. En cuanto a la arabinosa detectada el valor máximo fue de 0,4 g/100 g de materia prima.

4.3.4 Porcentaje de sacarificación, rendimiento y rendimiento global

4.3.4.1 De glucosa

El porcentaje de sacarificación en la hidrólisis enzimática, respecto al pre-tratamiento se expresa como el porcentaje de glucosa liberada después de las 72 horas de reacción en relación a la glucosa potencial presente en los sólidos insolubles o fibra pre-tratada.

$$\% \text{ sacarificación} = \left(\frac{\text{g glucosa obtenida en la hidrólisis enzimática (HE)}}{\text{g glucosa potencial en la fibra pre-tratada}} \right) \times 100$$

Indudablemente el porcentaje de sacarificación es una herramienta útil para evaluar la eficiencia del pre-tratamiento, pero para establecer las mejores condiciones también es útil evaluar la glucosa total producida por gramo de materia prima no tratada lo que se expresa como:

$$\text{Rendimiento de glucosa en la Hidrólisis Enzimática} = \left(\frac{\text{g glucosa obtenida en la HE}}{100 \text{ g de materia prima}} \right)$$

Si además de analizada la glucosa producida en la fracción de los sólidos insolubles, se valora la glucosa producida en el líquido de pre-tratamiento (hidrolizado ácido), el rendimiento global de glucosa respecto a la materia prima, se expresaría como:

$$\text{Rendimiento global de glucosa} = \left(\frac{\text{g glucosa obtenida en la hidrólisis enzimática} + \text{g glucosa obtenida en la hidrólisis ácida}}{100 \text{ g de materia prima}} \right)$$

En la Tabla 4-7 se muestran los resultados obtenidos para estos tres parámetros, evaluándolos para la glucosa.

Tabla 4-7 Porcentaje de sacarificación, rendimiento de glucosa y rendimiento global de glucosa en la hidrólisis enzimática

Ensayo	Porcentaje de sacarificación (%)	Rendimiento de glucosa en la HE (%)	Recuperación de glucosa en la HE (%)	Rendimiento global de glucosa (sólidos HE+ hidrolizado ácido)	Recuperación global de glucosa (%)
1	8,5	2,6	7,6	3,4	9,9
2	8,6	2,5	7,2	3,1	9,0
3	9,9	2,8	8,4	3,5	10,2
4	10,9	3,4	9,9	3,9	11,3
5	9,2	2,7	8,1	3,3	9,6
6	4,9	1,3	3,9	1,9	5,7
7	17,5	6,3	18,4	6,6	19,3
8	19,6	6,0	17,7	6,4	18,9
9	19,2	5,9	17,3	6,2	18,1
10	19,8	6,1	18,0	6,5	19,1
11	18,7	5,7	16,7	6,0	17,6
12	20,6	7,2	21,3	7,6	22,2
13	19,6	9,5	27,8	9,8	28,9
14	15,4	5,0	14,7	5,3	15,7
15	20,8	6,7	19,6	7,0	20,5
16	22,5	7,0	20,4	7,2	21,3
17	21,7	7,1	20,7	7,4	21,6

El mayor porcentaje de sacarificación en el paso de la hidrólisis enzimática fue de 22.5 correspondiente al pre-tratamiento a 200° C, 7.5% de sólidos y 5 min. Mientras que para el rendimiento de glucosa respecto a la materia prima se alcanzó un valor de 9.5 g de glucosa/100 g de materia prima, para 200° C, 5% de carga de sólidos y 5 min; con lo cual se alcanzó un 28% de recuperación de la glucosa teórica. La glucosa del hidrolizado ácido contribuye en 0.3 unidades del total de 9.8% para el ensayo donde se tiene el mayor porcentaje de recuperación total. Esta consideración se deberá tener en cuenta cuando se intente recuperar e incluir la carga de glucosa global a la fermentación.

4.3.4.2 De xilosa

Al poseer la fibra prensada un alto contenido de hemicelulosa, 26% en peso seco de su composición es importante analizar lo que sucede con esta fracción en el pre-tratamiento. La mayoría de xilanos en la hemicelulosa corresponden a xilosa (aproximadamente un 90%), por esto se puede expresar el rendimiento de xilosa, como:

$$\left(\frac{g \text{ de xilosa obtenida en el líquido HE} + g \text{ xilosa obtenida en el hidrolizado ácido}}{100 g \text{ de materia prima}} \right)$$

Resultados que se muestran en la Tabla 4-8.

Tabla 4-8 Rendimiento global de xilosa (% sobre la materia prima) y porcentaje de recuperación de xilosa (g de xilosa recuperados respecto a la teórica)

Ensayo	Rendimiento global de xilosa (%)	Recuperación xilosa (%)
1	1,1	4,4
2	1,7	6,3
3	2,3	8,9
4	1,5	6,0
5	1,8	6,7
6	6,6	25,5
7	7,4	28,5
8	7,1	27,4
9	7,0	27,0
10	5,3	20,5
11	9,2	35,5
12	9,8	37,6
13	16,5	63,4
14	16,4	63,2
15	13,7	52,5
16	9,8	37,8
17	14,7	56,7

Como se observa en la Tabla 4-8 el mayor rendimiento de xilosa fue de 16.5 g de xilosa/100 de material pre-tratado el cual se logró a una condición de 200° C, 5 % carga de sólidos y 5 min de pre-tratamiento. La recuperación de xilosa vario en un intervalo de

4.4 a 63.4% con respecto a la xilosa teórica propia del material, viéndose una tendencia de recuperación mayor a medida que aumenta la temperatura del pre-tratamiento.

4.3.4.3 Rendimiento global de azúcares fermentables

Si se tiene en cuenta el aporte de la xilosa como azúcar fermentable, el rendimiento global de azúcares se expresaría como:

Rendimiento global de azúcares

$$= ((g \text{ de azúcares (glucosa + xilosa)}) / (100 \text{ de materia prima}))$$

En la Tabla 4-9 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4-9 Rendimiento global y porcentaje de recuperación de azúcares fermentables con respecto a la materia prima

Ensayo	Rendimiento global azúcares fermentables (%)	Recuperación de azúcares fermentables (%)
1	4,5	7,5
2	4,7	7,9
3	5,8	9,6
4	5,4	9,0
5	5,0	8,4
6	8,6	14,3
7	14,0	23,2
8	13,6	22,6
9	13,2	21,9
10	11,8	19,7
11	15,2	25,3
12	17,4	28,9
13	26,3	43,8
14	21,8	36,2
15	20,6	34,4
16	17,1	28,4
17	22,1	36,8

Al tener en cuenta el aporte tanto de la glucosa y xilosa obtenida en la hidrólisis enzimática como en el hidrolizado ácido, el rendimiento global de azúcares aumenta hasta un 26.3 g/100 g de materia prima para la condición de 200° C, 5% carga de sólidos y 5 min de reacción, resultado que debe tenerse en cuenta desde un punto de vista económico, ya que es necesario considerar los azúcares derivados de la fracción hemicelulósica presente en el filtrado, los cuales podrían ser también transformados a etanol por cepas de levaduras selectas. Con esto la recuperación final de azúcares fermentables obtenidos en el pre-tratamiento es de 43.3% respecto al valor teórico potencial. Este valor supera el encontrado en trabajos previos (25%) utilizando paja de arroz bajo condiciones de pre-tratamiento de 190° C, 120 min y una relación de 7% p/p como lo reportan Rogalinski et al., 2008.

4.3.5 Inhibidores de crecimiento de microorganismos

En la Tabla 4-10 se presentan los resultados para el contenido (g de inhibidor/100 g de materia prima) de inhibidores analizados en los líquidos de pre-tratamiento los cuales se dividieron en tres grupos. El primero de ellos corresponde al ácido acético como parte de los ácidos débiles, el segundo los derivados de los furanos que fundamentalmente corresponde al 5-hidroximetilfurfural y el furfural y el tercer grupo a los compuestos fenólicos donde se tuvo en cuenta la contribución del resto de componentes analizados (véase Tabla 3-5).

En la Tabla 4-10 se observa que el contenido de inhibidores para el ácido acético varía entre 0.5 a 7.4 g/100 de materia prima, infiriéndose un aumento del contenido de ácido acético con la temperatura.

Para el grupo de los derivados del furano se observa que estos no se producen hasta cuando la temperatura supera los 180° C y se obtuvieron en un intervalo de 0.1 a 0.8%. Mientras que para los compuestos fenólicos se generaron desde temperaturas bajas con valores entre un 0.2 a 0.5%.

Tabla 4-10 Concentración de inhibidores de crecimiento de microorganismos $\left(\frac{g \text{ de inhibidor}}{100 g \text{ de materia prima}}\right)$

Ensayo	Ácido acético (%)	Furanos (%)	Fenólicos (%)
1	0,5	0,0	0,2
2	0,9	0,0	0,2
3	1,1	0,0	0,3
4	0,8	0,0	0,2
5	2,0	0,0	0,2
6	3,2	0,0	0,5
7	2,5	0,0	0,3
8	2,4	0,0	0,3
9	2,2	0,0	0,3
10	1,7	0,0	0,2
11	3,1	0,1	0,2
12	2,3	0,1	0,2
13	6,0	0,2	0,5
14	5,9	0,2	0,5
15	5,8	0,1	0,2
16	3,4	0,1	0,3
17	7,4	0,8	0,4

Considerar el efecto de los inhibidores sobre el crecimiento de los microorganismos en las eficiencias de procesos posteriores de fermentación, es muy importante. Por ejemplo, se podrían presentar alargamientos en la fase de adaptación de los microorganismos a los sustratos con alta concentración de inhibidores, lo que se reflejaría de manera directa en tiempos y costos de proceso.

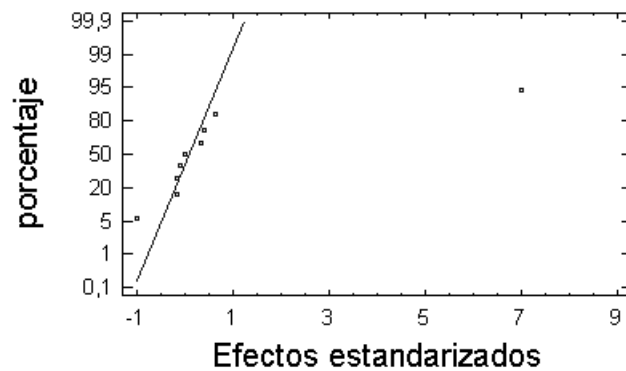
4.3.6 Análisis superficie de respuesta

4.3.6.1 Rendimiento global de azúcares

Para el análisis estadístico de la superficie de respuesta se utilizó el software Statgraphics Plus v.5.0. En este se estimó el diseño experimental maximizando el rendimiento global de azúcares fermentables como gramos de glucosa+xilosa/100 gramos de materia prima, Anexo V. Con el análisis de varianza los datos experimentales se ajustaron a un r-cuadrado de 87.9%, como se observa en la Figura 4-1.

Figura 4-1 Gráfico de Probabilidad normal para Rendimiento Azúcares

Gráfico de Probabilidad normal para Rendimiento Azúcares

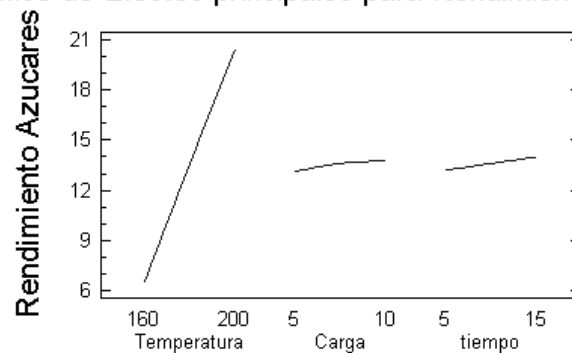


- **Grafica de efectos principales**

En la Figura 4-2 se evidencia que el factor que tuvo mayor incidencia fue la temperatura en la maximización del diseño experimental, encontrándose una relación ascendente entre el rendimiento global de los azúcares y la temperatura, mientras que los factores de carga y tiempo no tuvieron una incidencia importante. Sin embargo, una alta dosificación de sólidos puede incrementar la viscosidad de la mezcla, consecuentemente incrementando la resistencia a la transferencia de masa (Sheng et al., 2010).

Figura 4-2 Gráfico de Efectos principales para Rendimiento Azúcares

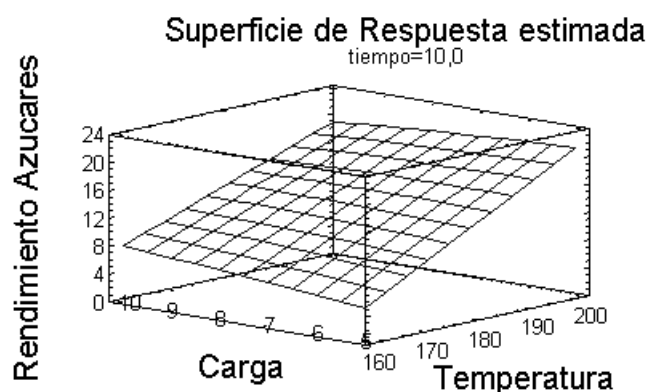
Gráfico de Efectos principales para Rendimiento Azúcares



- **Superficie de respuesta estimada**

Al observar la Figura 4-3 se evidencia que no se ha alcanzado un punto óptimo para el rendimiento global de azúcares, aunque se encontró un punto máximo en 211.8°C , carga de $3.3\text{ g}/100\text{ mL}$ y un tiempo de 1.6 min , para el cual se espera obtener un valor de 28.9 gramos de azúcares/100 gramos de materia prima. Según el modelo ajustado, se puede inferir que en el diseño experimental planteado no se ha cubierto un rango adecuado de temperaturas ya que la tendencia de la producción de azúcares siempre fue creciente en el intervalo de $146.6\text{-}213.6^{\circ}\text{C}$ estudiada. Investigaciones de Sheng et al., 2010, usando las hojas de la palma de aceite reportan rendimientos de glucosa de 92.8% en un punto óptimo de 178°C , en una relación de líquido-sólido de 9.6 y en un tiempo de pre-tratamiento de 11.1 min .

Figura 4-3 Superficie de respuesta estimada para el rendimiento global de azúcares



4.3.6.2 Rendimiento global de glucosa más Inhibidores de crecimiento de microorganismos

Al realizar un análisis de optimización de respuesta múltiple maximizando el rendimiento global de glucosa (7.29%) y minimizando la producción de inhibidores de fermentación (1.79) se encontró un punto óptimo a una temperatura de 186°C , $9.4\text{ g}/100\text{ mL}$ y un tiempo de 1.6 min , como se observa en la Figura 4-4 y 4-5. Este resultado proyecta un resultado importante para ser evaluado en la siguiente etapa de fermentación, tomando

como materia prima solamente la glucosa y teniendo en cuenta los compuestos tóxicos para el desempeño de los microorganismos.

