

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

**Aprovechamiento del subproducto lignocelulósico
raquis, procedente de la extracción de aceite de
palma para la producción de bioetanol**

Memoria presentada por

NATALIA ANDREA GÓMEZ VANEGAS

Para optar al grado de Doctor en Ingeniería

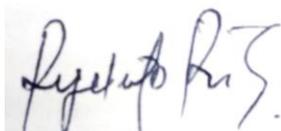
Mayo de 2015

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Facultad de Ingeniería

Rigoberto Ríos Estepa (Ph.D.) en calidad de director, Mariana Peñuela Vásquez (Ph.D.) como asesora; ambos docentes vinculados al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Antioquia e investigadores del Grupo de Bioprocesos y Juan Lema Rodicio (Ph.D.) y Thelmo Alejandro Lu Chau (Ph.D.) codirectores bajo el programa de Becas Santander para América Latina pertenecientes al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela (España) informan que:

La memoria de tesis titulada “**Aprovechamiento del subproducto lignocelulósico raquis, procedente de la extracción de aceite de palma para la producción de bioetanol**” presentada por **Natalia Andrea Gómez Vanegas**, para optar al título de doctor en Ingeniería de la Universidad de Antioquia se realizó bajo nuestra tutela. Para constancia se firma:



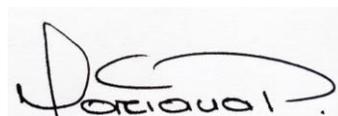
Rigoberto Ríos Estepa



Juan M. Lema Rodicio



Thelmo Alejandro Lu Chau



Mariana Peñuela Vásquez



Natalia Andrea Gómez Vanegas

“...Siempre didáctico, hizo una sabia exposición sobre las virtudes diabólicas del cinabrio, pero Úrsula no le hizo caso, sino que se llevó los niños a rezar. Aquel olor mordiente quedaría para siempre en su memoria, vinculado al recuerdo de Melquíades.

El rudimentario laboratorio –sin contar una profusión de cazuelas, embudos, retortas, filtros y coladores- estaba compuesto por un atamor primitivo; una probeta de cristal de cuello largo y angosto, imitación del huevo filosófico, y un destilador construido por los propios gitanos según las descripciones modernas del alambigque de tres brazos de María la judía. Además de estas cosas, Melquíades dejó muestras de los siete metales correspondientes a los siete planetas, las fórmulas de Moisés y Zósimo para el doblado del oro, y una serie de apuntes y dibujos sobre los procesos del Gran Magisterio, que permitían a quien supiera interpretarlos intentar la fabricación de la piedra filosofal...”

Fragmento de *Cien años de soledad* de Gabriel García Márquez

Resumen

La creciente demanda mundial por fuentes de nuevos combustibles ha motivado la búsqueda de alternativas diferentes al petróleo. La exploración de biomasa lignocelulósica se ha constituido en objeto de estudio para su aprovechamiento en la producción de etanol para fines energéticos. Considerando lo anterior y dado que en la industria colombiana se generan 1,2 millones de toneladas/año del residuo lignocelulósico denominado raquis de palma (racimos de frutos vacíos), este trabajo plantea estrategias y/o procedimientos para lograr el aprovechamiento de los azúcares presentes en él y la evaluación de su uso como sustrato potencial para la producción de bioetanol. El pretratamiento para la remoción de lignina se evaluó mediante métodos biológicos, enzimáticos, químicos y mecánicos; la evaluación de la calidad de los azúcares reductores obtenidos, se hizo mediante la fermentación con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (SC) (Ethanol Red), *Pachysolen tannophilus* CECT 1426 (PT) y *Pichia stipitis* CECT 1922 (PS).

En el pretratamiento biológico se estudió la remoción de lignina y la digestión enzimática para obtener azúcares reductores, haciendo uso de los hongos *Bjerkandera* sp R1 (BKA), *Irpex lacteus* (IL), *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Lentinus tigrinus* (LT) y *Pleurotus eryngii* (PE). El hongo *Pleurotus eryngii* (PE) demostró ser el más selectivo en la remoción de lignina (35,7% de la lignina removida y una selectividad de 77,45 gramos de lignina/gr de celulosa removida). Esto hizo que incrementara la digestibilidad de la celulosa en un 5%, pasando del 17 al 22%. Tras monitorizar durante 40 días la fermentación en estado sólido usando *P. eryngii*, se encontró la mayor digestibilidad del material (43% en celulosa y 16,8% en hemicelulosa, 32,5% de los azúcares recuperables) tras 30 días de biopretratamiento. Igualmente, se estableció que la deslignificación del raquis se llevó a

cabo por la acción sinérgica de las enzimas lignolíticas lacasa (Lac) y manganeso peroxidasa (MnP).

El pretratamiento enzimático se realizó mediante la aplicación, de manera independiente, de crudos enzimáticos de MnP de BKA y lacasa de PE (con y sin mediador HBT). La aplicación de la enzima MnP incrementó las digestibilidades de celulosa y hemicelulosa de 12,3 a 22% y de 11,4 a 40,2%, respectivamente. Con la lacasa no se apreciaron incrementos en la digestibilidad. Sin embargo, mediante análisis FTIR, se evidenció la acción de la lacasa sobre los grupos de la lignina presentes en el material.

En la remoción de lignina de raquis mediante el pretratamiento alcalino con NaOH se aplicó un Diseño Experimental Central Compuesto (DECC), mediante el cual se estableció que a 120°C, 2% NaOH y 1,9 h se favorece la recuperación de azúcares reductores ($0,475 \pm 0,02$ g AR/g raquis, para relación sólido/líquido de 1g de raquis/20 mL). Posteriormente, estas condiciones se evaluaron sobre el raquis extruído con cargas de sólido más altas y se logró incrementar en 170% la recuperación de azúcares reductores y en 192% la concentración de glucosa, al pasar de una relación sólido/líquido de 1/20 (hidrolizados con $75,8 \pm 8,3$ g AR/L y $44,8 \pm 2,1$ g glucosa/L) a 1/7,5. También se encontró que la aplicación independiente del cóctel Cellic HTec2 favoreció la recuperación selectiva de los azúcares presentes en la hemicelulosa, luego de 4 horas de digestión (hidrolizados con $29,5 \pm 1,6$ g AR/L y $2,9 \pm 0,1$ g glucosa/L).

Finalmente, se estudió la fermentación de los hidrolizados de raquis mediante la evaluación de 12 configuraciones diferentes (en monocultivo y combinación en cocultivo de SC, PT y PS) haciendo uso de sistemas de hidrólisis, sacarificación y fermentación separadas (SHF), tanto de la hemicelulosa como la holocelulosa, al igual que sacarificación y fermentación simultánea (SSF). La hidrólisis de hemicelulosa, separada de la fermentación, permitió aprovechar el 84 y 69% de los azúcares presentes, cuando se usó PT y PS, respectivamente. El mayor rendimiento de etanol (102,30 mg de etanol/g raquis) se alcanzó cuando se usaron PT y SC, en cocultivo y en sistemas SSF, precedidos de una etapa separada de hidrólisis de hemicelulosa y celulosa (sistema secuencial).

Estos y otros hallazgos presentes a lo largo del documento, dan cuenta del potencial del raquis como material lignocelulósico, principalmente como fuente de azúcares fermentable para ser usados como materia prima en una Biorrefinería. Los resultados de este proyecto buscan dar valor agregado a un residuo agroindustrial que, en volúmenes significativamente importantes, ha sido parcialmente utilizado.

Palabras clave: racimos vacíos de palma (raquis), biomasa lignocelulósica, biopretratamiento, digestión enzimática, enzimas ligninolíticas, fermentación alcohólica.

Abstract

The growing demand, worldwide, for new energy sources has reinforced the search for energy alternatives different to crude oil. Research on Lignocelulosic biomass has become continuously active, mainly, for the purpose of ethanol production as a biofuel. With this in mind, and taking into consideration that the Colombian industry produces 1.2 million tons/year of rachis or empty fruit bunch palm (EFBP), this work aims at designing strategies and/or methodologies for taking advantages of the reducing sugars present in it, and testing its applicability as a potential substrate for the production of bioethanol. The pretreatment for lignin removal was evaluated by means of biological, chemical, and mechanical methods. Quality of the resulting reducing sugars was tested by fermentative assays, using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (SC) (Ethanol Red), *Pachysolen tannophilus* CECT 1426 (PT) y *Pichia stipitis* CECT 1922 (PS).

The biological pretreatment did study lignin removal, as well as, enzymatic digestion for reducing sugar production, by using the fungi, *Bjerkandera* sp R1 (BKA), *Irpex lacteus* (IL), *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Lentinus tigrinus* (LT) y *Pleurotus eryngii* (PE). The fungus *Pleurotus eryngii* (PE) showed to be promisory for lignin removal (35.7%

ligning removal, and a selectivity around 77.45 g lignin/gr removed cellulose). This caused the cellulose digestibility to increase from 17 to 22%. Following the *P. eryngii* fermentative process in solid state, during 40 days, it was found the highest rachis digestibility (43% in cellulose and 16,8% in hemicellulose, 32,5% of recoverable sugars) after 30 days biopretreatment. Similarly, it was established that rachis delignification took place due to the synergistic action of the lignolytic enzymes lacase (Lac) y manganese peroxidase (MnP).

The enzymatic pretreatment was carried out by applying, independently, crude enzyme extracts of, MnP from BKA and lacase from PE (with and without HBT mediator). The application of MnP did increase cellulose and hemicellulose digestibility from 12,3 to 22%, and 11,4 to 40,2%, respectively. Digestibility did not increase while applying lacase. However, using FTIR analysis, lacase action on ligning groups, was also encountered.

For the purpose of studying the ligning removal, present in rachis, using an alkaline method, a Central Composite Experimental Design was applied (DECC); it was established that, at 120°C, 2% NaOH and 1,9 h, the recovery of reducing sugar ($0,475 \pm 0,02$ g RS/g rachis, for a solid/liquid ratio of 1g of rachis /20 mL) is favorable. Afterwards, these conditions were evaluated on extruded material, using larger solid/liquid ratios (from 1/20 to 1/7.5), thus achieving an increment in reducing sugar recovery (170%) and glucose concentration 192%. Besides, the independent application of the commercial Cellic HTec2 did favor the selective recovery of hemicellulose sugars, after 4 hours of digestion (hydrolyzates with $29,5 \pm 1,6$ g RS/L and $2,9 \pm 0,1$ g glucose/L).

Finally, the performance of the different rachis hydrolyzates was tested in fermentative assays; 12 different configurations (mono and co-cultivo with SC, PT and PS) using hydrolysis, separated saccharification and fermentation (SHF) of both hemicellulose as well as holocellulose, and simultaneous saccharification and fermentation (SSF), were considered. Hemicellulose hydrolysis, separated from fermentation, did allow for a recovery of reducing sugars of around 84 and 69% when PT and PS, respectively, were used. The larger ethanol yield (102,30 mg ethanol/g rachis) was reached when the co-culture of PT

and SC was used, in a SSF configuration; fermentation was preceded by separated hemicellulose and cellulose hydrolysis steps.

These and other findings shown all along the document, provide experimental evidence about the potential of rachis as a lignocellulosic material, mainly as a fermentable sugar source, to be used as raw material for Biorefinery purposes. The results of this work aimed at adding value to an agroindustrial residue that has been partially or underutilized.

Key Words: Ethanol, Empty Fruit Bunch Palm (EFBP), ligninolytic enzymes, white-rot fungi, enzymatic digestion, alcoholic fermentation.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras.....	XVII
Lista de tablas.....	XX
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XXII
Introducción.....	XXIV
1. Capítulo 1. Introducción a la industria de los biocombustibles	1
1.1 Aspectos generales sobre la producción de biocombustibles	16
1.2. Concepto de biorrefinería.....	16
1.3. Uso de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol.....	21
1.3.1. Estructura de los materiales lignocelulósicos	23
1.3.2 Pretratamientos.....	255
1.4 Alcance del trabajo de investigación.....	299
1.4.1. Objetivo general	30
1.4.2. Objetivos específicos	30
2. Capítulo 2. Caracterización del raquis de palma.....	31
2.1 Introducción	35
2.1.1. Producción de aceite de palma	36

2.1.2. Características de la palma de aceite	36
2.1.3. Características de los frutos vacíos de palma de aceite (raquis)	39
2.1.4. Alcance	42
2.2. Materiales y métodos	44
2.2.1. Adecuación del raquis de palma	44
2.2.2. Caracterización química	45
2.2.3. Caracterización estructural del raquis de palma	46
2.2.4. Análisis estadístico	47
2.3. Resultados y discusión	47
2.3.1. Características y composición química	47
2.3.2. Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)	50
2.3.3. Análisis de difracción de rayos X. (Cristalinidad)	51
2.3.4. Análisis de Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	52
2.4. Conclusiones	54
3. Capítulo 3. Pretratamiento biológico de raquis de palma de aceite para la obtención de azúcares fermentables.....	56
3.1 Introducción	57
3.1.1. Alcance	61
3.2. Materiales y métodos	61
3.2.1. Caracterización del material	61
3.2.2. Técnicas analíticas	62
3.2.3. Preparación del medio de cultivo fúngico y preparación del inóculo.....	62
3.2.4. Evaluación de la actividad enzimática y remoción de lignina	64
3.2.5. Digestibilidad e hidrólisis enzimática	64
3.2.6. Actividad de las enzimas lignolíticas	65
3.3. Resultados y discusión	65

3.3.1. <i>Screening</i> de hongos sobre raquis	65
3.3.2. Efecto del biopretratamiento sobre la estructura del raquis	73
3.3.3. Biopretratamiento usando <i>Pleurotus eryngii</i>	76
3. 4. Conclusiones	79
4. Capítulo 4. Pretratamiento enzimático de raquis de palma	81
4.1. Introducción	83
4.1.1. Enzimas ligninolíticas	85
4.1.1.1. Manganese peroxidasa (MnP)	85
4.1.1.2. Lignino peroxidasa (LiP)	87
4.1.1.3. Lacasas	88
4.1.2. Alcance	89
4.2. Metodología	90
4.2.1. Producción de extractos crudos de enzimas	90
4.2.2. Actividad enzimática	91
4.2.3. Pretratamiento enzimático	91
4.2.4. Digestibilidad	92
4.2.5. Microscopio electrónico de barrido (SEM)	92
4.2.6. Análisis infrarrojo (FTIR)	92
4.3. Resultados y discusión	93
4.3.1. Digestibilidad	93
4.3.2. Análisis SEM	96
4.3.3. Análisis infrarrojo	96
4.4. Conclusiones	99

5. Capítulo 5. Pretratamiento físico, químico y digestibilidad de raquis	101
5.1. Introducción	103
5.1.1. Pretratamiento alcalino	104
5.1.2. Pretratamiento físico (extrusión)	105
5.1.3. Digestibilidad de la holocelulosa	107
5.1.4. Relación sólido/líquido y su influencia en el proceso de digestión	110
5.1.5. Alcance	111
5.2. Materiales y métodos	111
5.2.1. Diseño experimental y análisis estadístico de la evaluación del pretratamiento alcalino sobre raquis crudo	111
5.2.2. Digestibilidad enzimática	112
5.2.3. Análisis químico del material pretratado	115
5.3. Resultados y discusión	115
5.3.1. Pretratamiento alcalino	115
5.3.2. Efecto de la extrusión y la carga de sólidos sobre la digestibilidad del material .	118
5.3.3. Digestibilidad de la fracción hemicelulolítica	122
5.3.4. Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)	122
5.3.5. Análisis infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) del efecto del pretratamiento alcalino sobre el raquis de palma	123
Conclusiones	125
6. Capítulo 6. Fermentabilidad de hidrolizados de raquis de palma	126
6.1. Introducción	129
6.1.1. Microorganismos empleados en la fermentación	129
6.1.2. Configuraciones para la hidrólisis y fermentación de la fracción holocelulósica .	132
6.1.3. Alcance	136

6.2. Metodología	137
6.2.1. Microorganismos, medios de cultivo y preparación del inóculo	137
6.2.2. Pretratamiento del raquis	138
6.2.3. Fermentaciones alcohólicas	138
6.2.4. Métodos analíticos	139
6.3. Resultados y discusión	139
6.3.1. Evaluación de las fermentaciones en las configuraciones C1 a C6	140
6.3.2. Evaluación de los sistemas secuenciales utilizando las configuraciones C7 y C8	143
6.3.3. Comparación de configuraciones	144
6.4. Conclusiones	146
7. Capítulo 7. Conclusiones y recomendaciones	147
8. Bibliografía	152

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1.1. Gráfica representativa de la proporción en la cantidad de petróleo mundial y tiempo de consumo	5
Figura 1.2. Evolución histórica del precio del petróleo desde 1861 hasta 2012	7
Figura 1.3. Distribución del uso de energías tanto renovables como no renovables a nivel mundial	9
Figura 1.4. Rutas de transformación de la biomasa para la obtención de combustibles, sólidos, líquidos y gaseosos.....	11
Figura 1.5. Clasificación de los biocombustibles según su fuente.....	13
Figura 1.61. Legislación colombiana referente a la proyección de mezclas de etanol anhidro con gasolina.....	16
Figura 1.72. Comparación de los ciclos de producción y uso de combustibles derivados del petróleo (izquierda) y derivados de fuentes renovables (derecha).....	18
Figura 1.8. Esquema general de una biorrefinería donde la biomasa es transformada en diversos productos con valor agregado	20
Figura 1.93. Esquema de distribución estructural típico de los materiales lignocelulósicos.....	23
Figura 2.1. Diagrama de bloques y balance de masa de la producción de aceite palma y aceite de <i>kernel</i> de palma	37
Figura 2.2. Partes de la palma de aceite	38
Figura 2.3. Adecuación del raquis y apariencia física molido, extraído y con hidrólisis ácida	48
Figura 2.4. Dimensiones de la fibra de raquis intacta y extruida	50

Figura 2.5. Observaciones de las características estructurales de la superficie del raquis	51
Figura 2.6. Difractograma del raquis crudo.....	53
Figura 2.7. Espectro infrarrojo del raquis crudo de palma evaluado en este estudio correspondiente al lote 2 y una muestra de raquis de palma, raquis crudo y pretratado con NaOH 2%	54
Figura 3.4. Diagrama de bloques para el <i>screening</i> de hongos en el pretratamiento biológico	63
Figura 3.2. Apariencia del raquis luego de 21 días de pretratamiento con diferentes hongos	66
Figura 3.3. Rendimiento de digestiones enzimáticas de raquis biopretratado 21 días con PE.	71
Figura 3.4. Difractogramas obtenidos para el raquis crudo y pretratado con <i>Bjerkandera</i> sp. R1, <i>Irpex lacteus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Lentinus tigrinus</i> y <i>Pleurotus eryngii</i>	74
Figura 3.5. Correlación entre la selectividad, la digestibilidad de la celulosa y la fracción amorfa posterior al pretratamiento	75
Figura 3.6. Análisis SEM para el raquis sin pretratar y el raquis pretratado con <i>I. lacteus</i> , <i>Bjerkandera</i> sp. R1 y <i>P. eryngii</i>	76
Figura 3.7. Evolución de la remoción de lignina, MnP y Lacasa para el pretratamiento biológico durante 40 días con el hongo <i>P. eryngii</i>	78
Figura 3.8. Perfiles de digestibilidad holocelulósica y azúcares reductores totales en el tiempo empleando <i>P. eryngii</i>	79
Figura 4.1. Esquema hipotético del mecanismo enzimático de la MnP sobre la lignina.....	86
Figura 4.2. Oxidación de subunidades fenólicas de la lignina vía Lacasa y oxidación de unidades no fenólicas vía Lacasa mediador (ABTS).....	90
Figura 4.3. Pretratamiento enzimático de raquis <i>in vivo</i> con <i>P. eryngii</i> e <i>in vitro</i> con extractos enzimáticos crudos de MnP y lacasa	95
Figura 4.4. Análisis SEM para el raquis sin pretratamiento, y pretratamiento enzimático usando MnP (RA-MnP)	97
Figura 4.5. Espectro infrarrojo del raquis de palma crudo, pretratado biológicamente con el hongo <i>P. eryngii</i> y pretratado con extracto crudo de lacasa obtenido del hongo <i>P. eryngii</i>	98
Figura 5. 1. Ejemplo de una configuración de extrusor de tornillos gemelos	106
Figura 5.2. MRS de los azúcares reductores recuperados del raquis, en función de a) temperatura y tiempo y b) NaOH y temperatura	118
Figura 5.3. Efecto de la extrusión del raquis sobre la concentración de AR, glucosa	

y % de rendimiento logrados en la digestión enzimática	119
Figura 5.4. Efecto de la carga de sólidos y la extrusión del raquis sobre la concentración de AR, Glucosa y % rendimiento	120
Figura 5.5. Digestibilidad del raquis extruido pretratado con NaOH 2%p/v/1,9h/120°C y una relación sólido líquido 1/7,5	122
Figura 5.6. Digestibilidad de hemicelulosa de raquis aplicando Cellic, HTec2	123
Figura 5.7. Imágenes SEM (a) Raquis crudo (b) Pretratado alcalino (c) Silicatos precipitados en licor alcalino	124
Figura 5.8. Espectro infrarrojo del raquis de palma (a) crudo (b) luego de pretratamiento alcalino	125
Figura 6.1. Rutas fermentativas para la producción de etanol a partir de hexosas y pentosas para <i>E coli</i> , <i>Z. mobilis</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>P. stipitis</i>	132
Figura 6.2. Esquema de las configuraciones típicas de bioprocesamiento de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol	134
Figura 6.3. Fermentación de hidrolizados de raquis en configuraciones C1 a C6	142
Figura 6.4. Perfiles de la concentración de AR, glucosa y etanol de las fermentaciones en configuraciones de los sistemas secuenciales C7 y C8	145

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.1. Composiciones medias de celulosa, hemicelulosa y lignina de diferentes materiales lignocelulósicos	24
Tabla 1.2. Eficiencia de los diferentes pretratamientos, sobre las variables de interés en los materiales lignocelulósicos	28
Tabla 2.1. Diferentes aplicaciones del raquis de palma	40
Tabla 2.2. Estudios sobre el aprovechamiento de la fracción holocelulósica presente en el raquis	42
Tabla 2.3. Caracterización química del raquis de palma. Muestra cruda y extruida ..	49
Tabla 3.2. Evaluación del proceso de deslignificación de diferentes sustratos, diferentes cepas y las enzimas detectadas durante el pretratamiento	59
Tabla 3.3. Composición (%) y digestibilidad de raquis tras 21 días de pretratamiento biológico	67
Tabla 3.3. Algunos estudios sobre biopretratamientos y su relación con las enzimas ligninolíticas e hidrolíticas	72
Tabla 5.1. Diseño experimental Central Compuesto para establecer las condiciones más favorables del pretratamiento alcalino del RC	113
Tabla 5.2. Resultados del ANOVA para determinar el efecto del pretratamiento alcalino sobre la recuperación de azúcares reductores (ARR)	116
Tabla 5.3. ANOVA para la variación de la carga de sólidos	120
Tabla 6.1. Configuraciones y combinaciones de levaduras en la fermentación de hidrolizados de raquis de palma	139

Tabla 6.2. Rendimientos y productividades de etanol logradas a partir de las diferentes configuraciones	146
--	-----

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ACPM</i>	Aceite Combustible Para Motores
<i>AFEX</i>	Explosión de fibra con amonio
<i>AR</i>	Azúcares reductores
<i>ARdG</i>	azúcares reductores diferentes de glucosa
<i>ARR</i>	Rendimiento de azúcares
<i>BKA</i>	<i>Bjerkandera</i> sp R1
<i>CBP</i>	Procesamiento consolidado de la biomasa
<i>DC</i>	Digestibilidad de la celulosa
<i>DECC</i>	Diseño Experimental Central Compuesto
<i>DH</i>	Digestibilidad de la hemicelulosa
<i>EFBP</i>	EMPTY FRUIT BUNCH PALM
<i>EIA</i>	Agencia sobre Administración Energética
<i>FPP</i>	Fibras de palma prensada
<i>FPU</i>	Unidad de papel filtrante
<i>FTIR</i>	Espectroscopía infrarroja
<i>G</i>	Unidades de guayacilo
<i>GJ</i>	Gigajulio
<i>GW</i>	Gigavatio
<i>IL</i>	<i>Irpex lacteus</i>
<i>IR</i>	Índice de recalcitrancia

<i>Kg</i>	Kilogramo
<i>Lac</i>	Lacasa
<i>LHW</i>	Agua líquida a alta temperatura
<i>LiP</i>	<i>Lignino peroxidasa</i>
<i>LT</i>	<i>Lentinus tigrinus</i>
<i>MnP</i>	Manganeso peroxidasa
NREL	Laboratorio Nacional de Energía Renovable
<i>PC</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>PC</i>	<i>Pichia stipitis</i>
<i>PE</i>	<i>Pleurotus eryngii</i>
<i>PKC</i>	Torta de <i>kernel</i> de palma
<i>PKS</i>	Cáscara de <i>kernel</i> de palma
<i>PPP</i>	Ruta de pentosa fosfato
<i>PT</i>	<i>Pachysolen tannophilus</i>
<i>S</i>	Unidades de siringilo
<i>SC</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>SEM</i>	Microscopía electrónica de barrido
<i>SHCF</i>	Hidrólisis y co-fermentación separadas
<i>SHF</i>	Sacarificación y fermentación separadas
<i>SSF</i>	Sacarificación y fermentación simultáneas
<i>t/ha</i>	Toneladas métricas por unidad de superficie

Introducción

La base del desarrollo industrial moderno, desde hace muchos años, ha sido el petróleo. Sin embargo, las altas demandas y los cambios en las condiciones de mercado, sumados a las preocupaciones que a nivel ambiental suscita este producto, han motivado la generación e implementación de fuentes alternativas. Por ello, uno de los retos actuales en la ciencia es el desarrollo de procesos productivos limpios que integren el aprovechamiento de todo tipo de subproductos de la industria, para la producción de bienes de alto valor agregado, entre ellos los biocombustibles.

De esta manera, uno de los temas de mayor interés en el ámbito científico, industrial y gubernamental desde hace algunas décadas ha sido la producción de etanol de segunda generación (producido a partir de material lignocelulósico), y el continuo mejoramiento de las condiciones de operación, para lograr que este combustible sea, en poco tiempo competitivo, rentable y, en última instancia, estable en el mercado.

Colombia produce anualmente un millón de toneladas de aceite de palma para la producción de biodiesel, lo que hace que sea uno de los cinco mayores productores a nivel mundial. El proceso productivo para la extracción del aceite de palma genera una gran cantidad de residuos de naturaleza lignocelulósica, que, para el caso de Colombia, representa alrededor de 1,2 toneladas de racimos de frutos vacíos o raquis. En esta

medida, la valoración de este residuo se constituye un pilar importante en el desarrollo de la industria aceitera colombiana.

Esta tesis parte de las presunciones que el raquis es un material lignocelulósico potencialmente utilizable para la obtención de azúcares fermentables, permitiendo el aprovechamiento tanto de la fracción hemi como celulósicas y su aplicación en procesos fermentativos para la producción de etanol es viable. De igual manera, el uso de extractos crudos de enzimas ligninolíticas, permitirán una mayor velocidad de deslignificación del raquis en comparación con el pretratamiento biológico donde se aplica el hongo directamente. Por lo anterior, el documento se estructuró por capítulos, distribuidos de la siguientes manera:

El Capítulo 1 se enfoca en una revisión bibliográfica detallada de la situación actual de los combustibles fósiles, a través de un análisis de su recorrido histórico y los riesgos tangibles sobre la economía mundial. Posteriormente, se realiza una revisión sobre formas alternativas para la generación de energía, con especial énfasis en la producción de biocombustibles, denotando especial interés en la situación de Colombia, sus políticas actuales y a las oportunidades de desarrollo en el sector energético. Una vez descrita la situación en materia de energía, se introduce el concepto de biorrefinería como puente para la integración de procesos en ciclos productivos basados en el reaprovechamiento de subproductos de industria. La transformación de dichos subproductos en otros con mayor valor agregado, es uno de los puntos que mayor atención ha demandado en cuanto al desarrollo y el funcionamiento rentable de las biorrefinerías.

De esta forma, se presenta una revisión conceptual de las características principales de los materiales lignocelulósicos enfocadas a identificar las principales barreras naturales propias de la biomasa. Finalmente, se presentan algunos de los diferentes pretratamientos reportados para la biomasa lignocelulósica, que incluyen procesos químicos, físicos y biológicos.

Tomando el contexto colombiano en lo que se refiere a la producción de aceite de palma y la consecuente generación de subproductos, el Capítulo 2 hace un reconocimiento general del proceso productivo del aceite de palma, del uso potencial del raquis de palma para la producción de diferentes compuesto de alto valor agregado, como aislantes eléctricos, bioaceites, taninos, entre otros, abarcando diferentes áreas de la industria y fundamentado en los reportes de literatura. Se realiza además una revisión sobre algunos estudios enfocados al área de los biocombustibles, en donde se mencionan diferentes metodologías empleadas para la producción de etanol. Una vez logrado un contexto general sobre dicho material, el Capítulo 2 se orienta a la caracterización del raquis de palma, a través de métodos físicos y químicos que incluyen análisis por infrarrojo y microscopía electrónica de barrido.

En los capítulos posteriores se desarrollan estudios sobre cada etapa de la producción de etanol a partir del raquis de palma. La primera etapa consiste en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica a fin de remover principalmente la lignina. En el Capítulo 3 se realizan ensayos aplicando un pretratamiento biológico a través de un *screening* de cinco diferentes tipos de hongos de la pudrición blanca de la madera: *Bjerkandera sp* R1 (BKA), *Irpex lacteus* (IL), *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Lentinus tigrinus* (LT) y *Pleurotus eryngii* (PE) y evaluando como variable de respuesta su selectividad sobre la fracción lignocelulósica del material y la recuperación de azúcares en el proceso de digestión enzimática. Se pudo determinar que el hongo PE fue la cepa más selectiva dentro del *screening* sobre el raquis de palma, logrando remover lignina sin afectar notablemente la fracción holocelulósica.

El Capítulo 4 presenta evaluaciones experimentales sobre el uso de extractos enzimáticos empleando un proceso oxidativo de deslignificación con manganeso peroxidasa, extraída del hongo BKA y lacasa de PE. Se realizaron además análisis de espectroscopía infrarroja (FTIR) para observar el resultado del proceso oxidativo de lacasa sobre raquis de palma, en comparación con el pretratamiento directo con el hongo PE. En el Capítulo 5 se evalúan

las condiciones óptimas de remoción de lignina que favorezcan la recuperación de azúcares, teniendo en cuenta factores como concentración de NaOH, temperatura y tiempo. En este capítulo, también se evalúa la implementación de un pretratamiento físico consistente en la extrusión del material lignocelulósico, con el fin de exponer las fibras y simultáneamente determinar el efecto de diferentes cargas de sólidos, esto con el fin de mejorar el rendimiento en la recuperación de azúcares fermentables.

Finalmente, en el Capítulo 6 se estudia el proceso de fermentación como etapa final en la producción de etanol. Bajo este esquema, se evalúan diferentes configuraciones de sacarificación y fermentación, al igual que diferentes tipos de levaduras, reportadas previamente como consumidoras de pentosas y hexosas.

Colombia posee un gran potencial para el aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos, en especial los frutos vacíos de palma de aceite (raquis), cuya producción se asocia a la extracción de aceite de palma para la producción de biodiesel. De esta forma, se plantean las necesidades técnicas y científicas en el desarrollo de protocolos eficientes para la generación de las energías alternativas derivadas de la biomasa.

Capítulo 1



Capítulo 1

Introducción a la industria de los biocombustibles

Resumen

Entre los factores ambientales asociados al uso del petróleo se encuentran la contaminación y el agotamiento de este recurso no renovable, mientras que los factores económicos involucran la volatilidad de los precios y el fenómeno de escasez. Esta situación evidencia la necesidad de implementar plataformas alternativas, que sean competitivas y den respuesta de manera eficiente a los requerimientos energéticos, utilizando como base el concepto de biorrefinería. Una de las fuentes renovables que ha ganado terreno en las aplicaciones energéticas, es la biomasa y de ella el componente lignocelulósico, que típicamente se considera un desecho y no compite con la alimentación y el uso de la tierra, y ha sido objeto de investigaciones enfocadas a liberar las fracciones azucaradas útiles para la producción de biocombustibles, en especial el etanol.

En este capítulo presenta una revisión bibliográfica detallada la situación actual de los combustibles fósiles, de algunas formas alternativas para la generación de energía, con especial énfasis en la producción de biocombustibles y las políticas presentes en torno al tema para Colombia. A través del concepto de biorrefinería, se plantea el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica como una manera de darle utilidad a los residuos de palma presentes en Colombia, para la obtención de biotanol; lo anterior genera la necesidad de conocer las barreras y los procedimientos que implica el uso de este tipo de biomasa.

Adicionalmente, se presenta la constitución química de la matriz lignocelulósica y una revisión de los principales métodos químicos, físicos y biológicos para su pretratamiento. Finalmente, se presentan los objetivos general y específicos que son el objeto de estudio de este trabajo; que buscan el aprovechamiento de la fracción holocelulósica del raquis de palma para la producción de etanol, a través de la exploración de distintos pretratamientos (Biológico con hongos, enzimático con enzimas ligninolíticas, físico mediante extrusión y alcalino con NaOH) y la aplicación en la fermentación de tres levaduras con capacidad metabólica diferente para el consumo de azúcares (*Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* y *Pachysolen thanopillus*).

1.1 Aspectos generales sobre la producción de biocombustibles

Con el fin de satisfacer las necesidades en cuanto a bienes y servicios, en un medio energéticamente demandante como el actual, y a fin de generar un menor impacto sobre el entorno, la sociedad industrial se ha redefinido y ha establecido como objetivo más cercano el desarrollarse bajo mecanismos y procesos industrialmente sustentables, en un entorno donde coexisten la producción de bienes y la generación de energía a partir de fuentes renovables.

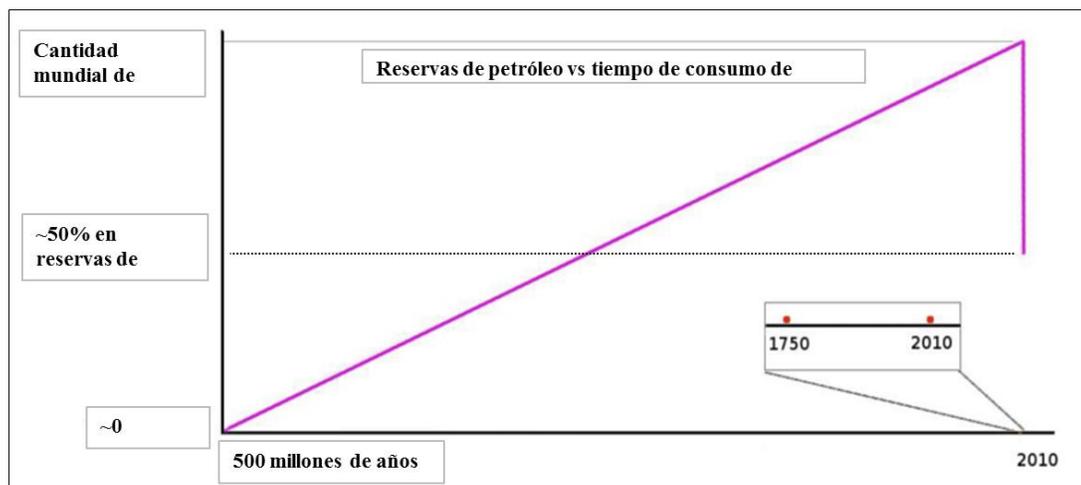
La disminución progresiva de las reservas de crudo, las tendencias en la demanda mundial asociada al sector de transporte principalmente, estimada en 2009 en aproximadamente 84 millones de barriles por día, y proyectada a 2030 en 116 millones de barriles por día (FitzPatrick et al., 2010; Cherubini, 2010) y la emisión de agentes contaminantes, han contribuido a generar conciencia ambiental tanto en la sociedad como en la industria y, ha advertido la necesidad de desarrollar propuestas de investigación asociadas al desarrollo y uso de fuentes alternativas de energía. Los principales factores que, asociados al uso de combustibles fósiles, llevan a la búsqueda de nuevas alternativas para aplicar como fuentes de energía y síntesis química (EEA report, 2013; Doherty, 2012), pueden resumirse en los siguientes aspectos:

Agotamiento de las fuentes. Se estima que desde el inicio de la revolución industrial (a finales del siglo 18) hasta ahora, las reservas de crudo han disminuido en aproximadamente un 50% (ver Figura 1.1.). Considerando las tendencias en la demanda y las reservas proyectadas de petróleo a nivel mundial, se estima que éstas alcanzan a cubrir la demanda de un poco más de medio siglo.

Precisamente, la expectativa del agotamiento ha encarecido los procesos de extracción del crudo lo que repercute en última instancia en el precio final de los combustibles.

En la Figura 1.1. se observa que el consumo de petróleo representa una línea vertical descendente y equivale a un consumo estimado del 50% de las reservas de crudo a nivel mundial. Estas predicciones se basan en modelos econométricos, construidos a partir de tendencias en precios, proyecciones poblacionales y consumo mundial (Singh & Singh, 2004).

Figura 1.1. Gráfica representativa de la proporción en la cantidad de petróleo mundial y el tiempo de consumo. Doherty (2012)



Cabe aclarar que aproximadamente el 50% de la energía consumida a nivel mundial proviene del petróleo y sus derivados, mientras que el otro 50%, corresponde, en diferentes proporciones, a gas natural y carbón. La existencia y uso de estas fuentes de energía se proyectan a un mayor tiempo, en comparación con el petróleo. Sin embargo, las emisiones generadas a partir de su explotación y consumo generan preocupaciones ambientales igualmente importantes (Doherty, 2012; Singh & Singh, 2004).

(2) Emisión de gases de efecto invernadero que contribuyen al calentamiento global. No solo la escasez de fuentes energéticas representa un problema para el funcionamiento a largo plazo de los procesos productivos; a su vez, los agentes resultantes en la combustión de los combustibles fósiles, principalmente CO₂, metano y óxido nitroso, constituyen el foco primario de contaminación medioambiental (Cherubini, 2010). Nuevamente, las fuentes energéticas sostenibles se perfilan como modelos de transición hacia procesos industriales de bajo impacto ambiental, en donde el tiempo de residencia del CO₂ en el

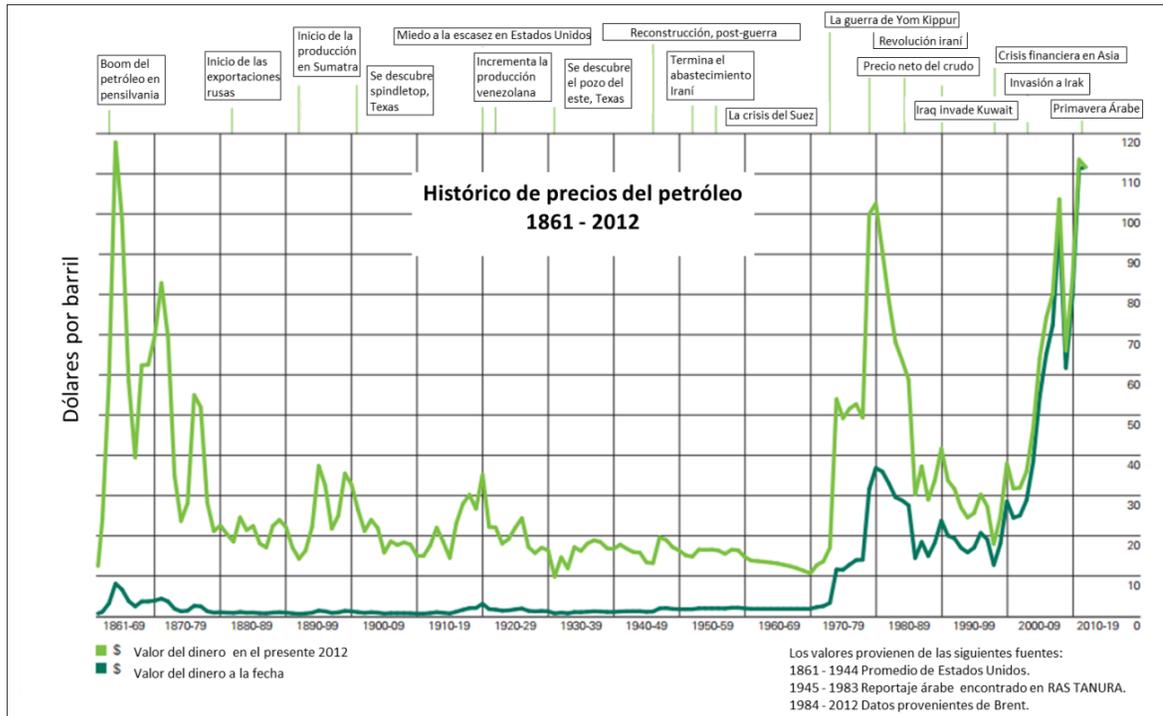
ambiente es mucho menor y el balance neto en ciclos de vida con respecto al dióxido de carbono es cero. Se estima por ejemplo, que las emisiones generadas por los combustibles fósiles son mucho mayores a aquellas que provienen de fuentes renovables. A partir de energías renovables se producen, aproximadamente 44 Kg CO₂ por cada GJ de energía generado, lo que implica un 62% menos que las emisiones a partir de un combustible fósil, para producir la misma cantidad de energía.