Figura 4-4 Superficie de respuesta estimada maximizando el rendimiento global de glucosa y minimizando la producción de inhibidores

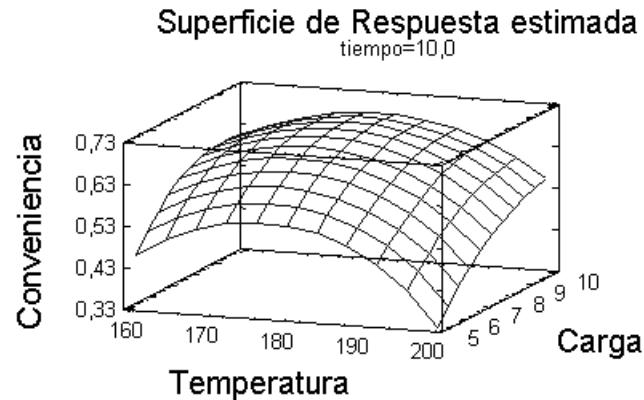
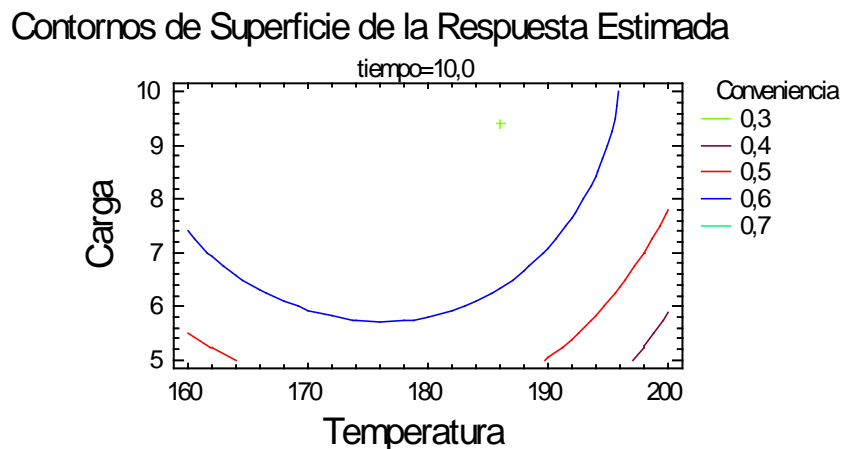


Figura 4-5 Contornos de superficie de respuesta estimados maximizando el rendimiento global de glucosa y minimizando la producción de inhibidores



4.4 Pre-tratamiento biológico

4.4.1 Ensayo preliminar

4.4.1.1 Caracterización del material pre-tratado

El sólido pre-tratado se caracterizó en su contenido de lignina, cenizas y carbohidratos estructurales; se realizó la determinación de lignina residual el cual consistió en calcular

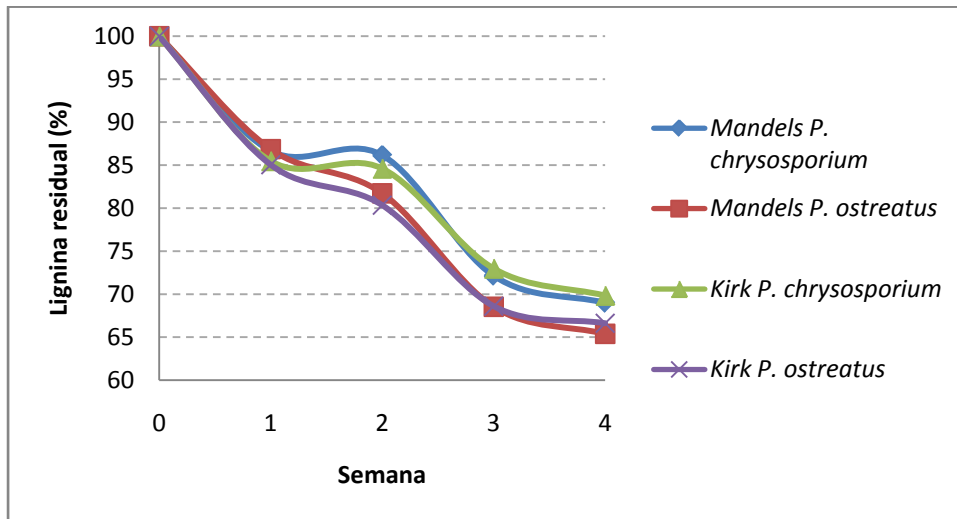
el grado de deslignificación y correlacionarlo con la lignina presente en la materia prima sin pre-tratar.

- **Grado de deslignificación**

$$GD = \left(\frac{\text{Lignina material pre - tratado}}{\text{Lignina materia prima}} \right) * 100$$

Como se observa en la Figura 4-6 el mayor grado de deslignificación estuvo a cargo del hongo *P. ostreatus* en combinación con el medio de cultivo Mandels al alcanzarse un 34.6% a la cuarta semana, sin embargo fue muy semejante al resultado obtenido para la combinación con medio de cultivo Kirk al alcanzarse un 33.4% en el mismo tiempo. Por otro lado las combinaciones *P. chrysosporium* en los dos medios de cultivo tan solo alcanzaron el 31% de deslignificación.

Figura 4-6 Lignina residual en función del tiempo de tratamiento



Como se observa en la Tabla 4-11 el porcentaje de recuperación disminuyó a lo largo del tiempo, los valores que se encontraron a 95.2% y 66.3% para la primera y última semana respectivamente, se correlaciona con la pérdida de lignina a través del tiempo. En cuanto al contenido de cenizas no se observaron diferencias significativas (2.2 – 3.4%) y se fueron incrementando ligeramente con el tiempo de tratamiento.

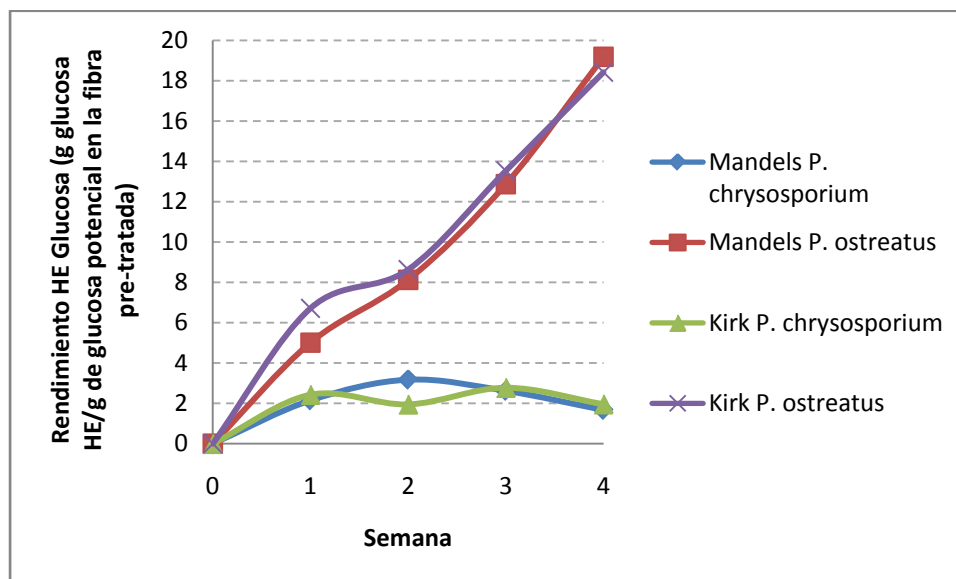
Tabla 4-11 Porcentaje de recuperación gravimétrica de sólidos y composición de cenizas a través del tiempo

Medio de cultivo	Hongo	1° Semana		2° Semana		3° Semana		4° Semana	
		Recuperación	Cenizas	Recuperación	Cenizas	Recuperación	Cenizas	Recuperación	Cenizas
Mandels	<i>P. chrysosporium</i>	82,4	2,9	72,8	2,3	66,3	2,4	66,4	2,4
	<i>P. ostreatus</i>	86,8	2,6	82,3	2,4	76,2	2,7	67,7	3,2
Kirk	<i>P. chrysosporium</i>	95,2	2,2	82,4	2,2	70,1	2,4	66,9	3,0
	<i>P. ostreatus</i>	78,8	2,7	79,9	2,4	87,2	3,4	70,4	3,4

4.4.2 Porcentaje de sacarificación

En cuanto al porcentaje de sacarificación o rendimiento de hidrólisis enzimática en la Figura 4-7 se observa que el mayor valor alcanzado fue de 19.2 g glucosa en la Hidrólisis Enzimática (HE)/g glucosa potencial en la fibra pre-tratada para la combinación *P. ostreatus* en medio de cultivo Mandels, aunque de cerca estuvo el valor obtenido para la combinación *P. ostreatus* en medio de cultivo Kirk con un 18.4%, mientras que la biomasa no pre-tratada tuvo un rendimiento de hidrólisis enzimática inferior de 5.6%. Cabe resaltar que el pre-tratamiento biológico con el hongo *P. ostreatus* empieza a superar este valor desde la primera semana de tratamiento, lo cual demuestra que este hongo efectivamente mejora la glucosa liberada de la fibra prensada de palma en las condiciones adecuadas de crecimiento (medio de cultivo, humedad y temperatura).

Figura 4-7 Rendimiento de glucosa en la hidrólisis enzimática a través del tiempo



Los resultados para las combinaciones del hongo *P. chrysosporium* en los dos medios de cultivo no arrojan rendimientos promisorios ya que ni siquiera superan al control, o sea al material sin pre-tratar en ninguna de las cuatro semanas de tratamiento; esto se debe principalmente a que el hongo *P. chrysosporium* degradada no solamente la lignina sino también la celulosa, como se observa en la Tabla 4-12. Para la cuarta semana de pre-tratamiento la caracterización del material arroja un 5% menos de celulosa para el material pre-tratado con la combinación *P. chrysosporium* en medio Kirk respecto al *P. ostreatus* en el mismo medio, resultado que se ratifica también con lo obtenido en el ítem 4.4.1.1 correspondiente al grado de deslignificación.

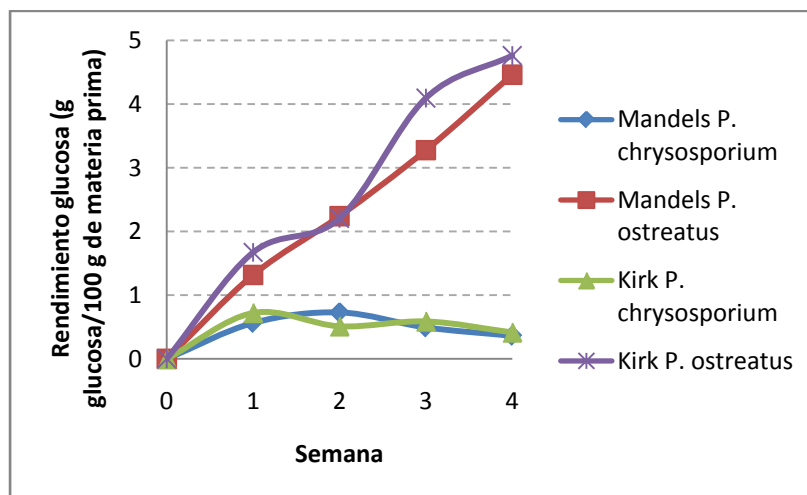
Tabla 4-12 Caracterización de las fracciones de celulosa y hemicelulosa a través del tiempo

Medio de	Hongo	1° Semana		2° Semana		3° Semana		4° Semana	
		Celulosa	Hemicelulosa	Celulosa	Hemicelulosa	Celulosa	Hemicelulosa	Celulosa	Hemicelulosa
Mandels	<i>P. chrysosporium</i>	29,7	22,3	29,2	23,2	26,1	19,8	29,7	24,5
	<i>P. ostreatus</i>	28,3	21,7	30,5	22,0	30,7	20,3	31,1	21,0
Kirk	<i>P. chrysosporium</i>	28,2	22,7	29,0	23,0	27,9	22,3	28,8	22,8
	<i>P. ostreatus</i>	28,2	22,3	29,1	21,4	31,5	22,0	33,3	21,7

4.4.2.1 Rendimiento de glucosa y xilosa

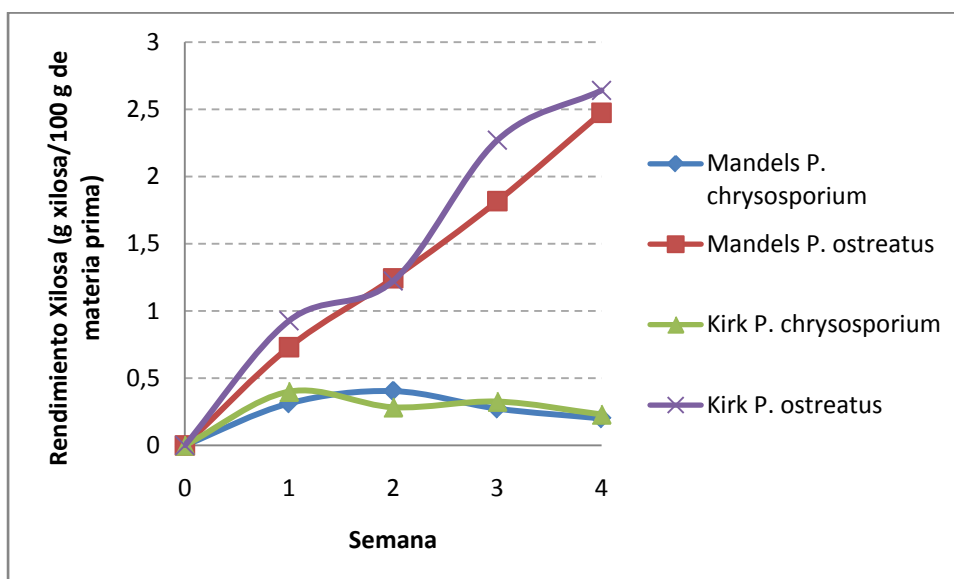
Los resultados del rendimiento de glucosa por 100 gramos de materia prima no tratada se muestran en la Figura 4-8. El mayor rendimiento de glucosa obtenido en la etapa de la hidrólisis enzimática correspondió a 4,8 g de glucosa/100 g de materia prima, para la combinación del hongo *P. ostreatus* tanto en medio de cultivo Kirk, muy seguido por la combinación del mismo hongo pero en el medio Mandels con un 4,5%, lo que corresponde a un 14 y 13,1% respectivamente de recuperación de la glucosa liberada respecto a la teórica. De nuevo los resultados obtenidos para la combinación *P. chrysosporium* en los dos medios de cultivo no arrojan resultados prometedores ya que ni siquiera superan al material tomado como control (1,67% de rendimiento de glucosa). Para el hongo *P. ostreatus* se observa que este empieza a superar el límite alcanzado por el control a partir de la segunda semana de tratamiento.

Figura 4-8 Rendimiento global de glucosa en función del tiempo



En cuanto al rendimiento de xilosa, Figura 4-9, que se ha tenido en cuenta en esta investigación por ser considerada como azúcar fermentable y por ser detectada en el análisis después de la hidrólisis enzimática, esto atribuido principalmente a que las enzimas empleadas deben presentar en menor proporción actividad hemicelulasa por ser un complejo enzimático, además que la fibra prensada de palma presenta un alto contenido de esta fracción. Se observa que el mayor valor alcanzado fue de 2,6 y 2,5 g de xilosa/100 de materia prima para la combinación *P. ostreatus* en medio de cultivo Kirk y Mandels respectivamente, con lo cual el porcentaje de recuperación de este azúcar correspondió a un 10,2 y 9,5%.

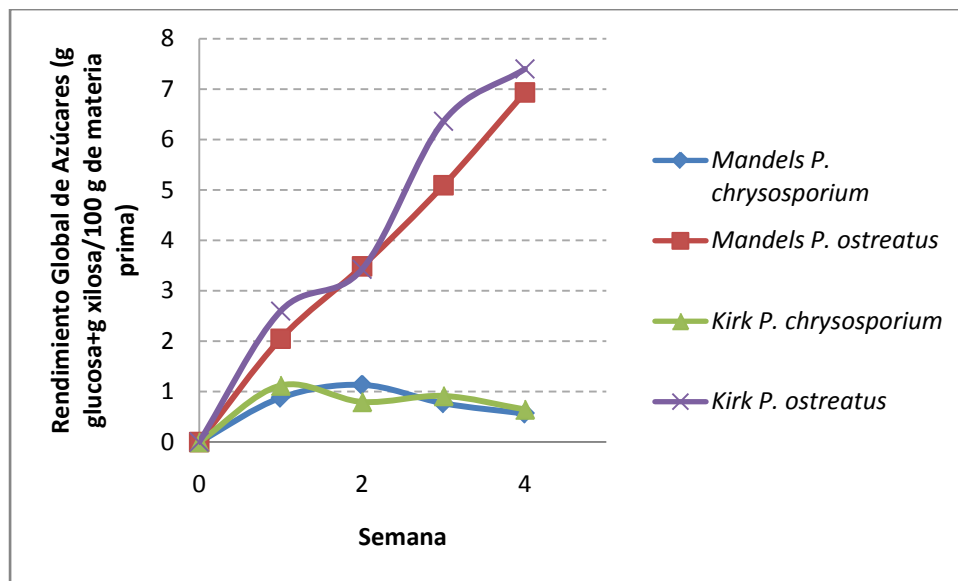
Figura 4-9 Rendimiento global de xilosa en función del tiempo



4.4.2.2 Rendimiento global de azúcares

El parámetro principal para evaluar el pre-tratamiento biológico corresponde al rendimiento global de azúcares que expresa la suma de la glucosa y xilosa liberadas en la hidrólisis enzimática del material pre-tratado con respecto a la materia prima de partida, azúcares que posteriormente serían los disponibles para la posterior etapa de fermentación. En la Figura 4-10 se observa que el mayor rendimiento correspondió a la combinación *P. ostreatus* en medio de cultivo Kirk con un 7.4% seguido de la combinación del mismo hongo en el medio de cultivo Mandels con un 6.9%. Con esto el porcentaje de recuperación de los azúcares fermentables respecto a la materia prima fue de un 4,5% y un 4,2% respectivamente. Para la combinación *P. chrysosporium* en los dos medios de cultivo el porcentaje de recuperación de azúcares no superó el 0,4%.

Figura 4-10 Rendimiento global de azúcares fermentables en función del tiempo



Al tener en cuenta no solamente la caracterización del material pre-tratado (grado de deslignificación y contenido de celulosa), sino también el rendimiento de hidrólisis enzimática y el rendimiento global de glucosa/g de materia prima, se escogió la combinación *P. ostreatus* en medio de cultivo Kirk para ser evaluada variando la relación C/N (ítem 4.4.2), ya que aunque se obtiene un porcentaje de deslignificación menor (33,4%) con respecto a la combinación *P. ostreatus* en medio de cultivo Mandels (34,6%),

se ve compensada en cuanto a la disponibilidad de la celulosa luego de la caracterización del material pre-tratado 33,3% con respecto a un 31,1% que en conversión de glucosa significa un 2,4% adicional (véase Tabla 4-12).

Además respecto al porcentaje de sacarificación de glucosa en la hidrólisis enzimática se observa que desde la primera semana los valores son mayores para la combinación *P. ostreatus* en medio de cultivo Kirk, mientras que para la segunda combinación (*P. ostreatus*-Mandels) se incrementa levemente a la cuarta semana, en tan solo un 0,8%. Por último teniendo en cuenta el rendimiento global de azúcares como aporte de la glucosa liberada más el de la xilosa. Y al ser el parámetro más significativo por estar relacionado directamente con el material que se carga sin pre-tratar se obtuvo en la combinación Kirk/*P. ostreatus* un rendimiento (7,4%) mayor sobre la combinación Mandels/*P. ostreatus* con un valor de 6,9%.

Sustentados en lo anterior se decidió tomar la primera combinación. Adicionalmente para apoyar esta discusión el medio de cultivo Kirk ha sido ampliamente reportado por poseer una relación de nutrientes adecuados para la deslignificación biológica (Cardona et al., 2009).

Si se compara el pre-tratamiento biológico con el de agua caliente, se pueden obtener resultados similares a los obtenidos con agua caliente a temperaturas entre 146 y 160° C, con la ventaja de no utilizar una carga energética elevada, sin embargo; para un análisis más exhaustivo se debe tener en cuenta la productividad del proceso.

4.4.3 Ensayo variando la relación C/N

4.4.3.1 Caracterización del material pre-tratado

El porcentaje de recuperación para este ensayo varió de un 66.2 a un 71.3%, el porcentaje de cenizas se incremento en la cuarta semana de un 2 a un 3.6% y como era de esperarse la celulosa y hemicelulosa se concentraron de una semana a la otra con la respectiva compensación del incremento en el grado de deslignificación (Tabla 4-13).

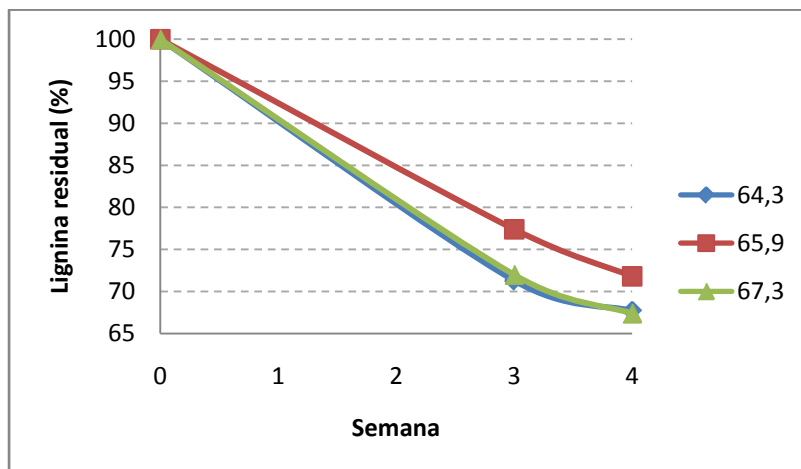
Tabla 4-13 Porcentaje de recuperación y composición del material pre-tratado variando la relación C/N

Relación C/N	% Recuperación		% Lignina		% Cenizas		% Celulosa		% Hemicelulosa	
	Semana 3	Semana 4	Semana 3	Semana 4	Semana 3	Semana 4	Semana 3	Semana 4	Semana 3	Semana 4
64,3	66,2	68,0	33,5	30,1	2,7	3,5	23,1	25,9	20,2	20,8
65,9	70,1	67,7	33,3	32,0	2,0	3,3	23,0	24,0	20,0	19,0
67,3	66,1	71,3	32,5	30,5	2,6	3,6	24,7	21,7	20,8	17,6

- **Grado de deslignificación**

Como se observa en la Figura 4-11 después de la tercera y cuarta semana de pre-tratamiento con la relación propia (64,3) de C/N del material, se alcanzó un grado de deslignificación del 28.7% y 32.3% respectivamente, valor semejante al obtenido cuando el medio de cultivo se suplemento con 10g/L de glucosa (relación C/N de 67,3) 28.0 y 32.6, respectivamente. Mientras que el resultado obtenido para la relación intermedia (65,9) alcanzó valores de deslignificación inferiores a las otras dos relaciones; por tanto este parámetro por ahora indica que para obtener el mismo grado de deslignificación no es necesario suplementar el medio de cultivo con adición de fuente de carbono, ya que la relación intrínseca que tiene el material es suficiente; además si se observa la Tabla 4-12 el porcentaje de celulosa disponible en el material pre-tratado es superior para la relación C/N propia en 2 unidades (tercera semana de tratamiento) y 4.62 unidades (cuarta semana de tratamiento) convertidas a glucosa disponible en comparación con las otras dos relaciones respectivamente, lo que de nuevo ratifica la no necesidad de variar la relación C/N, en cuanto al grado de deslignificación.

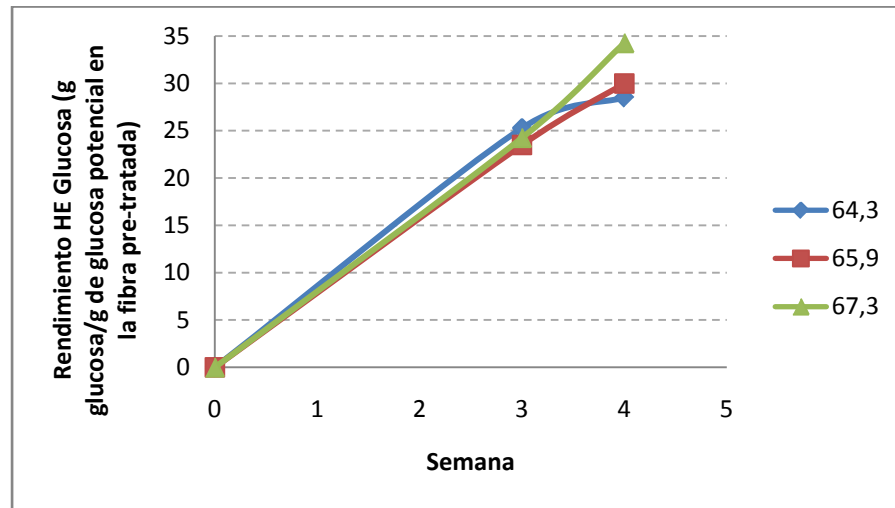
Figura 4-11 Lignina residual en función del tiempo



4.4.3.2 Porcentaje de sacarificación

En la Figura 4-11 se observa que el porcentaje de sacarificación en la hidrólisis enzimática respecto a la glucosa (g de glucosa liberados en la HE/g de glucosa potencial en la fibra pre-tratada) alcanzan valores de 13.5 15.7 y 17.9% a la cuarta semana de tratamiento, mientras que para el control se alcanza un 4.6%. A medida que aumenta la relación C/N se observa un aumento en el porcentaje de sacarificación.

Figura 4-12 Rendimiento de glucosa en la hidrólisis enzimática en función del tiempo



4.4.3.3 Rendimiento de glucosa y xilosa

Al evaluar el parámetro correspondiente al rendimiento de glucosa (Figura 4-12) y xilosa (Figura 4-13) que se expresa como los gramos de glucosa o xilosa liberados en la HE/100 g de materia prima se observa que los valores en las diferentes relaciones C/N, estuvieron cercanos en un rango de 5.4 a 5.7% y de 3 a 3.2% respectivamente, después de la cuarta semana de tratamiento. Con estos resultados el porcentaje de recuperación vario entre valores de 12.2 a 16.7%, mientras que para la xilosa variaron en un 8.9 a un 12.2%.

Comparados estos resultados con el tratamiento de agua caliente en las condiciones de temperatura de 146.6 a 160° C (Ensayos 1 al 5) y ensayo 6 correspondiente a las

condiciones $T=180^{\circ}\text{C}$, 3.3 carga de sólidos y 10 min se alcanzan rendimientos semejantes de glucosa y xilosa en la hidrólisis enzimática.

Figura 4-13 Rendimiento global de glucosa en función del tiempo para las diferentes relaciones C/N

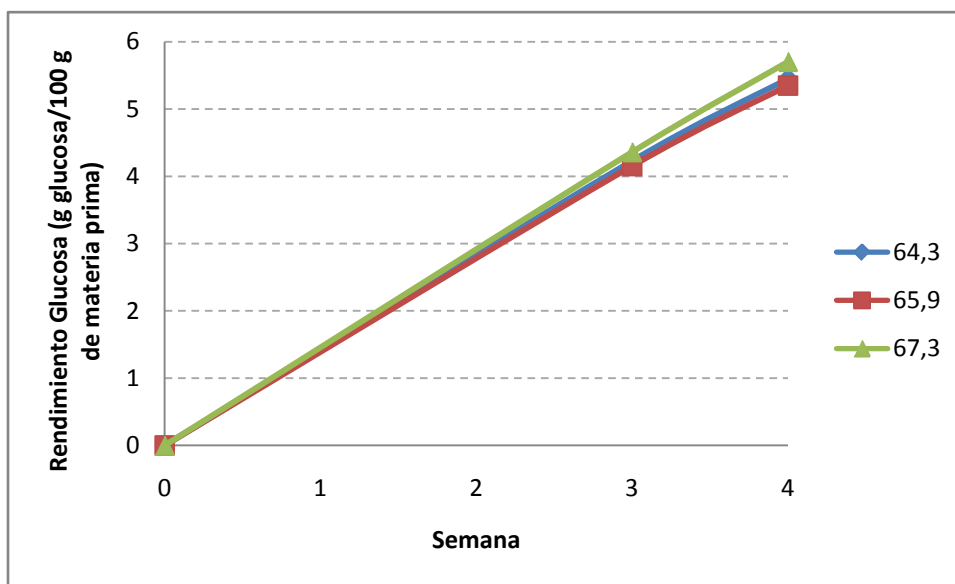
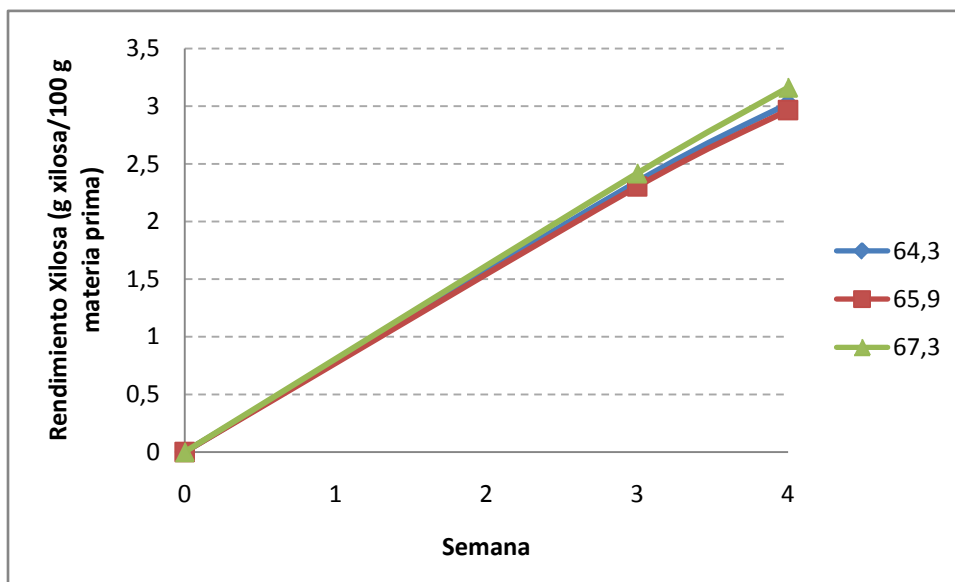


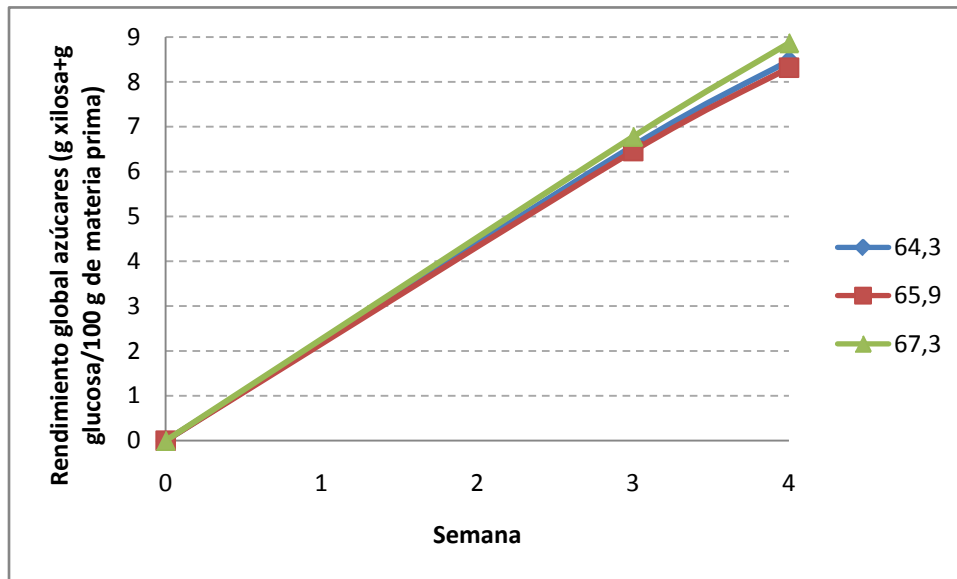
Figura 4-14 Rendimiento global de xilosa en función del tiempo para las diferentes relaciones C/N



4.4.3.4 Rendimiento global de azúcares fermentables

El rendimiento global de azúcares fermentables (glucosa + xilosa) se contempló como el parámetro principal para evaluar el ensayo, Figura 4-14. Con este se encontró un rendimiento máximo de 8.9 g de azúcares/100 de materia prima con un porcentaje de recuperación correspondiente del 5.3% para la relación C/N que se suplementó con mayor cantidad de glucosa. Sin embargo, para la relación propia del material los valores estuvieron en un 8.5 g de azúcares/100 g de materia prima para una recuperación del 5.1%. Con este resultado nuevamente se corrobora que la adición de una fuente de carbono como suplemento, no sería necesaria para llevar a cabo el pre-tratamiento.

Figura 4-15 Rendimiento global de azúcares en función del tiempo



4.5 Combinación de pre-tratamiento agua caliente con biológico

La combinación del punto estimado encontrado en el ítem 4.3.6 utilizando el material previamente tratado biológicamente con el hongo *P. ostreatus* en medio Kirk a la cuarta semana y sin adición de fuente de carbono, se llevó a cabo para evaluar el rendimiento global de azúcares. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

Como se observa en la Tabla 4-14 se pretrato material original como control y material previamente tratado biológicamente con la combinación del punto máximo de 211° C, 3.3 g/100 mL de solución y 1.6 min. El porcentaje de sólidos solubles y el pH fueron semejantes para los dos materiales; se observó diferencia en el porcentaje de recuperación gravimétrica donde se obtuvo un 10% más de recuperación para el material pre-tratado biológicamente. En cuanto al contenido de lignina se observa que el material pre-tratado biológicamente presentó un porcentaje menor debido a que el material ingresa al tratamiento previamente deslignificado por parte del hongo *P. ostreatus*, lo que a su vez se corresponde con el contenido de celulosa (40,4%) siete unidades por encima del reportado para el material original.

Tabla 4-14 Caracterización del material original y el material pre-tratado con la combinación (biológico más agua caliente) en el punto máximo

Material	Recuperacion (%)	Sólidos insolubles (%)	Sólidos solubles (%)	pH	Lignina (%)	Cenizas (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)
Original	67,9	1,8	0,9	3,4	52,6	4,4	33,3	4,7
Pre-tratado biológicamente	80,1	1,5	0,9	3,5	43,3	4,1	40,4	2,9

En cuanto al porcentaje de sacarificación alcanzado se observa en la Tabla 4-15 que para el material previamente pre-tratado se alcanzó un valor quince veces superior que con el material original, debido esto principalmente a que el material pre-tratado previamente ya ha logrado un grado de deslignificación donde deja a mayor disposición la celulosa y por ende la glucosa potencial. En cuanto al rendimiento de glucosa y xilosa se obtuvo una recuperación del 47.7% y 82.9% respectivamente, para el pre-tratado biológicamente contra una recuperación del 36.1% y 63% para el material original. En conclusión con la combinación de los dos pre-tratamientos se obtiene una recuperación del 62.9% de los azúcares fermentables contra un 47.8% cuando se utiliza solamente el tratamiento con agua caliente. Finalmente se alcanzó el valor predicho por la superficie de respuesta: 28.9 gramos de azúcares/100 de materia prima para el caso del material sin pre-tratar biológicamente y se supero este valor en nueve unidades aproximadamente al tratarse previamente la fibra prensada con el hongo con *P. ostreatus*.