(3) Volatilidad en los precios del petróleo. El petróleo, se considera un producto de gran importancia a nivel mundial y uno de los factores más influyentes en las economías de diferentes países. Hoy en día, constituye alrededor del 10% de las transacciones del mercado a nivel mundial. A pesar de su importancia comercial, el petróleo presenta grandes variaciones y fluctuaciones en el precio. Desde agosto de 2003 en donde se pagaban 25 dólares por barril, el precio del petróleo inició un continuo aumento hasta mayo de 2008, en donde superó los 130 dólares por barril y desembocó en la llamada crisis del 2008 (Gileva, 2010).

El precio del petróleo se ve altamente influenciado por factores de diversa índole, tales como fenómenos socioeconómicos y de consumo, eventos geopolíticos, fenómenos ambientales que afectan la operación normal de las refinerías, operaciones de balance de mercados asociados a la producción en Arabia Saudita, entre otros. La alta volatilidad en los precios genera incertidumbre y, como resultado, la inestabilidad económica en países importadores y exportadores de crudo, especialmente en países cuyas economías son altamente dependientes. Por ejemplo, el aumento en el costo del petróleo afecta variables macroeconómicas como la inflación y las variables de mercado como las tasas de interés y de intercambio (Gileva, 2010).

En la Figura 1.2. se observa el fenómeno de volatilidad de los precios del petróleo durante toda su historia de extracción y producción. En ella se observa como los fenómenos geopolíticos y macroeconómicos inciden en el comportamiento de los precios. El descubrimiento de nuevas fuentes, las guerras y las post-guerras y la influencia y comportamiento del medio oriente son factores claves en la volatilidad del costo del crudo (*BP statistical review*, 2013).

Figura 1.2. Evolución histórica del precio del petróleo desde 1861 hasta 2012. BP statistical review (2013)



Con el objeto de eliminar la dependencia sobre los combustibles fósiles, que hoy día equivale a más del 80% de la demanda energética mundial, del cual aproximadamente un 58% se destina al sector de transporte (Nigam & Singh, 2011), se ha propuesto el uso de medios energéticos alternativos, cuyas fuentes – de origen natural – se regeneran constantemente. En el marco de este proceso de transición, han surgido plataformas energéticas que consideran el uso del viento, el agua, el sol y la biomasa. Los continuos avances tecnológicos, el mejoramiento en la eficiencia de los procesos sostenibles, la intencionalidad política en investigación, desarrollo y aplicación y la diversidad de opciones bioenergéticas, permiten vislumbrar un panorama alentador referente a la independencia energética de las fuentes del petróleo, al desarrollo industrial sostenible y a una gestión eficaz en la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero (FitzPatrick et al., 2010; Haghghi Mood et al., 2013).

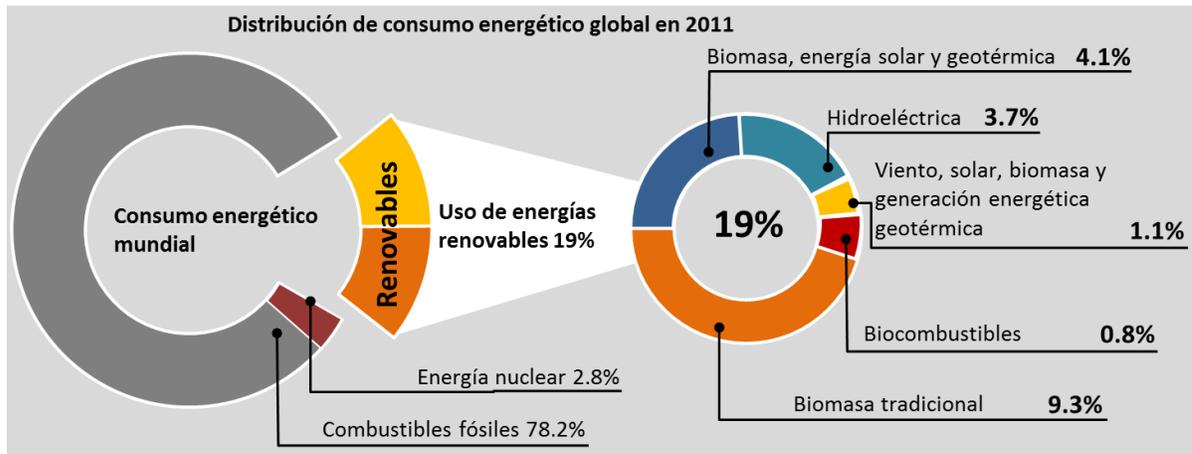
A pesar de la crisis económica internacional generalizada, la demanda mundial de energía renovable se ha incrementado en los últimos años. Los gobiernos en todo el mundo han

implementado políticas relacionadas con la producción y el consumo de biocombustibles, cuya aplicación principal se destina al transporte. La Unión Europea por ejemplo, ha dispuesto en 2009 la meta de implementar el uso de fuentes renovables para lograr una participación energética del 20% de su consumo energético total (EEA report, 2013). Por su parte, y para hacer frente a las problemáticas medioambientales, en 2009 el gobierno colombiano decidió incluir un 5% de biodiesel al diesel de petróleo. Para 2013 ha alcanzado entre un 8 y un 10% de biocombustible mezclado; y para 2020, se proyecta implementar mezclas de hasta 20% de biocombustibles que incluyen biodiesel y bioetanol (Salomón et al, 2013). Este panorama, asociado al área del transporte, no hace más que ejemplificar la creciente demanda de bioproductos en todos los ámbitos de la sociedad, no solo en Colombia sino a nivel mundial.

Tras un paulatino aumento en la implementación de las políticas ambientales y de mercado y en la oferta de tecnologías alternativas, se logró suplir en 2011, cerca de un 19% de la energía consumida a nivel mundial. La Figura 1.3. presenta la distribución del consumo por fuentes de energía hacia finales del año 2011, discriminando la participación de cada fuente energética. Se observa la participación de un 19% de energías renovables respecto al consumo energético mundial. Se aprecia además, que el uso de biomasa tradicional con el fin de obtener energía equivale a poco menos del 50% de las fuentes alternativas utilizadas. La biomasa es usada comúnmente en países en desarrollo, en la combustión directa como fuente de calentamiento o de cocción.

Para 2012, la capacidad productiva total de energía renovable en todo el mundo superaba los 1470 GW, constituyéndose en aproximadamente el 8,5% de la demanda energética mundial. La energía hidroeléctrica aumentó 3% a una potencia estimada de 990 GW, mientras que otras energías renovables crecieron un 21,5% superando los 480 GW. A nivel mundial, la energía eólica representó alrededor del 39% de la capacidad energética renovable durante 2012, seguida de la energía hidroeléctrica y la energía solar fotovoltaica,

Figura 1.3. Distribución del uso de energías tanto renovables como no renovables a nivel mundial. McGinn et al., (2013)



representando cada una el 26%. El interés por el uso de los recursos renovables como fuentes energéticas ha crecido a un punto tal que los consumidores industriales, comerciales y residenciales, son cada vez más los mismos productores de energía renovable en un número creciente de países (McGinn et al., 2013).

La demanda de energía para sistemas de calentamiento y enfriamiento aumenta continuamente, abriendo campos potenciales de desarrollo y aplicación de las diferentes energías renovables. Hoy en día, se registra el uso de fuentes alternativas para el calentamiento de diferentes sistemas, tales como la energía solar y la biomasa moderna.

No obstante, este sector se encuentra en lenta evolución y ligado a la ejecución de diferentes políticas de implementación. Cabe aclarar que, el término *biomasa moderna* se refiere a aquella que se produce de manera sostenible, es decir, la que se obtiene a partir de residuos forestales y subproductos agroindustriales. Aquella que se considera *biomasa*

tradicional, es la madera que se utiliza para la combustión directa en sistemas de cocción y calentamiento. Gran parte de la biomasa tradicional que se utiliza a nivel mundial – especialmente en países en desarrollo – es producto de la deforestación tanto a nivel industrial como doméstico (Goldemberg & Teixeira Coelho, 2004). A pesar de que la Agencia sobre Administración Energética (EIA por sus siglas en inglés) considera que tanto la biomasa tradicional como la moderna son fuentes renovables (Goldemberg & Teixeira Coelho, 2004), son claras las ventajas comparativas que se derivan del uso de biomasa moderna como fuente de energía renovable.

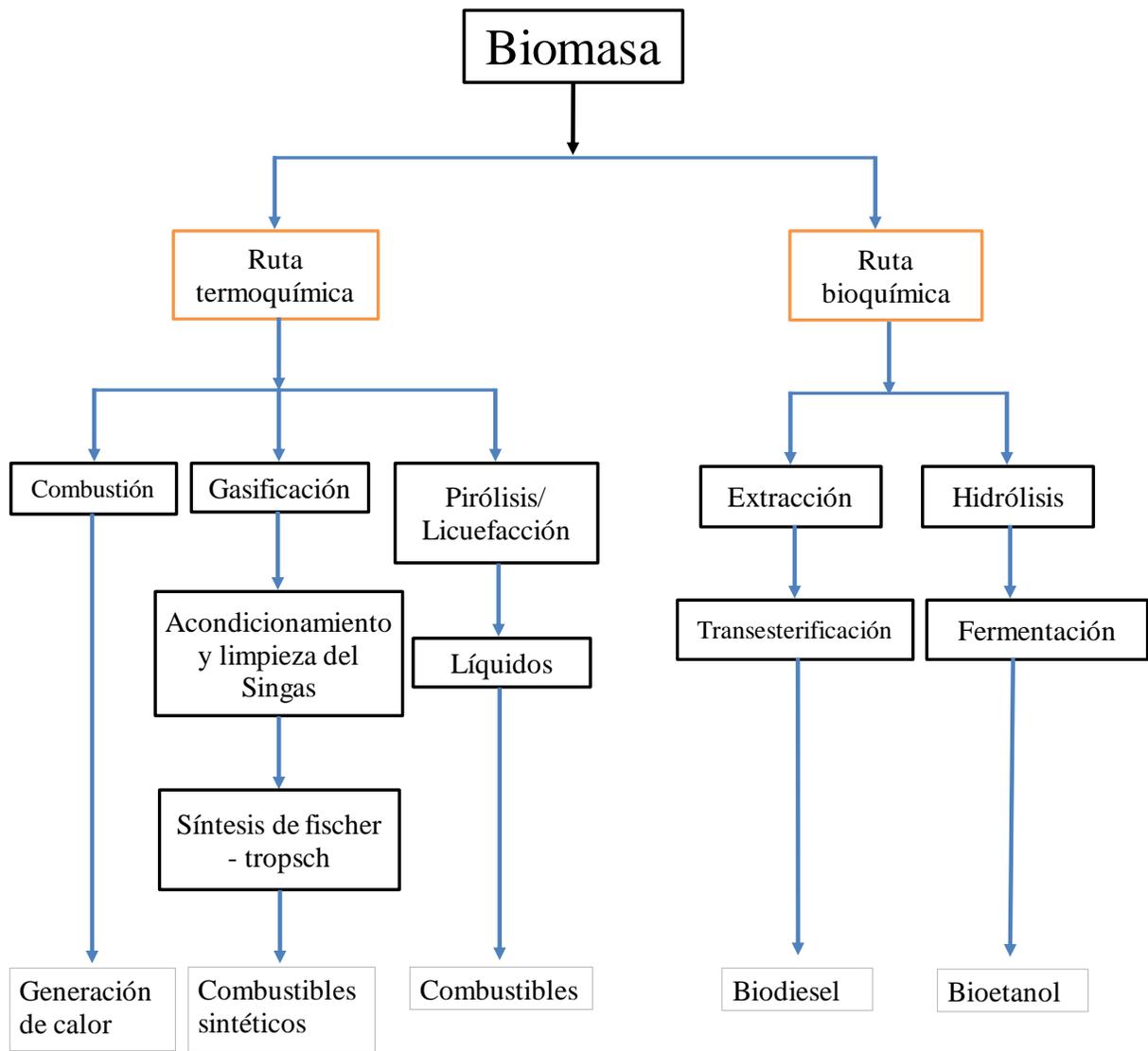
La biomasa moderna, constituye una fuente estratégica para la generación energética debido a cuatro razones potenciales. En primer lugar, se considera un recurso renovable que puede ser explotado de forma sostenible a futuro. En segundo lugar, se le adjudican propiedades ambientalmente amigables en cuanto a que no aumenta la producción de dióxido de carbono (asociado a los análisis de ciclos de vida) y posee bajos contenidos de azufre. En tercer lugar, se estima que puede tener un gran potencial económico con respecto al incremento de los precios en los combustibles fósiles. Y por último, se considera que la biomasa tiene una ventaja única con respecto a las demás fuentes renovables, puesto que de ella pueden derivarse combustibles sólidos, líquidos y gaseosos y que pueden ser almacenados, transportados y finalmente utilizados lejos del lugar de origen (Demirbas, 2008). Según la naturaleza de la biomasa su transformación en energía aprovechable requiere la aplicación de métodos y tecnologías específicas para lograr los productos y aplicaciones deseadas. En la Figura 1.4. se presentan dos de las rutas principales para dichas transformaciones: la ruta termoquímica y la ruta bioquímica.

La ruta termoquímica provee tres opciones de tratamiento: la combustión directa de la biomasa, la cual es el proceso tecnológicamente menos complejo y cuyo fin es el de proveer calor. Los procesos de pirólisis y gasificación, que requieren la aplicación de metodologías de limpieza y acondicionamiento de gases, para obtener finalmente combustibles líquidos sintéticos.

Por otra parte, la ruta bioquímica consiste en la transformación enzimática de la fracción holocelulósica en azúcares y la fermentación posterior empleando levaduras o bacterias,

para la obtención de combustibles como el etanol y el butanol. De igual forma, en esta ruta se considera la obtención de aceites que por medio de reacciones de transesterificación se transforman en biodiesel (Damartzis & Zabaniotou, 2011).

Figura 1.4. Rutas de transformación de la biomasa para la obtención de combustibles, sólidos, líquidos y gaseosos. Damartzis & Zabaniotou,(2011)



Dada la importante demanda de energía por parte del sector del transporte a nivel mundial (60 del 80% de la demanda total de combustibles fósiles) (Balat, 2011), la aplicación más importante de la biomasa es la producción de biocombustibles. No obstante, cabe

mencionar que la biomasa cuenta con aplicaciones en otras áreas, que incluyen la producción de biopolímeros, papel y en general bioproductos. El término biocombustible, se refiere a aquellos combustibles líquidos o gaseosos que se obtienen principalmente a partir de biomasa. Puede obtenerse una gran variedad de combustibles entre los que se incluyen el etanol, metanol, butanol, biodiesel, diesel Fischer-Tropsch y combustibles gaseosos como el hidrógeno y el metano. Los beneficios medioambientales provenientes de los biocombustibles implican un crecimiento rápido de su propio mercado debido a su creciente demanda.

Los biocombustibles se clasifican según su fuente (Figura 1.5.), en primarios o secundarios (Nigam & Singh, 2011). Los biocombustibles primarios provienen de materia orgánica sin transformación química, e incluyen la madera, pellets y chips de madera, principalmente; su uso principal es la combustión directa para la obtención de calor y electricidad. Por otra parte, los biocombustibles secundarios son aquellos que provienen de fuentes primarias modificadas o procesadas y poseen un rango más amplio de aplicación, principalmente el transporte y diferentes aplicaciones industriales.

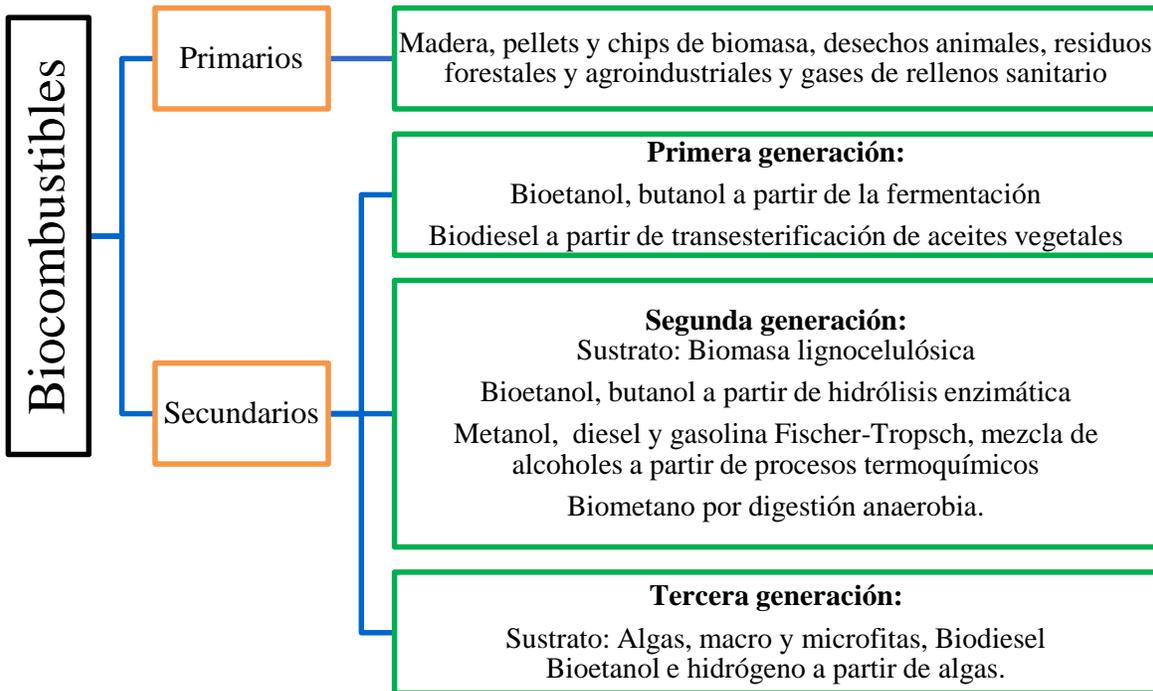
El tema de los biocombustibles secundarios es un poco más complejo desde el punto de vista social. Al observar la Figura 1.5., se aprecia que estos biocombustibles se pueden clasificar como de primera, segunda y tercera generación. Los combustibles de primera generación, son aquellos que se producen a partir de azúcares, granos y semillas y requieren un procesamiento relativamente simple para la obtención del producto final. El bioetanol por ejemplo, se produce a partir de la fermentación de azúcares extraídos de cultivos almidonados como el maíz. No obstante, el uso de tierras para la producción de cultivos energéticos destinados a la obtención de combustibles entra en conflicto con la producción de alimentos, generando preocupaciones y cuestionamientos a nivel mundial sobre seguridad alimentaria.

Los combustibles líquidos de segunda generación, se producen a partir de biomasa lignocelulósica, proveniente de residuos agroindustriales y forestales. Esta biomasa, constituida por las partes no comestibles de las plantas, se puede considerar como una materia prima de bajo costo. La característica principal de estos combustibles es que se

encuentran fuera de la competencia entre alimentos y combustibles por tierras fértiles. A pesar del potencial de los combustibles de segunda generación con respecto a los precios, los beneficios sociales y ambientales y la eficiencia energética, es necesario realizar investigación que permita lograr avances tecnológicos para disminuir los costos de transformación, el aumento de la producción y posibilitar el escalado de los procesos.

Los combustibles de tercera generación son aquellos que se obtienen a partir de microorganismos, que incluyen principalmente las microalgas. El principio fundamental de este tipo de combustibles, es la bioacumulación de ácidos grasos y su posterior transesterificación para la obtención de biodiesel. Los lípidos de estos microorganismos son similares a los aceites vegetales y contienen ácido palmítico, linoleico, esteárico, oleico y un 64% de ácidos grasos insaturados.

Figura 1.5. Clasificación de los biocombustibles según su fuente. Nigam & Singh (2011)



El mercado de los biocombustibles se encuentra en plena expansión y crecimiento junto con las proyecciones para el sector de transporte a nivel mundial. En 2007, se estimaba la existencia de 806 millones de vehículos, con una proyección a 2030 de más de 1,3 billones

de vehículos. Este crecimiento, aunado a las preocupaciones medio ambientales asociadas directamente a la demanda de combustibles acelera el mercado de los biocombustibles. La producción mundial de bioetanol, se estimaba en 2004 en 72 billones de litros, 8 años después, se estimó en 90 billones de litros (Wang & Sun, 2012). El 60% del etanol producido a nivel mundial proviene de cultivos de caña (Demirbas, 2009). Por otra parte, menos del 0,2% del diesel usado para el transporte corresponde al biodiesel. Una de las principales limitaciones para la implementación de mezclas de diesel/biodiesel es el costo del biocombustible. El costo de los biocombustibles varía dependiendo de la materia prima utilizada, la región, los procesos de conversión y el escalado. La producción de etanol, por ejemplo, es hoy en día más costosa que la producción de gasolina, especialmente cuando se produce a partir de maíz, que es la fuente principal en Estados Unidos, o de remolacha como se hace en Europa. Por su parte, la producción de bioetanol en Brasil a partir de caña, es competitiva con respecto a la gasolina (Demirbas, 2009). Este ejemplo, refleja las necesidades investigativas y tecnológicas en el área de los biocombustibles y las energías renovables en general.

A gran escala, el costo de producción de bioproductos es hoy en día elevado. La producción de biocombustibles por ejemplo, es aproximadamente tres veces más costosa que los combustibles derivados del petróleo, dejando a un lado los beneficios medioambientales no cuantificables. Las ventajas económicas de la industria de biocombustibles podría incluir el incremento en la generación de empleos rurales, en los ingresos económicos de las economías locales y regionales, inversiones tecnológicas e investigativas, disminución en las emisiones de gases contaminantes, disminución en la dependencia de los países importadores de crudo y generación de oportunidades de mercado.

Hoy en día, el proceso de conversión de celulosa a etanol es económicamente inviable. No obstante, se están desarrollando programas especiales en diferentes países, enfocados a la producción de biocombustibles y no solo de bioetanol, sino también biogás, biodiesel y celdas combustibles a partir de recursos renovables. La producción global de bioetanol se incrementó desde 17,25 billones de litros en el año 2000 hasta superar los 46 billones de litros en 2007, representando alrededor de un 4% de los 1300 billones de litros de gasolina

consumidos a nivel mundial. Se prevé que con la implementación de los programas de biocombustibles en América, Asia y Europa, la demanda de etanol podría exceder los 125 billones de litros para 2020. A esta demanda se han sumado compañías como POET (inicialmente conocida como Broin) y Abengoa, la cuales construyen refinerías capaces de procesar la biomasa y transformarla en etanol, mientras que otras compañías como Genencor, Diversa, Novozymes y Dyadic, están produciendo enzimas que permitan, en un futuro, la obtención de etanol celulósico. En general, se están creando plantas industriales alrededor del mundo para suplir la demanda actual y proyectada (Menon & Rao, 2012).

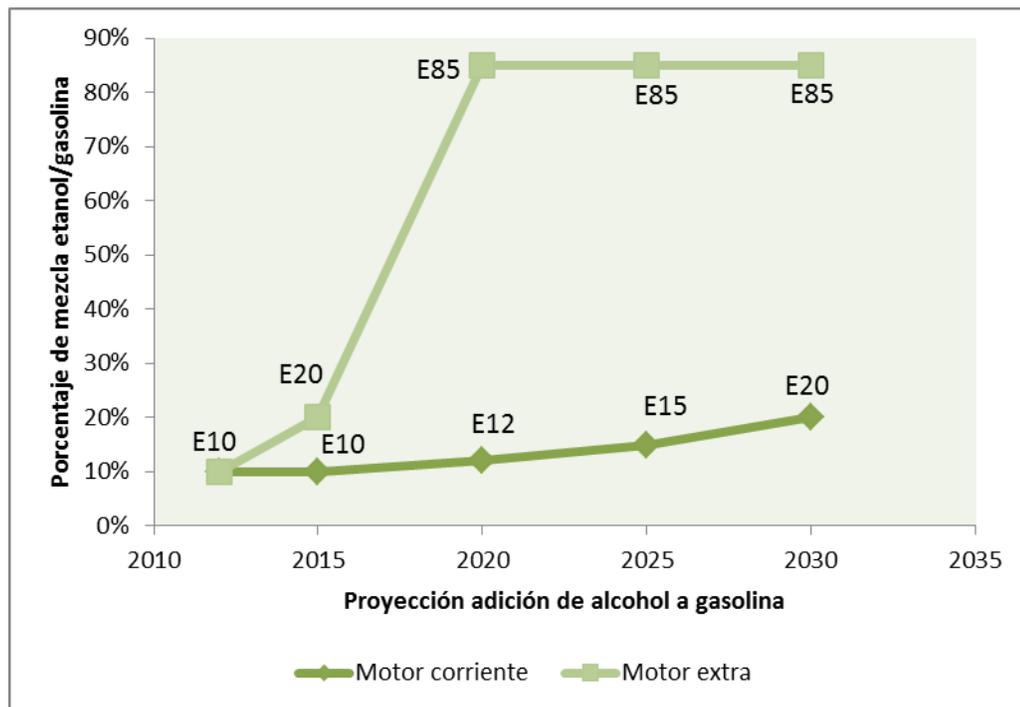
El caso colombiano, por su parte, está enfocado en la producción de aceite de palma como insumo principal para la transesterificación y producción de biodiesel y su uso en mezclas con ACPM por encima del 5% y se proyectó para 2012 en hasta un 20% (Ministerio de Minas y Energía, 2007). Durante 2012, se produjeron 973 mil toneladas de aceite de palma, equivalente a un crecimiento del 25% en los últimos 5 años, de los cuales el 45% (cerca de 450 mil toneladas) se destinaron a la producción de biodiesel. Colombia es hoy en día, uno de los cinco principales países cultivadores de palma a nivel mundial y se ha enfocado en la producción de biodiesel aprovechando los rendimientos en la producción de aceites. A pesar del potencial en la industria de palma, la presión sobre el sector debido a las regulaciones, exige mayor capacidad productiva y el incremento de las áreas cultivadas. La respuesta a este crecimiento está ligada a la generación de residuos agroindustriales, que se está convirtiendo en un eje de trabajo con respecto al manejo y disposición de estos recursos y la sostenibilidad general del proceso.

La apreciación hoy en día de los residuos agroindustriales ha cambiado, con miras al aprovechamiento absoluto de estos recursos y la mayor eficiencia energética global de los procesos. En promedio, se producen entre 190 y 250 kg de aceite por tonelada de fruto fresco de palma y entre 260 y 480 kg de residuos sólidos. El 40% de estos residuos se quema directamente para realizar cogeneración energética o el simple calentamiento. El 60% restante se utiliza principalmente para la fertilización y el abono de los campos de palma (Salomón et al., 2013). Se estima que se producen entre 120 y 260 kg de *frutos vacíos* de palma (raquis) por cada tonelada de fruto fresco de palma, los cuales hoy en día en Colombia no son usados para fines energéticos (Salomón et al., 2013) y constituyen un

gran potencial para la producción de etanol de segunda generación, a la par que se produce biodiesel a partir del aceite de palma.

Tomando en cuenta la normativa promulgada por el Ministerio de Minas y Energía que pretende obtener mezclas de alcohol y gasolina partiendo de un 10% actual en motores corrientes (E10) y motores extra (E10), hasta obtener mezclas de 20% de etanol en motores corrientes (E20) y 85% en motores extra (E85) en 2030 (Figura 1.6.), se observan grandes oportunidades de mercado para los *frutos vacíos* de palma, si se tiene en cuenta su gran potencial como recurso energético renovable.

Figura 1.65. Legislación colombiana referente a la proyección de mezclas de etanol anhidro con gasolina.



1.2. Concepto de biorrefinería

Una de las medidas que se han propuesto para la disminución del uso de combustibles fósiles y el uso óptimo de la biomasa, es la implementación de cadenas cíclicas productivas en donde a partir de la biomasa, se producen combustibles, energía,

biomateriales y productos químicos. Los sistemas tecnológicos integrados para la transformación de biomasa se agrupan en el concepto de *Biorrefinería* (Ohara, (2003):

“La biorrefinería se puede usar para producir combustibles, solventes, plástico y alimentos para los seres humanos; a partir de biomasa residual. Los principales procesos de la biorrefinería incluyen las producciones vía fermentativa de etanol y ácido láctico. Para la operación de la biorrefinería es necesario el desarrollo de muchas tecnologías híbridas de diferentes campos, como la bioingeniería, la química de polímeros, ciencias de la alimentación y la agricultura”.

El concepto de biorrefinería surge también en analogía a la refinación de petróleo. La biomasa, al igual que el petróleo, presenta una composición compleja, por lo tanto, el fraccionamiento primario es indispensable para su transformación en una amplia gama de productos. No obstante, a diferencia del petróleo, la biomasa típicamente tiene una estabilidad térmica baja y un alto grado de funcionalidad por la diversidad de productos que de ella pueden lograrse (FitzPatrick et al 2010).

En la actualidad, este concepto ha evolucionado debido a factores como el incremento del precio de los biocombustibles y la posibilidad del aprovechamiento de todas las fracciones de la biomasa, para obtener una gran diversidad de bioproductos. De esta manera, biorrefinería es un término que engloba la integración de procesos y tecnologías para el uso eficaz de las materias primas, logrando instalaciones que operan de manera sostenible con el medio ambiente (FitzPatrick et al., 2010). Las biorrefinerías, deben ser versátiles de tal forma que la producción y los cambios en ella se ajusten a las tendencias del mercado y a la fluctuación de los precios.

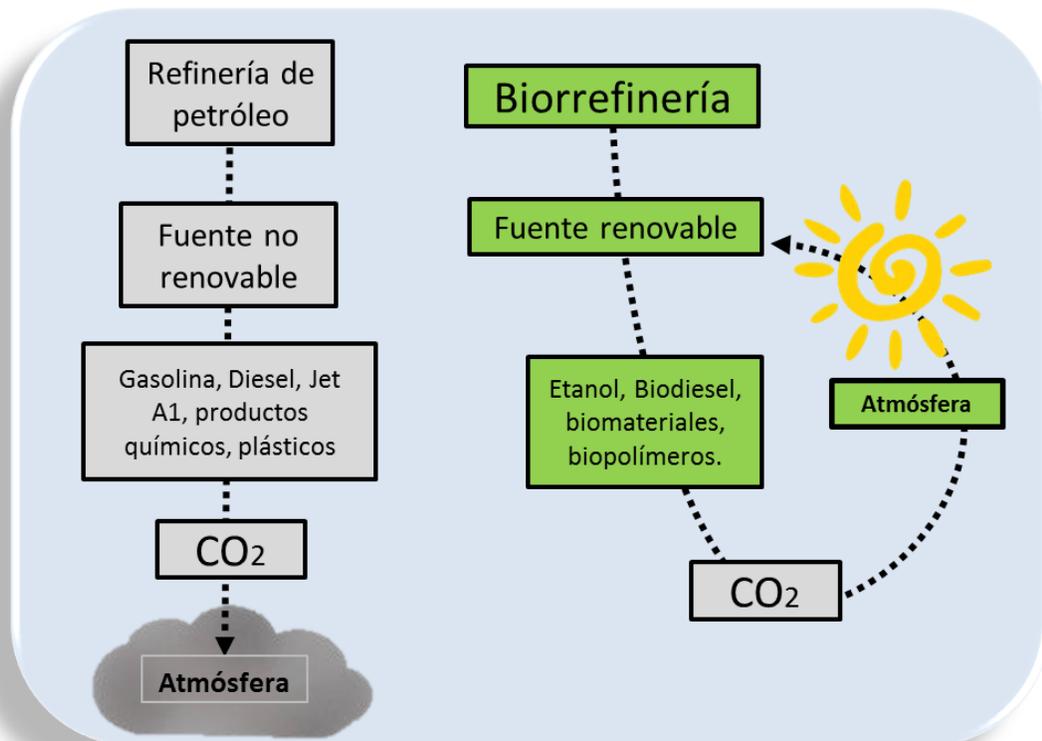
En la Figura 1.7., se presenta un cuadro comparativo entre los ciclos de CO₂ del petróleo y los biocombustibles.

Las biorrefinerías pueden clasificarse bajo diferentes enfoques. La clasificación inicial que considera la funcionalidad de los productos a obtener; algunos se orientan a la obtención de energía y a la valorización posterior de los residuos mientras que por el contrario, otros

buscan la obtención de productos de alto valor agregado y la valorización posterior de los residuos con fines energéticos.

El segundo enfoque las clasifica como biorrefinerías fase I, II y III. Las biorrefinerías de fase I y II son aquellas cuya materia prima está conformada por granos como el maíz y el trigo o fuentes directas de azúcares fermentables como la caña de azúcar. Las biorrefinerías de fase I han sido diseñadas para procesar cantidades fijas de materia prima y productos finales, mientras que las de fase II se caracterizan por tener flexibilidad en su procesamiento. Las biorrefinerías de fase III, por su parte, utilizan tecnologías mixtas, que permiten el uso de diferentes materias primas que incluyen tanto granos como material lignocelulósico, permitiendo producir por ejemplo, materiales con alto valor agregado en bajas cantidades, mientras se producen altas cantidades de etanol (Luo et al, 2010).

Figura 1.76. Comparación de los ciclos de producción y uso de combustibles derivados del petróleo (izquierda) y derivados de fuentes renovables (derecha). Tomada de Alonso et al (2010)



La utilización de cultivos almidonados, (Biorrefinerías fase I y fase II) como materias primas es una opción costosa y de baja competitividad (FitzPatrick et al., 2010). De esta manera, se están incrementando los esfuerzos de investigación y técnicos enfocados al aprovechamiento de biomasa lignocelulósica proveniente de residuos forestales y agroindustriales, debido a que son materias primas de bajo costo, alta disponibilidad y provenientes de fuentes renovables.

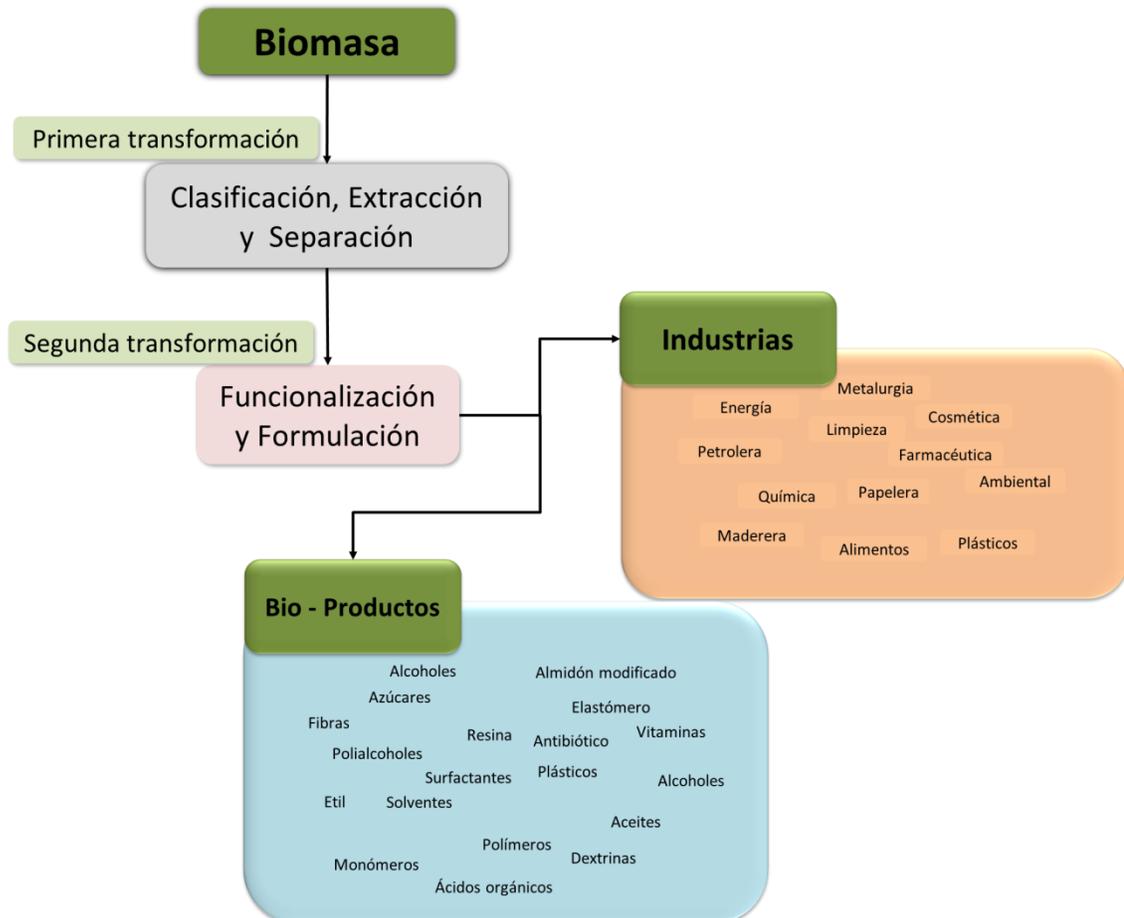
En general, las materias primas para las biorrefinerías provienen de cuatro sectores diferentes: a) la agricultura, que provee cultivos y residuos, b) residuos forestales, c) residuos industriales y desechos urbanos y finalmente, d) la biomasa proveniente de algas y microalgas. Estas materias primas se agrupan en tres diferentes categorías que representan los compuestos activos a obtener: carbohidratos y lignina, triglicéridos y residuos orgánicos mixtos (Cherubini, 2010).

El esquema global de una biorrefinería se presenta en la Figura 1.8. Inicialmente se hace la recepción de la biomasa en donde se selecciona y se extraen los diferentes componentes de interés, como carbohidratos, lignina y triglicéridos, de tal forma que su tratamiento posterior sea menos complejo. Posteriormente, se aplican tecnologías para el fraccionamiento, el craqueo biológico o diferentes tratamientos fisicoquímicos. Este tratamiento se realiza con el fin de liberar las moléculas que van a ser funcionalizadas. Estos compuestos actúan como intermediarios para el desarrollo de una amplia gama de biomateriales con alto valor agregado que pueden ser usados en rutas biosintéticas y como sustitutos de moléculas derivadas del petróleo (Octave & Thomas, 2009).

Los componentes esenciales de la biomasa, y por tanto la materia prima para las biorrefinerías, son los azúcares. Éstos se organizan en dos grupos principales. El primer grupo lo constituyen los azúcares que se consideran metabolitos de reserva y se les llama también (en concordancia con los biocombustibles) de primera generación. Son compuestos de fácil acceso producidos principalmente por la industria alimenticia, entre los que se incluyen jarabes azucarados, bebidas fermentadas, entre otros. El segundo grupo lo conforman azúcares de estructura más compleja y cuyo acceso es complicado. Estos compuestos se encuentran en las partes estructurales de las plantas y se les conoce como

materiales lignocelulósicos. Los materiales lignocelulósicos representan la parte más abundante de la biomasa y corresponden a cerca de un 70% de su constitución, con un aporte de polisacáridos de aproximadamente un 75%. Se les considera además un subproducto abundante y de bajo costo, así como una materia prima promisoriosa para la producción de biocombustibles y la generación de energía.

Figura 1.8. Esquema general de una biorrefinería donde la biomasa es transformada en diversos productos con valor agregado (Octave & Thomas (2009)).



El conflicto que generan los biocombustibles de primera generación – al igual que las biorrefinerías asociadas a éstos, debido a la inconveniencia de destinar los cultivos

comestibles para la producción de combustibles y al encarecimiento de los alimentos - genera interés por el desarrollo de tecnologías y procesos eficientes para el tratamiento de los materiales lignocelulósicos y la operación de biorrefinerías asociadas a ellos.