Tabla 4-15 Porcentaje de sacarificación, rendimiento de glucosa y xilosa, rendimiento global de azúcares para el pre-tratamiento en combinación o no en el punto óptimo

Material	Porcentaje de sacarificación (g glucosa HE/g glucosa potencial en la fibra pre-tratada)	Rendimiento glucosa (g glucosa/100 g de materia prima)	Rendimiento xilosa (g xilosa/100 g de materia prima)	Rendimiento azúcares fermentables (g azúcares/100 g de materia prima)
Original	40,8	12,3	16,4	28,7
Pre-tratado biológicamente	55,4	16,3	21,4	37,8

En cuanto al análisis de inhibidores se encontraron valores semejantes para los dos materiales con 2,4 g (material original) y 3 g (combinación de pre-tratamientos) de inhibidor/100 de materia prima, donde los compuestos detectados fueron principalmente ácido acético y 5-hidroximetilfurfural, no se encontró presencia de los compuestos fenólicos.

En la literatura revisada no se tiene referencia de la aplicación de estos tratamientos a este tipo de residuos. Solamente Abdul et al., 2002 reportan porcentajes de conversión de fibra prensada de palma en peso seco aplicando pre-tratamientos de blanqueamiento y alcalinos comparándolos con el material sin ningún tipo de tratamiento. Los resultados fueron para la xilosa de 23.9%, 9.3% y 22.3% y para la glucosa de 18%, 45.2% y 27.8% respectivamente.

Los resultados hallados en el presente trabajo ratifican el potencial de este residuo para la producción de azúcares fermentables aplicando la combinación de dos pre-tratamientos: uno biológico seguido por otro con agua caliente, los cuales presentan ventajas interesantes desde el punto de vista ambiental y económico.

5. CONCLUSIONES

- La fracción correspondiente a la hemicelulosa (26%) hace de este residuo, un material interesante para la producción de productos como el xilitol o furfural.
- La fibra prensada de palma presenta un contenido total de 60% (peso seco) de carbohidratos, lo que lo hace un sustrato adecuado para la producción de azúcares fermentables.
- En el pre-tratamiento de agua caliente se logra recuperar un 30% de la glucosa y un 64% de la xilosa respecto a la materia prima, para las condiciones de 200° C, 5 % de carga y 5 min de reacción.
- Los líquidos de pre-tratamiento después de someter el material al agua caliente se caracterizaron en cuanto a su contenido de inhibidores de crecimiento de microorganismos encontrándose que: el ácido acético vario en un intervalo de 0.5 a 7.4 g de inhibidor/100 g de materia prima; para los derivados del furano de 0.1 a 0.8 g de inhibidor/100 g de materia prima, rescatando además que estos se producen cuando se supera la temperatura de 180° C solamente y para los compuestos fenólicos de 0.2 a 0.5 % sobre la misma base.
- En el pre-tratamiento de agua caliente aplicado a la fibra prensada se presentó una incidencia significativa de la temperatura sobre los otros dos factores analizados: tiempo y carga.
- Maximizando el diseño experimental de superficie de respuesta se encontró un punto máximo de rendimiento global de los azúcares fermentables (28.9 gramos de glucosa+xilosa/100 gramos de materia prima) a las condiciones de 211.8° C, carga de 3.3 y un tiempo de 1.6 min.
- En el pre-tratamiento biológico se logro un mayor grado de deslignificación (34.6%) con el hongo *P. ostreatus* en medio de cultivo Mandels a la cuarta semana de tratamiento en fermentación en estado sólido, sobre las otras tres combinaciones del mismo hongo en medio Kirk y del hongo *P. chrysosporium* en los dos medios de cultivos evaluados.
- Considerando el tratamiento biológico como un todo se encontró que la combinación *P. ostreatus* en medio Kirk es la mejor opción para tratar la fibra prensada de palma

reportándose valores de rendimiento global de azúcares de 7.4 gramos de azúcares fermentables/100 gramos de materia prima en contraste con un 1.67% del material sin pre-tratar.

- Cabe resaltar que al tratar el material biológicamente, se encuentran rendimientos semejantes que al tratarlo con agua caliente a una condición de temperatura 146 a 160° C, lo que desde el punto de vista energético es interesante porque el tratamiento biológico tan solo se realiza a 30° C. Además no produciría elementos inhibidores en una fermentación lo que si se genera con el incremento de temperatura y la posterior degradación de las fracciones hemicelulosicas y/o celulósicas.
- No se encontraron diferencias significativas cuando el medio de cultivo Kirk se suplementó con fuente de carbono, variando la relación C/N intrínseca del material. Por tanto se decidió trabajar con el material sin adición de glucosa.
- La combinación del material pre-tratado biológicamente por el hongo *P. ostreatus* en medio de cultivo Kirk por cuatro semanas con el punto máximo encontrado con el pre-tratamiento con agua caliente (211.8° C, carga de 3.3 y un tiempo de 1.6 min) mejora el rendimiento global de azúcares fermentables:

En 9 unidades sobre el tratamiento térmico,

En 30.4 unidades sobre tratamiento biológico y

En 36 unidades sobre el material sin pre-tratamiento.

Lo cual ratifica el potencial de este residuo de la industria de palma de aceite aplicando la combinación de estos dos tratamientos que presentan ventajas importantes sobre un impacto ambiental del proceso y sobre una evaluación económica del mismo

6. RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones relacionadas con el tema se recomienda:

Para el pre-tratamiento con agua caliente:

- Realizar ensayos donde no se varié la carga de los sólidos ya que se identificó que esta variable no es significativa en el proceso.
- Ampliar el intervalo de temperaturas y tiempos para el pre-tratamiento con agua caliente.
- Se sugiere estudiar alternativas para acortar el tiempo de calentamiento del sistema

Para los inhibidores de fermentación identificados:

- En cuanto al análisis de los inhibidores de crecimiento de microorganismos se recomienda realizar un análisis de fermentabilidad teniendo en cuenta el slurry en cuanto a cinéticas de crecimientos vs formación de producto.

Para la hidrólisis enzimática:

- Evaluar otras enzimas comerciales disponibles en el mercado.
- Aumentar la carga de sólidos en la hidrólisis enzimática

Para la combinación de los pre-tratamientos:

- En cuanto al análisis estadístico realizado optimizando múltiples respuestas: maximizando glucosa y minimizando inhibidores, probar el punto óptimo encontrado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abdul A., Das K., Husin M., Mokhtar A., (2002). Effects of physical and chemical pre-treatments on xylose and glucose production from oil palm press fiber. *Journal of Oil Palm Research* Vol. 14 No. 2, December, p. 10-17.

Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J., (2009). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* 101:4851-4861.

Allen, S.G., Schulma, Deborah, Lichwa, J., Antal Jr., M.J., (2001). A comparison of aqueous and dilute-acid single-temperature pretreatment of yellow poplar sawdust. *Ind. Eng. Chem. Res.* 40: 2352-2361.

Ballesteros I., Oliva J. M., Sáez F., & Ballesteros M. (2001). Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of olive oil extraction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91/93: 237-252.

Ballesteros I., Ballesteros M., Manzanares P., Negro M. J., Oliva J., Sáez F., (2008). Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal* 42: 84-91.

Bic-Biocentrum-DTU (2006) Ethanol potential for empty fruit bunches pre-treated by wet-explosion. Ed. M-D E C Programme. Denmark's Technical University, Denmark.

Calvalheiro F, Esteves MP, Parajó JC, Pereira H, Gírio FM. (2004). Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresour Technol*; 91:93-100

Cara C., Ruiz E., Ballesteros I., Negro M. J., Castro E., (2006). Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree Wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry* 41:423-429.

Cardona C., Quintero J., Paz I., (2009) Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*.

Carrasco, F., (1989) Fundamentos del fraccionamiento de la biomasa. *Afinidad* 46:425-429.

Da Costa Sousa L., Chundawat S., Balan V., Dale B., (2009) 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocelluloses pretreatment technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, 20:339-347

Duff S. J. B. & Murray W. D. (1996) Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol. *Bioresour. Technol.* 55: 1-33.

Ekman R and Holmbom B (2000). The chemistry of Wood resin. Pitch Control, Wood Resin and Deresination Espinal, C.F.; Martínez, H.J. y Gonzales, E.D. 2005. Industria de Aceites y Grasas en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas. Colombia. 15-20p.

Fengel D and Wegener G (1989). Wood-chemistry, ultrastructure, reactions.

Fernández-Bolaños J., Felizón B., Heredia A., Rodríguez R., Guillén R., & Jiménez A. (2001) Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresour. Technol.* 79: 53-61.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajo, J.C., (1999a). Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Roh Werkst* 57 (3), 191-202.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajo, J.C., (1999b). Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74 (11), 1101-1109.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajo, J.C., (2001a). Generation of xylose solutions from *Eucalyptus globulus* wood by autohydrolysis–posthydrolysis processes: posthydrolysis kinetics. *Bioresour. Technol.* 79 (2), 155-164.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajo, J.C., (2001b). Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. *Process Biochem.* 36 (6), 571-578.

Garrote, G., Domínguez, H., Parajo, J.C., (2001c). Manufacture of xylose-based fermentation media from corncobs by posthydrolysis of autohydrolysis liquors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95 (3), 195-207.

Garrote, G., Parajo, J.C., (2002). Non-isothermal autohydrolysis of *Eucalyptus* wood. *Wood Sci. Technol.* 36 (2), 111-123.

Gil, L. (2007) Evaluación de la actividad enzimática de las ligninasas mediante el cultivo en fase sólida de *P. ostreatus* sobre los residuos (EFB) de palma de aceite. Trabajo dirigido de grado en Ingeniería de Alimentos, Fundación Universitaria Jorge Tadeo Lozano, Bogotá.

Girio F., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L., Marques S., Bogel-Lukasik R., (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 101, 4775-4800

Gutierrez L., Sanchez O., Cardona C., (2008) Process integration possibilities for biodiesel production from palm oil using ethanol obtained from lignocellulosic residues of oil palm industry. *Bioresource Technology* 100, p. 1227–1237.

Gregg D., and J.N. Saddler (1995). Bioconversion of lignocellulosic residue to ethanol: process flowsheet development. *Biomass Bioeng.* 9:287-302

Hatakka A.I., (1983) Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 350-357.

Hendriks A.T.W.M., Zeeman G., (2008). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* Volume 100, Issue 1, January. Pages 10-18

Hernández R., López C., (2006) Evaluación del crecimiento y producción de *P. ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca. Trabajo de grado en Microbiología industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá

Ismail, M.R.; Sze, L.Y.; Poulus, P. y Ibrahim, H. (2004). The use of empty oil palm fruit bunch (EFB) compost as additive in coconut dust soilless system for vegetable crop production. 7-9p.

Kumar, K.S., Manimaran, A., Permaul, K., Singh, S., (2009). Production of b-xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. *J. Biosci. Bioeng.* 107 (5), 494-498.

Laser M, Schulman D, Allen S G, Lichwa J, Antal M J and Lynd L R (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource technology* 81, 33-44.

Larsson S, Quintana-Sáinz A., Nilvebrant N O and Jonsson L J (2000). Influence of lignocelluloses-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied biochemistry and biotechnology* 84, 617-632.

Lee J., (1997) Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Review article. *Journal of Biotechnology* 56, 1-24.

Lucas R., Robles A., Gálvez A., García T., Pérez R., Álvarez G., (2001). Biodegradación de la celulosa y la lignina Universidad de Jaen, primera edición. Páginas 14-28, 31-33, 65-69

Manjarres, K, Piñeros Y. (2007). Cocultivo de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. para la producción de celulasas, utilizando residuos de palma, IX Congreso latinoamericano de Microbiología de los alimentos, Isla Margarita.

Martín C., Galbe M., Nilvebrant N. O., & Jönsson L. J. (2002) Comparisson of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretrated by steam explosion using different impregnating agents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98/100: 699-716

Mosier, N., Wyman, C.E., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96 (6), 673-686.

Negro M. J., Manzanares P., Ballesteros I., Oliva J. M., Cabañas A., & Ballesteros M. (2003 b) Study of pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.*

Ocampo, D. (2007). La palma aceitera africana, un recurso de alto potencial para la producción animal en el trópico. 2-8p.

Oi S., Matsuzaki K., Tanaka T., Iizuka M., Taniguchi M., Prasertsan P., (1994) Effect of steam explosion treatment on enzymatic hydrolysis of palm cake and fiber as solid wastes and natural resources. *Journal of Fermentation and Bioengineering* Volume 77, Issue 3, 1994, Pages 326-328

Oliva J M (2003). Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Colección documentos CIEMAT. ISBN 84-7834-457-8. 160 p.

Ospina, A. Piñeros, Y (2007). Estudio de la producción de ligninasas a partir del cultivo de *Pleuoruts sp.* sobre residuos de palma, efecto del pH y la temperatura. Trabajo dirigido de grado en Ingeniería de Alimentos, Fundación Universitaria Jorge Tadeo Lozano, Bogotá.

Palmqvist E., Hahn-Hagerdal B., (1999). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Review paper. *Bioresource Technology* 74 :25-33.

Prasertsan, S., Prasertsan, P., (1996). Biomass residues from palm oil mills in Thailand: an overview on quantity and potential usage. *Biomass and Bioenergy* 11 (5), 387-395.

Pérez J.A., Ballesteros I., Ballesteros M., Sáez F., Negro M.J., Manzanares P., (2008) Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel* 87:3640-3647.

Ravi, N.; Rahman, Z.A. y Bakar, N.A. (2003). Empty Fruit Bunches Evaluation: Mulch in Plantation vs. Fuel for Electricity Generation. *Oil palm industry economic journal* vol 3.1-4p

Rogalinski T., Ingram T., Brunner G., (2008). Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *Journal of Supercritical Fluids* 47, 54-63.

Sanchez C., (2008). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27, 185-194.

Sheng G. S., Teong L. K., Bhatia S., (2010). Hot compressed water pretreatment of oil palm fronds to enhance glucose recovery for production of second generation bio-ethanol. *Bioresource Technology* 101 7362-7367.

Shi J., Chinn M., Sharma-Shivappa R., (2008) .Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. Bioresource Technology 99 6556-6564

Siregar, F.A.; Saletes, S.; Caliman, J.P. y Liwgang, T. (2002). Empty Fruit Bunch Compost: Processing and Utilities. International Oil palm Conference. Nusa Dua, Ball, Indonesia. 5-9p.

Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D. (2008) Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory [1] Analytical Procedure (LAP) NRLE "National Renewable Energy Laboratory

Suhaimi, M. y Ong, H.K. (2001). Composting Empty Fruit Bunch of Oil Palm. Malaysian Agricultural Research and Developmnet Institute. 1-6p.

Sun Y., Cheng J., (2002) Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review. Bioresource Technology 83:1-11.

Tangchirapat, W.; Saeting, T.; Jaturapitakkul, C.; Kiattikomol, K. y Siripanichgorn, A. (2005). Use of waste ash from palm oil industry in concrete Department of Civil Engineering, King Mongkut's University of Technology. 3-6p.

Templeton, D. M. (2002). Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. New York, NY, USA: Marcel Dekker Incorporated, p 536.

Wang L., Yang S., (2007). Chapter 18. Solid State Fermentation and Its Applications. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Pag. 465

Wan Z., Alimon R., (2004). Use of Palm Kernel Cake and Oil Palm by-products in compound feed. Palm oil developments 40, 5-9.

Yojiro K., Ayaaki I., (1990). Chemical composition of palm fiber and its feasibility as cellulosic raw material for sugar production, Agric. Biol. Chem. 54 (5):1183-1187.

Zabel R., Morrel J. (1992). Decay and its Prevention. San Diego, California. Academic Press.

Zhuang X., Yuan Z., Ma L., Wu Ch. Xu M., Xu J., Zhu S., Qui W. (2009)Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water. Biotechnology Advances Volume 27, Issue 5, September-October 2009, Pages 578-582.

Referencias web

<http://www.fedepalma.org/palma.htm>

Anexo I Determinación de lignina y carbohidratos estructurales (NREL)



NREL National Renewable Energy Laboratory

Innovation for Our Energy Future

*A national laboratory of the U.S. Department of Energy
Office of Energy Efficiency & Renewable Energy*

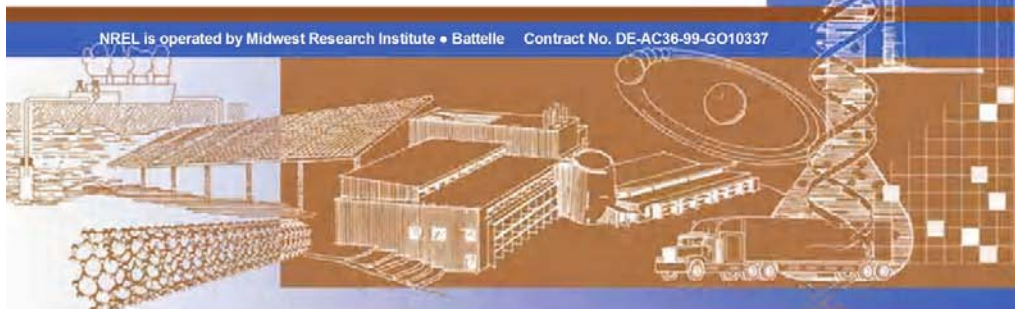
Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass

Laboratory Analytical Procedure (LAP)

Issue Date: 4/25/2008

A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata,
J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker

Technical Report
NREL/TP-510-42618
Revised April 2008



Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass

Laboratory Analytical Procedure (LAP)

Issue Date: 4/25/2008

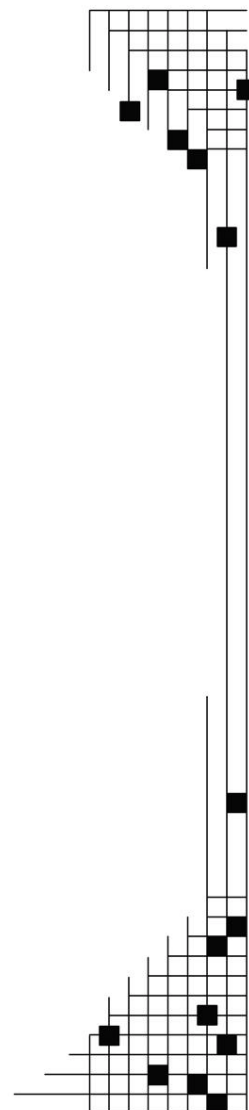
A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata,
J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker

Technical Report
NREL/TP-510-42618
Revised April 2008

National Renewable Energy Laboratory
1617 Cole Boulevard, Golden, Colorado 80401-3393
303-275-3000 • www.nrel.gov

Operated for the U.S. Department of Energy
Office of Energy Efficiency and Renewable Energy
by Midwest Research Institute • Battelle

Contract No. DE-AC36-99-GO10337



DISCLAIMER

These Standard Biomass Analytical Methods ("Methods") are provided by the National Renewable Energy Laboratory ("NREL"), which is operated by the Midwest Research Institute ("MRI") for the Department Of Energy.

Access to and use of these Methods shall impose the following obligations on the user. The user is granted the right, without any fee or cost, to use, copy, modify, alter, enhance and distribute these Methods for any purpose whatsoever, except commercial sales, provided that this entire notice appears in all copies of the Methods. Further, the user agrees to credit NREL/MRI in any publications that result from the use of these Methods. The names NREL/MRI, however, may not be used in any advertising or publicity to endorse or promote any products or commercial entity unless specific written permission is obtained from NREL/MRI. The user also understands that NREL/MRI is not obligated to provide the user with any support, consulting, training or assistance of any kind with regard to the use of these Methods or to provide the user with any updates, revisions or new versions.

THESE METHODS ARE PROVIDED BY NREL/MRI "AS IS" AND ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE DISCLAIMED. IN NO EVENT SHALL NREL/MRI BE LIABLE FOR ANY SPECIAL, INDIRECT OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OR ANY DAMAGES WHATSOEVER, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO CLAIMS ASSOCIATED WITH THE LOSS OF DATA OR PROFITS, WHICH MAY RESULT FROM AN ACTION IN CONTRACT, NEGLIGENCE OR OTHER TORTIOUS CLAIM THAT ARISES OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE ACCESS, USE OR PERFORMANCE OF THESE METHODS.

Procedure Title: Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass

Laboratory Analytical Procedure

1. Introduction

- 1.1 Carbohydrates and lignin make up a major portion of biomass samples. These constituents must be measured as part of a comprehensive biomass analysis. Carbohydrates can be structural or non-structural. Structural carbohydrates are bound in the matrix of the biomass, while non-structural carbohydrates can be removed using extraction or washing steps. Lignin is a complex phenolic polymer.
- 1.2 Portions of this procedure are substantially similar to ASTM E1758-01 “Standard method for the Determination of Carbohydrates by HPLC.
- 1.3 This procedure is suitable for samples that do not contain extractives. This procedure uses a two-step acid hydrolysis to fractionate the biomass into forms that are more easily quantified. The lignin fractionates into acid insoluble material and acid soluble material. The acid insoluble material may also include ash and protein, which must be accounted for during gravimetric analysis. The acid soluble lignin is measured by UV-Vis spectroscopy. During hydrolysis the polymeric carbohydrates are hydrolyzed into the monomeric forms, which are soluble in the hydrolysis liquid. They are then measured by HPLC. Protein may also partition into the liquid fraction. A measure of acetyl content is necessary for biomass containing hemicellulose with a xylan backbone, but not biomass containing a mannan backbone. Acetate is measured by HPLC.

2. Scope

- 2.1 This procedure is appropriate for extractives free biomass, which includes biomass that has been extracted using LAP “Determination of Extractives in Biomass”, as well as process solids containing no extractives. Results are reported on an oven dry weight basis. Results may be reported on an as received biomass basis or an extractives free basis, depending on type of biomass used. LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis” should be used prior to this procedure.
- 2.2 This procedure is appropriate for biomass containing the components listed throughout the procedure. Any biomass containing other interfering components not listed must be further investigated.
- 2.3 A measure of acetyl content is necessary for biomass containing hemicellulose with a xylan backbone, but not biomass containing a mannan backbone.
- 2.4 All analyses should be performed in accordance with an appropriate laboratory specific Quality Assurance Plan (QAP).

3. Terminology

- 3.1 *Oven dry weight (ODW)*- the weight of biomass mathematically corrected for the amount of moisture present in the sample at the time of weighing
- 3.2 *Prepared biomass*- biomass prepared according to LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis”.

- 3.3 *Extractives free biomass* - Biomass after exhaustive water and ethanol extraction (refer to LAP "Determination of Extractives in Biomass").
- 3.4 *Acid insoluble lignin*- the residue remaining on a medium porosity filtering crucible after a two step hydrolysis, with correction for acid insoluble ash and acid insoluble protein, if necessary.
- 3.5 *Structural carbohydrates*-Polymeric carbohydrates, namely cellulose and hemicellulose.
- 3.6 *Non-structural components*- Non-chemically bound components of biomass that include but are not limited to sucrose, nitrate/nitrites, protein, ash, chlorophyll, and waxes.

4. Significance and Use

- 4.1 This procedure is used, possibly in conjunction with other procedures, to determine the amount of structural carbohydrates and lignin in a solid biomass sample.

5. Interferences

- 5.1 This procedure has been optimized for the particle size range specified in LAP "Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis". Deviation to a smaller particle size may result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to excessive carbohydrate degradation. Deviation to a larger particle size may also result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to incomplete hydrolysis of polymeric sugars to monomeric sugars.
- 5.2 Samples containing extractives are not suitable for this procedure. Extractives will partition irreproducibly, resulting in a high lignin bias.
- 5.3 Samples with an ash content above 10 wt % may not be suitable for this procedure, as the sample may contain soil or other minerals that will interfere with appropriate acid concentrations and may catalyze side reactions.
- 5.4 Samples with a moisture content above 10 wt % may not be suitable for this procedure, as the excess moisture will interfere with appropriate acid concentrations. Samples should be dried (air-dried or oven dried at less than 40°C) prior to this procedure.
- 5.5 Samples containing protein will bias the acid insoluble lignin high unless the protein is accounted for in the gravimetric determination of acid insoluble material. An independent nitrogen analysis is required to estimate the protein content of the residue. The protein estimate is then subtracted from the acid insoluble residue measurement. Physical separation of the acid insoluble protein from the acid insoluble lignin is beyond the scope of this procedure.
- 5.6 This procedure is not suitable for samples containing added acid, base, or catalyst.
- 5.7 Certain guard columns for carbohydrate quantification may cause artifact peaks. Individual carbohydrates should be run on new columns and guard columns to verify to absence of artifact peaks.

6. Apparatus

- 6.1 Analytical balance, accurate to 0.1 mg
- 6.2 Convection drying oven, with temperature control of $105 \pm 3^\circ\text{C}$
- 6.3 Muffle furnace, equipped with a thermostat, set to $575 \pm 25^\circ\text{C}$ or equipped with optional ramping program
- 6.4 Water bath, set at $30 \pm 3^\circ\text{C}$
- 6.5 Autoclave, suitable for autoclaving liquids, set to $121 \pm 3^\circ\text{C}$
- 6.6 Filtration setup, equipped with a vacuum source and vacuum adaptors for crucibles
- 6.7 Desiccator containing desiccant
- 6.8 HPLC system equipped with refractive index detector and the following columns:

- 6.8.1 Shodex sugar SP0810 or Biorad Aminex HPX-87P column (or equivalent) with ionic form H^+/CO_3^- deashing guard column
- 6.8.2 Biorad Aminex HPX-87H column (or equivalent) equipped with an appropriate guard column
- 6.9 UV-Visible spectrophotometer, diode array or single wavelength, with high purity quartz cuvettes of pathlength 1 cm
- 6.10 Automatic burette, capable of dispensing 84.00 mL water, optional

7. Reagents and materials

7.1 Reagents

- 7.1.1 Sulfuric acid, 72% w/w (specific gravity 1.6338 at 20°C)- (also commercially available as a reagent for the determination of fluorine, from Fluka #00647)
- 7.1.2 Calcium carbonate, ACS reagent grade
- 7.1.3 Water, purified, 0.2 μ m filtered
- 7.1.4 High purity standards : D-cellobiose, D(+)glucose, D(+)xylose, D(+)galactose, L(+)arabinose, and D(+)mannose
- 7.1.5 Second set of high purity standards, as listed above, from a different source (manufacturer or lot), to be used to prepare calibration verification standards (CVS)

7.2 Materials

- 7.2.1 QA standard, well characterized, such as a National Institute of Standards and Technology (NIST) biomass standard or another well characterized sample of similar composition to the samples being analyzed
- 7.2.2 Pressure tubes, minimum 90 mL capacity, glass, with screw on Teflon caps and o-ring seals (Ace glass # 8648-30 tube with #5845-47 plug, or equivalent)
- 7.2.3 Teflon stir rods sized to fit in pressure tubes and approximately 5 cm longer than pressure tubes
- 7.2.4 Filtering crucibles, 25 mL, porcelain, medium porosity, Coors #60531 or equivalent
- 7.2.5 Bottles, wide mouth, 50 mL
- 7.2.6 Filtration flasks, 250 mL
- 7.2.7 Erlenmeyer flasks, 50 mL
- 7.2.8 Adjustable pipettors, covering ranges of 0.02 to 5.00 mL and 84.00 mL
- 7.2.9 pH paper, range 4-9
- 7.2.10 Disposable syringes, 3 mL, fitted with 0.2 μ m syringe filters
- 7.2.11 Autosampler vials with crimp top seals to fit

8. ES&H Considerations and Hazards

- 8.1 Sulfuric acid is corrosive and should be handled with care.
- 8.2 Use caution when handling hot pressure tubes after removal from the autoclave, as the pressurized tubes can cause an explosion hazard.
- 8.3 When placing crucibles in a furnace or removing them, use appropriate personal protective equipment, including heat resistant gloves.
- 8.4 Operate all equipment in accordance with the manual and NREL Safe Operating Procedures
- 8.5 Follow all applicable NREL chemical handling procedures

9. Sampling, Test Specimens and Test Units

- 9.1 Care must be taken to ensure a representative sample is taken for analysis.
- 9.2 LAP "Preparation of Samples of Biomass Compositional Analysis" should be performed prior to this analysis. Samples must have a minimum total solids content of 85%.
- 9.3 LAP "Determination of Extractives in Biomass" should be performed prior to this analysis if extractives are present in the sample.
- 9.4 LAP "Determination of Solids in Biomass" should be performed at the same time that samples for this analysis are weighed out.
- 9.5 This procedure is suitable for samples that have been air dried or lyophilized. Samples dried at a temperature of 45°C or higher are not suitable for this procedure.
- 9.6 Steps 9.2 to 9.4 should be applied to the QA standard

10. Procedure

10.1 Prepare the sample for analysis and hydrolyze

- 10.1.1 Place an appropriate number of filtering crucibles in the muffle furnace at 575 ± 25 °C for a minimum of four hours. Remove the crucibles from the furnace directly into a desiccator and cool for a specific period of time, one hour is recommended. Weigh the crucibles to the nearest 0.1 mg and record this weight. It is important to keep the crucibles in a specified order, if they are not marked with identifiers. Permanent marking decals are available from Wale Apparatus. Do not mark the bottom of the filtering crucible with a porcelain marker, as this will impede filtration.
- 10.1.2 Place the crucible back into the muffle furnace at 575 ± 25 °C and ash to constant weight. Constant weight is defined as less than ± 0.3 mg change in the weight upon one hour of re-heating the crucible.
- 10.1.3 Weigh 300.0 ± 10.0 mg of the sample or QA standard into a tared pressure tube. Record the weight to the nearest 0.1 mg. Label the pressure tube with a permanent marker. LAP "Determination of Total Solids in Biomass" should be performed at the same time, to accurately measure the percent solids for correction. Each sample should be analyzed in duplicate, at minimum. The recommended batch size is three to six samples and a QA standard, all run in duplicate.
- 10.1.4 Add 3.00 ± 0.01 mL (or 4.92 ± 0.01 g) of 72% sulfuric acid to each pressure tube. Use a Teflon stir rod to mix for one minute, or until the sample is thoroughly mixed.
- 10.1.5 Place the pressure tube in a water bath set at 30 ± 3 °C and incubate the sample for 60 ± 5 minutes. Using the stir rod, stir the sample every five to ten minutes without removing the sample from the bath. Stirring is essential to ensure even acid to particle contact and uniform hydrolysis.
- 10.1.6 Upon completion of the 60-minute hydrolysis, remove the tubes from the water bath. Dilute the acid to a 4% concentration by adding 84.00 ± 0.04 mL deionized water using an automatic burette. Dilution can also be done by adding 84.00 ± 0.04 g of purified water using a balance accurate to 0.01 g. Screw the Teflon caps on securely. Mix the sample by inverting the tube several times to eliminate phase separation between high and low concentration acid layers.
- 10.1.7 Prepare a set of sugar recovery standards (SRS) that will be taken through the remaining hydrolysis and used to correct for losses due to destruction of sugars during dilute acid hydrolysis. SRS should include D-(+)glucose, D-(+)xylose, D-(+)galactose, -L-(+)arabinose,

and D-(+)mannose. SRS sugar concentrations should be chosen to most closely resemble the concentrations of sugars in the test sample. Weigh out the required amounts of each sugar, to the nearest 0.1 mg, and add 10.0 mL deionized water. Add 348 μ L of 72% sulfuric acid. Transfer the SRS to a pressure tube and cap tightly.

- 10.1.7.1 A fresh SRS is not required for every analysis. A large batch of sugar recovery standards may be produced, filtered through 0.2 μ m filters, dispensed in 10.0 mL aliquots into sealed containers, and labeled. They may be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex the frozen SRS prior to use. If frozen SRS are used, the appropriate amount of acid must be added to the thawed sample and vortexed prior to transferring to a pressure tube.
- 10.1.8 Place the tubes in an autoclave safe rack, and place the rack in the autoclave. Autoclave the sealed samples and sugar recovery standards for one hour at 121°C, usually the liquids setting. After completion of the autoclave cycle, allow the hydrolyzates to slowly cool to near room temperature before removing the caps. (If step 10.2 is not performed, draw a 10 mL aliquot of the liquor for use in step 10.5.)

10.2 Analyze the sample for acid insoluble lignin as follows

- 10.2.1 Vacuum filter the autoclaved hydrolysis solution through one of the previously weighed filtering crucibles. Capture the filtrate in a filtering flask.
- 10.2.2 Transfer an aliquot, approximately 50 mL, into a sample storage bottle. This sample will be used to determine acid soluble lignin as well as carbohydrates, and acetyl if necessary. Acid soluble lignin determination must be done within six hours of hydrolysis. If the hydrolysis liquor must be stored, it should be stored in a refrigerator for a maximum of two weeks. It is important to collect the liquor aliquot before proceeding to step 10.2.3.
- 10.2.3 Use deionized water to quantitatively transfer all remaining solids out of the pressure tube into the filtering crucible. Rinse the solids with a minimum of 50 mL fresh deionized water. Hot deionized water may be used in place of room temperature water to decrease the filtration time.
- 10.2.4 Dry the crucible and acid insoluble residue at 105 ± 3 °C until a constant weight is achieved, usually a minimum of four hours.
- 10.2.5 Remove the samples from the oven and cool in a desiccator. Record the weight of the crucible and dry residue to the nearest 0.1 mg.
- 10.2.6 Place the crucibles and residue in the muffle furnace at 575 ± 25 °C for 24 ± 6 hours.
 - 10.2.6.1 A furnace with temperature ramping may also be used
Furnace Temperature Ramp Program:
 - Ramp from room temperature to 105 °C
 - Hold at 105°C for 12 minutes
 - Ramp to 250 °C at 10°C / minute
 - Hold at 250 °C for 30 minutes
 - Ramp to 575 °C at 20 °C / minute
 - Hold at 575 °C for 180 minutes
 - Allow temperature to drop to 105 °C
 - Hold at 105 °C until samples are removed
- 10.2.7 Carefully remove the crucible from the furnace directly into a desiccator and cool for a specific amount of time, equal to the initial cool time of the crucibles. Weigh the crucibles and ash to the nearest 0.1 mg and record the weight. Place the crucibles back in the furnace

and ash to a constant weight. (The amount of acid insoluble ash is not equal to the total amount of ash in the biomass sample. Refer to LAP “Determination of Ash in Biomass” if total ash is to be determined.)