1.3. Uso de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol

De la misma forma que las refinerías de petróleo separan el crudo en fracciones para la obtención de diferentes productos químicos y combustibles, el reto de las biorrefinerías, que eventualmente las hará económicamente viables, será enfocarse en los materiales lignocelulósicos y en los procesos de fraccionamiento para la obtención de sus unidades estructurales.

Los materiales lignocelulósicos se consideran productos renovables, abundantes y de bajo costo y su atractivo principal es el potencial en la producción de bioetanol como combustible, a partir de la ruptura de las barreras poliméricas naturales y la exposición de los azúcares fermentables. Se estima que anualmente se producen alrededor de 10^{10} toneladas métricas de biomasa lignocelulósica a nivel mundial (Deswal et al 2014). Los materiales lignocelulósicos se clasifican, según su procedencia, en cuatro grupos: los residuos forestales, los residuos sólidos urbanos, los residuos de papel y los residuos procedentes de cultivos (Xu et al 2009; Balat, 2011).

1.3.1. Estructura de los materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos, se conforman principalmente de tres fracciones poliméricas, la celulosa, hemicelulosa y la lignina, las cuales se encuentran asociadas entre sí a través de enlaces covalentes (Hendriks & Zeeman, 2009; Feng et al., 2011). La celulosa y la hemicelulosa conforman las dos terceras partes de la biomasa lignocelulósica y se consideran las principales fuentes de azúcares fermentables para la producción de biocombustibles de segunda generación, especialmente el etanol (Bhalla et al 2013). En general se estima que la celulosa conforma entre un 40 a 50% de la biomasa

lignocelulósica, seguida de la hemicelulosa que aporta entre un 25 a un 35% y finalmente la lignina cuya proporción se encuentra entre un 15 a un 20% (Alonso et al., 2010).

1.3.1.1 Celulosa

La celulosa es el mayor componente en la biomasa y consiste en un polímero lineal conformado por unidades monoméricas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4. La orientación espacial de los enlaces y la formación de puentes de hidrógeno hace que el polímero sea rígido y se organice en microfibras las cuales son difíciles de romper.

1.3.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa, es un carbohidrato de estructura compleja conformado por diferentes cadenas poliméricas ramificadas (heteropolisacárido) que contienen pentosas como xilosa y arabinosa, hexosas como manosa, glucosa y galactosa y azúcares ácidos. La hemicelulosa es más fácilmente hidrolizable debido a su naturaleza amorfa y altamente ramificada.

1.3.1.3 Lignina

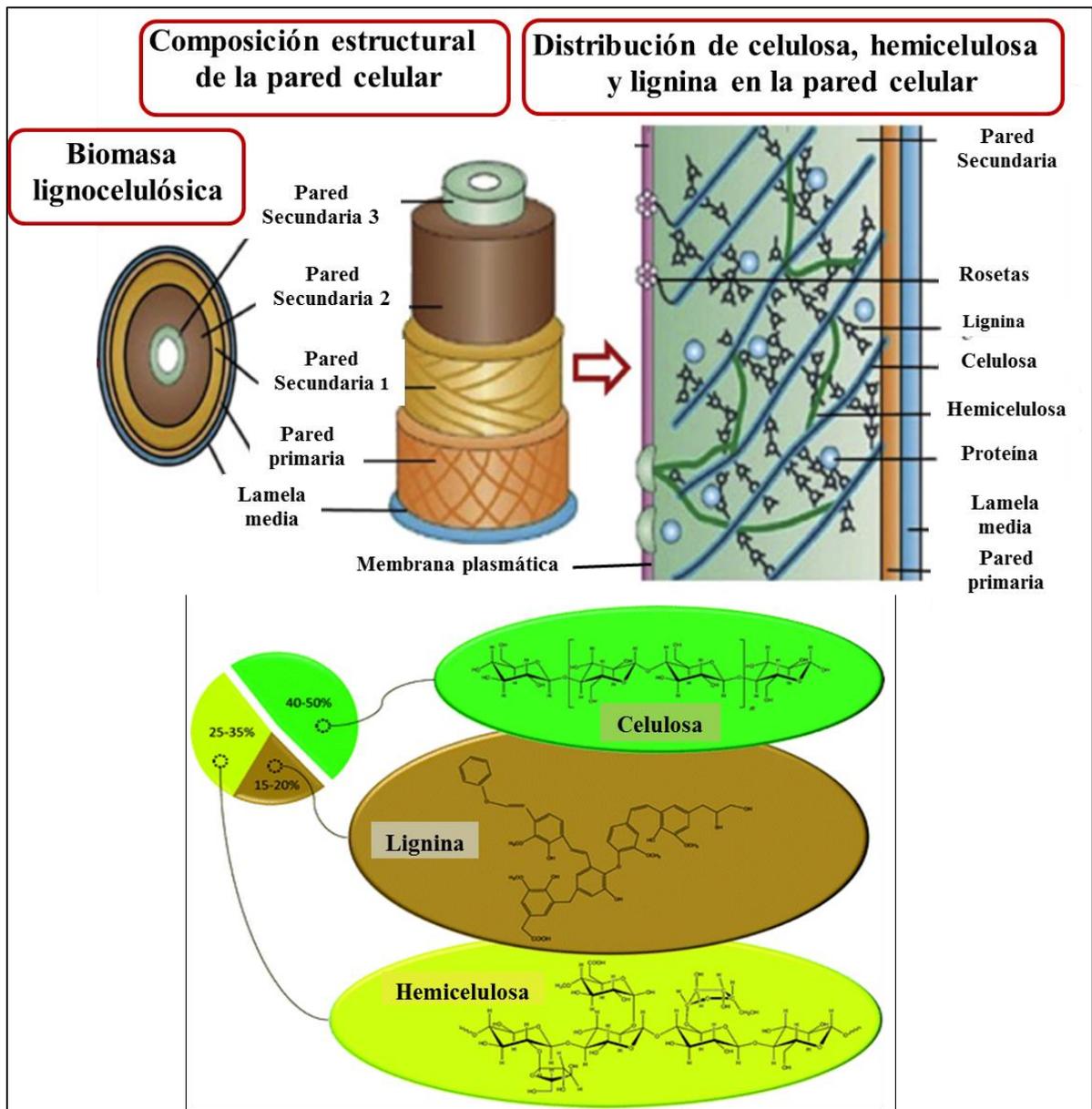
La lignina es, después de la celulosa y la hemicelulosa, uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza y está presente en la pared celular. Consiste en un heteropolímero amorfo conformado por la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropiónicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico). La lignina se sintetiza a partir de estos compuestos y su composición y estructura varía según cada planta, tejidos y capas en la pared celular. La matriz lignolítica contiene una gran variedad de grupos funcionales, como hidroxilos, metoxilos y carbonilos. La función principal de la lignina es dar soporte estructural a las plantas, impermeabilizar y ofrecer resistencia contra el estrés oxidativo y los ataques microbianos.

Los heteropolímeros amorfos son insolubles y ópticamente inactivos, por lo que su degradación es muy compleja. La lignina se encuentra unida a la hemicelulosa a través de enlaces covalentes y sus cadenas poliméricas envuelven la celulosa en la pared celular. Estas estructuras complejas inhiben la degradación de los compuestos lignocelulósicos y de esta manera los procesos de compostaje en la naturaleza son lentos.

La lignina se agrupa en dos categorías. En la primera categoría se ubican la maderas suaves o coníferas, cuyo contenido de lignina (en base seca) es de 20 a 40%. La segunda categoría, agrupa las llamadas maderas duras o frondosas, que contienen entre un 10 y 40% en peso de lignina. Normalmente, las maderas suaves contienen más lignina que las duras.

En la Figura 1.9. se presenta un esquema de la distribución de los componentes estructurales en la pared celular.

Figura 1.97. Esquema de distribución estructural típico de los materiales lignocelulósicos. Tomada de Menon & Rao (2012) y Alonso et al. (2010)



En general, las paredes celulares de las plantas se subdividen en pared primaria y secundaria (Figura 1.9.). La distribución de la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, varía considerablemente entre estas capas. La pared secundaria, se divide en subcapas secundarias (1, 2 y 3) en donde la segunda subcapa es normalmente la más gruesa y contiene la mayor cantidad de celulosa.

En la Tabla 1.1. se presenta un resumen de los compuestos lignocelulósicos más comunes y sus fracciones medias de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Tabla 1.4. Composiciones medias de celulosa, hemicelulosa y lignina de diferentes materiales lignocelulósicos. Menon & Rao (2012). ** Moya & Torres (2012)

Material lignocelulósico	Composición de carbohidratos (%peso seco)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Racimo de frutos vacíos de palma de aceite**	55,5	20	18,2
Cáscara de cebada	34	36	19
Paja de cebada	36 - 43	24 - 33	6,3 - 9,8
Bambú	49 - 50	18 - 20	23
Desechos del banano	13	15	14
Tusa de maíz	32,3 - 45,6	39,8	6,7 - 13,9
Rastrojo de maíz	35,1 - 39,5	20,7 - 24,6	11 - 19,1
Algodón	85 - 95	5,0 - 15	0
Tallo del algodón	31	11	30
Pulpa de café	33,7 - 36,9	44,2 - 47,5	15,6 - 19,1
Pino de Oregón	35 - 48	20 - 22	15 - 21
Eucalipto	45 - 51	11,0 - 18	29
Tallo de madera dura	40 - 55	24 - 40	18 - 25
Paja de arroz	29,2 - 34,7	23 - 25,9	17 - 19
Cáscara de arroz	28,7 - 35,6	11,96 - 29,3	15,4 - 20
Paja de trigo	35 - 39	22 - 30	12,0 - 16
Salvado de trigo	10,5 - 14,8	35,5 - 39,2	8,3 - 12,5
Pasto	25 - 40	25 - 50	10,0 - 30
Periódico	40 - 55	24 - 39	18 - 30
Bagazo de caña	25 - 45	28 - 32	15 - 25
Copa de la caña	35	32	14
Pino	42 - 49	13 - 25	23 - 29
Álamo	45 - 51	25 - 28	10,0 - 21
Biomasa de olivo	25,2	15,8	19,1

Material lignocelulósico	Composición de carbohidratos (%peso seco)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Fibras yute	45 - 53	18 - 21	21 - 26
Pasto	35 - 40	25 - 30	15 - 20
Centeno	29 - 30	22 - 26	16,1
Canola	27,3	20,5	14,2
Tallo de madera suave	45 - 50	24 - 40	18 - 25
Paja de avena	31 - 35	20 - 26	10,0 - 15
Cáscaras de nuez	25 - 30	22 - 28	30 - 40
Paja de sorgo	32 - 35	24 - 27	15 - 21
Polvo de <i>kernel</i> de tamarindo	10,0 - 15	55 - 65	-
Buchón o Jacinto de agua	18,2 - 22,1	48,7 - 50,1	3,5 - 5,4

1.3.2 Pretratamientos

La biomasa lignocelulósica debe ser tratada y fraccionada en sus constituyentes principales para ser procesada de manera eficiente. Este proceso es complejo y genera altos costos al utilizar los compuestos lignocelulósicos como materia prima. Alonso et al., (2010) estimó que el costo de producir etanol celulósico (segunda generación) es dos veces mayor que el que se produce a partir de azúcares de primera generación, como los que provienen del maíz, y atribuyó el componente mayor de estos costos a la complejidad del proceso de aislamiento de los azúcares presentes en la biomasa lignocelulósica. La mayor parte de los sustratos celulósicos se encuentran altamente lignificados, por lo tanto, la mayoría de la celulosa en la naturaleza es inadecuada para la producción de biocombustibles, por lo menos hasta que se desarrollen pretratamientos económicamente competitivos y efectivos para la remoción de la lignina.

De esta forma, una de las funciones principales en los pretratamientos de materiales lignocelulósicos, es despolimerizar las barreras de lignina de tal forma que sea posible acceder a los carbohidratos fermentables en la biomasa. El paso siguiente, es la extracción de la hemicelulosa, lo que hace que el proceso de recuperación de glucosa celulósica sea más efectivo (Menon & Rao, 2012); por último, debe realizarse la hidrólisis de la celulosa, que se considera una de las mayores limitantes en este proceso.

En general, y tal como se ha descrito previamente, los materiales lignocelulósicos son altamente recalcitrantes a la degradación microbiana o al estrés climático, debido no solo a la presencia de lignina, sino a otras variables como el grado de cristalinidad, el grado de polimerización de los polisacáridos, el área superficial expuesta y el contenido de humedad. Para representar la facilidad o complejidad en la degradación de los compuestos lignocelulósicos, se ha definido el *índice de recalcitrancia* (IR) como la relación entre el peso de carbón remanente y la masa total inicial de carbón. Cuanto más alto es su valor, mayor será la dificultad para su degradación. De este modo, las maderas suaves presentan índices de 0,87, mientras que las maderas duras presentan índices más bajos de recalcitrancia (0,56). Por su parte, los residuos agroforestales presentan valores más bajos de 0,25 y 0,45.

Para determinar la efectividad de un pretratamiento se deben considerar los siguientes aspectos para la efectividad del proceso: conservación de las fracciones de hemicelulosa, aumento del área superficial, control y limitación de la formación de inhibidores debido a la degradación de materiales, recuperación de subproductos de alto valor agregado (lignina y proteínas), tratamiento de residuos y efluentes, minimización de la demanda energética y viabilidad económica (Menon & Rao, 2012).

Los pretratamientos pueden ser físicos, químicos, físico-químicos, biológicos o combinaciones sinérgicas de estos. Según su severidad, los pretratamientos permiten la remoción parcial o selectiva de la lignina, incluso logran la extracción de parte de la hemicelulosa.

A continuación se presentan algunas características de los pretratamientos.

Físicos: Los pretratamientos físicos se aplican para aumentar el área superficial fraccionando el material, disminuir la cristalinidad y el grado de polimerización del material lignocelulósico. Los tratamientos físicos incluyen la molienda, la irradiación, aplicación de vapor, temperatura y presión. La extrusión es un tratamiento termo-físico en el que se combinan los efectos del calentamiento y la cizalladura, alterando la estructura física y química del material. La extrusión presenta varias ventajas, entre ellas bajo tiempo de residencia, temperatura de tambor moderada, alta cizalladura, mezcla rápida, no se

forman compuestos inhibitorios como el furfural y el HMF, posibilidad de funcionamiento en continuo y no se producen efluentes (Haghighi Mood et al., 2013). Estos tratamientos mecánicos incrementan los rendimientos de la hidrólisis entre un 5 y un 25%, mientras que reducen el tiempo de digestión entre un 23 y 59% (Hendriks & Zeeman, 2009). El incremento en la temperatura permite solubilizar, inicialmente la hemicelulosa y posteriormente la lignina.

Químicos: Inicialmente, los pretratamientos químicos fueron desarrollados para la deslignificación de materiales celulósicos en la producción de papel de alta calidad. Los pretratamientos químicos de manera general presentan un alto grado de selectividad en cuanto a la remoción de los compuestos. Sin embargo, se requieren etapas de tratamiento de efluentes y acondicionamiento de la biomasa pretratada, para evitar problemas posteriores en las etapas de digestión y fermentación. En los pretratamientos químicos se incluyen los procesos de ozonólisis, ácidos diluidos o concentrados, alcalinos, oxidativos con H_2O_2 y *organosolv* (disolvente orgánico o sistema acuoso-orgánico mezclado con un catalizador inorgánico).

Físico-químicos: Estos pretratamientos se utilizan en condiciones químicas suaves, pero con condiciones operacionales fuertes a temperaturas y presiones elevadas, lo cual genera costos operacionales altos. En los pretratamientos fisicoquímicos se incluye la aplicación de agua líquida caliente (LHW, hidrotermólisis), explosión con vapor con adición o no de productos químicos, explosión de fibras con amonio (AFEX), explosión con CO_2 .

Biológicos: Los pretratamientos biológicos se basan en la capacidad que tienen algunos microorganismos para degradar la lignina. Los microorganismos más usados son los hongos denominados de la pudrición blanca, debido a su capacidad para producir enzimas ligninolíticas. La degradación de lignina por este método es un proceso complejo en el que influyen muchos factores, entre ellos las condiciones de cultivo, el mecanismo específico de cada cepa fúngica y la secreción de las enzimas. (Hendriks & Zeeman, 2009). En comparación a los pretratamientos termoquímicos, los pretratamientos biológicos incluyen técnicas sencillas, bajos requerimientos energéticos, poca o ninguna producción de

corrientes residuales y efluentes tóxicos y no generan inhibidores de los procesos fermentativos. Sin embargo, la remoción de la lignina por parte de los hongos requiere de tiempos de residencia altos y puede perderse una fracción significativa de la holocelulosa. En este sentido, se hace necesaria la búsqueda de microorganismos que sean lo más selectivos posibles en la remoción de la lignina (Wan & Li, 2012).

Haghighi Mood et al., (2013), presentó el comportamiento de los tratamientos más comunes sobre la biomasa lignocelulósica e identificó las siguientes cinco variables sobre las que deben incidir los pretratamientos: el incremento en el área superficial, la disminución en la cristalinidad de la celulosa, la solubilización y remoción de la hemicelulosa, la remoción de lignina y la formación de compuestos inhibidores. Además, presentó las desventajas de cada pretratamiento, en donde se pueden observar los puntos a mejorar y optimizar en cada proceso, con el fin de que sean competitivos, en un futuro cercano.

Tabla 1.2. Eficiencia de los diferentes pretratamientos, sobre las variables de interés en los materiales lignocelulósicos. Haghighi Mood et al., (2013)

Pretratamiento	Incremento del área superficial	De-cristalización de la celulosa	Solubilización y remoción de la hemicelulosa	Remoción de lignina	Formación de inhibidores	Desventajas
Físico	++	++	-	-	-	Alto consumo energético Problemas de corrosión, degradación de azúcares y neutralización de efluentes
Ácido	++	-	++	+	++	Tiempo de residencia alto y neutralización de efluentes
Alcalino	++	-	+	++	(+/-)	Alto costo del líquido
Líquido iónico	++	++	+	+	-	Alto costo de recuperación y reciclaje de solventes
<i>Organosolv</i>	++	ND	++	++	-	Proceso costoso, con gran demanda de ozono
Ozonólisis	++	ND	-	++	-	

Explosión de vapor	++	-	++	(+/-)	++	Formación de compuestos tóxicos, tratamiento incompleto en la ruptura de lignina
AFEX	++	++	+	++	(+/-)	Consumo de amoníaco, alta presión y baja eficiencia para altos contenidos de lignina
Explosión de CO ₂	++	-	++	-	-	Alta presión, no afecta la hemicelulosa ni la lignina
Oxidación húmeda	++	+	++	++	(+/-)	Alto costo de oxígeno y catalizador
LHW	++	ND	++	(+/-)	+	Alta temperatura y control alcalino de pH
Biológico	++	+	(+/-)	++	-	Baja tasa de hidrólisis, alta demanda de espacio y control de microorganismos

Los procesos de deslignificación constituyen un área de investigación muy activa; sin embargo, en la actualidad las tecnologías desarrolladas para los pretratamientos no se encuentran en su etapa de madurez técnica y económica, por lo que su aplicación en procesos a gran escala aun no es viable. Entre otras causas, esto se debe inicialmente a que los pretratamientos no se pueden considerar de alguna manera genéricos, puesto que tanto el material como sus características fisicoquímicas no son valores fijos, y por lo tanto la hidrólisis final de la celulosa no siempre ocurre bajo las mismas condiciones. Así, cambios operacionales en los pretratamientos, pueden incidir y tener repercusiones en las etapas posteriores del proceso, impactando la eficiencia global del mismo y, en última instancia, la economía.

1.4 Alcance del trabajo de investigación

Atendiendo a la normativa y proyección a nivel mundial y a nivel nacional, referentes a la producción de etanol y a las necesidades de formulación de proyectos de investigación relacionados con el desarrollo de metodologías para la producción de biocombustibles de segunda generación, este proyecto pretende explorar alternativas de producción de etanol a partir del uso de racimos de frutos vacíos (raquis) como sustrato. Como se ha mencionado,

el raquis es generado tras la extracción del aceite de palma, y es considerado un subproducto sin aplicación energética. Debido al avance de la industria del aceite de palma en Colombia, esta materia prima presenta una alta disponibilidad. El desarrollo de este trabajo de investigación consideró, 1) la aplicación de un pretratamiento de tipo biológico del material de raquis, mediante el uso de hongos ligninolíticos y extractos crudos de enzimas ligninolíticas, 2) la hidrólisis del material lignocelulósico con enzimas comerciales (celulasas, xylanasa y β -glucosidasa) y 3) la implementación de estrategias de fermentación de la fracción holocelulósica del raquis mediante fermentación separada y en cocultivo de las levaduras *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*. De esta manera se plantearon los siguientes objetivos:

1.4.1. Objetivo general

En general, se pretende estudiar la deslignificación del raquis procedente del proceso de extracción de aceite de palma, para la síntesis de azúcares fermentables y evaluar su potencial aplicación en la producción de etanol.

1.4.2. Objetivos específicos

1.4.2.1. Caracterizar el material lignocelulósico producido por la industria de palma aceitera en Colombia.

1.4.2.2. Evaluar la deslignificación biológica del raquis mediante el empleo de hongos ligninolíticos.

1.4.2.3. Estudiar la deslignificación del raquis empleando enzimas ligninolíticas.

1.4.2.4. Evaluar el efecto de los factores Temperatura, tiempo y concentración de NaOH sobre el Raquis crudo, a fin de recuperar la mayor cantidad posible de azúcares reductores. Optimizar la relación líquido/sólido en el proceso de digestión enzimática posterior a un pretratamiento químico con NaOH y físico de extrusión.

1.4.2.5. Estudiar la fermentación alcohólica a partir de los hidrolizados logrados de las fracciones hemi y celulósica del raquis pretratado, utilizando las levaduras *Pachysolen tannophilous*, *Pichia stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Capítulo 2



Capítulo 2

Caracterización del raquis de palma

Resumen

El raquis de palma es un subproducto lignocelulósico de la industria de extracción de aceite de palma, con potencial aplicación en la producción de azúcares fermentables. Dado su carácter recalcitrante, se hace necesario conocer previamente sus características fisicoquímicas que orienten en la identificación de las mejores condiciones de pretratamiento.

Inicialmente, en este capítulo se presenta una revisión de la literatura científica, en relación con los procesos de obtención del raquis de palma y sus aplicaciones. De igual manera, se describen algunos estudios a nivel mundial, sobre la obtención de bioproductos a partir de su procesamiento, tomando etanol como caso de estudio. Seguidamente, se describen los métodos analíticos para su caracterización química mediante el método “*Determination of*

Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” NREL, y caracterización física mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), rayos X y espectroscopía infrarroja (FTIR).

El raquis presentó una composición porcentual en peso de celulosa, hemicelulosa y lignina de $29,5 \pm 2,3$, $16,5 \pm 1,7$ y $25,7 \pm 0,5$ respectivamente. Las imágenes SEM, muestran una superficie rugosa que cubre las fibras de celulosa y gran presencia de silicatos. Mediante análisis de rayos X se encontró que el raquis tiene una cristalinidad de 29,5%. El análisis FTIR permitió identificar los grupos característicos presentes en los materiales lignocelulósicos y de manera específica las vibraciones a 2830 y 2930 cm^{-1} correspondientes a las unidades guayacilo (G) y siringilo (S) de la lignina.

2. 1. Introducción

La necesidad de reemplazar los combustibles fósiles para reducir su impacto ambiental y, debido a los problemas de seguridad alimentaria, los biocombustibles de primera generación (obtenidos de granos de maíz principalmente), han originado, desde hace más de una década, una intensa carrera por el desarrollo de tecnologías que permitan el aprovechamiento de los residuos agroindustriales en la obtención de combustibles de segunda generación. Su interés radica además, en el hecho de que son materias primas de bajo costo y de alta disponibilidad. La extracción de aceite de palma además de haberse constituido en la fuente primaria para la obtención de biodiesel, genera cantidades significativas de residuos lignocelulósicos (en millones de toneladas al año) con potencial para la producción de etanol (Hassan et al., 2010; Gutiérrez et al., 2007).

En el proceso de la extracción del aceite de palma se generan varios residuos, entre ellos el raquis de palma, el cual se considera un subproducto agroindustrial de interés, debido a su alto contenido de holocelulosa (alrededor de un 50% de su composición estructural) y a su biodisponibilidad. Colombia es uno de los cinco principales productores de aceite de palma a nivel mundial junto con Malasia, Indonesia, Tailandia y Nigeria (Fedepalma, 2013; Moya & Torres, 2012). Se ha reportado, que el raquis o fruto vacío de palma cultivado en Colombia, equivale a un 23% del peso del fruto fresco lo que en flujos anuales se traduce en alrededor de 1 millón de toneladas de residuos lignocelulósicos (Fedepalma, 2013; Moya & Torres, 2012).

2.1.1. Producción de aceite de palma

El proceso global de extracción del aceite de palma se presenta en la Figura 2.1.

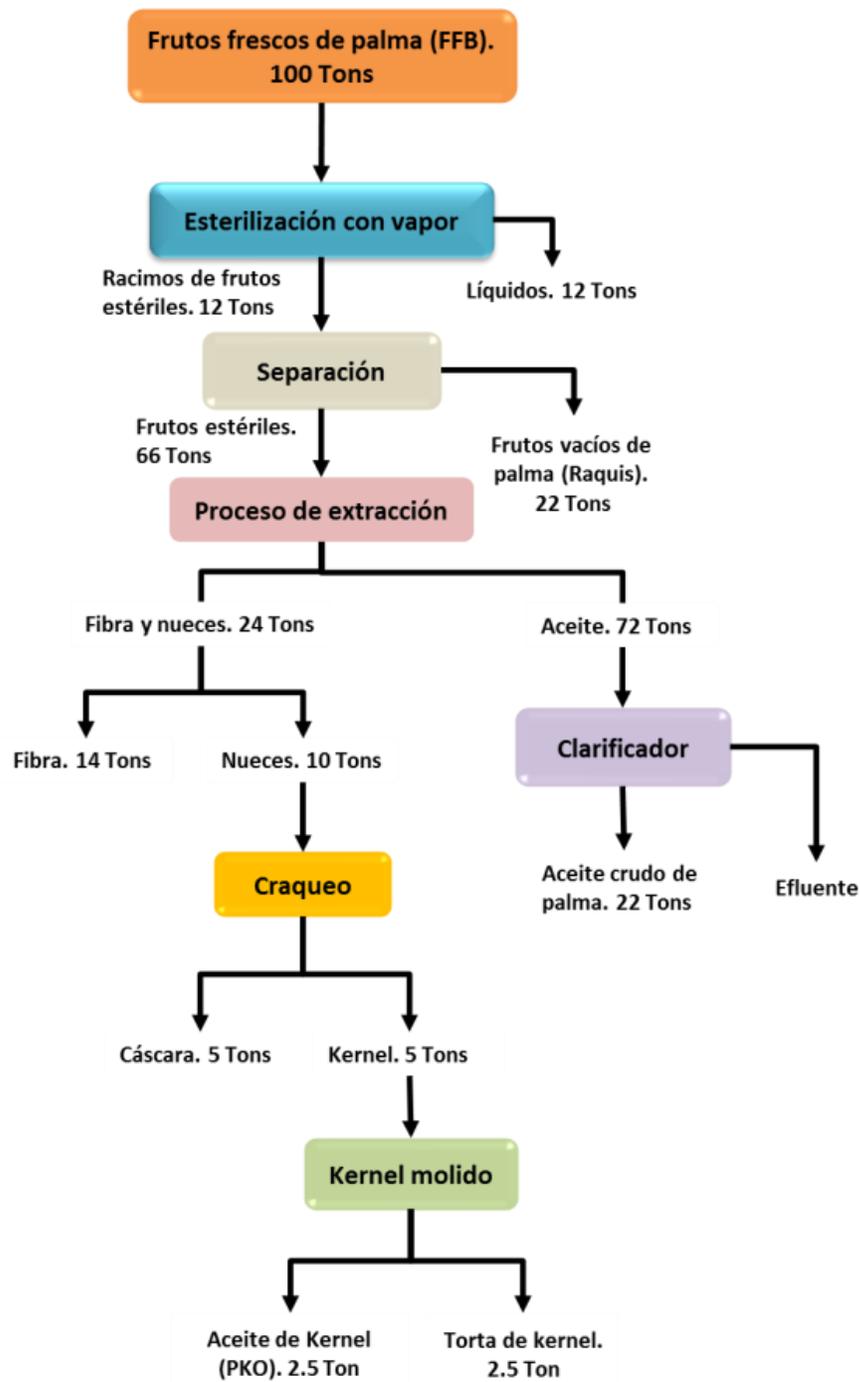
La materia prima se conoce como frutos frescos de palma. Éstos se cocinan en un esterilizador a contacto directo con vapor saturado para favorecer la remoción de los frutos y preparar la pulpa para la extracción posterior del aceite. Los frutos se remueven generalmente usando tambores rotatorios y posteriormente se llevan a tanques cilíndricos verticales agitados y a 100°C en donde se realiza la digestión. En esta etapa se lleva a cabo el proceso de macerado de los frutos y se retira la pulpa de las nueces. Los frutos macerados se envían al tornillo sin fin tipo prensa, en donde el aceite crudo se separa de la torta. El aceite se hace pasar a través de pantallas vibratorias que remueven los sólidos finos. Posteriormente, el aceite se clarifica en decantadores donde se adiciona agua a 90°C para acelerar el proceso. El decantado produce una torta mientras que el lodo que se retira por los fondos, se centrifuga para la recuperación del aceite. El aceite clarificado contiene cerca de un 1% de agua, por lo cual es deshidratado en un secador a vacío y finalmente almacenado. Por otra parte, la torta prensada se lleva a un ciclón en donde se separaran las nueces y las fibras de palma prensada (FPP). Las nueces se rompen para separar los *kernels* de las corazas de palma (PKS). Los *kernels* son molidos para extraer el aceite de *kernel* de palma (PKO) obteniéndose también una torta de *kernel* de palma (PKC) (Gutiérrez et al., 2007; Kerdsuwan et al., 2010).

2.1.2. Características de la palma de aceite

La palma de aceite (Figura 2.2.) es una planta perenne, cultivada en alrededor de 42 países y con cerca de 42 millones de acres sembrados a nivel mundial. Tiene una vida económica de 20 a 25 años y el primer cultivo comercial puede cosecharse luego de 5 o 6 años. El árbol de palma mide en promedio entre 7 y 13 m de altura y posee un diámetro de entre 45 y 65 cm. Normalmente producen entre 20 y 40 nuevas hojas y entre 8 y 12 racimos de frutos anualmente. Los racimos se desarrollan entre el tronco y la base de las hojas cada uno y pueden pesar entre 15 y 25 kg. Cada racimo de frutos lleva entre 1000 y 3000 frutos,

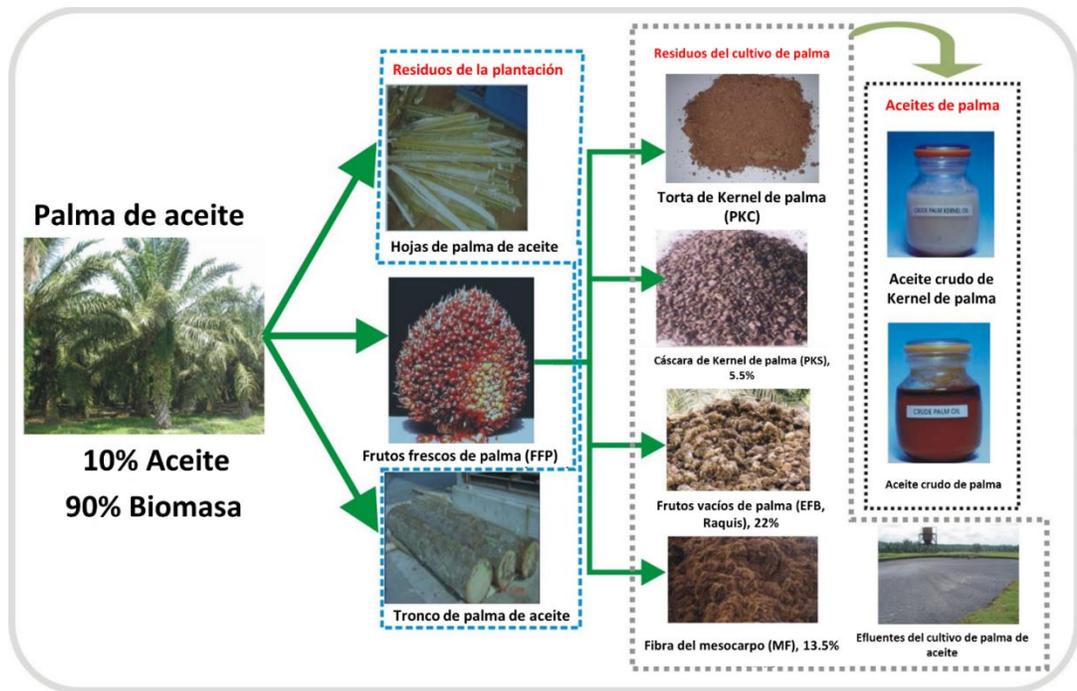
y de cada palma se obtienen alrededor de 40 kg de aceite anualmente. Los frutos son de forma esférica, de color morado oscuro a casi negro antes de la madurez y cambian a naranja y rojo en la madurez (Kerdsuwan et al., 2010; Zahari et al., 2009).

Figura 2.1. Diagrama de bloques y balance de masa de la producción de aceite palma y aceite de kernel de palma.



La industria de palma de aceite produce alrededor de un 10% de aceites y un 90% de biomasa remanente. Los productos principales de las plantaciones son las hojas de palma llamadas *fronds*, los frutos frescos de palma de donde se obtiene el aceite y los troncos de palma. De los frutos frescos se obtienen los dos tipos de aceites; aceite crudo de palma y aceite crudo de *kernel* de palma. Como subproductos y residuos se producen la torta de kernel de palma (PKC), la cáscara de *kernel* de palma (PKS), la fibra del mesocarpo, el raquis cuya producción es de 22% en promedio y los efluentes de la plantación y el proceso.

Figura 2.2. Partes de la palma de aceite. Tomada de página web http://jfe-project.blogspot.com/2010_04_01_archive.html [visitada el día 23/10/2014].



Las especies de palma de aceite *Elaeis guineensis* y *Elaeis oleifera* son originarias del oeste africano y de centro y Suramérica respectivamente (Kerdsuwan et al., 2010). En general, se cultivan en áreas tropicales principalmente en el sureste asiático y en Colombia, en alturas por debajo de los 500 msnm y a una temperatura óptima de 25°C. La palma aceitera constituye uno de los cultivos perennes más extensos en el mundo enfocado en la

producción de aceite de palma para fin alimenticio (Chang, 2014). Se han reportado altos rendimientos en la producción del aceite (4.87 t/ha.año), siendo casi 13 veces mayor que en soya, 8 veces más alto que en semillas de girasol y 6.5 más que en aceite de ricino. Con base en dichos rendimientos, en los largos tiempos de vida económica (mayor a 25 años), las políticas gubernamentales y las ayudas económicas para la producción sostenible, se ha incrementado la producción de cultivos a nivel mundial. En Malasia por ejemplo, la producción de aceite de palma pasó de 6 millones de toneladas en 1990 a 18.8 millones en 2012 (Chang, 2014). Colombia por su parte, pasó de 0.7 millones de toneladas en 2008 a cerca de 1 millón de toneladas a finales de 2012 (Fedepalma, 2013).

2.1.3. Características de los frutos vacíos de palma de aceite (raquis)

Luego de la cosecha, el aceite es retirado de los frutos frescos, generando el raquis. Este subproducto se utiliza típicamente en la combustión directa y en el compostaje. El raquis es un racimo seco, de color café, forma aleatoria, baja densidad y un peso aproximado de 3.5 kg. Su ancho y longitud depende del tamaño del fruto fresco y puede variar de 17-30 cm de largo y 25-35 cm de ancho (Kerdsuwan et al., 2010; Chang, 2014).

Las aplicaciones básicas del raquis son su utilización en propósitos no energéticos y en propósitos energéticos. Cuando se habla de propósitos no energéticos del raquis, su enfoque principal se da en el uso como materia orgánica. El raquis contiene una variedad de nutrientes, que incluyen: fósforo (P), potasio (K), magnesio (Mg), nitrógeno (N), entre otros. El raquis también se emplea como sustrato para la producción de champiñones y como suplemento en la producción de fertilizantes para las plantaciones de aceite palma. Debido a la presencia de fibras y a la compatibilidad del raquis con otras maderas, éste puede emplearse también en pulpa de papel y tableros de fibra. Por otra parte, la aplicación energética típica del raquis es la producción de pellets para la combustión directa, no obstante preocupa el hecho de que el raquis tiene un contenido alto de humedad (>60%) y

de cenizas, que implica un bajo poder calorífico y alta emisión de humo blanco (Chang, 2014; Kerdsuwan et al., 2010).

La fibra y el raquis son materiales de naturaleza lignocelulósica y, tanto por su composición química como por sus propiedades físicas, han sido objeto de estudio para diversas aplicaciones. En la Tabla 2.1 se presentan algunas aplicaciones reportadas en la literatura.

Tabla 2.1. Diferentes aplicaciones del raquis de palma

Estudio	Observaciones	Referencia
Utilización de fibra y raquis de palma para el cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	Ambos materiales suplementados con afrecho de arroz y cal para favorecer la fructificación del hongo, constituyéndose como sustratos potenciales para el cultivo del <i>Pleurotus ostreatus</i> .	Nafissa et al., (2008)
Incorporación de raquis en materiales poliméricos	Se recomienda el uso de fibras de raquis para su incorporación como material de refuerzo, tanto en polímeros sintéticos como biodegradables. Se resalta la gran variación de las propiedades de la fibra dependiendo de factores como edad de la planta, la calidad de los suelos y las zonas geográfica del cultivo.	Hassan et al., (2010)
Evaluación de fibras de raquis como aislante eléctrico	Se evaluó la mezcla hasta un 1%, de fibras de raquis con caucho de silicona, para su uso como recubrimiento de cables de transmisión a alta tensión. Se encontró que estas fibras logran mejorar las características del material.	Ahmad et al., (2012)
Briquetas de fibras de raquis	Elaboración de briquetas de mezcla de fibras de raquis con cuesco. Debido a su poder calorífico (17000-18000 kJ/Kg), se estima que las briquetas pueden tener un valor comercial similar al del carbón.	Bakar, (2010)
Gasificación de raquis en reactor de	En este estudio se encontró que el raquis tiene un potencial de generación de energía de 5,5 MJ/Nm ³	Lahijani, Najafpour, Alimuddin Zainal, &

lecho fluidizado	Sin embargo el proceso presenta problemas de aglomeración del material entre los 800°C y 850°C	Mohammadi, (2011)
Glicerólisis de fibras de raquis	A través de un proceso de extracción en fase acuosa con glicerol, se logró fraccionar el raquis en sus componentes principales: lignina, celulosa y hemicelulosa. El pretratamiento previo del material con hidróxido de sodio y ácido acético, cambia las relaciones de los componentes recuperados. El aumento en el tiempo de glicerólisis afecta la cantidad de lignina <i>Klason</i> que se puede extraer.	Ibrahim, (2012)
Producción de bio-aceite de raquis vía pirólisis	Se determinó que las condiciones óptimas para el proceso de pirólisis fueron a 500°C/250 µm/3 horas. El líquido logrado tiene un poder calorífico de 21.62 MJ/kg y no se puede considerar un combustible de baja calidad, se sugiere usarlo en combinación con otros combustibles	Azizan et al., (2012)
Extracción de taninos	Se logran porcentajes hasta de un 4.54% de taninos al extraerse en acetona al 75%. Las pruebas analíticas corroboran la naturaleza de estos compuestos; sin embargo, en el proceso se arrastran gran cantidad de subproductos, lo que sugiere la necesidad de mejorar el proceso	Ibrahim, Nadiah, & Amirue, (2005)
Evaluación de fibras residuales de palma para la industria del papel	Se reporta que las fibras de raquis tienen propiedades que las hacen adecuadas para su incorporación como pulpa para la elaboración de papel. Sin embargo, es necesario optimizar condiciones del proceso para hacerlo técnica y económicamente viable; la eliminación de la sílice de este material es uno de los pasos limitantes del proceso	Rosli, Daud, & Law, (2011)

Al igual que otros compuestos lignocelulósicos, el raquis se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina. De los tres componentes, la lignina posee la estructura más compleja, que la hace resistente a los ataques químicos y microbianos (Geng, 2011). Su composición se estima generalmente en 40-50% de celulosa, 20-30% de hemicelulosa, 20-30% de lignina y una mezcla de otros componentes alrededor de 10-15%. Los componentes que están en menor proporción son pectinas, hierro, calcio, magnesio, potasio, sodio y silicatos. Estos últimos pueden encontrarse entre un 5-6% (Hassan et al., 2010).