10.3 Analyze the sample for acid soluble lignin as follows

- 10.3.1 On a UV-Visible spectrophotometer, run a background of deionized water or 4% sulfuric acid.
- 10.3.2 Using the hydrolysis liquor aliquot obtained in step 10.2.2, measure the absorbance of the sample at an appropriate wavelength on a UV-Visible spectrophotometer. Refer to section 11.3 for suggested wavelength values. Dilute the sample as necessary to bring the absorbance into the range of 0.7 – 1.0, recording the dilution. Deionized water or 4% sulfuric acid may be used to dilute the sample, but the same solvent should be used as a blank. Record the absorbance to three decimal places. Reproducibility should be ± 0.05 absorbance units. Analyze each sample in duplicate, at minimum. (This step must be done within six hours of hydrolysis.)
- 10.3.3 Calculate the amount of acid soluble lignin present using calculation 11.3 .

10.4 Analyze the sample for structural carbohydrates

- 10.4.1 Prepare a series of calibration standards containing the compounds that are to be quantified, referring to Table 1 for suggested concentration range. Use a four point calibration. If standards are prepared outside of the suggested ranges, the new range for these calibration curves must be validated.

10.4.1.1 Table 1- Suggested concentration ranges for 10.4.1 calibration standards

Component	Suggested concentration range (mg/ml)
D-cellobiose	0.1-4.0
D(+)-glucose	0.1-4.0
D(+)-xylose	0.1-4.0
D(+)-galactose	0.1-4.0
L(+)-arabinose	0.1-4.0
D(+)-mannose	0.1-4.0
CVS	Middle of linear range, concentration not equal to a calibration point (2.5 suggested)

- 10.4.1.2 A fresh set of standards is not required for every analysis. A large batch of standards may be produced, filtered through 0.2 μm filters into autosampler vials, sealed and labeled. The standards and CVS samples may be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex frozen standards prior to use. During every use, standards and CVS samples should be observed for unusual concentration behavior. Unusual concentrations may mean that the samples are compromised or volatile components have been lost. Assuming sufficient volume, standards and CVS samples should not have more than 12 injections drawn from a single vial. In a chilled autosampler chamber, the lifetime of standards and CVS samples is approximately three to four days.

- 10.4.2 Prepare an independent calibration verification standard (CVS) for each set of calibration standards. Use reagents from a source or lot other than that used in preparing the calibration standards. Prepare the CVS at a concentration that falls in the middle of the validated range of the calibration curve. The CVS should be analyzed on the HPLC after each calibration set and at regular intervals throughout the sequence, bracketing groups of samples. The CVS is used to verify the quality and stability of the calibration curve(s) throughout the run.
- 10.4.3 Using the hydrolysis liquor obtained in step 10.2.2, transfer an approximately 20 mL aliquot of each liquor to a 50 mL Erlenmeyer flask.
- 10.4.4 Use calcium carbonate to neutralize each sample to pH 5 – 6. Avoid neutralizing to a pH greater than 6 by monitoring with pH paper. Add the calcium carbonate slowly after reaching a pH of 4. Swirl the sample frequently. After reaching pH 5 – 6, stop calcium carbonate addition, allow the sample to settle, and decant off the supernatant. The pH of the liquid after settling will be approximately 7. (Samples should never be allowed to exceed a pH of 9, as this will result in a loss of sugars.)
- 10.4.5 Prepare the sample for HPLC analysis by passing the decanted liquid through a 0.2 µm filter into an autosampler vial. Seal and label the vial. Prepare each sample in duplicate, reserving one of the duplicates for analysis later if necessary. If necessary, neutralized samples may be stored in the refrigerator for three or four days. After this time, the samples should be considered compromised due to potential microbial growth. After cold storage, check the samples for the presence of a precipitate. Samples containing a precipitate should be refiltered, while still cold, through a 0.2 µm filters.
- 10.4.6 Analyze the calibration standards, CVS, and samples by HPLC using a Shodex sugar SP0810 or Biorad Aminex HPX-87P column equipped with the appropriate guard column.
- HPLC conditions:
Injection volume: 10 – 50 µL, dependent on concentration and detector limits
Mobile phase: HPLC grade water, 0.2 µm filtered and degassed
Flow rate: 0.6 mL / minute
Column temperature: 80 - 85°C
Detector temperature: as close to column temperature as possible
Detector: refractive index
Run time: 35 minutes
- Note: The deashing guard column should be placed outside of the heating unit and kept at ambient temperature. This will prevent artifact peaks in the chromatogram.
- 10.4.7 Check test sample chromatograms for presence of cellobiose and oligomeric sugars. Levels of cellobiose greater than 3 mg/mL indicate incomplete hydrolysis. Fresh samples should be hydrolyzed and analyzed.
- 10.4.8 Check test sample chromatograms for the presence of peaks eluting before cellobiose (retention time of 4-5 minutes using recommended conditions). These peaks may indicate high levels of sugar degradation products in the previous sample, which is indicative of over hydrolysis. All samples from batches showing evidence of over-hydrolysis should have fresh samples hydrolyzed and analyzed.
- 10.5 Analyze the sample for acetyl content if necessary**
- 10.5.1 Prepare 0.005 M (0.01 N) sulfuric acid for use as a HPLC mobile phase. In a 2L volumetric flask, add 2.00 mL of standardized 10 N sulfuric acid and bring to volume with HPLC grade water. Filter through a 0.2 µm filter and degas before use. If 10N sulfuric acid is not

available, concentrated sulfuric acid may also be used. 278 µl concentrated sulfuric acid brought to volume in a 1L volumetric flask with HPLC grade water will also produce 0.005 M sulfuric acid.

- 10.5.2 Prepare a series of calibration standards containing the compounds that are to be quantified. Acetic acid is recommended, formic acid and levulinic acid are optional. A range of 0.02 to 0.5 mg/mL is suggested. An evenly spaced four point calibration is suggested. If standards are prepared outside of the suggested ranges, the new range for these calibration curves must be validated.
- 10.5.3 Prepare an independent calibration verification standard (CVS) for each set of calibration standards, using components obtained from a source other than that used in preparing the calibration standards. The CVS must contain precisely known amounts of each compound contained in the calibration standards, at a concentration that falls in the middle of the validated range of the calibration curve. The CVS should be analyzed on the HPLC after each calibration set and at regular intervals throughout the sequence, bracketing groups of samples. The CVS is used to verify the quality and stability of the calibration curve(s) throughout the run.
- 10.5.4 Prepare the sample for HPLC analysis by passing a small aliquot of the liquor collected in step 10.2.2 through a 0.2 µm filter into an autosampler vial. Seal and label the vial. If it is suspected that the sample concentrations may exceed the calibration range, dilute the samples as needed, recording the dilution. The concentrations should be corrected for dilution after running.
- 10.5.5 Analyze the calibration standards, CVS, and samples by HPLC using a Biorad Aminex HPX-87H column equipped with the appropriate guard column.
HPLC conditions:
Sample volume: 50 µL
Mobile phase: 0.005 M sulfuric acid, 0.2 µm filtered and degassed
Flow rate: 0.6 mL / minute
Column temperature: 55 -65°C
Detector temperature: as close to column temperature as possible
Detector: refractive index
Run time: 50 minutes

11. Calculations

- 11.1 Calculate the oven dry weight (ODW) of the extractives free sample, using the average total solids content as determined by the LAP “Standard Method for the Determination of Total Solids in Biomass”.

$$ODW = \frac{Weight_{air\ dry\ sample} \times \%Total\ solids}{100}$$

- 11.2 Calculate and record the weight percent acid insoluble residue (AIR) and acid insoluble lignin (AIL) on an extractives free basis

$$\% AIR = \frac{Weight_{crucible\ plus\ AIR} - Weight_{crucible}}{ODW_{sample}} \times 100$$

$$\% AIL = \frac{(Weight_{crucible\ plus\ AIR} - Weight_{crucible}) - (Weight_{crucible\ plus\ ash} - Weight_{crucible}) - Weight_{protein}}{ODW_{sample}} \times 100$$

where:

Weight_{protein} = Amount of protein present in the acid insoluble residue, as determined in LAP "Determination of Protein Content in Biomass". This measurement is only necessary for biomass containing high amounts of protein.

11.3 Calculate the amount of acid soluble lignin (ASL) on an extractives free basis

$$\% ASL = \frac{UVabs \times Volume_{filtrate} \times Dilution}{\epsilon \times ODW_{sample}} \times 100$$

where:

UVabs = average UV-Vis absorbance for the sample at 320 nm

Volume_{hydrolysis liquor} = volume of filtrate, 87 mL

$$Dilution = \frac{Volume_{sample} + Volume_{diluting\ solvent}}{Volume_{sample}}$$

ε = Absorptivity of biomass at specific wavelength (see table below)

Absorptivity constants for acid soluble lignin measurement for select biomass types

Biomass type	Lambda max (nm)	Absorptivity at lambda max (L/g cm)	Recommended wavelength (nm)	Absorptivity at recommended wavelength (L/g cm)
Pinus Radiata-NIST SRM 8493	198	25	240	12
Bagasse- NIST SRM 8491	198	40	240	25
Corn Stover- NREL supplied feedstock	198	55	320	30
Populus deltoides-NIST SRM 8492	197	60	240	25

Note: Lambda max values often contain interfering peaks from carbohydrate degradation products. Recommended wavelength values have been chosen to minimize these interferences.

11.4 Calculate the total amount of lignin on an extractives free basis.

$$\% Lignin_{ext\ free} = \% AIL + \% ASL$$

11.5 Calculate the total lignin value to an as received basis, if necessary

$$\% \text{ Lignin}_{\text{as received}} = (\% \text{ Lignin}_{\text{ext free}}) \times \frac{(100 - \% \text{ Extractives})}{100}$$

where:

% Extractives = percent extractives in the prepared biomass sample, as determined in LAP “Determination of Extractives in Biomass”

- 11.6 Create a calibration curve for each analyte to be quantified using linear regression. From these curves, determine the concentration in mg/mL of each component present in the samples analyzed by HPLC, correcting for dilution if required.
- 11.7 Calculate and record the amount of each calibration verification standard (CVS) recovered following HPLC analysis.

$$\% \text{ CVS recovery} = \frac{\text{conc. detected by HPLC, mg/mL}}{\text{known conc. of standard, mg/mL}} \times 100$$

- 11.8 For the sugar recovery standards (SRS), calculate the amount of each component sugar recovered after dilute acid hydrolysis, accounting for any dilution made prior to HPLC analysis. Average any replicate (%R_{sugar}) values obtained for each individual sugar and report %R_{avg, sugar}.

$$\% R_{\text{sugar}} = \frac{\text{conc. detected by HPLC, mg/mL}}{\text{known conc. of sugar before hydrolysis, mg/mL}} \times 100$$

- 11.9 Use the percent hydrolyzed sugar recovery values calculated in step 11.8 to correct the corresponding sugar concentration values obtained by HPLC for each of the hydrolyzed samples (C_{cor. sample}), accounting for any dilution made prior to HPLC analysis.

$$C_x = \frac{C_{\text{HPLC}} \times \text{dilution factor}}{\% R_{\text{ave. sugar}} / 100}$$

Where: C_{HPLC} = conc. of a sugar as determined by HPLC, mg/mL.
 % R_{ave. sugar} = average recovery of a specific SRS component.
 C_x = C_{cor. sample}, concentration in mg/mL of a sugar in the hydrolyzed sample after correction for loss on 4% hydrolysis

- 11.10 Calculate the concentration of the polymeric sugars from the concentration of the corresponding monomeric sugars, using an anhydro correction of 0.88 (or 132/150) for C-5 sugars (xylose and arabinose) and a correction of 0.90 (or 162/180) for C-6 sugars (glucose, galactose, and mannose)

$$C_{anhydro} = C_{corr} \times Anhydro\ correction$$

11.11 Calculate the percentage of each sugar on an extractives free basis

$$\% Sugar_{ext\ free} = \frac{C_{anhydro} \times V_{filtrate} \times \frac{1g}{1000mg}}{ODW_{sample}} \times 100$$

Where: $V_{filtrate}$ = volume of filtrate, 87.00 mL.

11.12 Calculate the percentage of each sugar on an as received basis, if necessary

$$\% Sugar_{as\ received} = (\% Sugar_{ext\ free}) \times \frac{(100 - \% Extractives)}{100}$$

where:

% Extractives = percent extractives in the prepared biomass sample, as determined in LAP "Determination of Extractives in Biomass"

11.13 Calculate the acetate percentage on an extractives free basis.

$$\% Acetate_{ext\ free} = \frac{C_{AA,HPLC} \times Volume_{filtrate} \times Conversion\ factor}{ODW_{sample}} \times 100$$

where:

$C_{AA,HPLC}$ = concentration in mg/mL of acetic acid as determined by HPLC

$Volume_{hydrolysis\ liquor}$ = volume of filtrate, 87 mL

Conversion factor = 0.683, the conversion from acetic acid to acetate in biomass

11.14 Calculate the acetyl percentage on an as received basis, if necessary.

$$\% Acetyl_{as\ received} = (\% Acetyl_{ext\ free}) \times \frac{(100 - \% Extractives)}{100}$$

11.15 To report or calculate the relative percent difference (RPD) between two samples, use the following calculation

$$RPD = \left(\frac{X_1 - X_2}{X_{mean}} \right) \times 100$$

Where:

X_1 and X_2 = measured values

X_{mean} = the mean of X_1 and X_2

- 11.16 To report or calculate the root mean square deviation (RMS deviation) or the standard deviation (st dev) of the samples, use the following calculations.

First find the root mean square (RMS), of the sample using

$$RMS = x_m = \text{mean} = \sqrt{\left(\frac{\sum_1^n x}{n}\right)^2}$$

Then find the root mean square deviation, or standard deviation, using

$$RMS\text{deviation} = \sigma = \text{stdev} = \sqrt{\frac{\sum_1^n (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Where:

x_m =the root mean square of all x values in the set
 n =number of samples in set
 x_i =a measured value from the set

12. Report Format

- 12.1 Report the weight percent of lignin, each sugar, and acetate. Report on an as received basis, correcting for extractives if necessary.
- 12.2 For replicate analyses, report the average and relative percent difference.

13. Precision and Bias

- 13.1 *Round robin testing* – For a report documenting an international round robin test of biomass analysis methods, including this procedure, see Milne et al., 1992.

14. Quality Control

- 14.1 Reported Significant Figures or decimal places: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.
- 14.2 Replicates: Run all samples in duplicate.
- 14.3 Blank: none
- 14.4 Relative percent difference criteria: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.
- 14.5 Calibration verification standard: Calibration verification standards should be independently prepared and analyzed as appropriate, per the procedure
- 14.6 Sample size: 4g, minimum, of sample, extracted if necessary (including amount necessary for percent solids determination)

- 14.7 Sample storage: Hydrolysis liquors may be stored in a refrigerator for up to two weeks. Neutralized hydrolysis liquors may be stored in a refrigerator for up to four days.
- 14.8 Standard storage: HPLC standards should be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex samples prior to use.
- 14.9 Standard preparation: Standards should be prepared as described in the procedure, including a QA standard.
- 14.10 Definition of a batch: Any number of samples that are analyzed and recorded together. The recommended size is three to six samples with a QA standard, all run in duplicate.
- 14.11 Control charts: All CVS, SRS recoveries, and NIST or QA standards should be control charted.

15. Appendices

- 15.1 None

16. References

- 16.1 NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure "Determination of Total Solids in Biomass".
- 16.2 NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure "Determination of Ash in Biomass".
- 16.3 NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure "Determination of Extractives in Biomass".
- 16.4 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#002 "Determination of Structural Carbohydrate Content in Biomass by High Performance Liquid Chromatography".
- 16.5 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#003 "Determination of Acid Insoluble Lignin in Biomass".
- 16.6 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#017 "Determination of o-Acetyl Groups in Biomass by High Performance Liquid Chromatography".
- 16.7 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#019 "Hydrolysis of Corn Stover for Compositional Analysis".
- 16.8 Moore, W., and D. Johnson. 1967. *Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products*. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture.
- 16.9 ASTM E1758-01 "Standard method for the Determination of Carbohydrates by HPLC: In *2003 Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.05*. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, International
- 16.10 Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). "Standardized Analytical Methods" Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar", 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K.. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366

Anexo II Ficha técnica Celluclast® 1.5L



Celluclast® 1.5 L

Valid From 2007-09-11

Características del producto:

Enzima Declarada	Celulasa
Actividad declarada	700 EGU/g
Color	Marrón El color puede variar de lote a lote, sin que la intensidad del color sea indicativa de la actividad enzimática.
Forma física	Líquido
Densidad aproximada (g/ml)	1,22
Estabilizantes	Cloruro de sodio Sorbitol
Conservadores	Sorbato de potasio
Olor	Ligero olor a fermentación.
Organismo de producción	Trichoderma reesei
Método de producción	Producido mediante fermentación sumergida de un microorganismo. Se separa la proteína enzimática del organismo de producción y se purifica.

Especificación del producto:

	Límite Mínimo	Límite Máximo	Unidad
Cellulase Units EGU	700		/g
Cuenta Total en Placa	-	50000	/g
Bacteria coliforme	-	30	/g
E.coli enteropatógeno	Ninguno detectado		/25 g
Salmonella	Ninguno detectado		/25 g

El producto cumple con las especificaciones de pureza recomendadas para enzimas de grado alimenticio dadas por la Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) y por Food Chemical Codex (FCC).

Envases: Revise la lista de envases estándar para mayor información.

Almacenamiento recomendado:

Utilizar preferentemente antes de	Almacenado como es recomendado, el producto debe utilizarse dentro de 6 meses a partir de la fecha de entrega.
Temperatura de almacenamiento	0-25°C (32°F-77°F)
Condiciones de almacenamiento	En envase intacto, en lugar seco y protegido de la luz solar. El producto ha sido formulado para mantener una estabilidad óptima. Puede resultar necesario aumentar la dosificación si la enzima ha experimentado un almacenamiento prolongado o condiciones adversas, incluyendo temperatura o humedad alta.

Precauciones de seguridad y manejo

Las enzimas son proteínas. La inhalación de polvo o aerosoles puede provocar sensibilización y causar reacciones alérgicas en personas propensas. Tras un contacto prolongado, algunas enzimas pueden irritar la piel, los ojos y las mucosas. El producto puede crear aerosoles inhalables si se salpica o si se agita fuertemente. El producto derramado puede secarse y generar polvo. Cualquier material derramado debe lavarse con agua abundante. Deben evitarse las salpicaduras. El material sobrante puede secarse y generar polvo. Úsense ropa, guantes adecuados y protección para los ojos y la cara según las indicaciones en la etiqueta de advertencia. Lávese toda la ropa manchada o salpicada. Con todos los productos se suministra una ficha de seguridad. Revise el Manual de Seguridad para mayor información sobre el manejo seguro del producto.

2 / 2

Novozymes Latin America Ltda.
Rua professor Francisco Ribeiro 683
CEP 83707-660 - Araucária - Paraná
Brazil

Tel. +55 41 641 1000
Fax +55 41 643 1443

Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd
Denmark

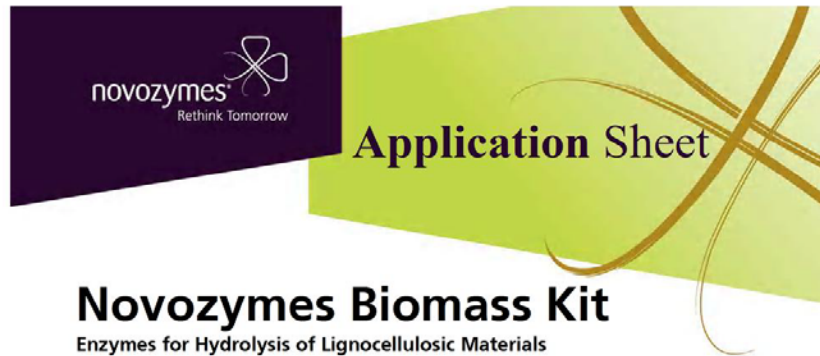
Tel. +45 4446 0000
Fax +45 4446 9999

Para más informaciones, o direcciones de nuestras oficinas, visite:
www.novozymes.com

La legislación, las reglamentaciones y los derechos de terceros podrían impedir que los clientes importasen, utilizarasen, procesasen o revendiesen los productos que se describen en el presente documento en determinadas formas. Sin otro contrato por escrito entre el cliente y Novozymes para ese efecto, este documento no constituye una declaración o garantía de ningún tipo y se encuentra sujeto a cambio sin previo aviso.

© Novozymes A/S

Anexo III Ficha técnica NS50010

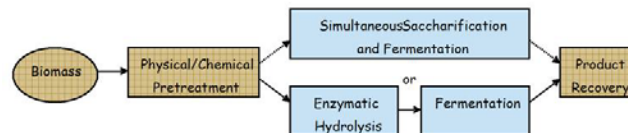


Introduction

Lignocellulosic biomass is an abundant and renewable source of sugars that can be fermented into high-value products like ethanol. The standard concept for lignocellulosic bio-processing requires a physical/chemical pretreatment to open the fiber structure, which allows carbohydrate in the plant cell walls to become accessible to enzymes. Pretreatment may in addition partially convert some fraction of plant polysaccharide to fermentable sugars, but to ensure high biomass conversion yields, the pre-treated hydrolysate is subsequently treated with enzymes to release fermentable sugars. The fermentation can be carried out by a single microbial strain, which is able to utilize all sugars in the hydrolysate, or by a multi-step process using different organisms, each optimized to convert a specific array of sugars to a high-value product.

Biomass conversion

Conversion of plant fiber to ethanol and other products requires liberation of the sugar constituents from the lignocellulosic material. Lignocellulose fibers are composed of three major fractions: cellulose, hemicellulose, and lignin. Biomass plant fibers are resistant to physical wear and microbial attack. The lignin protects the fibers against microbial and enzymatic attack by preventing the cellulose and hemicellulose from reacting with water and swelling. Hence, the use of lignocellulose as a raw material requires disruption of lignin in order to render the cellulose and hemicellulose fractions accessible for fermentation. Typically an initial physical/chemical pretreatment is applied to open the fiber structure, followed by the use of enzymes to liberate the C5 and C6 sugars from the cellulose and hemicellulose fractions. The enzyme treatment can be conducted as a separate step or together with a fermenting microorganism in a Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) process, as shown in the illustration below.



Application

The primary enzymes that should be used in the hydrolysis of lignocellulosic material are NS50013 (cellulase) supplemented with NS50010 (β -glucosidase). NS50013 will break down the cellulose in the pretreated material into cello-oligomers and cellobiose, while the NS50010 will further convert the cellobiose into glucose. Addition of NS50010 should be approximately 5%-10% (v/v) of the amount of NS50013 for complete hydrolysis of the available cellulose.

Depending on the properties of the feedstock and pretreatment method, a combination of NS50013 (cellulase), NS50010 (β -glucosidase), NS50030 (xylanase), NS22002 (hemicellulase), and NS50012 (multi-component complex) may be used. For example, for a corn stover substrate which has been pretreated using a dilute-acid process that has hydrolyzed a good portion of the hemicellulose, NS50010 should be used in combination with NS50013 to efficiently hydrolyze the remaining cellulose into glucose. If a pretreatment is employed which leaves a significant portion of the hemicellulose intact, such as neutral-pH or alkaline pretreatment methods, it is recommended to incorporate NS22002 along with NS50013 and NS50010 to hydrolyze both the hemicellulose and cellulose fractions. If a feedstock contains considerable amounts of pectin, it is recommended to use NS50012 along with NS50013 and NS50010.

In order to maximize yield from the enzymatic treatments, an optimized combination of enzyme activities must be used. The optimum enzyme blend depends greatly on the composition of the various fractions (cellulose, hemicellulose and lignin) in the biomass substrate. Experiments to determine the optimal blend of enzymes for saccharification of a specific feedstock and pretreatment combination should be conducted.

Pretreatment conditions must be optimized to achieve maximum conversion of polysaccharides to fermentable sugars while minimizing the enzyme requirement. It is essential to evaluate the pretreated biomass for cellulose digestibility at a solids concentration in which the substrate and enzymes can be properly mixed. If the solids concentration in a hydrolysis experiment is too high, non-enzyme related factors can be introduced which will interfere with the interpretation of the results. A range of 2%-5% total solids (TS) loading is suggested for determining the efficacy of the pretreatment system. Results may be compared by evaluating the required enzyme dose per mass of cellulose in the feedstock (cellulose content may be determined chemically) in order to give an indication of the enzymatic digestibility of the pretreated substrate (*i.e.*, the efficiency of the pretreatment technology).

The following tables contain information on the enzymes included in the Novozymes Biomass Kit. Listed here are the enzyme density and activity, as well as suggested pH, temperature, and dose parameters for this application. The suggested dose of the enzymes is based on weight percent relative to the amount of biomass (total solids) on a dry basis. The required enzyme dose may vary significantly due to the varying composition of lignocellulosic biomass feedstocks and the nature of various physical/chemical pretreatment methods which can be used. Even though some of the enzymes have high temperature ranges, they will work at lower temperatures, though at reduced activity. Operating at temperatures above the upper limit can result in irreversible enzyme denaturation. The general impact of temperature on enzyme activity and stability is shown in Appendix B.

Table 1: Descriptions of enzymes contained in the Novozymes Biomass Kit

NS50013 Cellulase complex	This cellulase preparation catalyzes the breakdown of cellulosic material into glucose, cellobiose, and higher glucose polymers. NS50013 can be used for reduction of viscosity or increase in extraction yield of various products of plant origin. The main reaction products of cellulose hydrolysis with NS50013 are cellobiose and glucose. Combination with NS50010 is recommended to maximize performance.
NS50010 β -Glucosidase	The β -glucosidase, also known as cellobiase, hydrolyzes cellobiose to glucose. Cellobiose is a carbohydrate consisting of two molecules of D-glucose linked together by a β -1,4-glycosidic bond. NS50010 can be used to supplement NS50013 in order to increase yield of fermentable sugars.
NS50012 Enzyme complex	NS50012 is a multi-enzyme complex containing a wide range of carbohydrases, including arabinase, β -glucanase, cellulase, hemicellulase, pectinase, and xylanase. NS50012 can breakdown cell walls for extraction of useful components from plant tissue and can be used in the processing of cereal and vegetable materials. This enzyme has the ability to liberate bound materials and can degrade a variety of non-starch polysaccharides.
NS50030 Xylanase	NS50030 is a purified endo-xylanase with a high specificity towards soluble pentosans. NS50030 can be used to liberate pentose sugars from biomass hemicellulose fractions.
NS22002 β -Glucanase Xylanase	NS22002 contains a mixture of β -glucanase and xylanase enzyme activities. β -glucanase and xylanase are the two main enzyme activities in the enzyme preparation, but the product also contains several other side activities, including cellulase, hemicellulase, and pentosanase.

Table 2: Enzyme activity, pH and temperature, and recommended dosage

Enzyme Name	Activities ¹	Density ² g/mL	pH	Temperature °C	Dose ³ % w/w (TS)
NS50013 Cellulase complex	700 EGU/g (~ 70 FPU/g)	1.2	4.5-6.5	45-50	2-6%
NS50010 β-Glucosidase	250 CBU/g	1.2	2.5-6.5	45-70	0.2-0.6%
NS50012 Enzyme complex	100 FBG/g (~13,700 PGU/g)	1.2	4.5-6.0	25-55	0.05-0.4%
NS50030 Xylanase	500 FXU/g	1.1	4.5-6.0	35-55	0.1-0.5%
NS22002 Hemicellulase	45 FBG/g (~470 FXU/g)	1.2	5.0-6.5	40-60	0.4-2%

1) CBU = Cellobiase Unit, EGU = Endo-Glucanase Unit, FBG = Fungal β-Glucanase Unit, FPU = Filter Paper Unit, FXU = Farvet Xylan Unit, and PGU = Polygalacturonase Unit.

See the Appendix A for further information on activity units.

2) Density values are approximate.

3) Dosage required is heavily dependent on feedstock type, pretreatment technology, and processing conditions. Therefore enzyme dosage requirements may range significantly.

Note: Inhibition of enzymatic hydrolysis

As mentioned earlier, a pretreatment is needed to make the cellulose more amenable to enzyme hydrolysis. The pretreatment method can create inhibiting products that can reduce the performance of the enzyme, resulting in lower cellulose conversion and/or increased enzyme dose. Lignin-related products released during the pretreatment process can interfere with the enzymatic performance by binding irreversibly to the enzymes or by blocking the enzymatic access to the substrate.

Additional information

We invite you to explore our biomass information site at www.biomass.novozymes.com.

Disclaimer

The enzymes provided in this Biomass Kit shall only be used for the conversion of lignocellulosic materials and shall not be used with other materials that will be used in food. Risks may be associated, therefore, Novozymes and its affiliated companies and their respective employees, affiliates and agents shall not be responsible for any claims or liabilities that might arise as a result of the materials contained in this Biomass Kit.

In addition, NOVOZYMES EXPRESSLY DISCLAIMS ALL WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION, WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE AND NON-INFRINGEMENT OF THIRD-PARTY INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS.

Appendix A:

Activity units and measurements

The following table contains information on the various enzyme activities which are contained in the Biomass Kit from Novozymes. For additional information on enzyme activity analyses, please contact Novozymes using the contact form at www.biomass.novozymes.com to place your inquiry.

Table 3: Description of activity units

Abbreviation	Description	Definition
CBU	Cellobiase unit	One cellobiase unit (CBU) is the amount of enzyme which releases 2 μmol glucose per minute under standard conditions with cellobiose as substrate.
EGU	Endo-glucanase unit	Endo-glucanase activity in EGU is measured relative to a Novozymes enzyme standard.
FBG	Fungal beta-glucanase unit	One FBG (Fungal beta-glucanase unit) is the amount of enzyme that produces reducing carbohydrate equivalent to 1 μmol glucose per minute under the conditions given in this method. The activity is determined relative to an enzyme standard.
FPU	Filter paper unit	0.185 FPU is that quantity of enzyme activity that, when assayed according to the standard FPU method, will produce reducing sugar equivalent to 2.0 mg of glucose. Reference: http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/4689.pdf
FXU	Farvet xylan unit	Endoxylanase activity in FXU (Farvet Xylan Unit) is measured relative to a Novozymes FXU enzyme standard.
PGU	Polygalacturonase unit	Polygalacturonase activity in PGU is measured relative to a Novozymes enzyme standard.

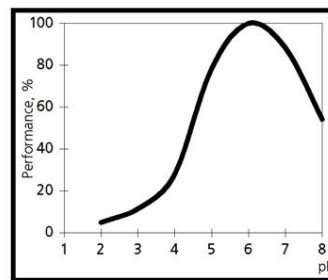
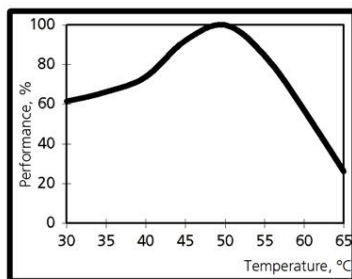
Appendix B:

Activity and stability response curves

NS50012

Description

NS50012 is a multi-enzyme complex containing a wide range of carbohydrases, including arabinase, β -glucanase, cellulase, hemicellulase, pectinase, and xylanase. Its main activities are polygalacturonase, mannanase and β -glucanase. In addition, it contains a range of plant cell wall degrading enzymes like pectin lyase, pectin esterase, and rhamnogalacturonase. It also contains some galactanase and other hemicellulolytic activities. The enzyme preparation is produced from a selected strain of *Aspergillus aculeatus*. Optimal conditions for NS50012 are pH 4.5-6.0 and 25-55°C.



NS22002

Description

NS22002 contains a mixture of β -glucanase and xylanase enzyme preparation produced by submerged fermentation of a *Hemicola insolens* strain. β -glucanase and xylanase are the two main enzyme activities in the enzyme preparation, but the product also contains several other side activities, including cellulase, xylanase, arabinase, and pentosanase. Optimal conditions for NS22002 are pH 5.0-6.5 and 40-60°C.

Product type

NS22002 is a brown liquid with a density of approximately 1.2 g/ml.

Product

Activity

NS22002 has a typical standardized activity of 45 Fungal Beta-Glucanase Units/g (FBG/g), and in addition, it has approximately 470 Fungal Xylanase Units/g (FXU/g).

NS50013

Activity and Stability

Figures 1 and 2 illustrate the activity of NS50013 at different pH values and temperatures, using CMC as substrate. The pH and thermo- stability of the enzyme in aqueous solutions can be seen from Figures 3 and 4. For practical applications, the optimum conditions are about 45-50°C (113-140°F) and a pH of 4.5-6.5.

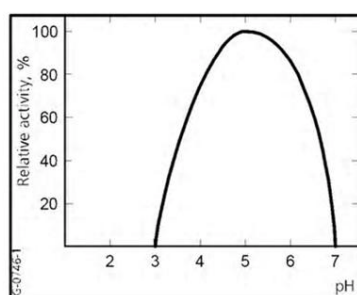


Fig. 1. Influence of pH on the activity of NS50013.

Concentration of enzyme:	0.009 EGU/ml
Temperature:	50°C (122°F)
Reaction time:	20 minutes

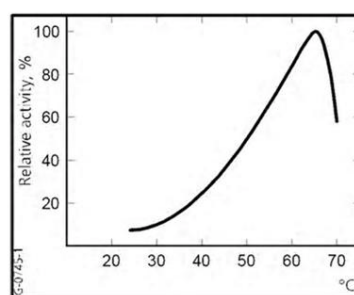


Fig. 2. Influence of temperature on the activity of NS50013.