Debido a que la mayor parte de este material lo constituye la holocelulosa, se han llevado a cabo diferentes estudios enfocados a la recuperación de estos azúcares para su aplicación en procesos fermentativos para la obtención de etanol. La mayoría de los estudios con raquis de palma se han realizado para el caso de Malasia cuya representación mundial es de alrededor del 40%. Sin embargo, en Colombia, dada la disponibilidad y aumento de los cultivos en las últimas décadas, también está siendo objeto de estudio (Moya & Torres, 2012; Piarpuzán et al., 2011; Piñeros-castro & Velásquez-lozano, 2014; Salomón, Gomez, & Martin, 2013).

2.1.4. Alcance

El objetivo de este trabajo fue caracterizar fisicoquímicamente el material lignocelulósico con el fin de determinar su contenido de lignina, hemicelulosa y celulosa, y algunas propiedades que le permitan explicar su comportamiento en los procesos de digestión enzimática para la recuperación de azúcares fermentables.

Tabla 2.2. Estudios sobre el aprovechamiento de la fracción holocelulósica presente en el raquis

Estudio	Resultados	Referencia
Optimización de hidrólisis ácida de raquis para la producción de xilosa	Las condiciones óptimas logradas para la recuperación de xilosa fueron 119°C/60 min/2% H ₂ SO ₄ . La máxima concentración de xilosa lograda fue de 30.81 g/L, la cual representa un	Rahman, (2007)

Estudio	Resultados	Referencia
Eficiencia de la producción de etanol a partir de raquis, en un reactor piloto	91.27% de selectividad. A través de un análisis de superficie de respuesta se estableció que las condiciones óptimas que favorecieron la máxima recuperación de glucosa en la digestión enzimática (89.61%), luego del pretratamiento, fueron 127.64 °C/, 22.08 min/ 2.89 mol L ⁻¹ . En esta condición y aplicando posteriormente un sistema fermentativo SSF se alcanzaron concentraciones de etanol hasta de 48.54 g/L (60 horas de fermentación)	Minhee, H. et al., (2011)
Evaluación de diferentes pretratamientos sobre el raquis de palma, para mejorar la digestibilidad y la producción de etanol	Se evaluó el pretratamiento con oxígeno presurizado (catalizado con hierro, impregnado con NaOH y en presencia de H ₂ O ₂) y NaHSO ₃ mezclado con H ₂ SO ₄ . El pretratamiento bajo con 8% NaHSO ₃ + 1% H ₂ SO ₄ /180°C/30 min, permite lograr las mayores recuperaciones de celulosa rindiendo en la digestión hasta 0.318 g glucosa/ g raquis en 72 horas de digestión. En un proceso cuasi- SSF se alcanzaron 52 g etanol/L, luego de 160h de proceso.	Tan et al., (2012)
Aumento de la digestibilidad del raquis por pretratamiento con líquido iónico	Se evaluaron 4 líquidos iónicos, de los cuales el [Emim]OAc (acetato de 3-metil imidazol) a 110°C/2h, permitió una remoción de lignina de 52.6%, reducción en la cristalinidad de la celulosa y de crecimiento del grado de polimerización. Bajo esta condición se alcanza una digestibilidad del 96.6% del material	Katinonkul et al., (2012)
Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de butanol e hidrógeno	El pretratamiento del raquis se hizo suavizando el material con NaOH al 2% durante 4h y autoclavado luego a 121°C/ 5min, luego lavado y neutralizado. La sacarificación se hizo con	Ibrahim, M. et al., 2015)

Estudio	Resultados	Referencia
combustibles	Celluclast 1.5L y simultáneamente se fermentó con <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824. Bajo estas condiciones se lograron 4.45 g/L de butanol y 2.75 g/L de acetona-etanol y se acumularon 282.42 mL de hidrógeno, luego de 96 horas de fermentación.	

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Adecuación del raquis de palma

Los racimos de frutos vacíos o raquis fueron suministrados por CENIPALMA, procedentes de la planta extractora de aceite de palma, ubicada en Barrancabermeja (Santander, Colombia). El material de raquis se partió en trozos de entre 15 – 20 cm, usando para ello una sierra manual, posteriormente se secó en un secador de túnel a 80°C/24h. El material seco se llevó a un molino de martillos y luego se tamizó para obtener retenidos de tres tamaños de malla, N°20, N°35 y N°80. Los análisis de composición se realizaron usando el material retenido en la malla 35. Para el estudio se utilizaron tanto las fibras logradas luego de la molienda de adecuación como las logradas luego de ser sometidas adicionalmente a un proceso de extrusión.

La extrusión se hizo con un molino manual de hierro con capa de estaño (Corona). Para este propósito, el material se sumergió en agua caliente (90°C) durante 1 hora, posteriormente se alimentó a una tolva y en forma manual se giró el tornillo sin fin, para de esta manera desplazar el material, por intermedio de un disco, al exterior. La presión al paso por el tornillo y al llegar al disco, permitió la apertura de las fibras.

2.2.2. Caracterización química

La composición química del material se determinó mediante el protocolo “*Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*” adaptado del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL por sus siglas en Inglés) (Sluiter et al., 2011). Aproximadamente 300 mg (P) del material exento de humedad se pusieron en contacto con 3 ml de H₂SO₄ (72%)/30°C/1h, y se transfirieron a un matraz de 100 ml utilizando 84 ml de agua. El matraz se selló con un tapón de caucho reforzado con teflón y se autoclavó a 121°C durante 1h, se dejó enfriar en desecador y se pesó (P0). Posteriormente, se filtró al vacío a través de membrana de polivinilideno (Durapore 25 mm, 5 µm) previamente pesada, exenta de humedad y puesta en un crisol perforado (PCM). El filtrado se recogió en su totalidad y se registró el volumen en L(V). Con el propósito retener el sólido en la membrana, se hicieron dos lavados con 85 ml de agua destilada cada una. El crisol que contenía la membrana y el sólido se secó en estufa a 105°C hasta lograr un peso constante (P1); posteriormente se llevó a una mufla y se calcinó durante 2h, se dejó enfriar y se pesó (P2). El filtrado recogido se neutralizó con NaOH y se midieron la concentración, en g/L, de azúcares reductores totales (ART método del DNS (Miller, 1959)) y de glucosa (Kit Glucosa Oxidasa GOD-PAP/*Trinder, Spinreact*) La composición del material de raquis se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Celulosa} = 0,9 * \frac{\text{Glucosa} * V}{P} * 100 \text{ (eq. 1)}$$

$$\% \text{ Hemicelulosa} = 0,88 * \left(\frac{\text{ART} - \text{Glucosa}}{P} \right) * V * 100 \text{ (eq. 2)}$$

$$\% \text{ Cenizas} = \left(\frac{P2 - PCM}{P} \right) * 100 \text{ (eq. 3)}$$

$$\% \text{ Lignina Klason o insoluble} = \left(\frac{P1 - PCM}{P} \right) * 100 \text{ (eq. 4)}$$

Donde: V corresponde al volumen de filtrado, P corresponde al peso del material exento de humedad, ART son los azúcares reductores totales, P1 equivale al peso del crisol con la membrana y el material seco, P2 corresponde al peso del material calcinado y PCM corresponde a la muestra filtrada y puesta en el crisol.

Los ensayos de caracterización se realizaron en dos lotes de material, denominados L1 y L2. Adicionalmente, el lote 2 se sometió a un proceso de extrusión indicado en el numeral 2.2.1, con el propósito de exponer las fibras del raquis para el posterior proceso de digestión enzimática.

2.2.3. Caracterización estructural del raquis de palma.

Los análisis de caracterización estructural tuvieron como propósito establecer un patrón de comparación que permitiera identificar cambios físicos (morfología) y de su constitución química funcional, tanto en el material crudo como en el resultante luego de los pretratamientos biológico y químico.

2.2.3.1. Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (SEM) se estudió la superficie del material con el fin de establecer los cambios en morfología estructural debidos al efecto de cada pretratamiento. Los ensayos se desarrollaron en un equipo EVO LS 15 Zeiss. En zonas específicas del material se hicieron análisis de espectroscopía de energía dispersiva (EDS por sus siglas en inglés), para identificar la composición elemental de las áreas de interés.

2.2.3.2. Análisis de difracción de rayos X. (Cristalinidad)

El análisis de difracción de rayos X permitió determinar la cristalinidad del material. Para ello se usó un difractómetro Empyrean. Los difractogramas de rayos X se tomaron desde 10 a 80°, a un ángulo 2θ y una velocidad de barrido de 5°/min (Bak et al., 2009).

2.2.3.3. Análisis de Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis infrarrojo del raquis de palma se llevó a cabo con un espectrómetro NEXUS 670 (Thermo Nicolet Corporation, Madison, WI).

2.2.4. Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre los lotes de material usados en este estudio (L1 y L2) y diferencias significativas en las composiciones del material evaluado con respecto al material reportado en estudios previos, se realizó un análisis estadístico a través de la identificación de valores atípicos, empleando el software *Statgraphics Centurion XVI*, considerando un nivel de confianza del 95%.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Características y composición química.

La Figura 2.3 presenta fotografías en las diferentes etapas de adecuación del raquis: a) troceado, b) secado y c) molienda. Las imágenes d) y e) presentan la apariencia física de las fibras molidas y tras un proceso de extrusión (numeral 2.2.1). Las fibras del raquis extruído presentan apariencia de aglomeración, aunque en su manipulación se apreció su fácil disgregación, de igual manera mediante la extrusión se logra un tamaño menor lo cual

incrementa su área superficial. Finalmente, en la Figura 2.3. (f) se muestra el efecto de la adición de ácido sulfúrico, durante el proceso de separación de la lignina ácida para la determinación de la composición química.

En la Tabla 2.3 se presentan los valores de las composiciones logradas para el raquis de palma en este estudio, además de algunas reportadas por otros investigadores. A pesar de las aparentes variaciones en estas composiciones, el análisis de valores atípicos mostró que el raquis utilizado y obtenido de plantaciones colombianas, en composición, es comparable con las reportadas a nivel mundial. Así, el conjunto de datos evaluados se ajusta a una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%, teniendo valores atípicos carentes de significancia estadística, según las pruebas de Dixon, Grubb y Shapiro-Wilk.

Figura 2.3. Adecuación del raquis y apariencia física molido, extraído y con hidrólisis ácida

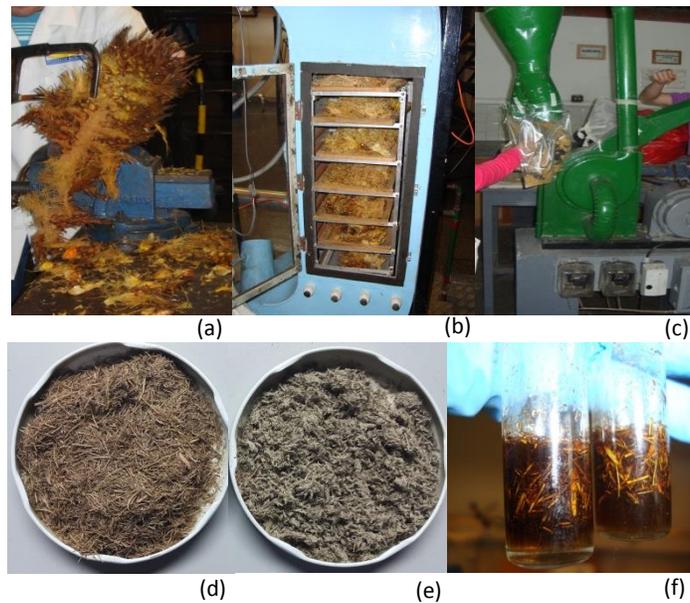


Tabla 2.3. Caracterización química del raquis de palma. Muestra cruda y extruida

Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Referencia
29,5 ± 2,3	16,5 ± 1,7	25,7 ± 0,5	L1 * (este estudio)
26,7 ± 3,9	16,9 ± 3,5	23,1 ± 1,1	L1 extruido (este estudio)
33,6 ± 0,7	23,7 ± 0,4	26,9 ± 0,3	L2 extruido (este estudio)
36,8	19,3	17,9	Tan et al., (2012)
33,0	23,4	21,1	Katinonkulet al., (2012)
42,85	24,01	11,70	Rahman, (2007)
32,74	21,42	23,55	Minhee Hanet al., (n.d.)
33,0	23,4	21,1	Katinonkul et al., (2012)

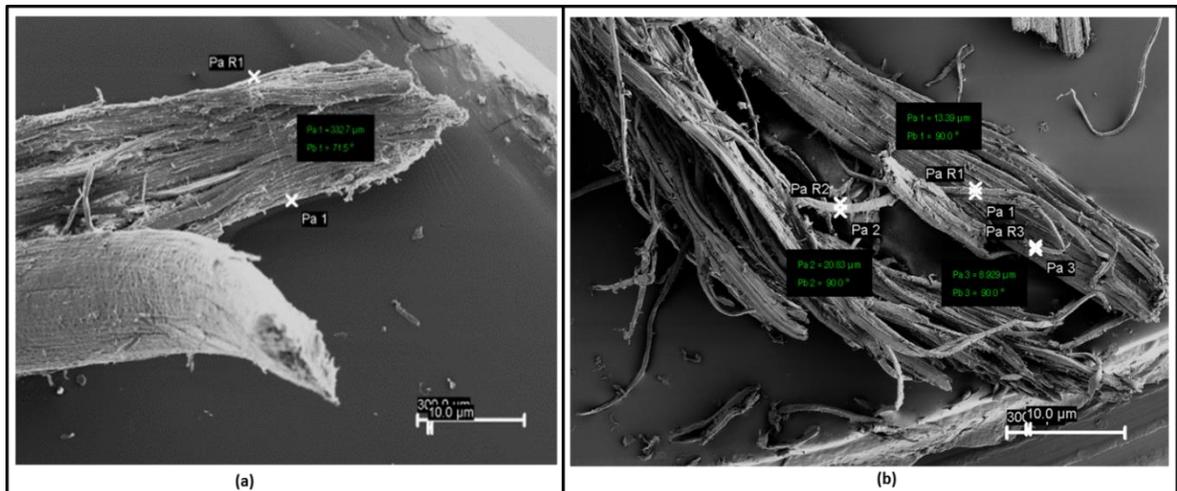
* La composición del lote 1 L1 corresponde en el estudio a RC: Raquis crudo

Adicionalmente, al considerar la composición del raquis y el rendimiento estequiométrico teórico, podrían obtenerse 190,4 mg de etanol/g raquis. Este rendimiento es comparable al que se obtiene con otros materiales de naturaleza lignocelulósica como la paja de arroz, la paja de trigo y el bagazo de caña, con los cuales se pueden obtener 198,3, 209,1 y 227,8 mg de etanol/g sustrato, respectivamente (Sathesh-Prabu & Murugesan, 2011, Salvachúa et al., 2011, Olofsson et al., 2008). Estos valores se presentan como estadísticamente similares a través de una prueba de normalidad para una distribución de valores con un 95% de confianza, obteniéndose un $p > 0,05$. Por lo tanto, el raquis de palma puede considerarse como una fuente potencial de azúcares para la producción de etanol.

2.3.2. Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Caracterización superficial. En la Figura 2.4. (a) se muestra una fibra de raquis, cuyo diámetro aproximado es de 3327 μm . En su extremo terminal se observa la presencia de microfibras. Al ser sometida a un proceso de extrusión la fibra se abre y es posible visualizar sus microfibras internas, cuyos diámetros oscilan entre 9 y 20 μm (Figura 2.3. (b)). La acción mecánica que experimenta la fibra expone su interior, aumentando su área superficial, y eventualmente favoreciendo los procesos de digestibilidad enzimática.

Figura 2.4. Dimensiones de la fibra de raquis intacta (a) y extruida (b).



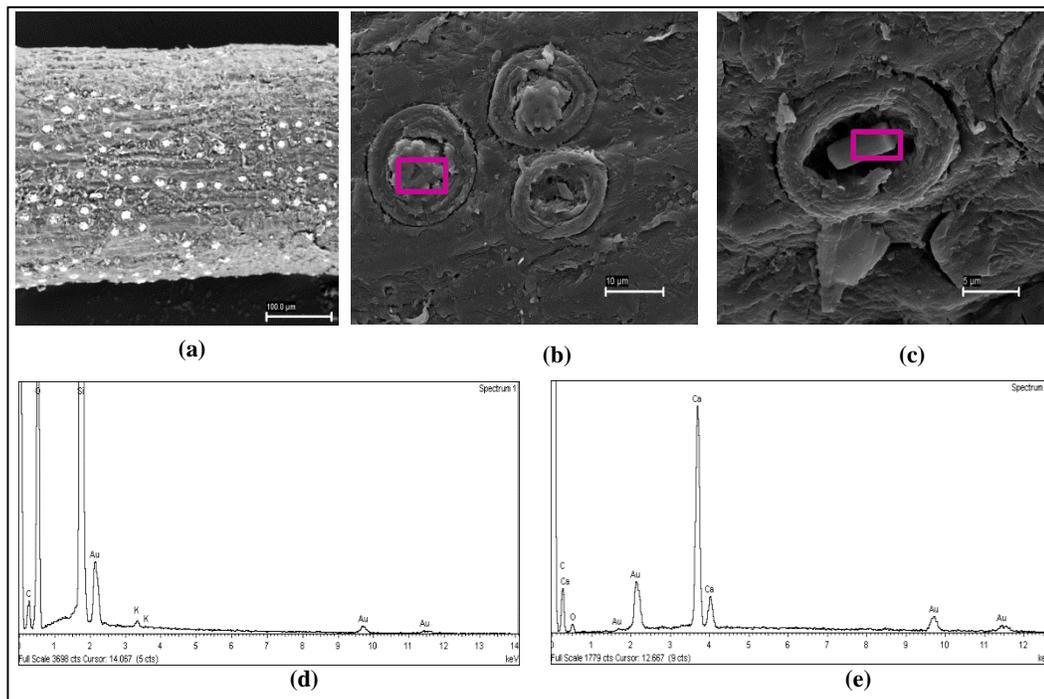
En la Figura 2.5. (a) se observa la superficie de la fibra de raquis con zonas rugosas y la presencia de estructuras cristalinas. Una observación más detallada de las estructuras cristalinas inmersas en las fibras del raquis puede verse en las Figuras 2.4. (b) y (e). El análisis EDS de estas secciones (Figuras 2.4. (c) y (f)) permite identificar que se trata de cristales que contienen Si (correspondientes a la sílice amorfa hidratada $\text{SiO}_n\text{H}_2\text{O}$) y Ca, respectivamente. El sílice se encuentra comúnmente en los tejidos vegetales como una incrustación o impregnación en la pared celular y provienen de la absorción del suelo a través de las raíces (Sandoval Z., 2005). Katinonkul et al., (2012) & Hassan et al., (2012) reportaron la presencia de silicatos en material de raquis y su participación en la fibra como una eventual barrera que dificulta la exposición de la fracción holocelulósica a la actividad

enzimática. El calcio es un catión divalente también reportado por Ghazali et al., (2009) y Law, (2007), junto con la presencia de manganeso, hierro y sodio en raquis de palma.

2.3.3. Análisis de difracción de rayos X. (Cristalinidad)

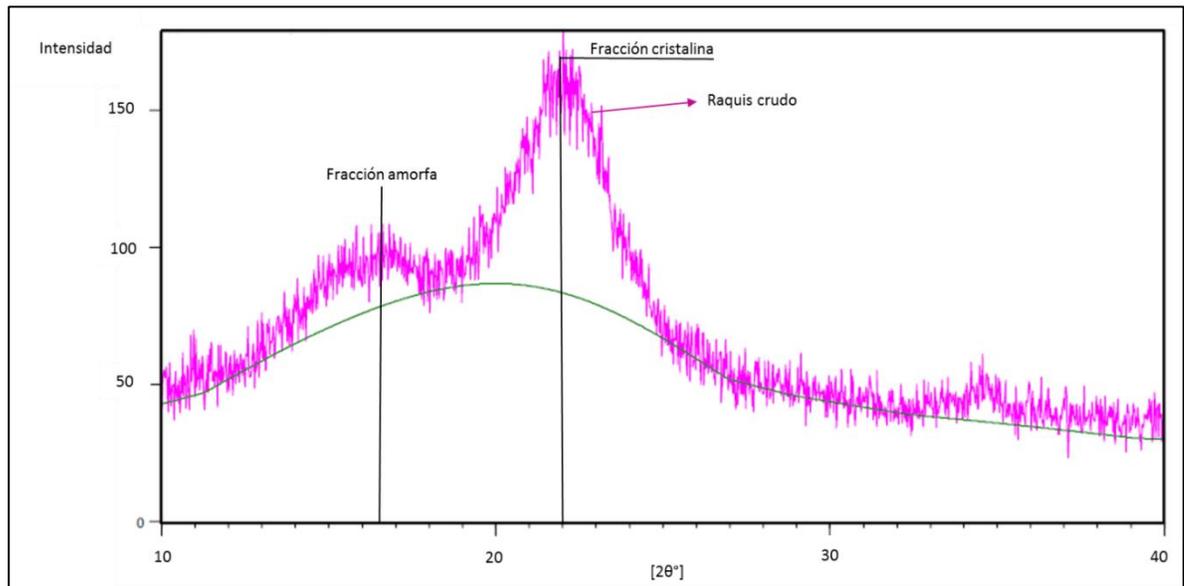
El análisis del difractograma para el raquis de palma (Figura 2.6.), muestra dos zonas, una de ellas a un ángulo 2θ de 16,5 y la otra a un 2θ de 22,0 característica de las zonas amorfas y cristalinas, respectivamente. En este tipo de materiales las zonas amorfas están asociadas a la hemicelulosa y la lignina, y las regiones cristalinas a la celulosa (Bak et al., 2009). La cristalinidad del raquis, de acuerdo con el difractograma, es de 29,5%. De acuerdo a la composición presentada en el numeral 2.3.1 para la celulosa ($33,6\pm 0,7$) se sugiere que aproximadamente un 4,1% de la celulosa total es amorfa y por lo tanto, más accesible a la digestión enzimática.

Figura 2. 5. Observaciones de las características estructurales de la superficie del raquis. El raquis crudo (a), acercamiento a las estructuras cristalinas del raquis (b) y (c) y sus respectivos análisis espectrales (d) y (e).

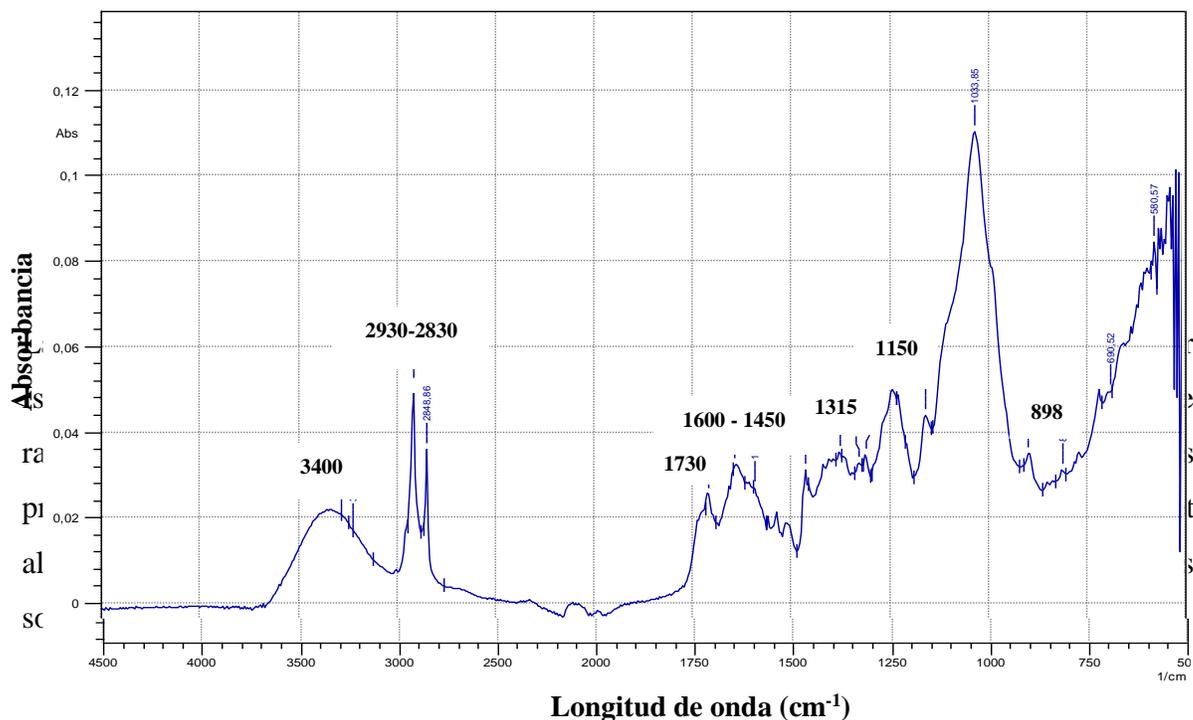


2.3.4. Análisis de Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 2.7. (a) se presenta el espectro de infrarrojo obtenido a partir de los análisis de raquis de palma. El espectro IR, muestra las cuatro regiones principales en las que vibran los enlaces estructurales de un material lignocelulósico. En la primera región se encuentra una banda que rodea los 3400 cm^{-1} correspondiente a la extensión de los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) y que están presentes en los monosacáridos que componen la fracción holocelulósica y la unidad fenilpropano de la lignina. La segunda región entre 2830 y 2930 cm^{-1} corresponde a la vibración de los enlaces metilo y metileno ($-\text{C}-\text{H}$ y $-\text{C}=\text{H}$), presentes en los carbohidratos y las unidades guayacilo (G) y siringilo (S) de la lignina. La tercera región está ubicada entre 1600 y 1450 cm^{-1} donde se manifiesta la extensión de enlaces $-\text{C}=\text{C}-$ conjugados y no conjugados del anillo aromático de la unidad fenilpropano de la lignina; la cuarta región son las bandas en 1730 , 1150 y 893 cm^{-1} las cuales corresponden a la vibración y flexión de los grupos carbonilo ($-\text{C}=\text{O}$) de los ácidos carboxílicos formados por la hidrólisis de los grupos acetilo de la hemicelulosa, la vibración asimétrica del enlace $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ característico de los carbohidratos de la celulosa y la hemicelulosa; el último, hace referencia a la vibración del enlace $-\text{C}-\text{H}$ fuera del plano característicos del anillo β -piranoso de la glucosa. Las bandas alrededor de 1045 , 1022 cm^{-1} y de $3000-3700\text{ cm}^{-1}$ se encuentran asociadas a las regiones cristalinas y amorfas del raquis (Anderson et al., 2012; Xu et al., 2013).

Figura 2.6. Difractograma del raquis crudo.

(Nieves et al., 2011) reportaron espectros FTIR para raquis crudo; al comparar con los resultado de este estudio se observaron los picos característicos tanto para el raquis de palma en general como para la biomasa lignocelulósica. En su estudio, Nieves et al. (2011) encontraron un valor de índice de cristalinidad de 0,81 al relacionar las absorbancias a 1430 (celulosa cristalina I) 898 (celulosa cristalina II); en este estudio, esa misma relación presentó un valor de 1,0; lo cual muestra que el raquis usado en este estudio presentó un mayor índice de cristalinidad.

Figura 2.7. Espectro infrarrojo del raquis crudo de palma evaluado en este estudio

2.4. Conclusiones

El raquis de palma es un material lignocelulósico que está siendo explorado a nivel mundial en diferentes aplicaciones. Una de estas aplicaciones es su uso como fuente de azúcares en fermentaciones etanólicas, lo cual implica el pretratamiento para la remoción de lignina, principalmente por medio de tratamientos alcalinos con NaOH.

La caracterización química del raquis evidencia que posee una buena fracción de holocelulosa (46%), lo cual indica un potencial aprovechable de 0,510 g AR/ g raquis. Considerando la producción anual de este material en Colombia, se podrían obtener 620000 Ton/año de AR, viables de ser utilizadas para la producción de etanol.

La extrusión del raquis de palma, según lo evidenció el SEM, es un procedimiento que permite abrir las fibras de raquis, lo cual las hace más disponibles en los posteriores procesos de digestión enzimática

Capítulo 3



Capítulo 3

Pretratamiento biológico de raquis de palma de aceite para la obtención de azúcares fermentables

Resumen

El raquis o racimos vacíos de palma de aceite es una biomasa lignocelulósica considerada como una fuente potencial de azúcares fermentables. En este capítulo se evaluó la remoción de la lignina presente en el raquis, a través del pretratamiento biológico, utilizando hongos de la pudrición blanca previo a la hidrólisis enzimática. El raquis se trató durante 21 días empleando cinco cepas de hongos lignolíticos: *Bjerkandera* sp R1 (BKA), *Irpex lacteus* (IL), *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Lentinus tigrinus* (LT) y *Pleurotus eryngii* (PE). El hongo *Pleurotus eryngii* (PE) mostró los mejores resultados, logrando remover el 35,7% de la lignina, equivalente a una selectividad de 77,45 g de lignina/g de celulosa removidos durante el biopretratmeinto, e incrementando la digestibilidad de la celulosa en un 5%, pasando del 17 al 22%. Tras monitorizar durante 40 días la fermentación en estado sólido usando *P. eryngii*, se estableció que la deslignificación del raquis fue el resultado de la acción sinérgica de las enzimas lignolíticas lacasa (Lac) y manganeso peroxidasa (MnP), presentándose la mayor remoción de lignina cuando la actividad lacasa era mayor. El mayor incremento en la digestibilidad del material (43% en celulosa y 16,8% en hemicelulosa) se observó tras 30 días del biopretratamiento. Estos valores representan el 32,5% de los azúcares recuperables.

3.1. Introducción

Los compuestos lignocelulósicos se componen de matrices poliméricas complejas que proveen rigidez y protección a la planta, contra el estrés climático y el ataque microbiano. El proceso natural de descomposición de los mismos ofrece una amplia gama de microorganismos los cuales han desarrollado la habilidad de degradar y utilizar biomasa como sustrato. En general, los sistemas de pretratamiento que utilizan microorganismos lignolíticos se han aplicado en la degradación de contaminantes industriales, incluidos los colorantes, en el incremento de la digestibilidad y el valor nutritivo de los alimentos animales, la bioconversión de lignina en compuestos orgánicos útiles y con valor agregado, y en el incremento de la fermentabilidad de los residuos lignocelulósicos (Arora, Chander, & Gill, 2002).

De este consorcio microbiano, un pequeño grupo de hongos filamentosos ha evolucionado para degradar específicamente la lignina, considerada como el material más difícil de degradar debido a que su estructura polimérica tridimensional la hace altamente recalcitrante (Dias et al., 2010; Sánchez, 2009). De hecho, los basidiomicetos de la pudrición blanca son las únicas especies conocidas con la capacidad de mineralizar la lignina hasta CO_2 y H_2O (Hakala et al., 2005).

En general, una de las mayores limitaciones en el aprovechamiento de los materiales lignocelulósicos para producir combustibles líquidos (etanol principalmente) es el carácter recalcitrante de las matrices lignolíticas. La solución técnica que se ha propuesto es el pretratamiento de la biomasa, el cual remueve las barreras naturales y facilita la aplicación de la hidrólisis enzimática. La destrucción de la lignina mejora el acceso a la celulosa por parte de la enzima celulasa, incrementando de este modo la producción de azúcares fermentables durante la hidrólisis enzimática (Bak et al., 2009; Balat, 2011). El

pretratamiento de la biomasa es el proceso clave en la producción de azúcares fermentables y de no ser efectivo, el residuo obtenido sería difícilmente fermentable lo que incrementaría los costos de operación.

Tal como se ha mencionado, los pretratamientos aplicados a la biomasa pueden ser fisicoquímicos y/o biológicos. Los pretratamientos biológicos (*in vivo* con hongos e *in vitro* con extractos crudos de enzimas) ofrecen ventajas medioambientales como la baja demanda química y energética del proceso, mientras que los pretratamientos químicos y fisicoquímicos requieren lavados continuos, uso de equipos resistentes a la corrosión, tratamiento de efluentes y, en general, riesgos medioambientales. No obstante, la desventaja asociada a los pretratamientos biológicos es el tiempo necesario para lograr una digestibilidad adecuada, el cual puede durar entre 15 y 50 días, dependiendo de las especies utilizadas y la naturaleza del material. Otra desventaja es la pérdida significativa de la fracción holocelulósica debida a la no especificidad de algunas especies (Binod et al., 2010; Singh et al., 2011; Wan & Li, 2012).

El pretratamiento biológico basado en el uso de hongos de la pudrición blanca, es un proceso altamente oxidativo que puede involucrar la presencia del oxígeno molecular y radicales hidroxilos. Se ha identificado la ocurrencia de reacciones oxidativas, de desmetilación, oxidación de cadenas secundarias y rupturas de cadenas propílicas secundarias (Wan & Li, 2012). Adicionalmente, el micelio de los hongos puede ejercer un efecto mecánico sobre el material, el cual incrementa el tamaño de los poros y de esta forma facilita el acceso a la celulosa (Sánchez, 2009).

Con respecto al pretratamiento fúngico, se han reportado una gran cantidad de estudios, usando diferentes especies (Tabla 3.1.) (Arora et al., 2002; Lopez et al., 2007; López-Abelairas et al., 2013; Salvachúa et al., 2011). Uno de los hongos más estudiados es *Phanerochaete chrysosporium*, el cual ha sido cultivado en madera, paja de trigo, tallos de algodón, entre otros materiales lignocelulósicos. Además, se han evaluado otras especies como *Pleurotus*, *Trametes*, *Bjerkandera* o *Fusarium*, para el pretratamiento de diferentes

materiales como paja de arroz, paja de trigo y rastrojos de maíz (Salvachúa et al., 2011; Xiros & Christakopoulos, 2009).

Tabla 3.5. Evaluación del proceso de deslignificación de diferentes sustratos, usando diferentes cepas y las enzimas detectadas durante el pretratamiento (Sánchez, 2009)

Hongo	Grupo	Tipo de hongo de la pudrición	Sustratos	Enzimas
<i>Strobilurus ohshimae</i>	Basidiomiceto	Blanca	Cedro japonés.	LiP, MnP
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Basidiomiceto	Blanca	Semillas de uva, cebada y viruta de madera.	LiP, MnP
<i>Trametes versicolor</i>	Basidiomiceto	Blanca	Viruta de madera, tusa de maíz, paja, bagazo de caña, bemillas de uva y cebada.	Lacasa, xilanasas, MnP, celobiosa deshidrogenasa, glucosa oxidasa, glioxal oxidasa, quinona oxidoreductasa
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Basidiomiceto	Blanca	Bagazo de caña, paja de maíz.	Xilanasas, celulasas, lacasa y MnP
<i>P.ostreatus</i> , <i>P.pulmonarius</i>	Basidiomiceto	Blanca	Pulpa de café, residuos de hierba, café limpio, paja de trigo y fibra industrial de algodón.	Endoglucanasa, celobiohidrolasa, lacasa, MnP
<i>Aspergillus niger</i>	Ascomiceto	Café	Bagazo de caña.	Xilanasas, celulasas
<i>Bjerkandera adusta</i>	Basidiomiceto	Blanca	Viruta de madera, tusa de maíz, paja de trigo compostada.	LiP, MnP
<i>Clonostachys rosea</i>	Ascomiceto	Café	Hojas de clavel, hojas de plantas jóvenes (del género Aster) y lamelas de avena y maíz.	Endopoligalacturonasas, galactosidasas, endoxilanasas, celulasas, arabinofuranosidasa, acetilesterasa, xilosidasa, galactosidasa
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ascomiceto	Café	Hojas de plantas	Endopoligalacturonasas,

Hongo	Grupo	Tipo de hongo de la pudrición	Sustratos	Enzimas
<i>Fusarium merismoides</i>	Ascomiceto	Café	jóvenes (del género Aster), lamelas de avena y maíz. Hojas de plantas jóvenes (del género Aster), lamelas de avena y maíz.	galactosidasas Endo-xilanasas, celulasas, arabinofuranosidasa, acetilesterasa, xilosidasa, galactosidasa
<i>Streptomyces</i>	Actinomiceto (bacteria)	Blanca	Hojas de clavel, hojas de plantas jóvenes (del género Aster) y lamelas de avena y maíz.	Endo-xilanasas y celulasas
<i>Penicillium sp.</i>	Ascomiceto	Blanca	Hojas de clavel, hojas de plantas jóvenes (del género Aster) y lamelas de avena y maíz.	Arabinofuranosidasa, acetilesterasa, xilosidasa
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Basidiomiceto	Blanca	Pulpa de maderas suaves.	Lacasa, LiP, MnP
<i>Xylaria hypoxylon X. polymorpha</i>	Ascomiceto	Blanca	Madera.	Lacasa, endoglucanasa, glucosidasa, esterasa, xilanasas
<i>Fomitopsis palustris</i>	Basidiomiceto	Café	Celulosa microcristalina.	Celulasas (exoglucanasas, endoglucanasas, beta-glucosidasa)

No obstante el gran avance en las investigaciones, aún no se han podido establecer relaciones directas entre las especies de hongos y el nivel de degradación de los sustratos lignocelulósicos. En otras palabras, una alta remoción de lignina, no garantiza necesariamente una buena digestión del material. Por este motivo, es importante identificar el tipo de hongo que presenta alta selectividad

en la degradación de lignina y que de forma simultánea incrementa la digestibilidad de la biomasa lignocelulósica. Bajo esta premisa, se sugiere la exploración de diferentes cepas fúngicas de potencial lignolítico reconocido, para implementarlas en el pretratamiento de raquis.

3.1.1. Alcance

Este estudio, se basó en la selección de las especies biológicas más apropiadas y en el desarrollo de metodologías que permitan llevar a cabo la deslignificación biológica del raquis, y la recuperación de los azúcares fermentables, para posteriormente ser usados como sustrato en la producción de etanol celulósico.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Caracterización del material

El raquis se obtuvo de la planta de extracción de aceite de palma perteneciente a CENIPALMA, ubicada en la ciudad de Barrancabermeja, Colombia. El raquis se procesó con el fin de obtener un material con un tamaño de partícula entre 15 y 30 centímetros. Posteriormente, se lavó, se secó y se le realizó molienda y tamizado con el fin de obtener fracciones finales de entre 0,5 y 2 cm. El material se caracterizó antes y después del tratamiento utilizando los métodos basados en los protocolos del Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL por sus siglas en inglés) descritos por López-Abelairas et al., 2013.

3.2.2. Técnicas analíticas

El efecto del pretratamiento biológico sobre la superficie del material lignocelulósico empleando cepas de hongos de la pudrición blanca, se observó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), utilizando un equipo EVO LS 15 Zeiss.

La cristalinidad de la muestra se determinó mediante difracción de rayos x, usando un difractómetro Empyrean. Los difractogramas de Rayos X se tomaron desde 10° a 80° (2 θ) a una velocidad de barrido de 5°/min (Bak et al., 2009).

3.2.3. Preparación del medio de cultivo fúngico y preparación del inóculo

Las cepas de hongos de la pudrición blanca se obtuvieron de la colección de cultivos del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela (España). Se evaluaron las siguientes especies de hongos: *Bjerkandera* sp R1 (BKA), *Irpex lacteus* (IL), *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Lentinus tigrinus* (LT) y *Pleurotus eryngii* (PE).

Las cepas fueron conservadas en extracto de malta al 2% (p/v) en agar a 4°C. Para su activación, se trasladaron a cajas Petri con un contenido del 2% de medio *Kimura* (Kimura, Asada, & M, 1990) y se cultivaron durante 3 a 10 días, factor que dependía del tipo de hongo. Posteriormente, se tomaron de 3 a 5 *plugs* de 1 cm², se llevaron a sendos Erlenmeyer tipo Fernbach y se inocularon en medio líquido *Kimura*. El cultivo se realizó en condiciones estáticas durante 7 días a 30°C y posteriormente se trituró y se usó como inóculo para cultivos líquidos agitados en medio *Kimura* durante 4 días a 180 rpm y 30°C, para inducir la formación de pellets.

Por otra parte, se tomaron 6 gramos de Raquis (con tamaño de partícula entre 0,5 y 2,5 cm), se pusieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 20 mL de agua corriente y finalmente, se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Figura. 3.1., corriente 1). Cada

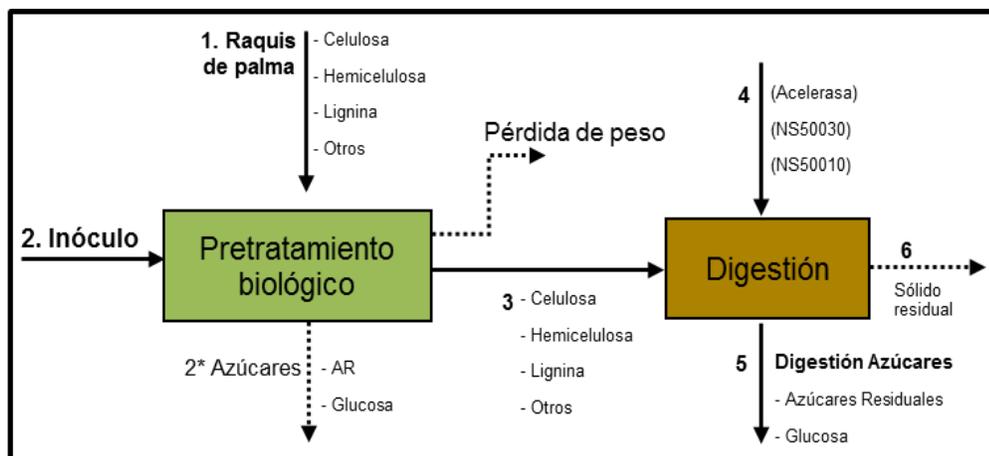
matraz con Raquis se inoculó con 3 mL del cultivo fúngico (corriente 2) y se incubó durante 21 días a 30°C, bajo condiciones estáticas (pretratamiento biológico). Cada punto experimental se realizó con dos réplicas.

Posteriormente, las muestras se lavaron durante 1 hora con 60 mL de agua a 160 rpm y 25°C. La biomasa, se liofilizó y se almacenó para análisis posteriores, que incluyen caracterización y digestión enzimática. Para efectos de análisis se consideró una muestra de raquis crudo (RC) tal cual era obtenido luego de la molienda. De igual forma, para evaluar los efectos del proceso de autoclavado sobre los componentes del raquis, se tomó una muestra control (K) a las mismas condiciones del pretratamiento, pero sin inoculación.

Las variables que se determinaron para cada muestra fueron: la pérdida de peso del material, la cantidad de lignina removida, composición y digestibilidad. La selectividad se definió como:

$$\text{Selectividad (S)} = \frac{\text{Lignina removida}}{\text{Celulosa removida}} \text{ (Ec. 3.1.)}$$

Figura 3.8. Diagrama de bloques para el *screening* de hongos en el pretratamiento biológico



3.2.4. Evolución de la actividad enzimática y remoción de lignina

Las cepas de hongos que mostraron mayor selectividad y la más baja pérdida de peso de material después de 21 días, se inocularon en material nuevo. La fermentación en estado sólido se llevó a cabo durante 40 días. Se tomaron muestras tras 7, 14, 21, 28, 35 días y al final del pretratamiento. A estas muestras se les se determinó la actividad de las enzimas lignolíticas y el porcentaje de remoción de lignina. A cada experimento se realizaron dos réplicas.

3.2.5. Digestibilidad e hidrólisis enzimática

Para la determinación de la hidrólisis enzimática se adaptó el protocolo del NREL, que consistió en el uso de 15 FPU (unidades de papel filtrante) de celulasa, 15 IU (unidades internacionales) de β -glucosidasa por gramo de celulosa y 15 IU de xilanasas y β -xilosidasas por gramo de hemicelulosa. La hidrólisis se realizó a través de la adición de las mezclas enzimáticas comerciales Celluclast 1.5L, NS50010, NS50013 y NS50030 (Novozymes) que contenían como actividad enzimática principal, celulasa, β -glucosidasa, β -xilosidasa y xilanasas, respectivamente. La hidrólisis se llevó a cabo en una solución buffer de citrato (0.1M, pH 4.8) con una carga de sólidos del 5%. Se agregaron antibióticos (tetraciclina y cicloheximida) con el fin de prevenir la contaminación. Debe anotarse que, la cicloheximida, que es un inhibidor de la biosíntesis de proteínas en los organismos eucarióticos, no se agregó cuando los productos de la hidrólisis iban a ser posteriormente fermentados, con el fin de prevenir efectos inhibitorios en los organismos fermentativos. La concentración de azúcares reductores totales y de glucosa en la fase líquida posterior a la hidrólisis, se determinó usando el método del DNS (Dowe & McMillan, 2008) y el kit de glucosa-oxidasa (GOD-PAP/*Trinder*, *Spinreact*), respectivamente.

La digestibilidad representa el rendimiento en la conversión de los compuestos lignocelulósicos en azúcares fermentables. La digestibilidad de la celulosa (DC) y la

hemicelulosa (DH) se calculó utilizando las siguientes ecuaciones (López-Abelairas et al., 2013):

$$\%DC = \frac{g \text{ glucosa en fase líquida} * 0.9}{g \text{ Celulosa en fase sólida antes de la hidrólisis}} * 100 \text{ (Ec. 3.2.)}$$

$$\%Dh = \frac{(g \text{ TRS en fase líquida} - g \text{ glucosa en fase líquida}) * 0.88}{g \text{ Hemicelulosa en fase sólida antes de la hidrólisis}} * 100 \text{ (Ec. 3.3.)}$$

3.2.6. Actividad de las enzimas lignolíticas

Las actividades enzimáticas de manganeso peroxidasa y lacasa se midieron espectrofotométricamente siguiendo la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (DMP) y 2,2'-azino-bis(3-etilbencenotiazolin-6-sulfonato) (ABTS), respectivamente (Salvachúa et al., 2011). La metodología seguida se describe a continuación:

La actividad manganeso peroxidasa (Mn^{2+}), se estimó a través de la medición de la formación del complejo Mn^{3+} -tartrato ($\xi_{238} = 6.500 M^{-1}cm^{-1}$) durante la oxidación de $MnSO_4$ (0,1mM), en una solución búfer de tartrato de sodio, a una concentración de 100mM y pH 5,0, en presencia de H_2O_2 0.1mM.

Por otra parte, la actividad lacasa se midió a pH 5, buffer acetato de sodio 100mM, a través del seguimiento de la oxidación de una solución 2mM ABTS a 420nm. Para ambas enzimas una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que transforma 1 μ mol de sustrato por minuto.

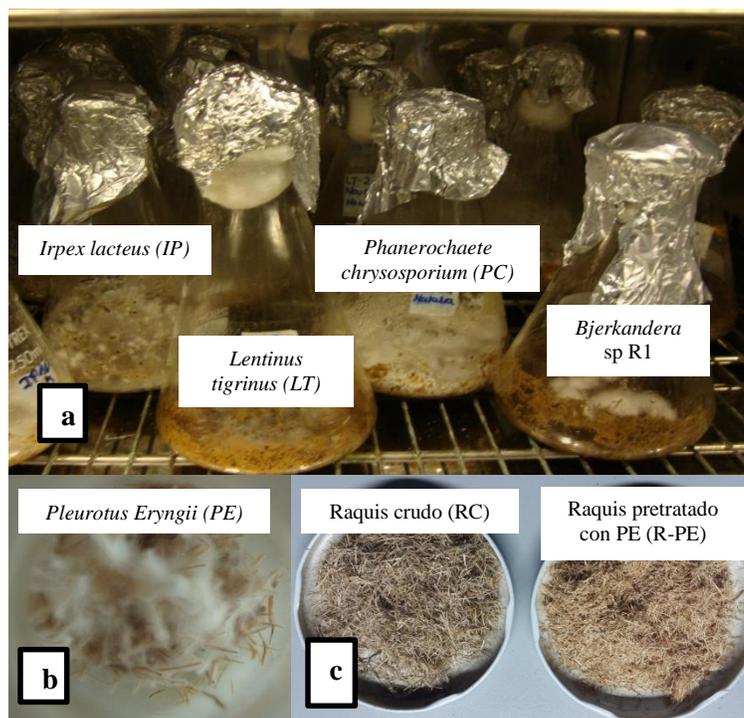
3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Screening de hongos sobre raquis

Durante el pretratamiento del raquis se observó que cada hongo presenta características particulares respecto a la colonización y a los cambios en la coloración del material, como

lo presenta la Figura 3.2, luego de 21 días de pretratamiento. Las primeras etapas de la síntesis de enzimas corresponde a la fase de colonización; esta etapa se asocia con la ruptura inicial del material vegetal, cuando moléculas pequeñas, como algunas especies reactivas con el oxígeno, inician la degradación de lignina; la degradación de los polisacáridos se presenta en una etapa posterior (Milovanovic, Stajic, Lonc, & Jasmina, 2013). Así, de las observaciones del crecimiento de los hongos sobre raquis se puede inferir que si la colonización es lenta, la remoción de lignina será selectiva; la invasión completa del sustrato puede dar cuenta del acceso a la fracción holocelulósica.

Figura 3.2. Apariencia del raquis luego de 21 días de pretratamiento con diferentes hongos. a) *Bjerkandera* sp R1 (BKA), *Irpex lacteus* (IL), *Phanerochaete chrysosporium* (PC) y *Lentinus tigrinus* (LT). b) *Pleurotus eryngii* (PE). c) Apariencia del raquis crudo y pretratado con PE



En la Tabla 3.2 se presentan los resultados de composición y digestibilidad del raquis tras 21 días de pretratamiento. Como se observa, los hongos BKA y PC, presentan la remoción

más baja de lignina, las mayores pérdidas de peso de material, y finalmente las composiciones más bajas de celulosa. Estos resultados demuestran las facultades metabólicas de los hongos, para producir diferentes enzimas ligninolíticas e hidrolíticas (Sánchez, 2009). Arora et al., (2002) encontraron resultados similares al pretratar paja de trigo con PC. Los resultados se atribuyeron a las actividades enzimáticas detectadas, alta actividad LiP (4,7 U/g), moderada de MnP (7,0 U/g) y ausencia de Lacasa. Esta última enzima, según sugiere este estudio, está estrechamente relacionada con la remoción selectiva de lignina.

De forma análoga, el material pretratado con estos hongos mostró una digestibilidad de celulosa de 0% para ambos hongos y, una vez más, la digestibilidad de la hemicelulosa fue baja con valores de $6,6 \pm 3,3$ y $6,1 \pm 1,1$ % para BKA y PC, respectivamente. A pesar de su habilidad para remover lignina, estas dos especies mostraron baja selectividad en el biopretratamiento del raquis.

Tabla 3.6. Composición (%) y digestibilidad de raquis tras 21 días de pretratamiento biológico

Hongo	Celulosa	Hemicel	Lignina	%Pérdida de peso	S	% Remoción lignina	%Digest celulosa	% Digest. Hemicel.
RC	29,5±2,3	16,5±1,7	25,7±0,5	*	*	*	17,0±0,0	17,9±2,3
K	31,8±0,9	16,6±1,3	26,3±0,9	9,4±0,7	1,74	8,34	13,9±2,5	14,7±2,1
BKA	31,7±2,1	18,5±2,8	28,8±0,6	36,9±6,6	0,92	30,8	0,01± 0,0	6,6 ±3,3
IL	35,7±1,8	19,0±1,6	24,4±0,9	38,2±5,0	1,69	40,1	7,1±2,8	16,3 ±4,2
PC	33,5±7,2	16,6±3,7	25,4±4,2	32,8±7,6	1,42	33,5	0,0±0,0	6,1 ±1,1
LT	40,4±6,7	15,2±5,0	23,7±3,9	29,9±6,5	8,83	35,3	1,2±0,6	6,7 ±1,5
PE	39,1±7,1	20,6±5,7	22,0±0,3	24,9±8,8	77,45	35,7	22,0 ±2,0	25,0±7,6

(*) El raquis crudo no fue sometido a remoción de lignina, por lo tanto los parámetros no son evaluados.

En este estudio, la mayor digestibilidad se logró con PE ($p < 4,11E-05$). Respecto a la digestión de la hemicelulosa IL presentó un valor similar a RC ($p = 0,981$). La digestibilidad de todos los otros hongos evaluados fue similar entre ellos ($p > 0,917$), pero significativamente más baja que los valores de RC ($p < 3,96E-3$).

Irpex lacteus fue el hongo que presentó la mayor remoción de lignina ($40,1 \pm 1,42$) y al mismo tiempo altos valores de digestibilidad de celulosa y hemicelulosa (7,1 y 16,4 %

respectivamente), y no superó los valores que se obtuvieron con la muestra de control ($17,0\pm 0,0$ y $17,9\pm 2,3\%$ respectivamente). Aparentemente, IL es capaz de acceder, de forma selectiva, a la fracción holocelulósica. Sin embargo, Yang et al., (2010) encontraron que el hongo IL tiene un comportamiento sobre el tallo del maíz similar al que se obtuvo en este estudio. Luego de 15 días de pretratamiento, IL disminuyó el contenido de lignina (de $19,25\pm 1,18$ a $16,97\pm 0,63\%$) y xilano (de $24,50\pm 0,17$ a $22,58\pm 0,28\%$) y se presentaron bajas pérdidas de glucano (de $45,52\pm 1,12$ a $43,26\pm 0,57\%$), lo que sugirió que este hongo es selectivo en la remoción de lignina sobre el residuo del tallo de maíz.

Por otra parte, los hongos LT y PE presentaron valores similares en remoción de lignina (35%). No obstante, PE presentó una mayor conservación de la fracción holocelulósica, lo cual se evidencia en su digestibilidad (Tabla 3.2). La selectividad más alta (77,6) se obtuvo con PE ($p < 9,78E^{-5}$), la cual fue alrededor de 8 veces más alta que la que presentó IL, el segundo hongo más selectivo. La selectividad que presentaron los otros tres hongos evaluados (BKA, IP y PC) fueron similares entre ellas ($p < 5,07E^{-3}$, pero la más baja la presentó el LT ($p < 5,07E^{-3}$). De esta forma, y considerando la selectividad como parámetro principal del *screening* de hongos, se seleccionó PE como el mejor hongo para llevar a cabo el pretratamiento biológico del raquis. Salvachúa et al., (2011) analizaron el comportamiento de 21 hongos sobre paja de trigo y observaron una alta selectividad de *P. eryngii*, una remoción máxima de lignina del 17% (respecto al contenido inicial PE no removió la fracción celulósica, siendo la única especie que presenta dicho comportamiento.

El material pretratado usando PE, mostró un incremento en la digestibilidad de la celulosa (29,2%) en comparación con la muestra control RC (17%, $p = 4,11E^{-5}$), aunque, la digestibilidad de la hemicelulosa (25%) resultó ser más baja indicando el consumo de algunas unidades estructurales en la fracción hemicelulósica.

Después del autoclavado, algunos azúcares se solubilizan tanto en las muestras de control (K) como en los medios inoculados. Estos azúcares, se encuentran disponibles para ser consumidos inicialmente por los hongos, dando inicio al biopretratamiento. Sin embargo, en el caso del experimento de control (RC), los azúcares no son consumidos y permanecen

disponibles. Esta situación, podría explicar los altos valores en la digestibilidad de la hemicelulosa, encontrados para las muestras de control RC, al ser comparados con los medios inoculados.

Finalmente, los resultados obtenidos son consistentes con los hallazgos reportados por Bak et al., (2009). En este trabajo, los autores muestran que una alta remoción de lignina no garantiza una mejor digestibilidad. A su vez, la aplicación del pretratamiento biológico si favorece el consumo de la fracción holocelulósica dada la no especificidad de los hongos empleados. Bak et al., (2009) mostró que durante el pretratamiento de paja de arroz, los mayores porcentajes de deslignificación se lograron el día 30, alcanzando un 56% del rendimiento teórico en glucosa, durante la digestión enzimática. Sin embargo, en el día 15 donde la deslignificación fue menor se alcanzó una digestibilidad del 83%.

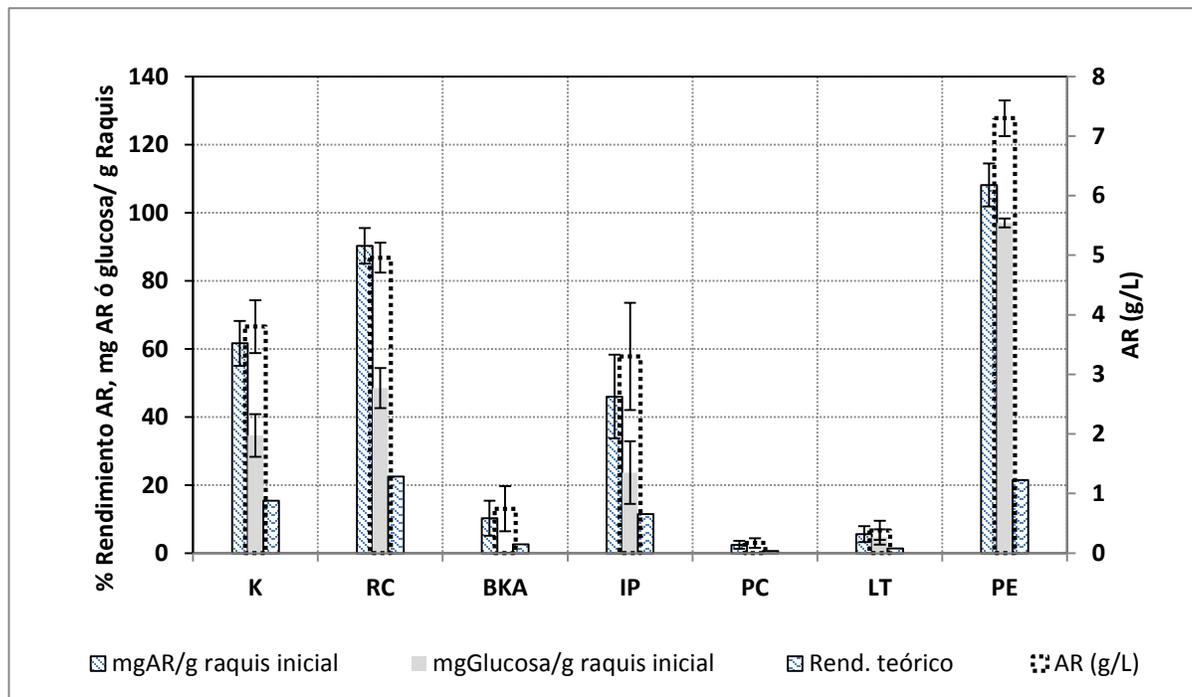
En la Figura 3.3 se presentan los resultados obtenidos para el material biopretratado. En ella se incluyen los rendimientos en la producción de azúcares reductores, y la relación total de azúcares reductores y de glucosa (ambos) con respecto al contenido inicial. Tal como se observa, el hongo PE fue el único que permitió obtener altas concentraciones de azúcares reductores (AR) de 7,3 g/L, en comparación con el control (K), cuya concentración fue de 3,8 g/L. El pretratamiento biológico usando PE, permitió además obtener altos valores de recuperación de glucosa (97%), mucho mayores que para el control (K), (34,5%). Este aspecto, eventualmente favorece los procesos fermentativos con glucosa, empleando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Salvachúa et al., (2011) encontraron que el hongo IL en comparación con PE, presenta un mejor desempeño en cuanto a digestibilidad cuando se trabaja sobre paja de trigo. Por el contrario, en el presente estudio se encontró que el hongo PE presenta una mayor recuperación de los azúcares reductores cuando se trabaja sobre raquis de palma, y es más selectivo en la remoción de lignina. Una vez más, estos resultados permiten establecer que cada hongo presenta un comportamiento particular frente a diversos tipos de material. Pinto et al., (2012) estudiaron la digestibilidad de paja de trigo luego del biopretratamiento con *Bjerkandera adusta*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma resinaceum*, *Irpex lacteus*,

Phanerochaete chrysosporium, *Trametes versicolor* y *Basidiomycete* Euc-1., y encontraron digestibilidades de 44, 55 y 32 mg AR/g paja para *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus* y *Phanerochaete chrysosporium*, respectivamente; este último no superó los valores alcanzados para la muestra control (sistema abiótico). Adicionalmente, estos autores estudiaron el efecto de la presencia de las enzimas lignolíticas Lac, MnP y LiP sobre la digestión de la paja de trigo, encontrando que no es un evento coincidente las máximas actividades ligninolíticas y las mejores sacarificaciones; sin embargo, la presencia de LiP si presenta efecto positivo sobre la sacarificación de la paja biopretratada.

Elisashvili & Kachlishvili, (2009) encontraron diferencias en las actividades enzimáticas de Lacasa y Manganeso peroxidasa, al cultivar los hongos ligninolíticos *Cerrena unicolor* y *Phellinus robustus* sobre diferentes materiales lignocelulósicos, entre ellos paja de trigo, cáscaras de mandarina y de banana. *C. unicolor* produjo sobre paja de trigo 108,1 U/mL de Lac y 0,7 U/mL de MnP, mientras *P. robustus* produjo 2,3 U/mL de Lac y 1,4 U/mL de MnP. Sobre cáscaras de mandarina *C. unicolor* produjo 78,5 U/mL de Lac y 2,2 U/mL de MnP, y *P. robustus* produjo 8,4 U/mL de Lac y 2,3 U/mL de MnP. Estos resultados permiten inferir que según la estructura química característica de la lignina presente en el material lignocelulósico, cada especie fúngica, atendiendo a su capacidad metabólica, genera diferentes cantidades de enzima accediendo al material de maneras diversas. Por este motivo, es necesario estudiar el comportamiento de cada hongo en particular, para establecer cual permite alcanzar la mejor recuperación de azúcares sobre cada tipo específico de biomasa.

Figura 3.3. Rendimiento de digestiones enzimáticas de raquis biopretratado 21 días con PE. El control RC no fue inoculado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar del experimento y sus réplicas



En algunos estudios relacionados con el pretratamiento biológico de paja de trigo, se alcanzaron rendimientos cercanos al 40%, para tiempos de residencia similares. En este trabajo, se obtuvo un rendimiento máximo de 21,5% utilizando raquis de palma. Estos resultados indican que la fracción holocelulósica en la paja de trigo es más accesible que en el raquis de palma.

La capacidad natural que poseen los hongos de la podredumbre blanca para degradar la lignocelulosa, está asociada tanto al crecimiento micelial, el cual permite el transporte de nutrientes (nitrógeno y el hierro), como a su sistema enzimático. Los hongos poseen dos sistemas enzimáticos: el hidrolítico, responsable de la degradación de polisacáridos, y el oxidativo ligninolítico, el cual degrada la lignina (Sánchez, 2009). En algunos hongos y bacterias anaerobias también se ha reportado la presencia de un sistema hidrolítico denominado celulosoma, el cual es responsable de la biodegradación de material vegetal

(Hasunuma et al., 2013); el celulosoma es un sistema multi-enzimático que permite el anclaje al sustrato a través de enzimas de acoplamiento y cohesinas, permitiendo un acercamiento directo de la superficie celular a la celulosa y favoreciendo el acceso (Fierobe et al., 2002).

La tabla 3.3 presenta los valores obtenidos en varios estudios para las enzimas hidrolíticas y ligninolíticas, con diferentes hongos y sobre diversos materiales, en sistemas en estado sólido; de igual manera, los reportes de digestibilidad o recuperación de azúcares. Como se observa, cada hongo presenta un comportamiento particular sobre sustratos diferentes; este aspecto se ve reflejado en la facilidad de acceso a la celulosa y en las respectivas digestibilidades.

Tabla 3.3. Algunos estudios sobre biopretratamientos y su relación con las enzimas ligninolíticas e hidrolíticas

Hongo	Sustrato	Enzimas	Remociones y digestibilidad	Referencia
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Paja de arroz	XYL: 430,00 IU/L LiP: 2,600 U/L MnP: 500U/L GLOX: 500 U/L AAO: 200 U/L	Lig: Disminuye de 19.4% a 13.1% (30d) Xyl: Disminuyen de 10.0% a 7.3% (30d) Gluc: Disminuyen de 38.0% a 21.9% (30d) DC (15d) 64.9%	(Bak et al., 2009)
<i>Bjerkandera adusta</i>	Paja de trigo	LiP: 1,4 U/g MnP: 16,5 U/g Lac: 0 U/g	44 mg AR/g	(Pinto et al., 2012b)
<i>Irpex Lacteus</i>	Paja de trigo	LiP: 0,18 U/g MnP: 11,4 U/g Lac: 0 U/g	55 mg AR/g	(Pinto et al., 2012b)

Lig: Lignina, XYL: Xylanasa; Xyl: Xilanos, Gluc: Glucanos, DC:Digestibilidad celulosa

(Dias et al., 2010) biopretrató paja de trigo usando los basidiomycetes *Irpex Lacteus* y el denominado en su estudio Euc-1 encontrando actividades enzimática de xylanasa y celulasas que se consideraron relativamente bajas, pero que fueron favorables para la etapa posterior de digestión enzimática. En esta etapa, lograron incrementar entre tres y cuatro veces la digestibilidad del material, respecto al control no biopretratado. En la relación de enzimas hidrolíticas de este estudio al parecer las bajas actividades β -Glucosidasa exo favorecen la conservación de la celulosa, haciendo el proceso de remoción de lignina más selectivo.

3.3.2. Efecto del biopretratamiento sobre la estructura del raquis

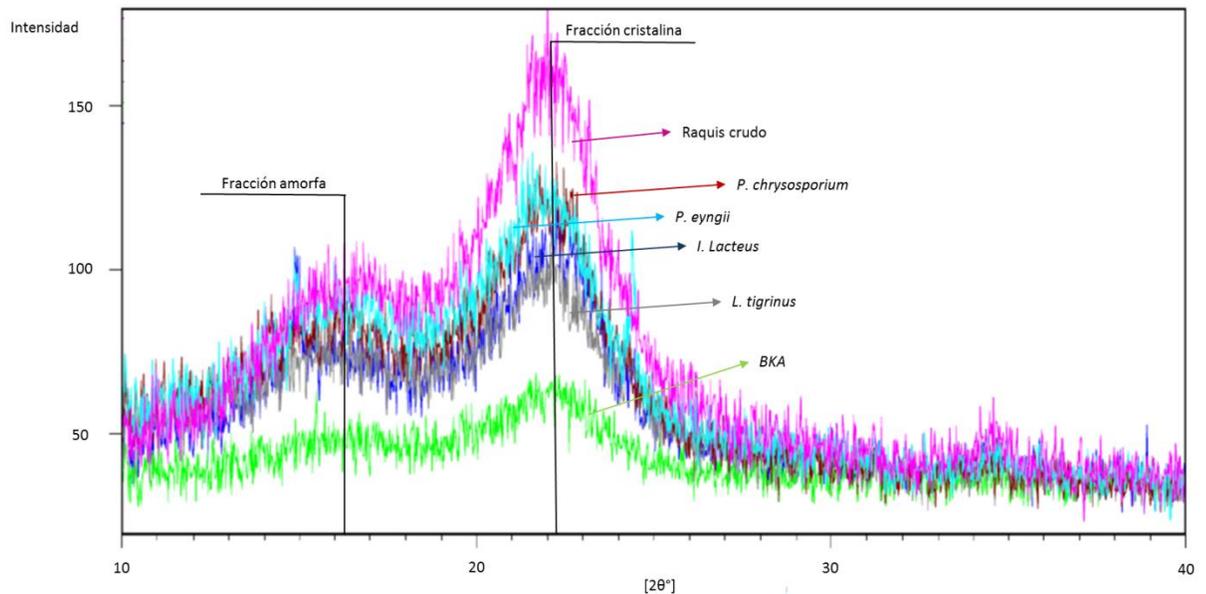
Luego del biopretratamiento del raquis con el hongo PE, se aprecian cambios en la apariencia física del material y en su composición molecular, los cuales son presentados en los ítems siguientes.

3.3.2.1. Cristalinidad

Los materiales lignocelulósicos la hemicelulosa y la lignina son polímeros amorfos mientras que la celulosa es en su mayoría cristalina. En la Figura 3.4 se presentan los difractogramas de muestras de raquis obtenidas tras el pretratamiento biológico con cada hongo. Se puede observar la línea de referencia (RC) que equivale al material sin ningún pretratamiento, en donde los picos aproximados de 17 y 22° corresponden a las fracciones amorfa y cristalina de la celulosa respectivamente. A partir de estos difractogramas se calculó el porcentaje de cristalinidad como el área bajo la curva. El porcentaje de cristalinidad obtenido para el material sin pretratar fue 29.5% y para la biomasa pretratada fueron de 33,2%, 28,0%, 27,1%, 29,9% y 24,7% para BKA, IL, PC, LT y PE, respectivamente. Después del pretratamiento con BKA, la cristalinidad del raquis aumentó en 12,5% con respecto al material sin pretratar, mostrando que esta cepa es la menos

selectiva de las cinco que se emplearon. Esto significa que BKA tiene la capacidad metabólica para modificar la biomasa y utilizar como sustrato la fracción amorfa de la celulosa. El hongo IL disminuyó la cristalinidad del material en un 5% y a pesar de que metabolizó la fracción amorfa de la celulosa su digestibilidad no fue tan alta como la obtenida con PE.

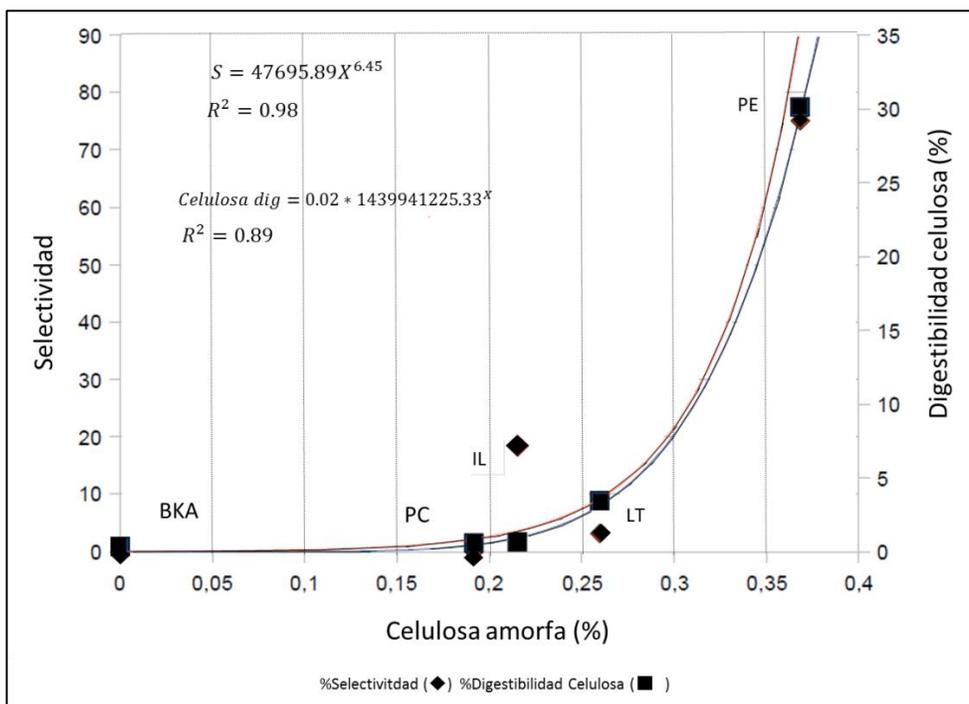
Figura 3.4. Difractogramas obtenidos para el raquis crudo y pretratado con *Bjerkandera* sp. R1, *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinus tigrinus* y *Pleurotus eryngii*



Los valores de cristalinidad observados, fueron comparados con la selectividad de cada hongo, la digestibilidad y la fracción remanente de celulosa amorfa, tras el pretratamiento (Figura 3.4.). Se encontró una relación directa entre la digestibilidad y la celulosa amorfa remanente, y entre la digestibilidad y la selectividad. Esto significa que bajos valores de cristalinidad en el raquis pretratado implican altas digestibilidades. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Bak et al., (2009), usando paja de arroz pretratada, quienes encontraron una correlación entre el rendimiento de glucosa y el índice de cristalinidad, de tal forma que si la cristalinidad aumenta, se obtendrán bajos rendimientos de glucosa. Wang et al. (2013), obtuvieron resultados similares. Estos resultados corroboran el hecho de que en el biopretratamiento, las enzimas oxidativas (que remueven la lignina y abren los anillos fenólicos) actúan de forma simultánea con las enzimas

hidrolíticas (degradadoras de polisacáridos). Es comunmente conocido, que no todos los hongos tienen la capacidad de obtener energía únicamente de la lignina y que su ruptura generalmente se hace con el fin de obtener acceso a la fracción holocelulósica (Sánchez, 2009).

Figura 3.5. Correlación entre la selectividad, la digestibilidad de la celulosa y la fracción amorfa posterior al pretratamiento

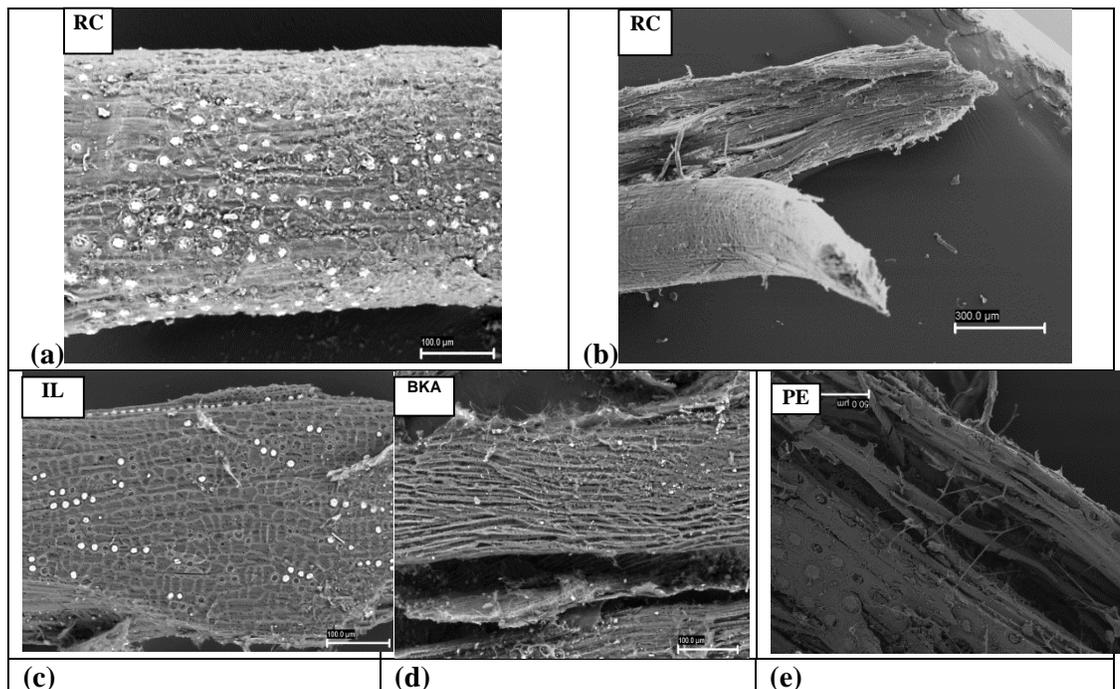


3.3.2.2. Análisis SEM

El análisis SEM se realizó con el objeto de evidencia los cambios en la estructura del raquis a causa del pretratamiento biológico. Las micrografías de la superficie del raquis sin pretratar se muestran en las Figuras 3.5. (a) y (b). Cada fibra presenta un diámetro aproximado de 3327 μm y están compuestas de microfibras de celulosa (Figura 3.5.(b)) con diámetros entre 9 y 20 micras. En la Figura 3.5. se presentan las diferencias entre la rugosidad y la suavidad del raquis. Las micrografías (c), (d) y (e) muestran los cambios en

el material, que revelan la presencia de poros en la superficie de las fibras indicando la remoción parcial de los silicatos. También se puede apreciar la degradación en la superficie.

Figura 3.6. Análisis SEM para el raquis sin pretratar (a), (b) y el raquis pretratado con *I. lacteus* (c), *Bjerkandera sp. R1* (d) y *P. eryngii* (e)



3.3.3. Biopretratamiento usando *Pleurotus eryngii*

3.3.3.1. Evolución de la actividad enzimática durante el pretratamiento con PE

La Figura 3.7 presenta los perfiles de degradación de la lignina presente en el raquis y la actividad de las enzimas lignolíticas, manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac) usando el hongo PE. Se observa que el proceso de remoción de lignina, en donde se logró una reducción equivalente al 26% del contenido inicial, se realizó en un tiempo de siete días. A

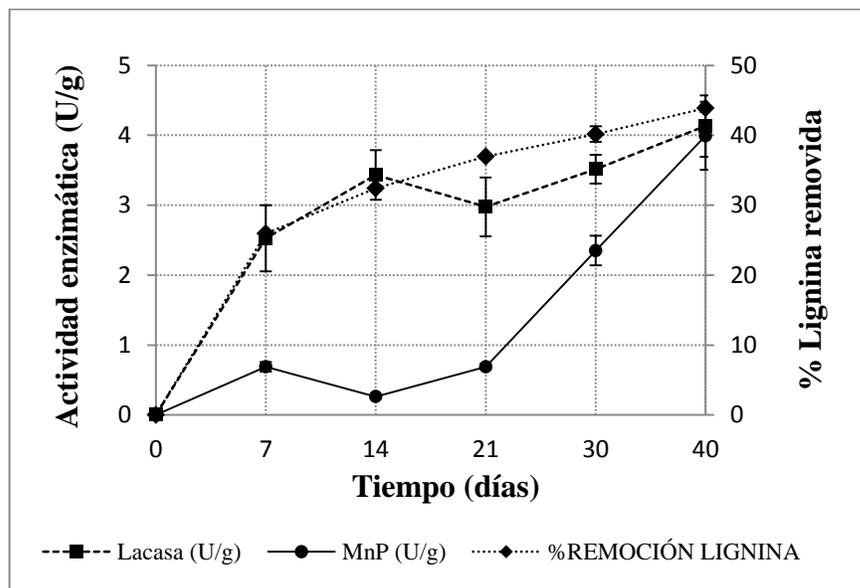
partir de este punto, comenzó a disminuir la tasa de remoción, alcanzando un valor final de 43,9% a los cuarenta días de pretratamiento. Wan & Li, (2010) encontraron una tendencia similar en la remoción de lignina, sobre rastrojo de maíz con el hongo *Ceriporiosis subvermispora* y establecieron que la deslignificación es significativa tras iniciarse la producción de las enzimas MnP y Lacasa. En una primera etapa (día 15), la velocidad de remoción de lignina es mayor (26% de lignina removida), luego la velocidad disminuye hasta alcanzar un 37%, en el día 40.

En el biopretratamiento de raquis con PE también se encontró una relación directa entre la remoción de lignina y la actividad enzimática de la Lacasa (Lac), en donde se observó que cuando disminuía la producción de la enzima la tasa de remoción de lignina también bajaba. Los resultados obtenidos en este trabajo, son equiparables con los reportados por Schiesser et al. (1989), usando *Pleurotus ostreatus* sobre paja de trigo.

Se observó también, que durante los primeros siete días, el proceso de deslignificación fue alto al igual que la producción simultánea de las enzimas Lac y MnP, fenómeno que muestra la sinergia entre ambas enzimas. De igual forma, este efecto sinérgico fue observado por Sánchez, (2009), aunque la relación las enzimas Lac y MnP depende del tipo de material a pretratar y el hongo utilizado.

Elisashvili & Kachlishvili, (2009), observaron una disminución de la relación entre las actividades Lac/MnP de 226 a 2, cuando se cambió el sustrato de paja de trigo a pericarpio de nogal, empleando diferentes hongos de pudrición blanca. Por otra parte, Pinto et al. (2012) establecieron la relación entre la presencia de las enzimas ligninolíticas Lac, MnP y LiP sobre la digestibilidad de la paja de trigo pretratada. Con los hongos *B. adusta* y *P. chrysosporium* observaron un incremento en la accesibilidad sobre paja de trigo por parte de las enzimas hidrolíticas, únicamente si la biomasa fue pretratada inicialmente por la cepa *B. adusta* y posteriormente por *P. chrysosporium*. Ambos hongos producen MnP, pero ninguno Lacasa, mientras que la enzima lignino peroxidasa (LiP), es producida únicamente por *B. adusta*. Esta diferencia en los perfiles enzimáticos explicaría los resultados obtenidos.