Concentration of enzyme:	0.009 EGU/ml
pH:	4.8
Reaction time:	20 minutes

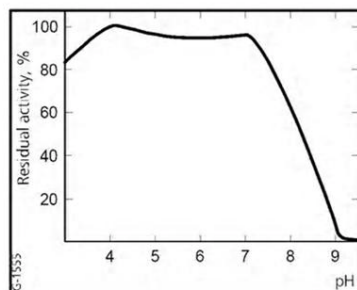


Fig. 3. Influence of pH on the stability of NS50013.

Concentration of enzyme:	0.9 EGU/ml
Temperature:	25°C (77°F)
Incubation time:	16 hours
Buffer system:	Mclvaine

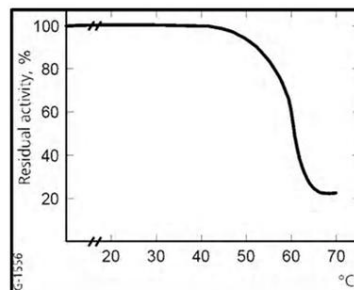


Fig. 4. Influence of temperature on the stability of NS50013.

Concentration of enzyme:	0.9 EGU/ml
pH:	4.8
Reaction time:	30 minutes

NS50030

Activity and Stability

Figures 1 and 2 illustrate the activity of NS50030 at different temperatures and pH values using Azo-wheat arabinoxylan as substrate. The heat and pH stability of the enzyme in aqueous solutions can be seen from Figures 3 and 4. For practical applications, the optimum conditions are about 35-55°C (95-131°F) and a pH of 4.5-6.0.

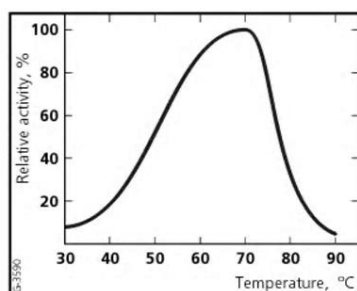


Fig. 1. The effect of temperature on activity of NS50030.

Substrate: Azo-wheat arabinoxylan
pH: 4.0
Reaction time: 10 minutes

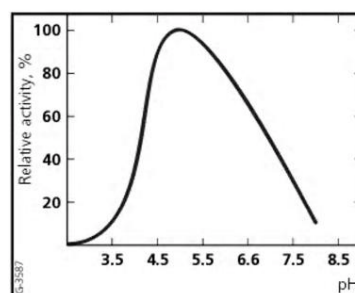


Fig. 2. The effect of pH on activity of NS50030.

Substrate: Azo-wheat arabinoxylan
Temperature: 70°C
Reaction time: 10 minutes

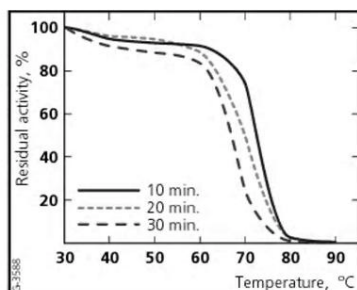


Fig. 3. The effect of temperature on stability of NS50030.

Substrate: Azo-wheat arabinoxylan
pH: 5.0

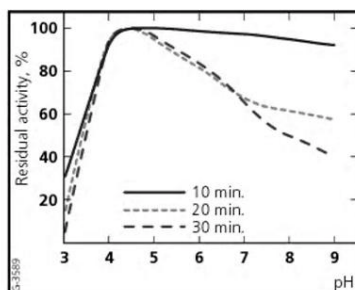


Fig. 4. The effect of pH on stability of NS50030.

Substrate: Azo-wheat arabinoxylan
Temperature: 50°C (122°F)

Anexo IV Determinación de azúcares reductores (Método DNS)

Los azúcares que poseen extremos carbonilos fácilmente oxidables (azúcares reductores) reaccionan con el ácido 3,5 dinitrosalicílico, produciendo el correspondiente ácido derivado del azúcar y ácido 3,5 amino-nitrosalicílico, de color naranja rojizo. La densidad óptica del color producido es directamente proporcional a la cantidad de azúcares reductores en solución.

Para la determinación de azúcares reductores por este método se sigue un protocolo establecido para la preparación del reactivo y la posterior construcción de una curva de calibración con una solución patrón de glucosa con concentraciones diferentes conocidas.

- **Reactivos**

Mezclar:	Agua destilada	1416 mL
	Ácido 3,5 dinitrosalicílico	10.6 g
	NaOH	19.8 g

Luego acidionar y disolver:

Sal Rochelle (tartrato de Na-K)	306 g
Fenol (fundido a 50° C)	7.6 mL
Metabisulfito de sodio	8.3 g

Solución patrón de glucosa (Solución I)

Disolver 100 mg de glucosa en agua destilada y llevar a volumen en un balón aforado de 100 mL

- **Curva de calibración azúcares reductores**

- Con una hora de anterioridad prender el espectrofotómetro.
- Prepara 5 tubos de ensayo, numerarlos y colocar en cada uno de ellos una concentración diferente de la solución I, de acuerdo a los volúmenes reportados en la Tabla 1

Tabla 1. Concentraciones para la curva de calibración de azúcares reductores

DILUCIÓN	Blanco	1	2	3	4	5
Volumen de solución I (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Volumen de agua (mL)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Concentración de glucosa (g/L)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0

- Tomar 0,5 mL de las soluciones preparadas anteriormente en 5 tubos de ensayo diferentes y adicionar 3 mL de solución de DNS preparada anteriormente

- Agitar en vortex brevemente y calentar en baño de agua en ebullición durante 10 minutos
 - Transcurridos los 10 minutos transferir inmediatamente a un baño de agua-hielo para detener la reacción rápidamente
 - Adicionar a cada tubo de ensayo agua destilada, agitar y dejar reposar por 5 minutos
 - Leer la densidad óptica de cada tubo de ensayo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm
-
- **Graficar la concentración de glucosa (g/L) en función de la densidad óptica (absorbancia), la cual será la curva de calibración para azúcares reductores**


Anexo V Análisis elemental

DIRECCIÓN DEL SERVICIO GEOLÓGICO	 Libertad y Orden	GLQ -534
		19-07-2010
LABORATORIOS DE QUÍMICA	INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS	Página 1 de 1

REMITENTE	UNIVERSIDAD NACIONAL SECCIONAL BOGOTA lcrojas@unal.edu.co
DIRECCIÓN	Depto. Ing. Química y Ambiental
TELÉFONO	2765759 Cel. 3002755474
TIPO DE MUESTRA	Material vegetal
PROCEDENCIA	Estudiante Maestría Ing. Carolina Rojas P.
SOLICITUD No.	92 1 del 14-07-2010

MUESTRA	21792-I
REFERENCIA	Fibra prensada de Palma
<u>Resultados en la muestra secada al aire:</u>	
Carbono, % masa	47,61
Hidrógeno, % masa	6,15
Nitrógeno, % masa	0,74

Nota 1: Los resultados del presente informe corresponden exclusivamente a la muestra recibida y no a otra de la misma procedencia. La muestra se trabajó bajo Norma ASTM D: 5373-07(07).


Sonia L. Guerra Lemoine
Química, MPQ-0112

Anexo VI Análisis estadístico

Analizar Experimento – Rendimiento azúcares

Resumen del análisis

Nombre de fichero: <Sin título>

Efectos estimados para Rendimiento Azúcares

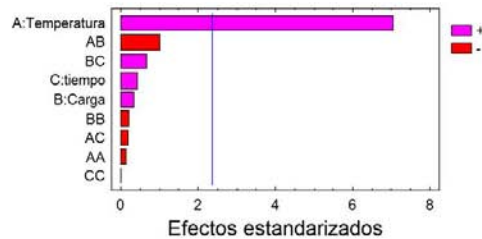
promedio	= 13,6035	+/- 2,10390
A:Temperatura	= 13,8687	+/- 1,97491
B:Carga	= 0,627932	+/- 1,97744
C:tiempo	= 0,793269	+/- 1,97744
AA	= -0,208154	+/- 2,18857
AB	= -0,575	+/- 2,58251
AC	= -0,425	+/- 2,58251
BB	= -0,383298	+/- 2,17765
BC	= 1,625	+/- 2,50251
CC	= -0,0289893	+/- 2,17765

Los errores estándar están basados en un error total con 7 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra cada uno de los efectos estimados e interacciones. También se muestra el error normal de cada uno de los efectos, el cual mide su error de muestreo. Trazar las estimaciones en orden decreciente de importancia, seleccionar Gráficos de Pareto de la lista de Opciones Gráficas. Para probar la significación estadística de los efectos, seleccione la Tabla de ANOVA de la lista de Opciones Tabulares. Después puede eliminar los efectos insignificantes pulsando el botón derecho del ratón, seleccionando Opciones del Análisis, y pulsando el botón Excluir.

Gráfico de Pareto estandarizado para Rendimiento Azúcares



Análisis de la Varianza para Rendimiento Azúcares

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:Temperatura	654,482	1	654,482	49,07	0,0002
B:Carga	1,34503	1	1,34503	0,10	0,7601
C:tiempo	2,14659	1	2,14659	0,16	0,7003
AA	0,12066	1	0,12066	0,01	0,9269
AB	13,2612	1	13,2612	0,99	0,3519
AC	0,36125	1	0,36125	0,03	0,8739
BB	0,413249	1	0,413249	0,03	0,8653
BC	5,28125	1	5,28125	0,40	0,5492
CC	0,00236383	1	0,00236383	0,00	0,9898

Error Total	93,3713	7	13,3388

Total (corr.)	770,661	16	

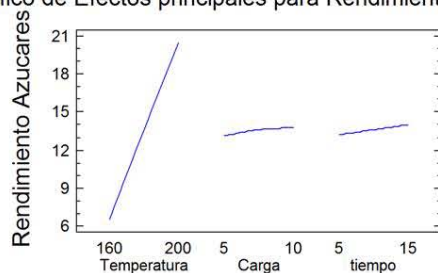
R-cuadrado = 87,8843 por ciento
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 72,3069 por ciento
Error Estándar de Est. = 3,65223
Error absoluto de la media = 1,79261
Estadístico Durbin-Watson = 0,820731 (P=0,0030)
Autocorrelación residual Lag 1 = 0,504845

El StatAdvisor

La tabla de ANOVA divide la variabilidad en Rendimiento Azucares en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos. después pruebe la significación estadística de cada efecto comparando la media al cuadrado contra una estimación del error experimental. En este caso, 1 de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 87,8843% de la variabilidad en Rendimiento Azucares. El estadístico R-cuadrado ajustado, el cual es más adecuado para la comparación de números diferentes de variables independientes, es 72,3069%. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos para ser 3,65223. El error absoluto de la media (MAE) de 1,79261 es el promedio del valor de los residuos. El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos. Puesto que el p-valor es inferior a 0.05, hay indicios de una posible correlación de serie. Represente los residuos frente al orden de la fila para ver si hay cualquier modelo que pueda ser visto.

Gráfico de Efectos principales para Rendimiento Azucares



Coef. de regresión para Rendimiento Azucares

constante	= -94,4665
A:Temperatura	= 0,654763
B:Carga	= 4,57054
C:tiempo	= -0,0140773
AA	= -0,000260192
AB	= -0,02575
AC	= -0,002125
BB	= -0,0306638
BC	= 0,065
CC	= -0,000579787

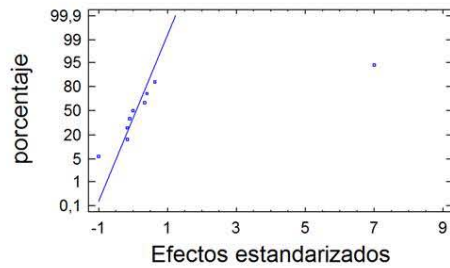
El StatAdvisor

Esta ventana muestra la ecuación de la regresión que se ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento Azucares} = & -94,4665 + 0,654763 \cdot \text{Temperatura} + 4,57054 \cdot \text{Carga} \\ & - 0,0140773 \cdot \text{tiempo} - 0,000260192 \cdot \text{Temperatura}^2 - \\ & 0,02575 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{Carga} - 0,002125 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{tiempo} - \\ & 0,0306638 \cdot \text{Carga}^2 + 0,065 \cdot \text{Carga} \cdot \text{tiempo} - 0,000579787 \cdot \text{tiempo}^2 \end{aligned}$$

siendo los valores de las variables especificados en sus unidades originales. Para que STATGRAPHICS evalúe esta función, seleccione Predicciones de la lista de Opciones Tabulares. Para trazar la función, seleccione Gráficos de Respuesta de la lista de Opciones Gráficas.

Gráfico de Probabilidad normal para Rendimiento Azucares



Respuesta Optimizada

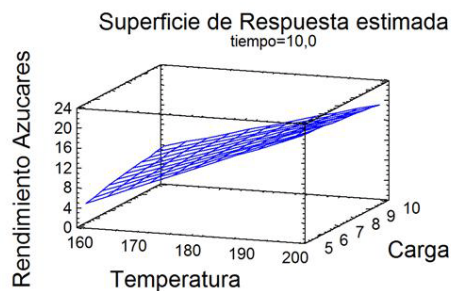
Meta: maximizar Rendimiento Azucares

Valor Optimo = 28,8893

Factor	Inferior	Mayor	Optimo
Temperatura	146,6	213,6	211,798
Carga	3,3	11,7	3,3
tiempo	1,6	18,4	1,6

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la combinación de niveles de factores que maximizar Rendimiento Azucares por encima de la región indicada. Utilice el cuadro de diálogo Opciones del Análisis para indicar la región en la que se realizará la optimización. Puede determinar el valor de uno o más factores para una constante fijando los límites inferior y superior en ese valor.



Optimización de Respuesta Múltiple

Optimización de Respuesta Múltiple

Nombre de fichero: C:\Users\Carola\Documents\TESIS\Carola.sfx

Datos/Variables:
Inhibidores
OY Gl

Respuesta	Observado	
	Mínimo	Máximo
Inhibidores	0,7	8,6
OY Gl	1,9	9,8

Respuesta	Bajo	Conveniencias Alto	Objetivo	Pesos		
				Primero	Segundo	Impacto
Inhibidores	0,0	8,0	Minimizar	1,0		3,0
OY Gl	1,0	9,0	Maximizar	1,0		3,0

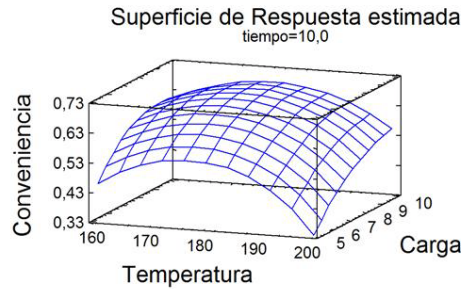
Fila	Inhibidores	OY Gl	Pronosticado Conveniencia	Observado Conveniencia
1	0,7	3,4	0,42996	0,523211
2	1,0	3,1	0,482298	0,479257
3	1,4	3,5	0,417902	0,507752
4	0,9	3,9	0,593977	0,567203
5	2,2	3,3	0,610611	0,45655
6	3,7	1,9	0,41588	0,245904
7	2,9	6,6	0,665029	0,668019
8	2,8	6,4	0,665029	0,662382
9	2,6	6,2	0,665029	0,662382
10	1,9	6,5	0,753465	0,72403
11	3,4	6,0	0,566382	0,599479
12	2,6	7,6	0,640596	0,746241
13	6,7	9,8	0,394943	0,403113
14	6,6	5,3	0,278497	0,306696
15	6,1	7,0	0,438194	0,422049
16	3,8	7,2	0,662048	0,637868
17	8,6	7,4	0,0	0,0

El StatAdvisor

Este procedimiento ayuda a determinar la combinación de factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas. Hace esto aumentando al máximo una función de conveniencia. Puede determinar varias características de la función de conveniencia en el cuadro de diálogo Opciones del Análisis. Los objetivos para cada una de las respuestas actualmente están determinados como:

Inhibidores - minimizar
OY Gl - maximizar

La salida también muestra la función de conveniencia evaluada en cada punto en el diseño. Entre los puntos del diseño, se logra una conveniencia máxima en la ejecución 10. Para encontrar la combinación de factores que logran la conveniencia óptima global, seleccionar Optimización del cuadro de diálogo Opciones Tabulares.



Conveniencia Optima

Valor Optimo = 0,781486

Factor	Bajo	Alto	Optimo
Temperatura	146,6	213,6	186,028
Carga	3,3	11,7	9,4019
tiempo	1,6	18,4	1,6

Respuesta	Optimo
Inhibidores	1,79495
OY Gl	7,29907

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la combinación de niveles de factores que aumentan al máximo la función de conveniencia por encima de la región indicada. También muestra la combinación de los factores en la que se logra la optimización. Utilice el cuadro de diálogo Opciones del Análisis para indicar la región en la que se realizará la optimización.

Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada