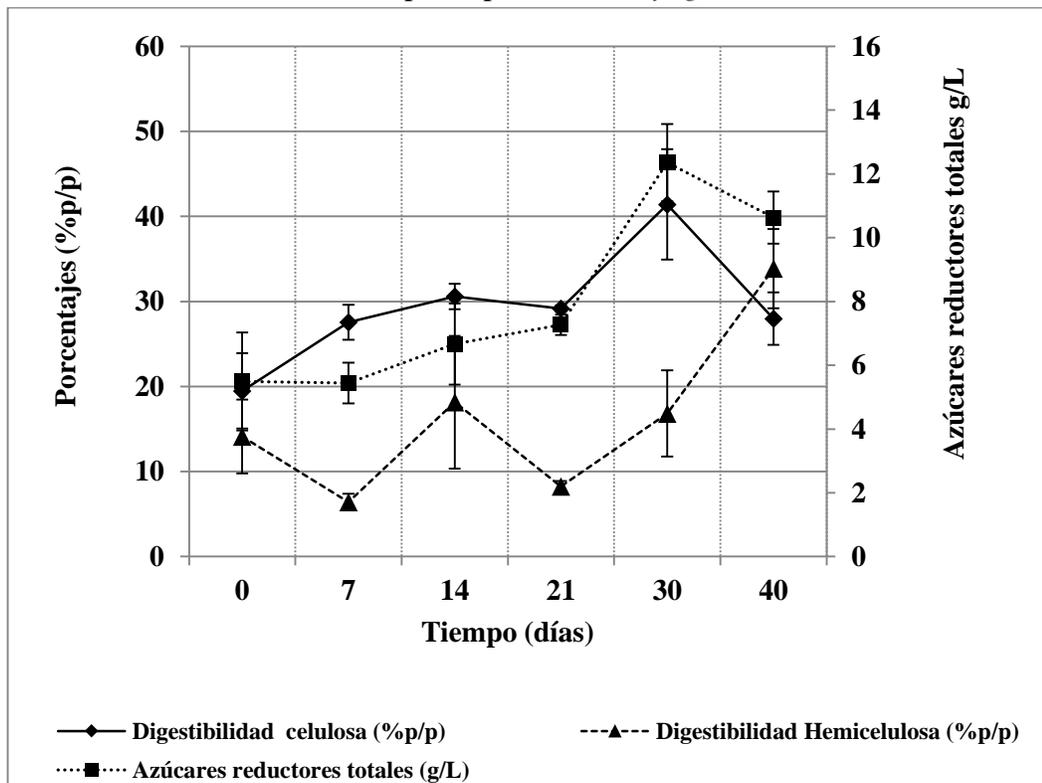
Figura 3.7. Evolución de la remoción de lignina, MnP y Lacasa para el pretratamiento biológico durante 40 días con el hongo *P. eryngii* (PE)



3.3.3.2. Pretratamiento en el tiempo con PE

En la Figura 3.8. se puede observar que la concentración más alta de azúcares reductores (12.4g/L) se alcanzó luego de 30 días y al mismo tiempo los valores de recuperación máximos de azúcares totales, digestibilidad de celulosa y hemicelulosa fueron 32,5, 43,7 y 16,8%, respectivamente. Estos resultados confirman el potencial del hongo PE para el biopretratamiento del raquis. Una alternativa para incrementar los rendimientos obtenidos en este estudio puede ser la recuperación de la fracción remanente de holocelulosa del material biopretratado combinando el tratamiento biológico con otro tipo de pretratamiento.

Figura 3.8. Perfiles de digestibilidad holocelulósica y azúcares reductores totales en el tiempo empleando *P. eryngii*



3. 4. Conclusiones

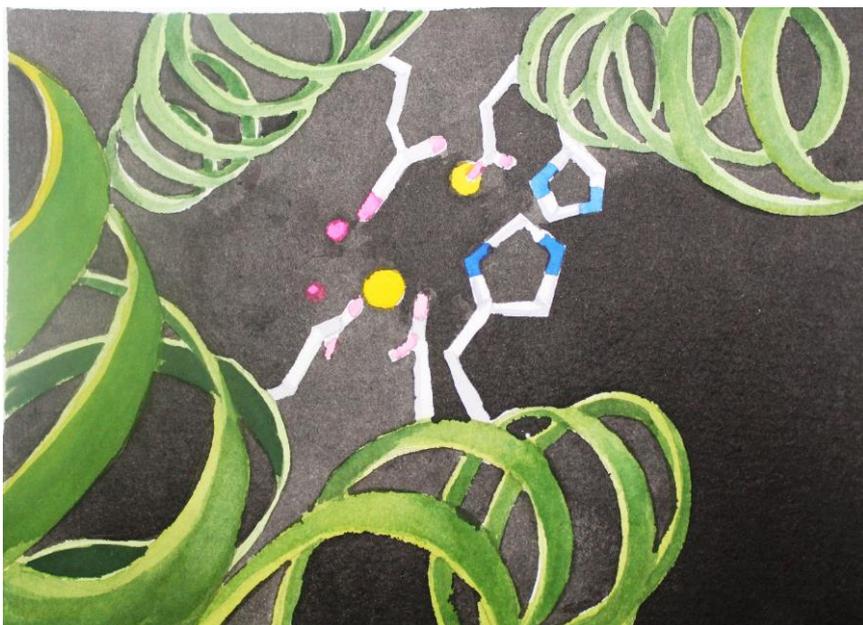
De los hongos evaluados, PE fue el que presentó mayor selectividad en la remoción de lignina (77,45 g de lignina/g de celulosa removidos). Esto permite demostrar el potencial de este hongo para llevar a cabo el acondicionamiento del raquis, previo a su hidrólisis para la obtención de azúcares reductores.

Se logró establecer la relación entre la cristalinidad del raquis pretratado con respecto a su digestibilidad. Se encontró además una relación directa entre la digestibilidad del raquis y el contenido de celulosa amorfa remanente, y entre la digestibilidad y la selectividad. Estos resultados son comparables con los obtenidos en estudios previos en los que se utilizaron otras matrices lignocelulósicas.

P. eryngii remueve la lignina presente en el raquis gracias a su capacidad para producir y utilizar de manera sinérgica las enzimas lignolíticas lacasa y MnP.

La remoción de lignina que favoreció el mayor incremento de la digestión de celulosa (43%) y de hemicelulosa (16,8%), con respecto al RC se alcanzó luego de 30 días de pretratamiento con PE, lo cual equivale a la recuperación del 32,5% de los azúcares disponibles en el raquis.

Capítulo 4



Capítulo 4

Pretratamiento enzimático de raquis de palma

Resumen

El tratamiento enzimático ha sido exitosamente usado en procesos de preoxidación de macromoléculas, con carácter recalcitrante. En este capítulo, se estudió el efecto de diversos extractos enzimáticos sobre la remoción de la lignina de raquis de palma, su digestibilidad y la disminución de los tiempos de proceso respecto al pretratamiento biológico. Para este propósito, se aplicaron extractos enzimáticos crudos de manganeso peroxidas (MnP) y lacasa, obtenidos de cultivos de *Bjerkandera adusta* y *Pleurotus eryngii* respectivamente. El pretratamiento con enzima MnP incrementó la digestibilidad de la hemicelulosa desde 21,2% a 33,2%. Al complementar la acción de MnP con un lavado alcalino la digestibilidad de la hemicelulosa se incrementó hasta 40,5. La aplicación de lacasa no permitió incrementar la digestibilidad de las fracciones hemi y celulósica. Sin embargo, mediante análisis FTIR, se observaron cambios en las bandas entre los 1600 y 1450 cm^{-1} , lo que evidenció que la lacasa si actuó sobre la lignina de raquis de palma; es posible que estos cambios sean el eventual resultado de la repolimerización de la lignina, por acción de la misma enzima.

4.1. Introducción

Los cocteles enzimáticos extracelulares, producidos por los hongos de la pudrición blanca, se componen típicamente de una o más de las tres enzimas lignolíticas reconocidas (lignino peroxidasa, LiP, manganeso peroxidasa, MnP y lacasa, Lac), capaces de degradar lignina, al igual que un amplio rango de contaminantes recalcitrantes (Wen, Jia, & Li, 2010).

El uso *in vitro* de extractos crudos de enzimas, presenta ventajas con respecto a los procesos de degradación *in vivo* con hongos de la pudrición blanca. El uso de extractos enzimáticos elimina las dificultades inherentes a los procesos de crecimiento a gran escala, los largos periodos de incubación, los fenómenos de absorción de contaminantes en el micelio que comprometen la viabilidad celular, la minimización en la interferencia debida a reacciones alternas y, en última instancia, representan un método más simple y efectivo (Wen et al., 2010), siempre y cuando se suplan las necesidades de cofactores enzimáticos propios de la enzima.

El raquis posee un alto contenido de celulosa y hemicelulosa, por lo cual se considera una buena fuente para la producción de etanol (Gutiérrez, Sánchez, & Cardona, 2009). A pesar del potencial observado y reportado en la biomasa lignocelulósica, para la producción de biocombustibles, su desarrollo e implementación aún se ve obstaculizado por limitaciones tecnológicas y desventajas económicas (Gutiérrez et al., 2009). Una de las principales limitantes en el proceso de aprovechamiento de material lignocelulósico en general, es la matriz natural y compleja de la estructura de la biomasa. La celulosa se encuentra cubierta por

polímeros conocidos como lignina y hemicelulosa y unida a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Las tecnologías actualmente usadas no son completamente selectivas de forma que remuevan la lignina y expongan las fracciones holocelulósicas (celulosa y hemicelulosa) a la acción de los diversos complejos enzimáticos propios de los procesos fermentativos.

La evolución natural de ciertos microorganismos, les ha permitido llevar a cabo procesos de digestión natural de la biomasa lignocelulósica con el fin de reintegrarla a los ciclos naturales de vida. Los hongos filamentosos, realizan la degradación *in vivo* de los materiales lignocelulósicos a través de la secreción de enzimas y su acción extracelular. Estos hongos producen enzimas tipo oxidoreductasas como lacasa (Lac) y peroxidasas, manganeso y lignino peroxidasa (MnP y LiP respectivamente). La biodegradación de lignina es un proceso oxidativo descrito como “combustión enzimática”, en donde la lignina es mineralizada hasta CO₂ a través de reacciones enzimáticas y radicalarias que atacan las estructuras aromáticas no fenólicas correspondientes a más del 80% del polímero lignolítico (Cañas & Camarero, 2010).

Las lacasas fueron descubiertas en el siglo XIX, mientras que el descubrimiento y producción de las enzimas LiP y MnP solo se realizó a mediados de 1980, a partir del cultivo del hongo *P. chrysosporium*. Posteriormente, se consideraron como verdaderas enzimas lignolíticas (ligninasas) debido a su alto potencial redox. Recientemente, se ha demostrado la actividad de otras enzimas en la degradación de lignina, entre ellas se encuentra la versátil peroxidasa (VP), la aril alcohol oxidasa (AAO), aril alcohol deshidrogenasa (AAD) y la quinona reductasa (QR) (Cañas & Camarero, 2010; Sánchez, 2009).

Debido a la complejidad y la naturaleza heterogénea de la biomasa lignocelulósica, el rol de las enzimas lignolíticas aún no está completamente esclarecido. A partir de diferentes ensayos que incluyen técnicas inmunocitoquímicas se han evidenciado limitaciones en el transporte difusivo a través de las paredes celulares de la biomasa debido principalmente a su alto peso molecular. De esta manera, el complejo enzimático se comporta como superficies activas adheridas a la pared celular e inducen la formación de agentes catalíticos con masas moleculares más bajas como radicales, los cuales se pueden difundir a través de la pared

celular e iniciar el proceso de oxidación, a la vez que facilitan el acceso de las enzimas (Wan & Li, 2012).

El efecto de cooperatividad propio de diversos extractos enzimáticos ha podido ser identificado en los hongos de la pudrición blanca. Los patrones enzimáticos hasta ahora descubiertos incluyen LiP-MnP, LiP-MnP-Lac, MnP-Lac y LiP-Lac. Esta sinergia bioquímica, presente en el proceso de degradación de lignina, ha llamado la atención sobre las diferentes aplicaciones industriales que potencialmente pueden tener estas proteínas, entre las que es posible mencionar, la biodegradación de contaminantes, el blanqueo de la madera y el papel, entre otros (H.-L. Wang, Li, Guo, Wang, & Pan, 2005).

4.1.1. Enzimas ligninolíticas

4.1.1.1. Manganeso peroxidasa (MnP)

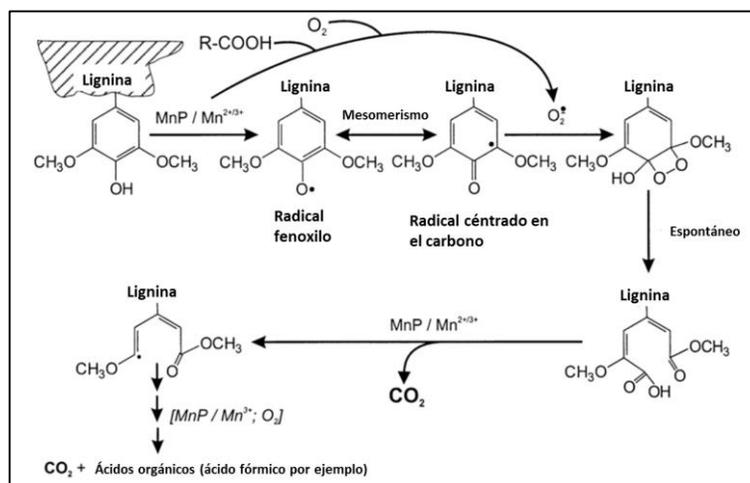
Manganeso peroxidasa, es una enzima producida y secretada por los hongos de la pudrición blanca de la madera con el fin de ayudar a la degradación de lignina; su función bioquímica es catalizar la reacción de oxidación de diferentes compuestos fenólicos, especialmente siringílico (3,5-dimetoxi-4-hidroxifenil) y los sustratos vinílicos de cadena secundaria, sustituidos en presencia de Mn^{2+} (Wan & Li, 2012). MnP no puede oxidar directamente compuestos no fenólicos presentes en la lignina, puesto que carece de la capacidad de generar el residuo triptófano necesario para la transferencia de electrones en sustratos aromáticos. Para este propósito, estas enzimas cuentan con agentes enlazantes, específicamente residuos de aminoácidos ácidos (Hammel & Cullen, 2008).

El ciclo catalítico de MnP es similar al de las hemoperoxidasas como la peroxidasa de rábano (HRP) y la lignino peroxidasa (LiP). No obstante, la MnP utiliza el ion Mn^{2+} como donador de electrones.

En la Figura 4.1. se presenta un esquema de los mecanismos involucrados en la mineralización de las estructuras aromáticas de la lignina en CO_2 por parte de la enzima MnP, propuesto por Hofrichter y col. (2002). El mecanismo de reacción comienza con la conversión

del anillo fenólico de la lignina en el radical fenoxilo. El radical puede reescribirse en su forma resonante o mesomérica por ejemplo, como un radical centrado en el carbono, en un anillo quinoide. De forma simultánea, los ácidos orgánicos quelantes (como el oxalato) se oxidan en presencia del oxígeno diatómico, para formar el radical peroxilo y otros radicales, los cuales pueden liberar oxígeno altamente oxidante. Este agente oxidante tiende a reaccionar con el radical presente en el carbono central para formar peróxido de éter, una sustancia inestable que sufre una ruptura espontánea en el anillo, dando como resultado la formación de una estructura alifática (derivados del ácido mucónico), con presencia de un grupo carboxílico libre. De esta forma, el sistema MnP puede actuar sobre el grupo carbonilo retirándolo de la cadena en forma de CO_2 . El radical alifático remanente, sufre reacciones posteriores con oxígeno molecular y es expuesto a ataques por parte de la enzima MnP que llevan presumiblemente a la generación de más dióxido de carbono y a la formación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Hofrichter, 2002).

Figura 4.5. Esquema hipotético del mecanismo enzimático de la MnP sobre la lignina. (Hofrichter, 2002).



4.1.1.2. Lignino peroxidasa (LiP)

La lignino peroxidasa, también llamada ligninasa, es una hemoproteína, involucrada en la ruptura oxidativa de fracciones aromática no fenólicas presentes en la lignina. La enzima LiP, puede oxidar los anillos aromáticos que están moderadamente activados a través del uso de sustituyentes donantes de electrones, atrayendo un electrón de los compuestos aromáticos que llevan solo dos o tres sustituyentes tipo éter (lignina no fenólica) pudiendo acceder a una gran cantidad de estructuras presentes en la lignina (Hammel & Cullen, 2008; Wan & Li, 2012).

Al igual que las peroxidases clásicas, la LiP es oxidada por medio del peróxido de hidrógeno, con el fin de generar un intermediario de dos electrones oxidados (compuesto I), en el cual el hierro se encuentra presente como Fe(IV), y un radical libre ubicado en el anillo tetrapirrólico o en un aminoácido cercano. El compuesto I oxida un sustrato donante por medio de un electrón, dando como resultado un sustrato libre de radicales y un compuesto II, en el cual el hierro aún se encuentra presente en la forma de Fe(IV), pero el radical libre ya no se encuentra presente en el anillo tetrapirrólico. El compuesto II oxida una segunda molécula del sustrato donante, liberando otro sustrato libre de radicales. De esta forma, la lignina presente en la biomasa se oxida continuamente. Finalmente la enzima es liberada (Hammel & Cullen, 2008).

Una de las características más significativas que posee la LiP es que el hierro presente en el anillo porfirínico posee una deficiencia de electrones mayor que las peroxidases clásicas; de esta forma, las lignino peroxidases se comportan como oxidantes fuertes. No obstante, se ha descubierto que la eficiencia en la oxidación por medio de este catalizador natural, disminuye conforme la estructura de la lignina es más compleja (Hammel & Cullen, 2008).

4.1.1.3. Lacasas

Las lacasas son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, llevando a cabo procesos naturales de oxidación y degradación, tanto de plantas como de insectos; igualmente, se encuentran asociadas a la síntesis de pigmentos relacionados con la melanina, y se han encontrado en todos los hongos superiores, participando en los ciclos naturales de la materia orgánica (Cañas & Camarero, 2010).

Las lacasas son oxidasas multicúpricas con actividad fenoloxidasa, que catalizan la oxidación de los fenoles, anilinas, y tioles aromáticos sustituidos a expensas del oxígeno molecular. Se les conoce también como proteínas azules debido al cobre y se caracterizan por la presencia de cuatro iones de cobre presentes en los sitios activos, involucrados en la catálisis enzimática. El cobre “azul” (sitio T1) está implicado en la oxidación del sustrato, capturando los electrones que son transferidos al clúster de cobre trinuclear (sitio T2/T3), en el cual se reduce el oxígeno. El potencial electroquímico del cobre en el sitio T1, es una de las características más importantes de la Lacasa y puede variar entre 0.4 y 0.8 V, lo que genera un gran interés biotecnológico debido al alto potencial redox de la enzima. No obstante, el potencial de los compuestos no fenólicos en la lignina es mucho mayor (1.3 V), por lo que las lacasas no pueden realizar la oxidación directa del material. De esta forma, la lacasa actúa en conjunto con mediadores redox en un sistema llamado lacasa-mediador (LMS). Los mediadores actúan como transportadores de electrones, estimulando la oxidación de sustratos complejos, como los polímeros de la lignina, (los cuales no entran a los sitios activos de la enzima debido a fenómenos estéricos) incrementando su actividad catalítica en las partes no fenólicas de la lignina (Cañas & Camarero, 2010; Kunamneni, Ballesteros, Plou, & Alcalde, 2007).

Hoy en día, se reconocen algunos mediadores tanto naturales como sintéticos, coadyuvantes de la acción enzimática sobre la biomasa. Entre los mediadores sintéticos que se conocen se encuentra el ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), el cual forma el par lacasa-ABTS y es capaz de oxidar las partes de la lignina no fenólicas (reconocidas como

las más recalcitrantes) y colorantes orgánicos, a través de rutas de transferencia de electrones (ET). Otros mediadores, son de tipo >N-OH, entre los que se encuentran 1-hidroxibenzotriazol (HBT), N-hidroxi-ftalimida (HPI), ácido violurico (VLA) y N-hidroxi-acetanilida (NHA). Esta ruta de oxidación parte de la generación por parte de la lacasa, de un radical nitroxilo (>N-O \cdot) altamente reactivo; allí se da la remoción enzimática de un electrón y la subsiguiente liberación de un protón. La oxidación del sustrato se realiza vía transferencia del átomo de hidrógeno (HAT) (Cañas & Camarero, 2010).

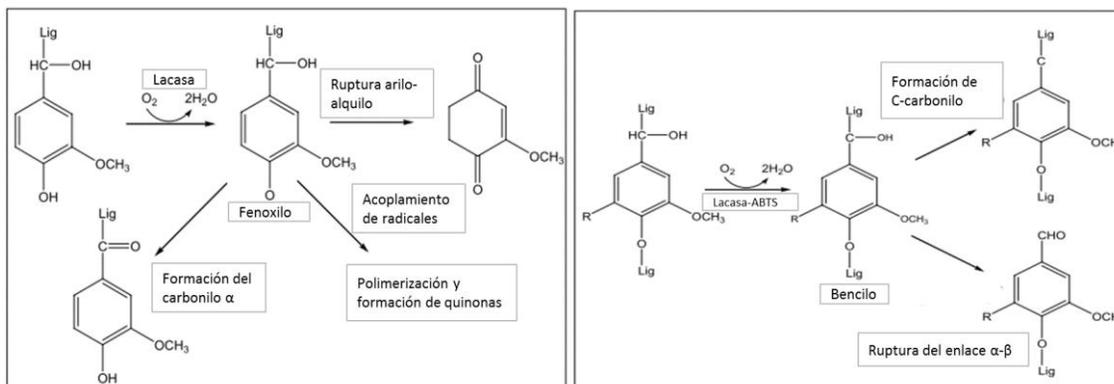
Por otra parte, los mediadores naturales identificados para la lacasa, son aquellos que se precian como productos provenientes de los hongos de la pudrición blanca. De este modo, se reconocen compuestos fenólicos como el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA), ácido 4-hidroxibenzoico y alcohol 4-hidroxibencílico. Estos compuestos, tienen la capacidad de mediar en la oxidación de los compuestos no fenólicos presentes en la lignina, a través de mecanismos radicalarios de reacción posteriores a la oxidación de los radicales fenoxilos por parte de la lacasa (Cañas & Camarero, 2010).

En términos generales, el proceso de oxidación catalítica vía lacasa, se identifica como una reacción de un electrón generador de un radical libre. El producto inicial es típicamente inestable y sufre una oxidación secundaria por medio de la enzima o algún otro mecanismo químico (polimerización o hidratación, por ejemplo). Los ataques realizados por la enzima a los enlaces de la lignina incluyen: oxidación del carbono C α y la ruptura de los enlaces C α -C β y los enlaces arilo-alquilo (Figura 4.2.(a)). Las lacasas pueden oxidar los compuestos no fenólicos de la lignina a través del uso de los mediadores previamente mencionados (Figura 4.2.(b)) (Kunamneni, Ballesteros, Plou, & Alcalde, 2007).

4.1.2. Alcance

En este capítulo se estudió el efecto de la aplicación de extractos crudos de MnP, obtenidos de la fermentación del hongo de la pudrición blanca *B. adusta* y de lacasa de *P. erezngii*, para la remoción de lignina de raquis de palma, y como una alternativa a los pretratamientos biológicos, buscando una disminución en los tiempos de pretratamiento.

Figura 4.6. Oxidación de (a) subunidades fenólicas de la lignina vía lacasa y (b) oxidación de unidades no fenólicas vía el sistema lacasa mediador (ABTS). (Kunamneni et al., 2007b).



4.2. Metodología

4.2.1. Producción de extractos crudos de enzimas.

Para la producción de MnP se utilizó el hongo *Bjerkandera adusta* (ATCC 90940), el cual se hizo crecer sobre agar extracto de malta durante 7 días a $30^\circ C$. Posteriormente, entre 3 y 5 trozos de medio con micelio fueron transferidos a un matraz *Fernbach* que contenía medio Kimura (Kimura, Asada, & M, 1990). Después de 10 días en crecimiento estático a $30^\circ C$, el hongo fue triturado en un *blender* y usado como inóculo para el cultivo en bioreactor (10% v/v). La producción de MnP se hizo en un bioreactor de 30L (Biostat C+ Satorious) con medio Kirk (Kirk T.K., 1986) a $30^\circ C$ y 250 rpm. El extracto enzimático obtenido fue concentrado 30 veces usando membranas de ultrafiltración de 10KDa, con el fin de obtener cantidades importantes de la enzima en bajas cantidades de volumen, y almacenados a $-20^\circ C$ para las pruebas posteriores.

Los extractos crudos de lacasa se obtuvieron mediante el cultivo de *Pleurotus eringii* sobre raquis de palma, como se indica en el numeral 3.2.3. Luego de 21 días de cultivo las muestras

se lavaron durante 1 hora con buffer acetato de sodio 100mM a 160 rpm y 25°C, se filtraron; el líquido recogido se usó como extracto crudo. A este extracto se le determinó la actividad enzimática de lacasa y MnP, antes de ser usado en el pretratamiento, este presentó $216,7 \pm 3,7$ U/L de lacasa, no se detectó MnP.

4.2.2. Actividad enzimática

Las actividades enzimáticas de manganeso peroxidasa y lacasa se midieron espectrofotométricamente siguiendo la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (DMP) y 2,2'-azino-bis(3-etilbencenotiazolin-6-sulfonato) (ABTS), respectivamente (Salvachúa et al., 2011), como se describe en el numeral 3.2.6.

4.2.3. Pretratamiento enzimático

El pretratamiento enzimático con MnP se hizo aplicando los procedimientos descritos a continuación: Una primera muestra del material lignocelulósico se pretrató usando extractos crudos de MnP (R-MnP); una segunda muestra fue suavizada con lavados alcalinos (RA) (para propósitos de análisis comparativo con el pretratamiento químico); una muestra final fue suavizada con lavados básicos y pretratada con la enzima (RA-MnP). Se tomó una muestra control RC.

Se utilizó una carga de 30 U MnP/ por gramo de raquis a 30°C durante 34 horas y 160 rpm.. Se adicionaron los cofactores de MnP en la misma concentración que durante la determinación de la actividad de la MnP: MnSO_4 (0,1mM); H_2O_2 (0.1mM), en una solución búffer de tartrato de sodio (100mM y pH 5,0). El porcentaje de sólidos fue del 5% p/p.

El pretratamiento con lacasa se hizo aplicando 4,32 U de lacasa/gramo de raquis, teniendo como criterio el rango máximo logrado de esta enzima en el pretratamiento biológico con *P. eryngii* (numeral 3.3.3.1), 30°C, 160 rpm, durante 24 horas.

4.2.4. Digestibilidad

La hidrólisis enzimática se realizó incubando el raquis pretratado con 25 FPU de celulasa, 15 U de xilanasa y 10 U de β -Glucosidasa (todas las enzimas se obtuvieron de Novozyme), por gramo de glucano ó de xilano en solución búfer de citrato de sodio (pH 4,8) durante 60 horas en un *shaker* orbital a 50°C y 150 rpm. El término de digestibilidad se expresó como un porcentaje de la cantidad máxima teórica de glucosa o xilosa disponible en el raquis, la cual se determinó previamente usando un procedimiento analítico de biomasa modificado a partir del método NREL (Laboratorio Nacional de Energías Renovables).

4.2.5. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

El efecto del pretratamiento con la enzima MnP sobre la superficie del material se observó a través de la técnica de emisión de campo, usando microscopía electrónica de barrido (EVO LS15 Zeiss).

4.2.6. Análisis infrarrojo (FTIR)

El análisis infrarrojo del raquis de palma se llevó a cabo con un espectrómetro NEXUS 670 (Thermo Nicolet Corporation, Madison, WI). Las muestras analizadas consistieron de, una primera con material lignocelulósico pretratado con el hongo *Pleurotus eryngii* (según las

condiciones presentadas en el Capítulo 3) y una muestra de raquis pretratado con extractos crudos de lacasa, provenientes del hongo *Pleurotus eryngii*.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Digestibilidad

El pretratamiento biológico de materiales lignocelulósicos utilizando hongos (sistemas *in vivo*) se ha estudiado sobre diferentes subproductos agroindustriales como la paja de trigo (Salvachúa et al., 2011), paja de arroz (Yu et al., 2010), rastrojo de maíz (Wan & Li, 2010), etc. En todos estos trabajos, las principales desventajas fueron los tiempos prolongados necesarios para el pretratamiento, además de la poca selectividad en la remoción de lignina que disminuye el potencial de azúcares disponibles en el material de estudio. Estas causas han motivado el uso de la aplicación directa de enzimas ligninolíticas. Sin embargo, aún las interacciones de estas enzimas con las celulasas involucradas en la etapa de digestión de la celulosa, no está totalmente dilucidadas (Wang et al., 2013). Por este motivo es necesario el estudio y la exploración de estos sistemas *in vitro* para la remoción de lignina.

El uso de enzimas lignolíticas *in vitro* para el tratamiento de materiales sólidos ya se ha llevado a cabo y se ha reportado por algunos autores para la deslignificación de pulpa de papel, la activación de lignina y fibras para la producción de ciertos tipos de madera comercial, entre otros (Lu, Moreira, Pablo, Lema, & Feijoo, 2008; Unbehaun, König, Spindler, & Kerns, 2008). No obstante, no existen reportes previos sobre el uso de MnP en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, para la producción de bioetanol.

En la Figura 4.3. se presentan los resultados de digestibilidad de celulosa y hemicelulosa obtenidos en el pretratamiento enzimático de raquis con MnP, lacasa y biológico con PE. Los resultados muestran un incremento en la digestibilidad de la hemicelulosa en el material

pretratado con MnP (33,2%), en comparación con los resultados obtenidos para el raquis crudo (21,2%, $p = 1,20E-3$), y con pretratamiento alcalino (21,8%, $p = 1,68E-3$). La combinación de los pretratamientos alcalino y enzimático (RA-MnP) incrementa la digestibilidad de la hemicelulosa por encima del 40,5%; no obstante, la digestibilidad de la celulosa no se incrementa. En términos generales la digestibilidad de celulosa no aumenta respecto al control ($p = 0,865$).

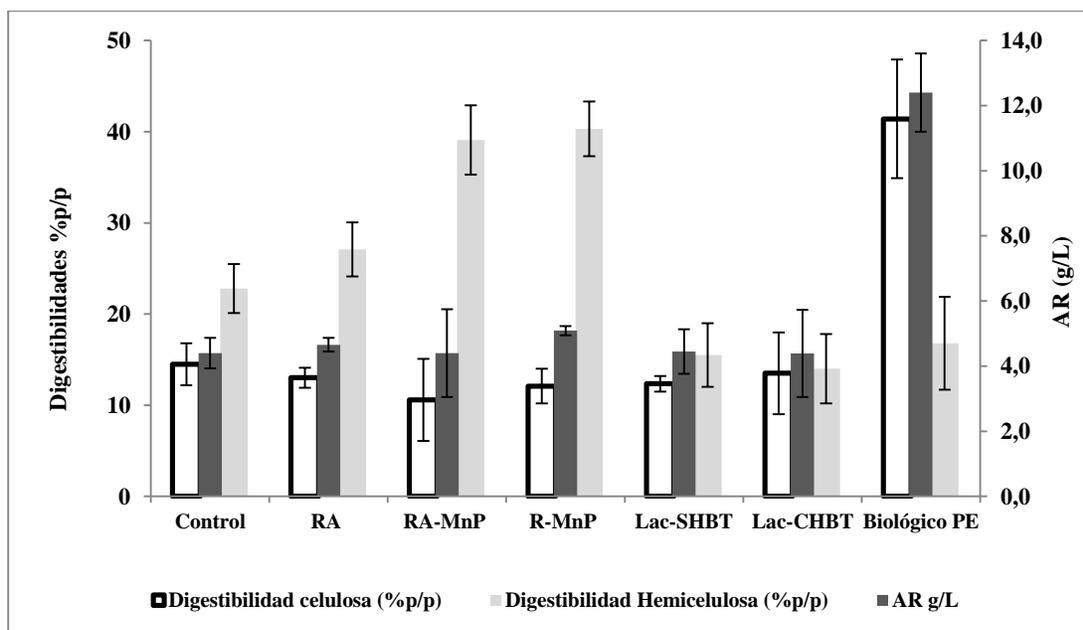
Adicionalmente, en esta misma figura (4.3) el pretratamiento con los extractos crudos de lacasa sobre el raquis, no presentaron incrementos en las digestibilidades de la holocelulosa. Sin embargo, si se comparan estos valores con los resultados obtenidos en Capítulo 3 con el hongo *P. eryngii*, se observa que el pretratamiento biológico permite incrementar la digestibilidad de la celulosa ($p = 0,0014$), mientras que en el pretratamiento enzimático se obtiene una mayor digestibilidad en la fracción hemicelulósica, cuando se hace el pretratamiento con MnP, lo cual representa un incremento del 200% respecto al crudo. Con respecto a los azúcares reductores totales, la máxima concentración que se obtuvo para el pretratamiento enzimático fue de 5.6 g/L para la muestra RA-MnP, mientras que el pretratamiento biológico presentó un máximo de 12.4 g/L.

Wang et al. (2013) encontraron disminuciones del 3,8% en los rendimientos de la digestión enzimática (mg de AR/g), (similar al obtenido en este estudio), al aplicar extractos crudos de lacasa de *Phanerochaete chrysosporium* sobre residuos de maíz. Dichas disminuciones fueron atribuidas a efectos inhibitorios de los compuestos fenólicos liberados por la acción de la lacasa, sobre las celulasas. Gracias a ello al implementar un sistema de lavado, luego del pretratamiento con enzimas, la digestión posterior mejora en 11,7%. Por su parte Qiu & Chen (2012), utilizaron lacasas para complementar la acción de celulasas en la digestión de paja explotada al vapor, logrando incrementos del 25,2% en la digestión de la celulosa.

La lacasa es una fenoloxidasa que oxida un amplio rango de polifenoles, mediante reacciones de polimerización, depolimerización, metilación y desmetilaciones (Eun et al., 2014). Por lo tanto, en los pretratamientos enzimáticos con lacasa se pueden presentar repolimerización de

la lignina externa en la lignocelulosa. Qiu & Chen (2012), en su estudio sobre paja de trigo, recomiendan hacer estudios detallados de la carga enzimática de la lacasa, debido a que valores altos pueden favorecer las reacciones de repolimerización, disminuyendo el acceso de las celulasas y por tanto de la digestiones enzimáticas. Si bien en este estudio se utilizaron 4,32 U lacasa/g raquis, tomando como base el comportamiento que se presentó en el sistema biológico (Capítulo 3), también cabe anotar que esta cantidad de lacasa supera en 7,8 veces al valor encontrado por Qiu & Chen (2012) (0,55U de lacasa/g), lo cual favorece la mayor digestión de celulosa (84,23%). Lo antes expuesto puede explicar porque la digestibilidad del raquis de palma no aumentó luego del pretratamiento con lacasa.

Figura 4.7. Pretratamiento enzimático de raquis *in vivo* con *P. eryngii* e *in vitro* con extractos enzimáticos crudos de MnP y lacasa.



Los resultados con el sistema Lac-CHBT no presentan diferencia con el sistema Lac-SHBT, lo cual no permitió evidenciar la función del mediador en la remoción de lignina sobre raquis de palma. Estos resultados son contrarios a los logrados por Camarero et al., (2004), cuando utilizó el sistema Lacasa-mediador (lacasa de *Pleurotus eryngii*) para el blanqueamiento de madera, en el cual disminuyó en una unidad del número Kappa respecto al control con el uso

de HBT, decrecimiento que no se presentó en lacasa-mediador con ABTS. (Qiu & Chen, 2012) lograron incrementos desde 64,35 a 72,27% de la digestibilidad de celulosa, cuando en la remoción de lignina usaron el sistema lacasa-ABTS.

El interés por la MnP se ha incrementado desde su descubrimiento, debido a su potencial de aplicación en el biopulpeo, bioblanqueo y biorremediación (Janusz, 2013). (Hofrichter, 2002) estudió la desintegración de cuatro ligninas sintéticas con MnP de *P. chrysosporium* en presencia de ácido malónico como agente quelante, con miras a su aplicación en biopulpeo. De manera complementaria, se evidencia en este estudio que la aplicación de MnP sobre raquis de palma mejora la digestibilidad el material, lo que muestran un uso potencial adicional de esta enzima.

4.3.2. Análisis SEM

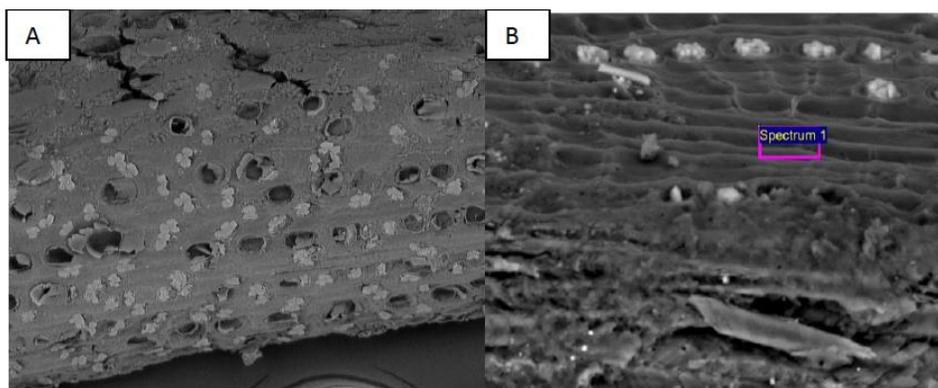
La imagen presentada a continuación (Figura 4.4.) muestra la acción de la enzima MnP sobre la superficie del material. Como se observa, se presenta un cambio en la morfología de la superficie (Figura 4.4. (b)) de las muestras expuestas al pretratamiento, representado en la falta de homogeneidad y presencia de irregularidades, dejando expuestos los cristales de sílice, (áreas blancas en la Figura). Estos cambios superficiales pueden deberse a la eventual mineralización parcial de las estructuras aromáticas de la lignina en CO₂, ocasionadas por la enzima.

4.3.3. Análisis infrarrojo

Los principales cambios con respecto al material crudo se presentan en la Figura 4.5. En las bandas con números de onda de 1461-1462 cm⁻¹, 1300-1450 cm⁻¹ y 1237-1241 cm⁻¹ se puede apreciar la ausencia de vibraciones en los enlaces en las regiones de 1461 y 1462 cm⁻¹ por parte del material pretratado con el hongo, al igual que el material pretratado con lacasa. En esta región se manifiesta la vibración del enlace -C=C- del anillo aromático de la unidad

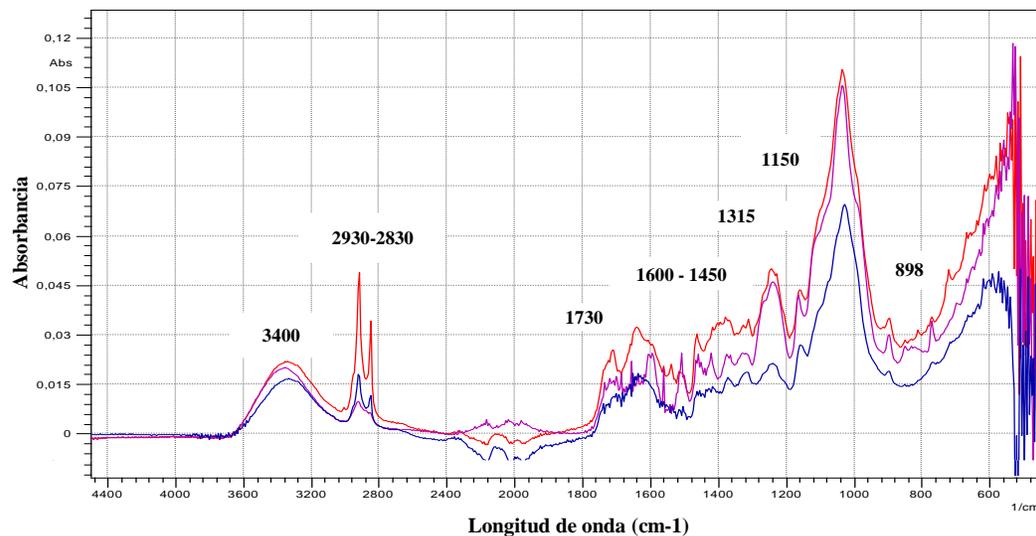
fenilpropano de la lignina, indicando de este modo el comportamiento oxidativo de ambos pretratamientos (Anderson, Nel, & Lucía, 2012; Xu, Yu, Tesso, Dowell, & Wang, 2013; Yang et al., 2010).

Figura 4.8. Análisis SEM para el raquis sin A) sin pretratamiento, B) pretratamiento enzimático usando MnP (RA-MnP)



La ausencia en la lectura de los valores a 1300 y 1340 cm^{-1} únicamente para la muestra tratada con el hongo PE indica que el pretratamiento ha afectado los anillos de guayacilo (G) y siringilo (S) de la estructura de la lignina en sus enlaces C-O y C-H (Anderson, Nel, & Lucía, 2012; Xu, Yu, Tesso, Dowell, & Wang, 2013; Yang et al., 2010). Este resultado no se evidencia en el espectro del raquis pretratado con lacasa, indicando la necesidad de una acción sinérgica de las enzimas ligninolíticas, situación que si existe en el pretratamiento con el hongo. Estos resultados se complementan con la observación de la disminución en las vibraciones propias de las bandas a $1237\text{-}1241\text{ cm}^{-1}$ en donde se identifica, en mayor medida, el anillo guayacilo de la lignina, claramente afectado por ambos pretratamientos. Las bandas por debajo de 919 cm^{-1} , se presentan intactas y corresponden a los enlaces glucosídicos presentes en la hemicelulosa y en la celulosa, indicando, de esta forma, que estas fracciones permanecen inmodificables tras el pretratamiento (Xu et al., 2013).

Figura 4.5. Espectro infrarrojo del raquis de palma crudo (línea roja), pretratado biológicamente con el hongo *P. eryngii* (línea azul) y pretratado con extracto crudo de lacasa obtenido del hongo *P. eryngii* (línea violeta).



Como complemento a la Figura 4.5., en la Tabla 4.1. se presentan los valores obtenidos de espectros infrarrojos de tres diferentes muestras de raquis de palma. La columna RC indica el material crudo sin ningún tipo de pretratamiento. La columna R-PE indica que el material fue pretratado biológicamente con el hongo *Pleurotus eryngii* y la tercera columna indica el pretratamiento con extractos crudos de Lacasa proveniente del hongo *Pleurotus eryngii*.

Tabla 4.7. Número onda y transmitancias obtenidas a partir de los espectros infrarrojos (FTIR) para tres muestras de material lignocelulósico sin pretratar RC, pretratado biológicamente con *Pleurotus eryngii* (R-PE) y con extractos crudos de Lacasa (R-Lac)

Número de onda/cm	Descripción del espectro infrarrojo	RC		R-PE		R-Lac(PE)	
		Número de onda/cm	%	Número de onda/cm	%	Número de onda/cm	%
3395 - 3397	Extensión en enlaces O-H	3284,77	95,5	3284,77	96,5	3371,57	95,5
		3240,2	96	3250,05	96,5	3338,78	95,5
		3223,05	96,5	3172,9	98	3313,71	95,5
		3103,46	98			3280,92	96
2850 - 2937	Extensión en enlaces C-H (CH ₂ , CH ₃)	2963,03	96	2916,37	96	2918,3	98
		2916,37	89	2848,86	97	2850,79	98,5
		2848,86	92				
1688 - 1708	Extensión en enlaces no conjugados C=O	1708,93	94			1734,01	96,5

Numero de onda/cm	Descripción del espectro infrarrojo	RC		R-PE		R-Lac(PE)	
		Numero de onda/cm	%	Numero de onda/cm	%	Numero de onda/cm	%
1600 - 1602	Extensión en C=O y vibración en compuestos aromáticos; S > G; condensado G > eterificada G Vibración en la estructura aromática; G > S	1643,36	93	1606,7	96	1593,2	94,5
1509 - 1513		1593,28	94				
1461 - 1462	Flexión en C-H, CH ₃ , Flexión asimétrica del enlace CH ₂ en estructura aromática de lignina	1463,97	93,5				
1300 - 1450	Anillo S y G sustituido en la posición 5, flexión en enlace C-O	1377,17	92,5	1315,45	96	1448,54	94,5
		1385,6	92,5			1419,61	95
		1327,03	93			1368,67	95
		1311,59	92,5			1327,03	95
						1313,52	95
1237 - 1241	Extensión en grupo metoxilo, enlaces C-C y C-O, tensión en C=O (condensado G > eterificado G)	1242,16	89	1238,3	95	1238,3	90
		1228,86	89,5				
		1207,44	91,5				
1168 - 1169	Características HGS; extensión en enlace tipo ester conjugado C=O	1159,22	90,5	1153,43	93,5	1163,08	91
1035 - 1045	Flexión en estructura aromática en enlace C-H, G > S; Extensión en enlace tipo alcohol primario C-O	1003,86	77,5	1028,06	85	1033,85	78,5
919	Flexión en enlace C-H aromático fuera de plano	898,83	92,5	898,83	96	896,9	93,5
						850,61	94
834 - 835	Flexión en enlace C-H del anillo S fuera de plano	848,68	93,5	848,68	93,5		
469 - 800	Flexión en los enlaces Si-H, Si-O-Si, C-N y O-CH ₃	812,03	93	789,6	95	829,39	94
		785,6	92,5	717,62	94		
		719,45	89	630,72	90	821,68	94
		690,52	89	592,15	90	789,6	92,5
		580,57	82,5			651,94	89
		430,13	85			559,36	81,5

4.4. Conclusiones

A partir de los resultados experimentales, fue posible evidenciar que la aplicación de los extractos crudos de MnP actúan sobre la lignina del raquis, incrementado a 33,2% la digestibilidad de la hemicelulosa, con respecto al raquis crudo (21,2%). De igual manera, el complementar la acción de la enzima MnP con un lavado alcalino mejoró la digestibilidad de hemicelulosa hasta 40,5% (RA-MnP). Estos resultados muestran como la combinación de

varios pretratamientos pueden complementar el efecto preoxidante y la desestabilización de la macromolécula, durante la remoción de lignina.

El pretratamiento con crudos enzimáticos tanto con MnP como con lacasa, no incrementaron la digestión de la fracción de celulosa. Adicionalmente, el tratamiento enzimático con lacasa tampoco incrementa la digestión de la hemicelulosa.

A pesar de que la digestión de la holocelulosa no se incrementó por la acción de la lacasa, el análisis FTIR evidenció la acción de esta enzima sobre lignina, al presentar cambios en sus bandas características ($1600, 1450 \text{ cm}^{-1}$); este aspecto puede atribuirse a la repolimerización de la lignina por la acción misma de la lacasa.

Es importante evaluar la combinación de crudos enzimáticos de MnP y lacasa conjuntamente, con el fin de mejorar el proceso de deslignificación y favorecer el efecto sinérgico que pueda presentarse entre estas enzimas, en los pretratamientos biológicos *in vivo*.

Capítulo 5



Capítulo 5

Pretratamiento físico, químico y digestibilidad de raquis

Resumen

Uno de los pasos más importantes en la producción de combustibles líquidos a partir de biomasa lignocelulósica es el pretratamiento. Su importancia radica en la necesidad de liberar los azúcares contenidos en la celulosa y en la hemicelulosa, protegidos por la lignina, considerada altamente recalcitrante. En este capítulo se exploró la remoción de lignina de raquis mediante el pretratamiento alcalino con NaOH. A través de un Diseño Experimental Central Compuesto (DECC) se encontró que a 120°C, 2% NaOH y 1,9 h se favorece la recuperación de $0,475 \pm 0,02$ g AR/g raquis, utilizando una relación sólido/líquido de 1/20 (g de raquis/mL). Posteriormente, aplicando las condiciones óptimas encontradas para el tratamiento alcalino, se evaluó el efecto de la extrusión del material y de la carga sólido/líquido en la digestión. Se observó que la aplicación de extrusión y de una relación sólido/líquido de 1/7,5 logran aumentar en 170% la recuperación de los azúcares reductores y, en 192%, la concentración de glucosa en comparación con la relación 1/20. Esto permitió obtener hidrolizados con $75,8 \pm 8,3$ g AR/L y $44,8 \pm 2,1$ g glucosa/L, disponibles para el

proceso fermentativo posterior. Adicionalmente, se evaluó la aplicación del cóctel enzimático Cellic HTec2 en la digestión del raquis, el cual favoreció la recuperación selectiva de los azúcares presentes en la hemicelulosa tras 4 h de digestión (hidrolizados con $29,5 \pm 1,6$ g AR/L y $2,9 \pm 0,1$ g glucosa/L).

5. 1. Introducción

Los pretratamientos de biomasa lignocelulósica incluyen métodos biológicos, mecánicos, químicos y combinaciones entre ellos. La elección de alguna de estas metodologías debe considerar diferentes aspectos, entre los que se incluyen, la compatibilidad con el tipo de biomasa, las enzimas y el microorganismo a emplear en la fermentación. Estos factores son importantes puesto que el costo de un pretratamiento no radica exclusivamente en su costo, sino que posee un impacto sobre el desempeño y, en consecuencia, sobre el costo de las etapas posteriores del proceso. En general, el costo de un pretratamiento depende de diferentes factores en estudio (vapor, ácido, álcali, hongos, enzimas, etc) y el acondicionamiento de los efluentes. Por otra parte, la efectividad de un pretratamiento se determina bajo ciertos criterios como la minimización del consumo energético y de la producción de compuestos inhibidores, la conservación de la fracción holocelulósica y la generación de efluentes no tóxicos, o el bajo costo en su tratamiento (Haghighi Mood et al., 2013).

De la amplia gama de pretratamientos, el pretratamiento químico es uno de los más frecuentemente empleados en la degradación de lignina, dada su capacidad para disminuir el grado de polimerización y la cristalinidad de la celulosa en la biomasa. Los compuestos químicos empleados incluyen agentes oxidantes, álcalis, ácidos, sales, explosión con vapor, agua caliente, amoníaco, explosión con CO₂, líquidos iónicos, *organosolv*, ozonólisis, entre otros (Sant et al., 2013; Behera, et al., 2014; Geng, 2011). En este trabajo se emplean tratamientos alcalinos para la remoción de lignina, teniendo en cuenta su selectividad y

efectividad en la ruptura de enlaces éster entre la lignina, la hemicelulosa y la celulosa (Tan et al., 2013).

Un pretratamiento exitoso producirá una alta remoción de lignina, y dará lugar a una estructura en la cual la holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) estará expuesta. La exposición de dichas fracciones permite a la enzima y/o microorganismo acceder más fácilmente a las unidades estructurales del polímero, como etapa previa al proceso de fermentación. Para la biomasa lignocelulósica, las unidades estructurales que se encuentran en mayor proporción son la D(+)-glucosa, en la celulosa, y la xilosa y galactosa, en la hemicelulosa. El hecho de que estas unidades azucaradas se encuentren asociadas como polímeros, requiere de la aplicación de una etapa de hidrólisis o escisión de las cadenas poliméricas, conocida como sacarificación.

5.1.1. Pretratamiento alcalino

El pretratamiento alcalino es uno de los métodos químicos más estudiados y empleados para favorecer la biodigestibilidad de la celulosa. Este pretratamiento incluye el uso de varios compuestos como hidróxido de sodio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, peróxido de hidrógeno y sus combinaciones (Behera et al., 2014). Los pretratamientos alcalinos se llevan a cabo en condiciones normales y en él ocurren reacciones de solvatación y saponificación que generan un hinchamiento de la biomasa, disminución de fenómenos estéricos y aumento en la reactividad de los polisacáridos; esto permite que la biomasa sea más accesible a la acción de enzimas y microorganismos (Balat et al., 2008; Hendriks & Zeeman, 2009; Sant et al., 2013). La saponificación por ejemplo, tiene lugar en los enlaces éster entre xilanos y lignina, causando remoción parcial tanto de lignina como de hemicelulosa (Sant et al., 2013). Además de la remoción de la lignina, los lavados alcalinos también remueven inhibidores, sales, furfural y ácidos fenólicos. Una de las limitaciones principales del pretratamiento alcalino, es la conversión del álcali en sales irrecuperables o su incorporación a la biomasa, generando un

efecto negativo a nivel de costos del proceso (Balat et al., 2008; Hendriks & Zeeman, 2009; Menon & Rao, 2012).

La aplicabilidad de estos métodos en el pretratamiento del raquis ha sido experimentalmente comprobada. Sudiyani et al., (2013) usaron soluciones de NaOH al 10% p/p durante 30 minutos a 140°C para pretratar raquis de palma. Bajo estas condiciones lograron disminuir la concentración de lignina y de hemicelulosa y, de esta manera, concentrar la celulosa hasta un 68,86 %. Luego de un proceso de sacarificación, alcanzaron digestiones de celulosa del 67,5%.

De igual manera, Minhee Han, et al. (2011) estudiaron la implementación del uso de NaOH para el pretratamiento de raquis de palma y encontraron que una concentración del 2,89 mol/L (aprox 11% p/v) de NaOH es óptima para la remoción de lignina y para favorecer la recuperación del 89,61% de celulosa, presente en el material.

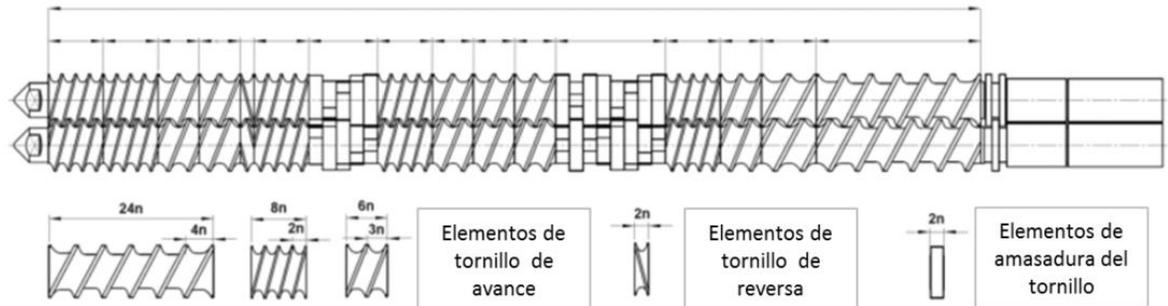
5.1.2. Pretratamiento físico (extrusión)

La extrusión, que en principio se diseñó para aplicaciones en la industria de polímeros y alimentos, es una técnica que está siendo aplicada en el pretratamiento de materiales lignocelulósicos. El uso actual de estos materiales, requiere condiciones que favorezcan las etapas posteriores de hidrólisis enzimática. Así, los pretratamientos físicos favorecen la disminución de la cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización y el aumento de área superficial, disminuyendo el tamaño de partícula y favoreciendo el acceso de las enzimas durante las etapas de digestión (Menon & Rao, 2012).

Durante el proceso de extrusión, la biomasa se calienta, mezcla y tritura, dando como resultado materiales con modificaciones físicas y químicas. Este proceso, presenta algunas ventajas como el alto grado de trituración y corte, y la transferencia efectiva de calor y de mezcla (Behera et al., 2014; Liu et al., 2013). De esta forma, el proceso de extrusión permite la combinación de un pretratamiento termomecánico y químico (Sant et al., 2013).

Los extrusores se componen típicamente de un barril con uno o varios tornillos rotativos que presionan y transportan el material continuamente, permitiéndoles alimentar la biomasa, bajo condiciones controladas, a las etapas subsiguientes. La extrusión es un proceso altamente versátil dado que permite el diseño de diferentes configuraciones, de acuerdo a las necesidades del proceso (Sant et al., 2013). Entre las configuraciones más comunes se encuentran los extrusores de un solo tornillo, de tornillos gemelos o extrusores de tornillos múltiples. En la Figura 5.1, se presenta un ejemplo de una configuración de tornillos gemelos. Los extrusores de tornillo y principalmente los de tornillos gemelos permiten generar alta compresión sobre el material; de esta manera, es posible lograr además del cambio en la morfología, separaciones sólido líquido, e incidir sobre las fracciones estructurales del material (Sant et al., 2013).

Figura 5. 1. Ejemplo de una configuración de extrusor de tornillos gemelos. Se presentan las partes que componen dicho sistema y que incluyen elementos de avance y reserva, y elementos obstructivos de amasadura. Los elementos son intercambiables para ser adaptados a los diferentes tipos de biomasa y a las condiciones de operación, como el tiempo de retención y la fuerza de corte. (Sant et al.,2013)



El desempeño enzimático en los procesos hidrolíticos puede llegar a ser de hasta tres a seis veces más alto en biomasa extruida que en el material sin pretratar (Sant et al., 2013). Este rendimiento mejorado es el resultado de cambios estructurales en el material tales como la fibrilación de la celulosa, el incremento en el área superficial, el tamaño del poro y la no generación de compuestos inhibidores, los cuales facilitan el acceso de las enzimas a la microestructura del material. Dado que el proceso de extrusión no afecta significativamente la

cristalinidad de la celulosa, no se presentan incrementos en la digestibilidad de la biomasa. Adicionalmente, el proceso de extrusión permite la combinación con otros pretratamientos a fin de mejorar el proceso de remoción de lignina; a partir de esta aproximación, se han obtenido incrementos en los rendimientos de glucosa de hasta un 50% (Zheng & Rehmann, 2014). Entre las combinaciones más empleadas se encuentra la extrusión con lavados alcalinos.

5.1.3. Digestibilidad de la holocelulosa

La eficiencia del proceso de sacarificación o hidrólisis se ve determinada, entre otros factores, por los rendimientos y el tipo de pretratamiento empleado. Se espera que el pretratamiento influya sobre el tamaño de partícula, el grado de polimerización de la celulosa y la configuración de sus fibras, y que de igual forma afecte las estructuras que protegen la celulosa como la lignina, pectina, las proteínas, y los minerales, como la sílice, y finalmente, evite la formación de compuestos inhibitorios. Al modificar de forma efectiva la estructura lignocelulósica del material, es posible obtener procesos hidrolíticos eficientes que permitan la biodigestión de los monómeros azucarados para la producción química o biológica de una gran variedad de metabolitos (Binod et al., 2010; Van Dyk & Pletschke, 2012).

La aplicación de diversos tratamientos sobre raquis, permite obtener valores de digestibilidad muy variados. Cuando Jung et al., (2011) utilizaron soluciones de amonio al 7% p/p, y cargas enzimáticas de 60 FPU/g de glucano, lograron incrementar la digestibilidad de la celulosa de 11,9% (en el material crudo) hasta 95,4%. Posteriormente implementaron un sistema SSF para evaluar la producción etanol y lograron rendimientos del 78,3% (13,3 g de etanol /L).

Tan et al., (2013) lograron digestibilidades del 83% de la celulosa (0,304 g glucosa/ g EFB, 72h) usando una carga enzimática de 20FPU/g de material seco, luego del pretratamiento con 10% de NaHSO₃ y 1% de H₂SO₄ a 180°C por 30 min. A partir de estos resultados, y luego de caracterizar el licor residual del pretratamiento, evaluaron la viabilidad técnica de operar una

biorrefinería a partir de raquis de palma, para la obtención de xilano/xilosa, lignosulfonato e hidroximetil furfural (HMF).

5.1.3.1. Sacarificación de celulosa

Las cadenas de celulosa se componen básicamente de unidades de glucosa, enlazadas a través de uniones beta en las posiciones 1 y 4, conocidos como beta-glucanos, y que forman una matriz cristalina de fibras. El conocimiento de dicha microestructura ha permitido emplear enzimas celulolíticas o celulasas para el proceso de sacarificación. Las celulasas juegan un papel catalítico en la hidrólisis de la celulosa, pues dan como resultado un producto soluble a la vez que fermentable. Estas enzimas se producen naturalmente y se extraen a partir de hongos, bacterias y plantas. *Thricoderma reesei* es un hongo comúnmente empleado en la producción de celulasas debido a que posee un sistema enzimático eficiente, estable y de carácter extracelular. No obstante, presenta baja actividad β -glucosidasa lo que implica hidrólisis incompletas (Bhalla et al., 2013; Menon & Rao, 2012).

Las celulasas son catalizadores naturales y se clasifican en base a variaciones estructurales, dando lugar a endoglucanasas o 1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4), exoglucanasas, que incluyen 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasas o celodextrinasas (EC 3.2.1.74) y 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasas o β -glucosido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21). La acción sinérgica de estas enzimas se lleva a cabo bajo las siguientes etapas: las endoglucanasas hidrolizan la celulosa en forma aleatoria pero a través de la ruptura de los enlaces no covalentes de las fibras de la celulosa, de tal forma que se producen oligosacáridos (cadenas de bajo peso molecular), celobiosa (moléculas compuestas por dos unidades de glucosa) y, finalmente, glucosa. Las exoglucanasas por su parte, rompen los enlaces β -1,4-D-glucosídicos liberando celobiosa y cadenas de 2 y 4 unidades de glucosa. Por último, las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa remanente, convirtiéndola en glucosa (Bhalla et al., 2013; Moya & Torres, 2012; Menon & Rao, 2012).

5.1.3.2. Sacarificación de la hemicelulosa

La hemicelulosa contiene heteropolisacáridos formados por hexosas y pentosas que conforman una red amorfa y ramificada. Las hemicelulasas no solo se emplean para la liberación de sus unidades estructurales; al hidrolizar esta fracción, se expone la celulosa y se permite el acceso a la acción de las enzimas. La hidrólisis de la hemicelulosa se centra principalmente en la ruptura de los enlaces presentes en los xilanos y el manano-oligosacárido, otro polímero estructural importante en la hemicelulosa, pero menos estudiado (Bhalla et al., 2013).

Dada la heterogeneidad en la composición de la hemicelulosa, el complejo enzimático se compone de proteínas con múltiples dominios. Uno de ellos es el dominio catalítico, responsable de la reacción de hidrólisis y otro, el dominio enlazante, que media en la unión entre la enzima y el sustrato (Menon & Rao, 2012). Las dos enzimas principales encargadas de la despolimerización de la hemicelulosa son la endo-1,4- β -D-xilanasas y la endo-1,4- β -D-mananasas. No obstante, la hidrólisis completa de la hemicelulosa requiere de la acción sinérgica de enzimas adicionales como β -xilosidasas, α -L-arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas, acetil xilano esterasas, ácido hidroxicinámico esterasas, β -1,4-manosidasas y arabino endo-1,5- α -L-arabinosidasas (Bhalla et al., 2013).

Las hemicelulasas son producidas por diferentes organismos entre los que cabe mencionar los hongos, las bacterias y levaduras, las algas marinas, los protozoos y caracoles, los crustáceos, los insectos y las semillas, siendo los hongos filamentosos los que producen mayores niveles de xilanasas. En la actualidad, industrialmente se usan especies como *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Termomonospora fusca*, *T. reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *T. koningii* (Menon & Rao, 2012).

5.1.4. Relación sólido/líquido y su influencia en el proceso de digestión

La cantidad de material a hidrolizar y el coctel enzimático constituyen la relación sólido-líquido, y se le considera como un factor influyente en los rendimientos de la digestión del material lignocelulósico. La fase fluida es esencial para el desempeño de las enzimas por razones de transferencia de masa y lubricidad. El medio líquido incrementa la efectividad de las reacciones enzimáticas y químicas, debido a que provee una matriz de soporte para solubilizar y ayudar en el proceso de transferencia de masa. Así mismo, la fase líquida reduce la viscosidad del material húmedo y la fricción entre las partículas, disminuyendo los esfuerzos cortantes y, en última instancia, la demanda energética necesaria para el mezclado.

Por otra parte, la naturaleza del material y del pretratamiento empleado, dan como resultado propiedades físicas y químicas específicas que influyen en la forma como la biomasa absorbe el agua, y en sus propiedades reológicas (Modenbach & Nokes, 2013).

La optimización de la carga de sólidos en la digestión enzimática, es una etapa importante porque evita el uso excesivo de enzimas y por lo tanto mejora la economía del proceso. A pesar de que el costo de las enzimas ha disminuido considerablemente en los últimos años, la hidrólisis aún se considera como una de las etapas más costosas en la producción de azúcares fermentables, con potencial aplicación en procesos fermentativos (Modenbach & Nokes, 2013). La implementación de un proceso de sacarificación con una alta carga de sólidos es motivada por las ventajas económicas que acarrea, esto es, menores costos de capital por la disminución de los volúmenes, menores costos de operación por la menor energía necesaria en las etapas de calefacción y refrigeración, y menor costo de procesamiento aguas abajo. Sin embargo, la hidrólisis con altas cargas de sólidos aumenta la fracción de sólidos no solubles en los reactores e induce aumentos bruscos en la viscosidad, haciendo que la mezcla se comporte como un fluido no newtoniano (Hodge et al., 2009).

Normalmente la carga de sólidos en procesos de hidrólisis enzimática oscilan entre el 5 y 20% (g de material/100 mL) (Modenbach & Nokes, 2013). Las altas cargas permiten concentrar azúcares, a consta de una posible reducción en la conversión de celulosa, debido a efectos

inhibitorios, o a dificultades operacionales, dada la consistencia del material. La implementación de un proceso de hidrólisis alimentado (Caspeta et al., 2014), permite minimizar los problemas de consistencia del material. Al usar raquis de palma pretratado con NaOH, la agitación en la etapa de digestión se hace imposible e impráctica para cargas de sólidos superiores al 25% (Minhee Han et al., 2011).

5.1.5. Alcance

El objetivo de este estudio fue promover la recuperación de la mayor cantidad posible de azúcares reductores, a partir de la evaluación del efecto de diferentes niveles de factores operativos en la etapa de pretratamiento (temperatura (T), tiempo (t) y concentración de NaOH), sobre la digestibilidad del raquis, usando técnicas estadísticas. Adicionalmente, se estudió el efecto de la extrusión y de la relación sólido/líquido más favorable para el proceso de digestión enzimática utilizando raquis pretratado químicamente aplicando las condiciones óptimas de T, t y concentración de NaOH.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Diseño experimental y análisis estadístico de la evaluación del pretratamiento alcalino sobre raquis crudo

Se utilizó un Diseño Experimental Central Compuesto (DECC), con 4 repeticiones en el punto central, para estudiar el efecto de la temperatura (A), el tiempo (B) y la concentración de NaOH (C), sobre la digestibilidad del raquis crudo (RC). Los niveles para las diferentes variables de estudio se seleccionaron, considerando intervalos de valores reportados en la literatura para materiales lignocelulósicos, y buscando lograr pretratamientos económicamente viables, así:

- Tiempo entre 1 – 2h.
- Temperatura entre 60 - 120°C.
- Concentración de NaOH entre 0.5 y 3.5 %p/v.

La variable de respuesta que se evaluó fue la cantidad de azúcares reductores recuperados, por cada gramo de raquis pretratado (ARR, mg AR/g raquis), como indicativo de la digestibilidad del material. La cara de material para los diferentes tratamientos fue 0,2 gramos de material, atendiendo a las condiciones establecidas en la Tabla 5.1. La carga de sólidos usada fue de 5% p/v (g de raquis crudo/100 mL de solución de NaOH). El tamaño de partícula para el material crudo varió entre 1 y 3mm.

El análisis estadístico de los resultados se hizo empleando el *software TrialDesing Expert* versión 7.0. (Stat- Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). Este análisis permitió identificar los efectos individuales de cada uno factores evaluados, así como sus posibles interacciones, sobre el contenido de ARR, como variable de respuesta. La significancia estadística se determinó usando un análisis de varianza (ANOVA) y la metodología de análisis de superficie de respuesta. Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo, cuyo uso apropiado (R^2), permitió identificar aquellos valores de las diferentes variables de estudio que maximizan la variable de respuesta.

5.2.2. Digestibilidad enzimática

5.2.2.1. Evaluación de la digestibilidad enzimática

Para la evaluación de la digestibilidad enzimática se utilizaron las enzimas celulasas, β -glucosidasa, β -xilosidasa y xilanasa, adicionando los cocteles enzimáticos comerciales de Novozymes Cellic CTec2, Cellic HTec2 and NS50010 y empleando el protocolo adaptado NREL (Dowe & McMillan, 2008). El procedimiento se desarrolla de manera similar al presentado en el numeral 3.2.5.

El rendimiento de azúcares (ARR) se definió como el porcentaje de azúcares monoméricos liberados tras la hidrólisis enzimática, con respecto a los azúcares monoméricos iniciales, contenidos en la celulosa o hemicelulosa (Ec. 5.1.).

$$(ARR) = \frac{gATR \text{ luego de la hidrólisis}}{\left[\frac{g \text{ Celulosa inicial en el sólido}}{0.9} + \frac{g \text{ Hemicelulosa inicial en el sólido}}{0.88} \right]} * 100 \quad (\text{Ec. 5.1.})$$

5.4.2.2. Efecto de la extrusión y la carga de sólidos sobre la digestión enzimática

Con el fin de mejorar la recuperación de AR y las características reológicas en la etapa de hidrólisis del material, se realizó un proceso de extrusión sobre el raquis, como se indica en el numeral 2.2.1. El raquis extruido (RE) se sometió a pretratamiento alcalino, bajo las condiciones obtenidas del tratamiento sobre el material crudo, estudiadas en el numeral 5.4.1. Con este material se evaluaron las relaciones sólido(g)/líquido (mL), dentro de los intervalos reportados en la literatura para el material crudo (1/20) y para el material extruido (1/20, 1/10, 1/7,5 y 1/5), de tal manera que se permitiera una mayor recuperación de azúcares y se favorecieran las condiciones operacionales durante la digestión enzimática.

Tabla 5.1. Diseño experimental Central Compuesto para establecer las condiciones más favorables del pretratamiento alcalino del RC

Experimento	A:Tiempo (h)	B:Temperatura (°C)	C:NaOH (%p/p)
1	1,50	90	0,00
2	1,00	120	3,50
3	1,50	40	2,00
4	1,50	90	2,00
5	1,00	120	0,50

6	1,00	60	0,50
7	1,50	90	2,00
8	2,34	90	2,00
9	2,00	120	3,50
10	1,50	90	2,00
11	1,00	60	3,50
12	2,00	60	3,50
13	0,66	90	2,00
14	1,50	90	2,00
15	2,00	60	0,50
16	2,00	120	0,50
17	1,50	90	2,00
18	1,50	90	4,52
19	1,50	130	2,00
20	1,50	90	2,00

5.2.2.3. Digestibilidad de la fracción de hemicelulosa

Con el fin de evaluar la fermentación selectiva de la fracción de hemicelulosa (Capítulo 6), se estudió la hidrólisis del material extruido mediante la aplicación de la enzima Htec2 utilizando la carga de sólidos indicada en el numeral 5.4.2.1. Los azúcares recuperados en esta etapa, procedentes de la hemicelulosa, se denominaron azúcares reductores diferentes de glucosa (ARdG).

5.2.3. Análisis químico del material pretratado

Las modificaciones producidas por el pretratamiento químico sobre la superficie del material lignocelulósico, empleando NaOH, se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un equipo EVO LS 15 Zeiss. Para determinar el efecto del pretratamiento sobre el cambio en la estructura química del material, se realizó un análisis infrarrojo a una muestra de raquis crudo y a una muestra de material pretratada con álcali, empleando un equipo FTIR-Shimadzu, modelo IR Prestige-21

5.3 Resultados y discusión

5.3.1. Pretratamiento alcalino

A partir del análisis de varianza (Tabla 5.2) se observó que dos de los tres factores evaluados (T y NaOH) presentaron incidencia significativa sobre la recuperación de azúcares. Del mismo modo, la interacción de la temperatura con la concentración de NaOH (B*C) presentó significancia estadística sobre la variable de respuesta. Por el contrario, la variable tiempo, dentro del rango evaluado, no mostró significancia estadística frente a la variación de la recuperación de azúcares. Adicionalmente, se determinó que el modelo cuadrático es el que más se ajusta ($R^2 = 0.9208$) a los datos experimentales, con una “falta de ajuste” sin relevancia estadística.

Tabla 5.2. Resultados del ANOVA para determinar el efecto del pretratamiento alcalino sobre la recuperación de azúcares reductores (ARR)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	X ²	F	P (Prob>F)	
Modelo	0,19	9	0,021	85,77	<0,0001	Significativo
A – Tiempo	1,07E-03	1	1,07E-03	4,42	0,0619	
B – Temperatura	0,012	1	0,012	50,53	<0,0001	
C – NaOH	0,14	1	0,14	590,72	<0,0001	
AB	5,00E-07	1	5,00E-07	2,06E-03	0,9647	
AC	4,05E-05	1	4,05E-05	0,17	0,6917	
BC	3,04E-03	1	3,04E-03	12,52	0,0054	
A ²	4,48E-04	1	4,48E-04	1,85	0,2042	
B ²	1,22E-03	1	1,22E-03	5	0,0494	
C ²	0,05	1	0,05	204,49	<0,0001	
Residuo	2,43E-03	10	2,43E-03			
Falta de ajuste	1,84E-03	5	3,68E-03	3,12	1,19E-01	No significativo
Error puro	5,90E-04	5	1,18E-04			
Cor total	0,19	19				

En la ecuación 5.4 se presenta el modelo obtenido, el cual explica el comportamiento de los datos experimentales en un 92,08%.

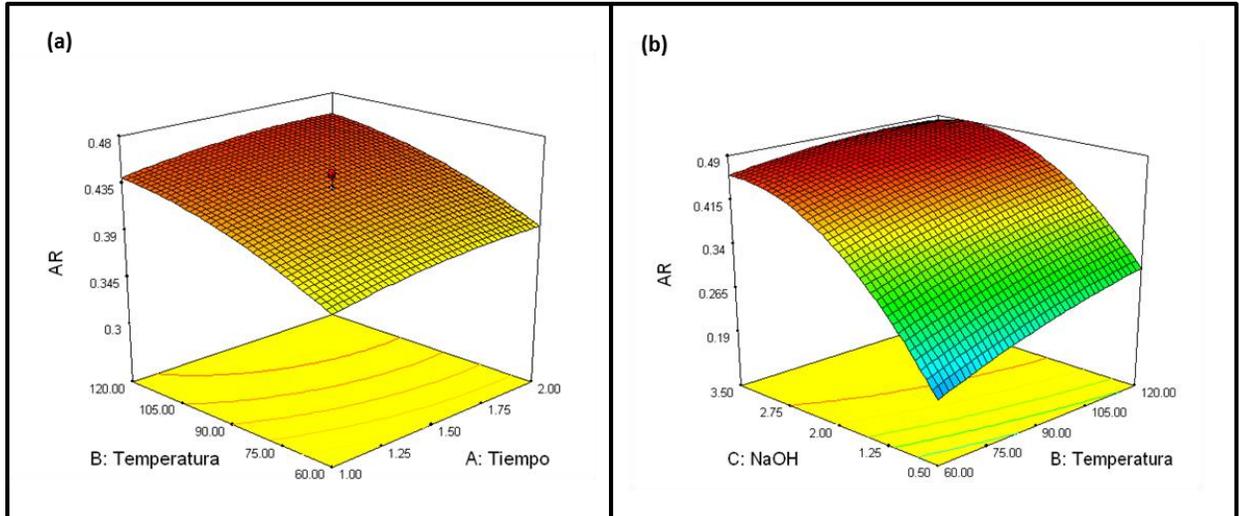
$$\text{ARR} = 0,43 + 8,867\text{E-}003 * A + 0,032 * B + 0,11 * C - 2,500\text{E-}004 * A * B + 2,250\text{E-}003 * A * C - 0,019 * B * C - 5,540\text{E-}003 * A^2 - 0,011 * B^2 - 0,068 * C^2 \quad (\text{Ec. 5.4.})$$

Una vez realizado el ajuste del modelo, se aplicó la función *Desirability* para obtener las condiciones de temperatura, tiempo y NaOH, que permitieran maximizar la recuperación de azúcares, a partir del raquis pretratado. A partir de los resultados del modelo, se observó que una T de 120, una concentración de NaOH del 2% y un tiempo de 1.9 h, permiten que el sistema alcance una recuperación de 0,459 g AR/g raquis (“Desirability” de 0,969). Este valor de ARR corresponde a una recuperación del 85% de los azúcares disponibles en el

material, representados en una digestión de hemicelulosa y celulosa de 92 y 60%, respectivamente. Han et al. (2011), en sus estudios sobre raquis de palma, se centraron solo en la recuperación de la fracción celulósica, logrando un 85% de recuperación. Sin embargo, en la etapa del pretratamiento, utilizaron 5,8 veces más soda que la usada en este estudio; para la digestión enzimática usaron 3,3 veces más carga enzimática. Estas condiciones operacionales desfavorecen la viabilidad económica del proceso.

En la Figura 5.2 (a) se observa la ausencia de curvatura asociada al factor tiempo, lo que confirma la poca influencia que tiene esta variable sobre la recuperación de azúcares del raquis (ARR). Por el contrario, en la figura 5.2. (b) se observa una curvatura muy marcada para la concentración de NaOH y la temperatura; lo anterior demuestra una vez más que, de los tres factores evaluados, la temperatura y la concentración de NaOH son los factores que tienen significancia estadística sobre el comportamiento de la variable respuesta. La zona de mayor recuperación de azúcares se encuentra a concentraciones por encima de 2% p/v; a partir de esta valor no se presentan incrementos significativos en el aumento de la variable respuesta. Del análisis del efecto de la temperatura se observa que a valores altos se alcanzan los mayores niveles de recuperación.

Figura 5.2. MRS de los azúcares reductores recuperados del raquis, en función de a) temperatura y tiempo y b) NaOH y temperatura

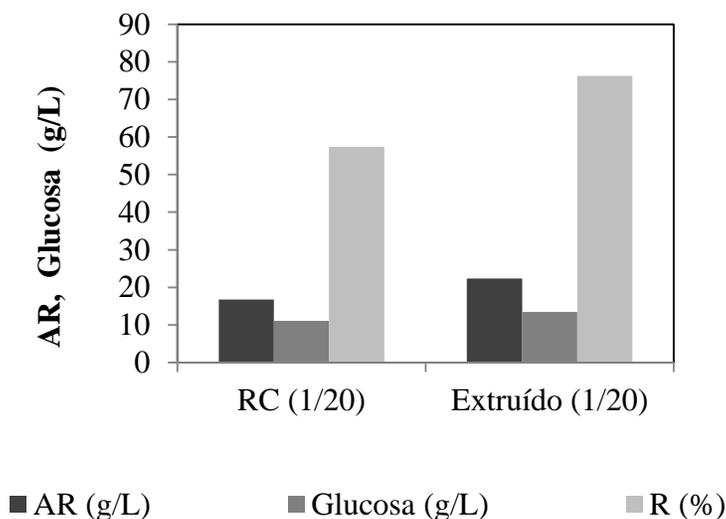


Posteriormente, se realizó un ensayo con dos réplicas en el que se usaron los valores óptimos obtenidos a partir de modelo estadístico (120°C, 2% NaOH y 1.9 h). Los resultados mostraron un rendimiento en la hidrólisis de $0,475 \pm 0,02$ g AR/g raquis, valor que representa una desviación de 0,01g g AR/g raquis, respecto del valor estimado por el modelo.

5.3.2. Efecto de la extrusión y la carga de sólidos sobre la digestibilidad del material

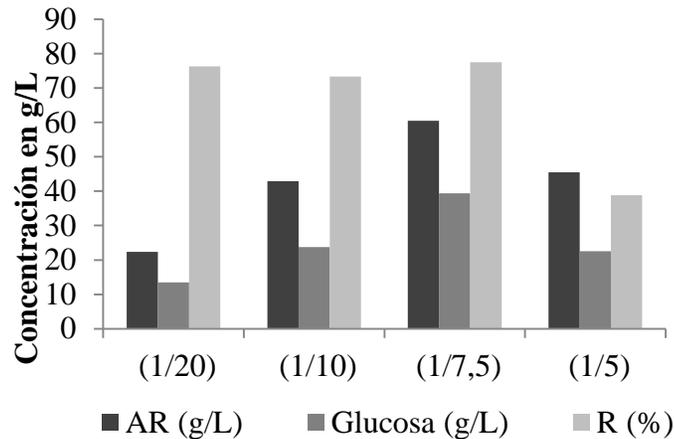
Como se observa en la Figura 5.3., la extrusión del material crudo permitió incrementar el rendimiento de la digestión en 33%, con respecto al RC. Estos resultados evidencian la efectividad de este pretratamiento sobre el raquis de palma. Lamsal et al, (2010), obtuvieron mayores rendimientos de azúcares reductores aplicando extrusión de salvado de trigo - pero no en el caso de cáscara de soja - en comparación con la molienda. Liu et al., (2013) trabajaron sobre paja de trigo y lograron incrementos en la digestión de azúcares reductores hasta de un 204%, cuando combinaron extrusión con pretratamiento alcalino mediante NaOH.

Figura 5.3. Efecto de la extrusión del raquis sobre la concentración de AR, glucosa y % de rendimiento, logrados en la digestión enzimática



Adicional al proceso de extrusión, se evaluaron diferentes relaciones sólido/líquido, como se presenta la figura 5.4. El aumento de la carga de sólidos, desde la relación 1/20 a 1/7,5 (≈ 13 % p/v), logró incrementar las concentraciones de azúcares reductores y de glucosa en cerca de un 300 y un 160%, respectivamente, con respecto al RC. La aplicación de estas dos cargas no afectó las propiedades reológicas del sistema, y permitió obtener una buena homogeneidad de la mezcla. Sin embargo, se pudo comprobar que en relaciones de sólidos más altas, como 1/5 (≈ 20 % p/v), las condiciones reológicas del medio no favorecieron el proceso de mezclado del material, y la recuperación de los líquidos de la digestión se dificultó, demostrando que las propiedades físicas y químicas de la biomasa específica afectan las características de absorción de agua por parte de la biomasa, al igual que los fenómenos de transporte molecular involucrados. Con cargas de sólidos cercanas al 20% (p/p), la fracción líquida se absorbe completamente en la biomasa dejando poca agua libre (Hodge et al., 2009). Con menores cantidades de agua libre, la viscosidad aparente de la mezcla aumenta y, por consiguiente, la mezcla y la manipulación de material es más difícil (Modenbach & Nokes, 2013). Caspeta et al., (2014), usaron cargas de sólidos del 10% p/p sobre residuos lignocelulósicos de agave, y encontraron dificultades para la hidrólisis requiriendo de una fase inicial de 2h para la licuefacción del material, para lograr el 62,5% de hidrólisis de la celulosa, luego de 24h.

Figura 5.4. Efecto de la carga de sólidos y la extrusión del raquis sobre la concentración de AR, Glucosa y % rendimiento



Con el fin de determinar si la variación de la carga de sólidos ejerce un efecto estadísticamente significativo sobre el proceso de digestión, se hizo un análisis de varianza (ANOVA, Tabla 5.3) con un nivel de confianza del 95%. De acuerdo con los resultados, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos, tanto para las concentraciones de azúcares reductores como para glucosa. Por lo tanto, la variación en la carga de sólidos permitió aumentar en 170% la concentración de los ARR y en 192% la concentración de glucosa, en la relación 1/7,5 en comparación a la relación 1/20.

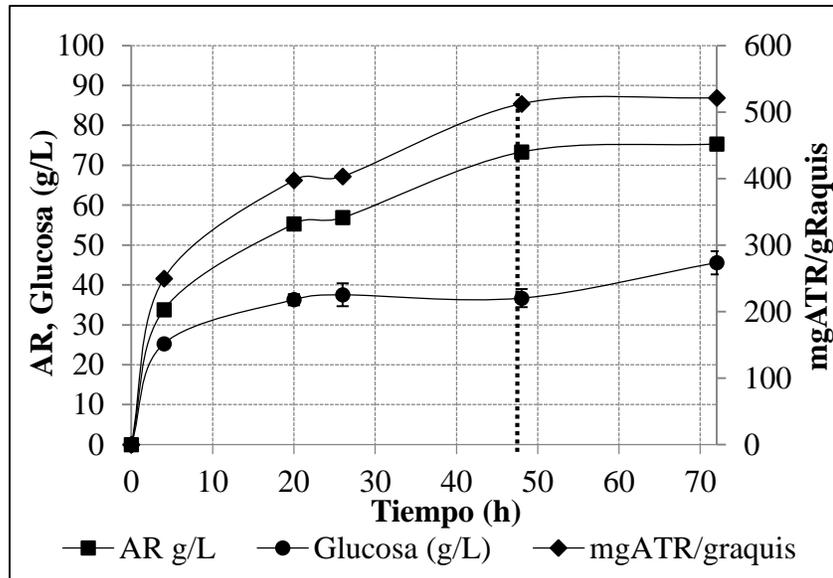
Tabla 5.3. ANOVA para la variación de la carga de sólidos

<i>Fuente</i>	ANOVA (Azúcares reductores g/L)				ANOVA (Glucosa g/L)			
	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4	959,733	138,06	0	4	373,628	152,87	0
Intra grupos	10	6,9514			10	2,4441		
Total (Corr.)	14				14			

La Figura 5.5. presenta la cinética de digestión de raquis, para una carga de sólidos de 1/7,5. La mayor velocidad de digestión se obtuvo durante las 5 primeras horas. Durante el proceso de hidrólisis del raquis, el complejo de celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas) actúa sinérgicamente de tal manera que se logra la liberación de glucosa. Sin embargo, es importante considerar que los azúcares que se van liberando en el proceso de digestión pueden actuar como inhibidores, a través de mecanismos enzimáticos tipo *feedback*. Así por ejemplo, la celobiosa es inhibidor de exo y endoglucanasas, por lo que suplementar β -glucosidasa contribuye a reducir la inhibición por altas concentraciones de celobiosa. No obstante, el proceso inhibitorio puede también deberse a los azúcares provenientes de la hemicelulosa, ya sean, xilosa, xilano y xilo-oligómeros (Modenbach & Nokes, 2013).

Luego de 48 horas de digestión, la liberación de azúcares cesa (Fig. 5.5) logrando recuperar el 80% de los AR disponibles en el material; lo anterior permite sugerir 48 horas como el tiempo más adecuado para la hidrólisis. Minhee Han, et al., (2011) estudiaron la digestión de EFBP de palma pretratada con NaOH y encontraron un rendimiento del 86%, luego de 40 horas de digestión; posteriormente, no se presentaron incrementos en la liberación de azúcares y por lo tanto en el rendimiento. Cabe resaltar que Minhee et al. (2011) utilizaron una carga enzimática de 50 FPU/g raquis, 3,3 veces más de la carga usada en este estudio, y lograron resultados similares. Katinonkul et al., (2012) estudiaron el efecto del pretratamiento con líquidos iónicos sobre la digestibilidad del EFBP, encontrando que no habían cambios en los rendimientos, luego de 48 horas de digestión enzimática, en condiciones similares a las de este estudio; el valor más alto de digestibilidad (96,6%), fue logrado luego del pretratamiento con acetato de 1-etil-3-metilimidazolio ([Emim]OAc), 90%/ 110°C/2h, el cual proporcionó más celulosa amorfa, removió más lignina y disminuyó el grado de polimerización, en comparación con los demás líquidos iónicos estudiados. Estos resultados permiten confirmar que los pretratamientos deben proporcionar cambios en las diferentes propiedades estructurales del material, para obtener incrementos en la digestibilidad del mismo.

Figura 5.5. Digestibilidad del raquis extruido pretratado con NaOH 2%p/v/1,9h/120°C y una relación sólido líquido 1/7,5



5.3.3. Digestibilidad de la fracción hemicelulolítica.

La hidrólisis selectiva de la fracción de hemicelulosa se implementó mediante la aplicación del coctel enzimático Cellic HTec2 sobre el raquis extruido y pretratado con NaOH. Este coctel está compuesto principalmente por endoxilanasas, la cual es la principal enzima para la depolimerización de la hemicelulosa. Durante las primeras cuatro horas de hidrólisis se recuperó el 54% de los ARdG, con una posterior disminución en la velocidad de hidrólisis. La máxima recuperación de los azúcares presentes en la hemicelulosa (96%), se logró en la hora 26 (Figura 5.6), con una concentración de azúcares reductores de $37,1 \pm 0,35$ g/L. Por consiguiente, se sugirió este tiempo como el más adecuado para la recuperación de azúcares provenientes de la hemicelulosa, cuando se usen en procesos fermentativos que involucren sacarificación y fermentación separada.

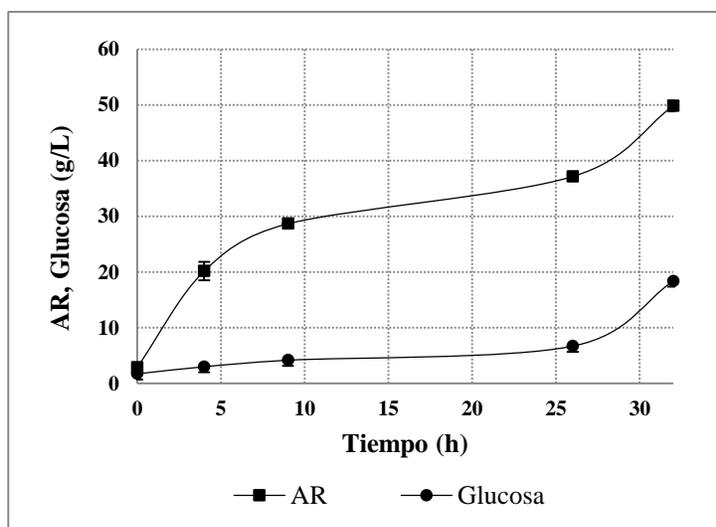
Rahman et al., (2007), lograron recuperaciones similares de xilosa, desde raquis de palma, mediante el uso de H_2SO_4 al 91,27% (34,1 g/L AR). Sin embargo, con este tratamiento también se producen ácido acético (6,54 g/L) y furfural (3,99 g/L), los cuales pueden, además

de disminuir la eficiencia de la recuperación, generar inhibición en las etapas posteriores de fermentación (Nigam, 2001). La recuperación selectiva de hemicelulosa puede favorecer la etapa posterior de hidrólisis de celulosa, evitando inhibiciones de la celulasa y la β -glucosidasa, por compuestos derivados de hemicelulosa tales como xilosa, xilanos y xilooligómeros (Qing et al., 2010). Adicionalmente, la remoción selectiva de hemicelulosa, es también una estrategia que está siendo explorada para la producción eficiente de etanol, a partir de biomasa lignocelulósica (Gírio et al., 2010)

5.3.4. Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

La micrografía resultante del análisis de superficie SEM, (Figura 5.6), muestra los cambios superficiales logrados en el material, tras el pretratamiento alcalino. En comparación con el raquis crudo (Figura 5.6. a), el material pretratado (Figura 5.6. b) presentó una superficie más lisa y con orificios, resultantes de la remoción de silicatos. Adicionalmente, se observó la remoción de los componentes amorfos (rugosidades) del raquis, lo cual ayuda a aumentar el área de acceso y exposición a la acción de la celulosa. En el licor procedente del pretratamiento (Figura 5.6. (c)) se observaron silicatos precipitados.

Figura 5.6. Digestibilidad de hemicelulosa de raquis aplicando Cellic, HTec2



5.3.5. Análisis infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) del efecto del pretratamiento alcalino sobre el raquis de palma

La Figura 5.7 muestra los principales cambios ocurridos sobre el raquis (línea roja), luego del pretratamiento alcalino (línea verde). Los resultados observados están en concordancia con los presentados por Nieves et al.(2011), al pretratar raquis de palma con NaOH al 8%. A partir del espectro, se observa disminución de las bandas ubicadas en 3345 cm^{-1} correspondientes con cambios de los grupos $-\text{OH}$ de los anillos fenólicos y de los estiramientos de los grupos $-\text{CH}$, asignados a la celulosa en 2900 cm^{-1} . La banda a 1740 cm^{-1} desaparece luego del pretratamiento alcalino; esta banda identifica la interacción $\text{C}=\text{O}$ del grupo acetil o ácido entre la hemicelulosa y la lignina, lo cual es indicativo del rompimiento entre estas dos fracciones en el raquis, debido al poder oxidante del NaOH. La zona de las bandas ente 1610 y 1465 corresponden a lignina; estas bandas también se ven disminuidas luego del pretratamiento alcalino (Anderson et al., 2012; Xu et al., 2013; Yang et al., 2010). Entre 1315 y 1150 cm^{-1} es la región de interacciones de la celulosa, las cuales también se vieron disminuidas; sin embargo, la banda a 898 cm^{-1} , correspondiente a la celulosa II, incrementa. La región que se encuentra por debajo de los 800 cm^{-1} se relaciona con los enlaces de sílice presentes en la lignina. La disminución en la lectura de estas bandas sugiere la remoción de los cristales de silicatos, como se comprobó con las imágenes SEM (numeral 5.3.4.).

Figura 5.7. Imágenes SEM (a) Raquis crudo (b) Pretratado alcalino (c) Silicatos precipitados en licor alcalino

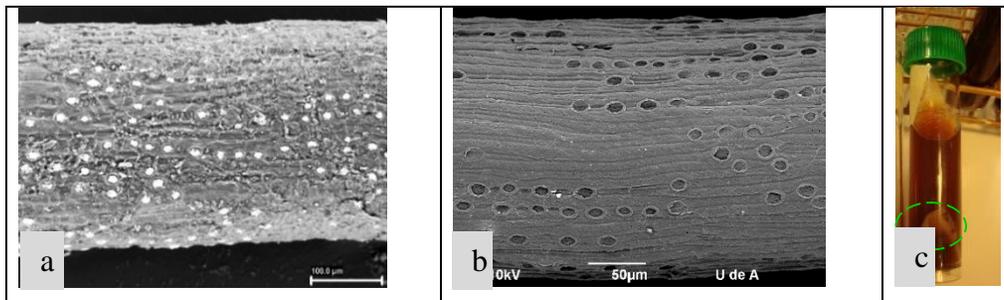
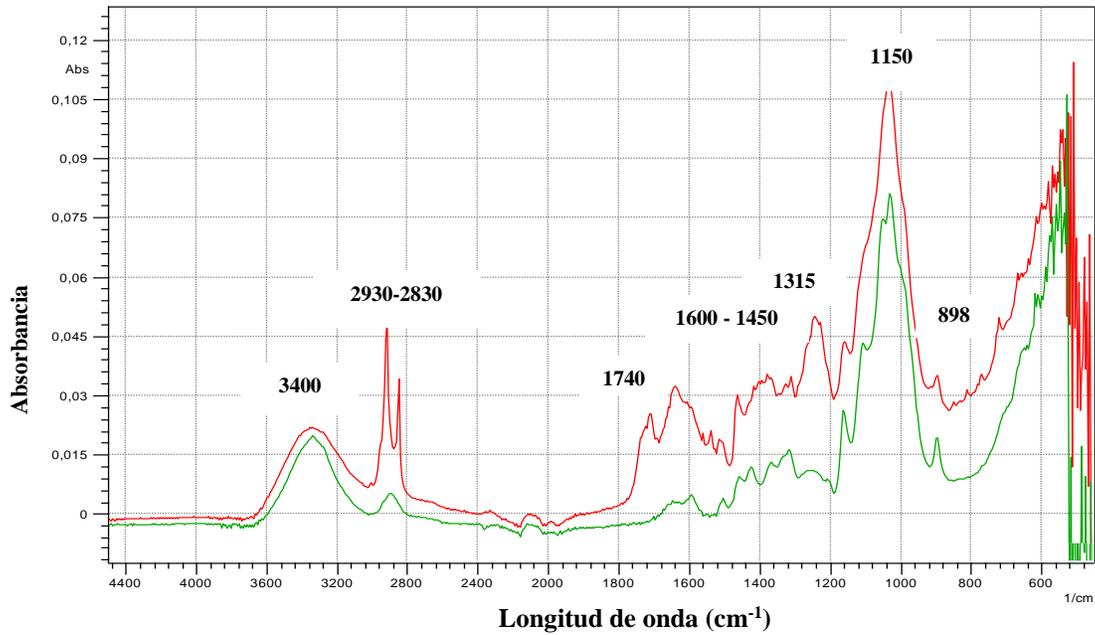


Figura 5.8. Espectro infrarrojo del raquis de palma (a) crudo (b) luego de pretratamiento alcalino



5. 4. Conclusiones

El mayor aprovechamiento de los azúcares reductores presentes en los materiales lignocelulósicos, depende directamente del éxito que se pueda lograr durante los procesos de pretratamiento. El método físico-químico permitió obtener un material pretratado, susceptible de ser procesado, para el mejor aprovechamiento de su contenido energético.

El desarrollo del diseño experimental (DECC) permitió establecer que las condiciones operacionales que favorecen una mayor remoción de lignina y recuperación de AR ($0,475 \pm 0,02$ g AR/g raquis) son 120°C , 2% NaOH y 1,9 h de pretratamiento.

La aplicación de extrusión y la modificación de la carga de sólidos, de una relación 1/20 a 1/7,5, favoreció la recuperación y concentración de los AR debido al incremento de la digestión de AR en 170%.

La carga de sólidos 1/7,5 es el valor límite que permite obtener condiciones operacionales favorables en el proceso de digestión del raquis. El uso de cargas superiores ($> 1/5$) no permite la agitación del medio, lo cual impide un mayor acceso a la holocelulosa por parte de las enzimas de digestión, desfavoreciendo la recuperación de los azúcares.

La evaluación de la cinética de digestión de la hemicelulosa con el cóctel enzimático HTec2 permitió establecer que tras 4 horas de hidrólisis se logran recuperar $29,5 \pm 1,6$ g AR/L, de los cuales $2,9 \pm 0,1$ g /L corresponden a glucosa. Esto puede favorecer las etapas posteriores de fermentación en las cuales se pretende aprovechar los ARdG a través de la capacidad metabólica de levaduras como PS y PT.

Finalmente, es posible agregar que solo los cambios configuracionales que pueda experimentar el material, luego del pretratamiento, contribuyen efectivamente a mejorar los fenómenos de transporte molecular, y con ello, la acción catalítica de las diferentes enzimas, sobre la fracción holocelulósica.

Capítulo 6



Capítulo 6

Fermentabilidad de hidrolizados de raquis de palma

Resumen

El gran avance en el tratamiento de residuos lignocelulósicos y en la generación de azúcares residuales con potencial aplicación en procesos fermentativos a gran escala, contrasta hoy en día con la disponibilidad de organismos que, de manera natural o mediante modificación genética, puedan metabolizar pentosas y hexosas, presentes en este tipo de sustratos.

En este capítulo, se evalúa el aprovechamiento de azúcares presentes en la holocelulosa de raquis extruído y pretratado con NaOH, mediante 12 sistemas diferentes. Las configuraciones propuestas consideraron el uso, en monocultivo y combinación en cocultivo, de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (SC) (*Ethanol Red*), *Pachysolen tannophilus* CECT 1426 (PT) y *Pichia stipitis* CECT 1922 (PS), haciendo uso de sistemas de hidrólisis, sacarificación y fermentación separadas (SHF), al igual que sacarificación y fermentación simultánea (SSF). La hidrólisis de hemicelulosa, separada de la fermentación, permitió aprovechar el 84% de los azúcares presentes, cuando se usó PT, y el 69%, cuando se usó PS. La disponibilidad de azúcares fermentables, luego de su completa hidrólisis, permitió a los microorganismos evaluados, activar su mecanismo de transporte intermembranal, preferencialmente por hexosas y/o pentosas, según corresponda. El mayor rendimiento de etanol (102,30 mg de

etanol/g raquis) se alcanzó cuando se usaron PT y SC, en cocultivo y en sistemas SSF, en el cual se hidroliza la hemicelulosa, se fermenta esta fracción y, en la misma unidad de manera secuencial, se hidroliza y fermenta la celulosa

6.1. Introducción

En general, la obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica se compone de las siguientes etapas: pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y obtención del producto final (Hendriks & Zeeman, 2009). No obstante, la definición de estas etapas y la obtención de etanol, enfrenta ciertas dificultades tales como la resistencia a la hidrólisis y la variedad de azúcares liberados durante la ruptura de los polímeros holocelulósicos, más la necesidad de encontrar organismos eficientes para su fermentación (Balat, 2011).

El proceso fermentativo puede llevarse a cabo mediante diversos modos operativos, ampliamente estudiados y documentados, tales como SHF, SSF o el bioproceso consolidado (Olofsson et al., 2008). Adicionalmente, la ingeniería de procesos ha explorado otros modos operacionales tales como: sistemas continuos, inmovilización de una de las cepas, coinmovilización de dos cepas, implementación de sistemas secuenciales, orientados a hacer más eficiente el aprovechamiento integral de los azúcares en la fermentación y el rendimiento hacia etanol (Yadav et al., 2011^a ; Fu & Peiris, 2008).

6.1.1. Microorganismos empleados en la fermentación

Los microorganismos fermentativos se describen según ciertos parámetros de desempeño, tales como: el rango de temperatura que soportan, el rango de pH, la tolerancia al producto final (alcohol), la velocidad de crecimiento, la productividad, la especificidad y la tolerancia a la inhibición. Como producto de la hidrólisis enzimática de la fracción holocelulósica, se obtienen hexosas y pentosas que incluyen glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, y fucosa, entre otros. La fermentación de hexosas y sus disacáridos, para la producción de etanol, se ha llevado a cabo típicamente empleando levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveryomyces* y *Debaryomyces* y bacterias como *Zymomonas mobilis*,

Escherichia coli y *Klebsiella oxytoca*. No obstante, estos organismos no poseen los mecanismos metabólicos para la transformación de las pentosas, por ejemplo xilosa. *S. cerevisiae* es uno de los microorganismos ampliamente aplicados a nivel industrial dada su tolerancia al etanol (inhibición por producto), el bajo pH que soporta y los altos rendimientos fermentativos. Por otra parte, existen levaduras con capacidad de fermentar pentosas y en especial xilosas, tales como: *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Candida parapsilosis* y *Pachysolen tannophilus*. Se ha encontrado además, que *S. cerevisiae* tiene la capacidad de fermentar xilulosa y que *P. stipitis* puede transformar xilosa a xilitol y finalmente a xilulosa (Balat, 2011). De esta forma, se evidencia la necesidad de implementar sistemas compuestos que integren la hidrólisis y la fermentación de la fracción holocelulósica de una forma más eficiente. Procesos en co-fermentación y en co-cultivo, son algunas de las opciones promisorias.

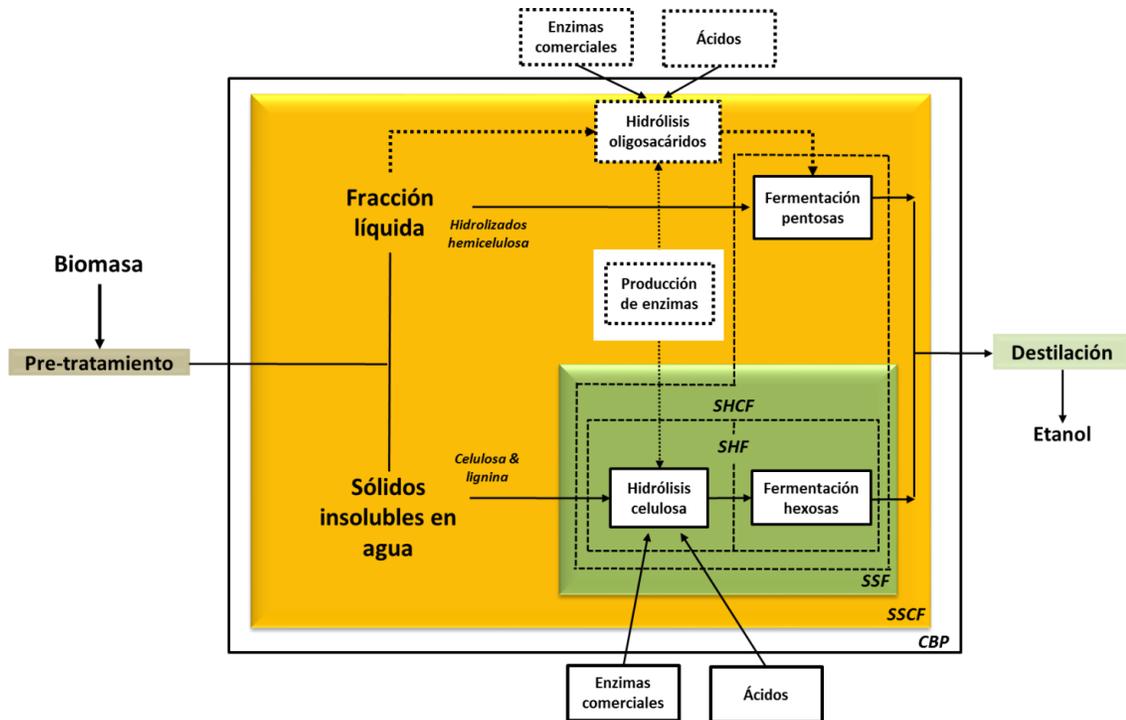
Entender el metabolismo propio de cada microorganismo, permite diseñar procesos eficientes y enfocados a la obtención de los diferentes metabolitos de interés. En la Figura 6.1 se presentan las diferentes rutas metabólicas de algunos microorganismos a saber: *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis*. Como lo indica la Figura 6.1 las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* tienen la capacidad metabólica de transformar a etanol, azúcares como la glucosa, galactosa y manosa, y xilosa y arabinosa, respectivamente. Dicha capacidad las convierte en microorganismos potenciales para el aprovechamiento de hidrolizados provenientes de materiales lignocelulósicos. Adicionalmente, presentan una ventaja competitiva frente a la bacteria *Zymomonas mobilis* la cual solo metaboliza glucosa.

Los microorganismos *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. stipitis* usan las rutas de glucólisis (o ruta EMP) y la ruta de pentosa fosfato (PPP), para convertir los monosacáridos en piruvato (los intermediarios más comunes para glucólisis y PPP son D-fructosa-6P y gliceraldehído-3P, respectivamente). *Z. mobilis* por su parte, utiliza la ruta Entner-Doudoroff (ED) para convertir glucosa en piruvato. En *Z. mobilis*, *S. cerevisiae* y *P. stipitis*, el piruvato se transforma en etanol vía PDC/ADH, mientras que para *E. coli*, la acetil-CoA es un intermediario metabólico. En los microorganismos *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. stipitis*, la D-galactosa se metaboliza a través

6.1.2. Configuraciones para la hidrólisis y fermentación de la fracción holocelulósica

Con el fin de lograr pretratamientos eficientes, con bajas demandas energéticas y mayores rendimientos hidrolíticos y fermentativos, se ha propuesto la implementación de diferentes sistemas reaccionantes. En la Figura 6.2 se presenta un esquema de las configuraciones típicas para la conversión de la biomasa lignocelulósica en etanol. En muchos casos, los pretratamientos producen una fracción de sólidos insoluble en fase acuosa, que contiene celulosa y lignina, y una fracción líquida que se compone en su mayoría de hemicelulosa. La hemicelulosa se encuentra más o menos intacta y, dependiendo del pretratamiento empleado, puede obtenerse pentosas directamente u oligosacáridos que requieran de hidrólisis, previo a la fermentación. La celulosa, por su parte, se hidroliza mediante celulasas (comercialmente disponibles) obteniéndose glucosa directamente fermentable. Cuando la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de la glucosa se hacen en forma separada, el proceso se conoce como hidrólisis y fermentación separadas (SHF). Cuando la fracción de pentosas se fermenta junto con la fracción de hexosas, posterior a una hidrólisis separada, el sistema se cataloga como hidrólisis separada y co-fermentación (SHCF). Cuando la hidrólisis de la celulosa se lleva a cabo de forma simultánea con la fermentación, el proceso se nombra como sacarificación y fermentación simultánea (SSF). Cuando el proceso de SSF incluye co-fermentación de glucosa y xilosa, el proceso se conoce con las siglas SSCF. Finalmente, cuando las enzimas se producen durante el proceso (no se adicionan enzimas comerciales) y de forma simultánea se llevan a cabo la hidrólisis y la fermentación, el proceso se conoce como procesamiento consolidado de la biomasa (CBP). La elección de cualquiera de estos sistemas estará determinada por las características de la biomasa y los microorganismos a emplear.

Figura 6.2. Esquema de las configuraciones típicas de bioprocesamiento de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol. Gírio et al., (2010).



6.1.2.1. Hidrólisis y fermentación separada (SHF)

El sistema de hidrólisis y fermentación separada (SHF por sus siglas en inglés), es un proceso convencional de dos etapas. Inicialmente se lleva a cabo el proceso de hidrólisis enzimática que da origen a la liberación de los azúcares reductores. La segunda etapa consiste en la fermentación de los azúcares liberados a través del uso de los microorganismos fermentativos. Tras la hidrólisis, la fermentación se inicia mediante el consumo de hexosas, requiriendo una etapa de destilación para la extracción del etanol. La xilosa remanente es fermentada por microorganismos afines a las pentosas. Nuevamente el mosto fermentado es destilado para obtener finalmente el etanol. Este proceso es ventajoso en la medida en que cada unidad reaccionante permite el control óptimo de sus condiciones de operación. Factores como el tiempo de reacción, la temperatura, el pH, la carga enzimática y la carga del sustrato son controlados y manipulados en estos equipos. La temperatura por ejemplo, puede ser llevada hasta los 50°C para el proceso de hidrólisis puesto que el microorganismo fermentativo no

está presente en el mismo reactor (Van Dyk & Pletschke, 2012). La principal desventaja del proceso SHF es la inhibición por producto. Se ha reportado que las celulasas y la β -glucosidasa, presentan inhibición por glucosa (Balat, 2011; Menon & Rao, 2012; Sánchez & Cardona, 2008).

6.1.2.2. Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)

Dado que las enzimas hidrolíticas son altamente susceptibles a inhibición *feedback* o a inhibición por producto (glucosa, xilosa, celobiosa y oligómeros), se ha planteado el uso de sistemas de sacarificación y fermentación simultánea (SSF, por sus siglas en inglés), de tal forma que a la vez que se producen los azúcares reductores, éstos son consumidos *in situ* por los microorganismos fermentativos. Mediante esta técnica, además de superar el problema de inhibición, la remoción de producto incrementa las tasas de hidrólisis, dada la alteración del equilibrio en los sistemas reaccionantes. Los microorganismos que se emplean típicamente en estos sistemas son *Saccharomyces* y *Zymomonas*. La característica principal de los sistemas SSF es la necesidad de la concordancia entre las condiciones de operación y las condiciones toleradas por el o los microorganismos fermentativos. Es posible ejemplificar la importancia en la similitud de las condiciones óptimas de operación sobre estos sistemas, pues se estima que las celulasas poseen mayor actividad a pH 4.5 y 55°C, mientras que las condiciones óptimas de crecimiento para *Saccharomyces* son pH 4.5 y 37°C, lo cual trae consigo disminución en la velocidad de hidrólisis. No obstante, estos sistemas presentan ventajas competitivas como bajos requerimientos de esterilización (dado el consumo inmediato de glucosa), bajos tiempos de proceso y menores volúmenes de reacción; la diferencia entre las condiciones de operación conlleva a productividades menores de las esperadas. En esta medida, se han propuesto microorganismos termófilos que puedan llevar a cabo la fermentación a la misma temperatura a la que se realiza la sacarificación, entre ellos la bacteria *Clostridium thermocellum* (Balat, 2011; Hasunuma et al., 2013; Menon & Rao, 2012).

6.1.2.3. Sacarificación y co-fermentación simultánea (SSCF)

La idea de llevar a cabo un proceso con un alto grado de integración ha resultado en la implementación de microorganismos modificados genéticamente, capaces de tolerar las condiciones de operación en el proceso de sacarificación, a la vez que se encuentran en la capacidad de fermentar hexosas y pentosas, ambas provenientes de la fracción holocelulósica. La bacteria *Zymomonas mobilis* ha sido modificada genéticamente, con el fin de co-fermentar xilosa y glucosa. Otros microorganismos que se han modificado para este fin han sido cepas de *Saccharomyces* y *Chizosaccharomyces pombe* (Gutiérrez et al., 2009; Menon & Rao, 2012).

Kim et al., 2012 reportaron las siguientes modificaciones sobre *Saccharomyces cerevisiae* para mejorar la eficiencia del consumo de azúcares diferentes de glucosa, presentes en hidrolizados de materiales lignocelulósicos:

Promover la fermentación de xilosa mediante la sobreexpresión de la vía metabólica de xilosa que consta de tres enzimas: xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XDH) de *Scheffersomyces stipitis* (anteriormente *Pichia stipitis*), y xiluloquinasa (XK) a partir de *S. cerevisiae* o *Sch. Stipitis*

Modificar la fermentación de galactosa por *S. cerevisiae* mediante la sobreexpresión de reguladores positivos como GAL4 y la supresión de reguladores negativos como GAL6, GAL80 o la sobreexpresión de fosfoglutamasa (PGM2).

Introducir el transportador de celodextrinas (cdt-1 o cdt-2) y el gen de β -glucosidasa intracelular (gh1-1) en *S. cerevisiae* e integrarlo a la vía metabólica de xilosa; esta estrategia ha permitido la cofermentación de xilosa y celobiosa, simultáneamente. La celobiosa se hidroliza a glucosa en el citosol lo que permite que no se acumule en el medio, por lo tanto no se presenta represión por glucosa, durante la absorción de xilosa.

6.1.2.4. Procesamiento consolidado de biomasa (CBP)

Típicamente, la bioprospección de los procesos de digestión de biomasa lignocelulósica se ha enfocado en tres etapas principales: la producción de enzimas sacarolíticas (celulasas y hemicelulasas), la hidrólisis de la fracción holocelulósica para la obtención de monómeros azucarados y la fermentación de las pentosas y las hexosas. La posibilidad de llevar a cabo estas tres biotransformaciones en una sola etapa se conoce como procesamiento consolidado de la biomasa (CBP). Los sistemas CBP requieren de la aplicación de cultivos microbianos que conjuguen propiedades relacionadas con la asimilación de los sustratos y la formación de productos de interés (Gutiérrez et al., 2009; Menon & Rao, 2012).

La producción de etanol a partir de raquis de palma se ha explorado principalmente a través del sistema SSF y al aprovechamiento de la fracción celulósica. Utilizando el sistema SSF, Ishola et al., (2014) lograron concentraciones de etanol de 21.6 g/L sobre raquis pretratado con ácido fosfórico. Kim y Kim (2013) alcanzaron 37.8 g/L a 60h, luego del consumo del 88% de los azúcares fermentables. Tan et al., (2013) implementaron una prehidrólisis del raquis pretratado con bisulfito durante 24 horas; luego de este tiempo adicionaron la levadura *S. cerevisiae*, y a las 160 h de cultivo alcanzaron 52 g/L de etanol, correspondientes a una productividad de 0,325 g/L.h. Estos ensayos se han realizado a escala de laboratorio; a nivel de planta piloto se reportan los estudios de Sudiyani et al., (2013) y Minhee et al., (2011). En el trabajo de Sudiyani et al., se utilizaron tanques de fermentación de 350L en sistema SHF, con hidrolizados de raquis previamente pretratado con NaOH al 10% p/p; luego de 36 h de fermentación, lograron 241 mg etanol/g raquis Sudiyani et al., (2013); por su parte (Mihee et al., 2011) lograron 136,82 mg etanol/ g raquis cuando implementaron un sistema SSF a escala de 50 L.

6.1.3. Alcance

Este trabajo pretende estudiar la fermentación alcohólica a partir de los hidrolizados obtenidos de la fracción holocelulósica del raquis pretratado, utilizando *Pichia stipitis*, *Pachysolen*

tannophilus y *Saccharomyces cerevisiae*. Se espera identificar las condiciones que favorezcan la síntesis del producto, específicamente el modo operativo, la combinación de levaduras y su respuesta metabólica frente a los hidrolizados usados.

6.2 Metodología

6.2.1. Microorganismos, medios de cultivo y preparación del inóculo

En los procesos fermentativos se utilizaron las levaduras liofilizadas *Saccharomyces cerevisiae* (SC) (*Ethanol Red*), *Pachysolen tannophilus* CECT 1426 (PT) y *Pichia stipitis* CECT 1922 (PS), las dos últimas procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

El medio de cultivo de *S. cerevisiae* consistió en 40% v/v de agua y 60% de un medio sintético que contenía 150g/L de glucosa, 2g/L de extracto de levadura, 2g/L de peptona, 4g/L de (NH₄)SO₄ y 2g/L KH₂PO₄. Las cepas PT y PS se activaron con los medios sugeridos por CECT. El medio de *P. tannophilus* contenía 20 g/L de extracto de malta, 20g/L de glucosa, 1g/L de micopeptona y 1L de agua. El medio para *P. stipitis* contenía 10 g/L de glucosa, 5g/L de micopeptona, 3g/L de extracto de levadura, 3g/L de extracto de malta y 1L de agua.

La preparación de los inóculos para *P. tannophilus* y *P. stipitis* se llevó a cabo mediante la transferencia de una colonia de cada una de las cepas a los medios de cultivo, en frascos de 100mL con 40mL de medio. Los recipientes se pusieron en agitación orbital a 150rpm y 32.5°C. Luego de 8 horas de crecimiento, 20mL se transfirieron a 80mL de medio fresco cargado con 50%v/v de hidrolizado de raquis y 50% del medio de cultivo sintético. Para el caso de la levadura *S. cerevisiae* el inóculo se realizó directamente en el medio sintético, luego del crecimiento. Los sistemas celulares estudiados se cultivaron durante 8h; la biomasa así obtenida se centrifugó, se lavó con agua destilada estéril y se usó como inóculo en cada uno de los caldos fermentativos seleccionados.

6.2.2. Pretratamiento del raquis

El raquis fue pretratado e hidrolizado siguiendo el procedimiento encontrado como el mejor, en los numerales 5.3.1 y 5.3.2. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: 120°C, 2% NaOH y 1.9 h y relación sólido/líquido de 1g de raquis /7.5 mL.

6.2.3. Fermentaciones alcohólicas

Las fermentaciones alcohólicas se llevaron a cabo en erlenmeyer de 50 mL con 25mL de medio de cultivo (hidrolizado de raquis), con una réplica por cada experimento. Las levaduras se inocularon a un 10% v/v con respecto al volumen total de cultivo. Los cultivos se mantuvieron a 33°C, excepto en las configuraciones SSF, en las cuales se trabajaron a 35°C. La agitación fue de 150 rpm. La toma de muestras se hizo bajo condiciones asépticas, retirando 500 µL del cultivo. Cada muestra se centrifugó para retirar los sólidos remanentes y precipitar la levadura; el sobrenadante se conservó para los respectivos análisis de azúcares y etanol. Los erlenmeyer se cerraron con un tapón de caucho provisto de una trampa de gases, para garantizar las condiciones de anaerobiosis en las fermentaciones. La Tabla 6.1. muestra las fermentaciones que se evaluaron, considerando diferentes configuraciones y combinación de las levaduras.

Tabla 6.1. Configuraciones y combinaciones de levaduras en la fermentación de hidrolizados de raquis de palma

Código	Tipo	Configuración
C1	SHF	Hidrólisis de holocelulosa durante 60h + fermentación con SC
C2	SHF	Hidrólisis de holocelulosa 60 h + fermentación con PT
C3	SHF	Hidrólisis de hemicelulosa + fermentación con PT
C4	SHF	Hidrólisis de hemicelulosa + fermentación con PS
C5	SHF	Hidrólisis del sólido residual de C3 y C4 seguido de fermentación con PT
C6	SHF	Hidrólisis del sólido residual de C3 y C4 seguido de fermentación con SC Hidrólisis de hemicelulosa durante 4h + inoculación a 5h PT y fermentación hasta 24h + Hidrólisis de celulosa durante 4h + Fermentación con SC hasta
C7	Secuencial	40h.

		Hidrólisis de hemicelulosa durante 4h + inoculación a 5h PS y fermentación hasta 24h + Hidrólisis de celulosa durante 4h + Fermentación con SC hasta 40h.
C8	Secuencial	40h.
C9*	SHF	C4+C6: PS+SC
C10*	SHF	C4+C5: PS+PT
C11*	SHF	C3+C6:PT+SC
C12*	SHF	C3+C5:PT+PT

*. El valor se obtiene de manera aditiva, considerando las cantidades logradas de etanol en cada una de las configuraciones correspondientes.

6.2.4. Métodos analíticos

6.2.4.1. Determinación de azúcares

La concentración de glucosa se midió usando el kit de glucosa oxidasa (GOD-PAP/ Trinder, Spinreact). Los azúcares reductores totales (ART) se determinaron empleando el método DNS (Miller, 1959).

6.2.4.2. Determinación de etanol

La determinación del contenido de etanol se realizó mediante cromatografía de gases empleando un equipo Agilent7890A compuesto por un detector de ionización de llama (FID), una columna capilar HP5-MS (30m x 0.25 mm, 0.25µm espesor de película) y usando helio (25psi) como gas de arrastre. La separación se llevó a cabo isotérmicamente a 28°C, y el inyector y el detector se mantuvieron a 100°C. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (Salvachúa et al., 2011).

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Evaluación de las fermentaciones en las configuraciones C1 a C6

En la Figura 6.3 se presentan los perfiles de consumo de azúcares, y producción de biomasa y etanol; a partir de estos perfiles se evaluaron las configuraciones descritas en el punto 6.2.3.

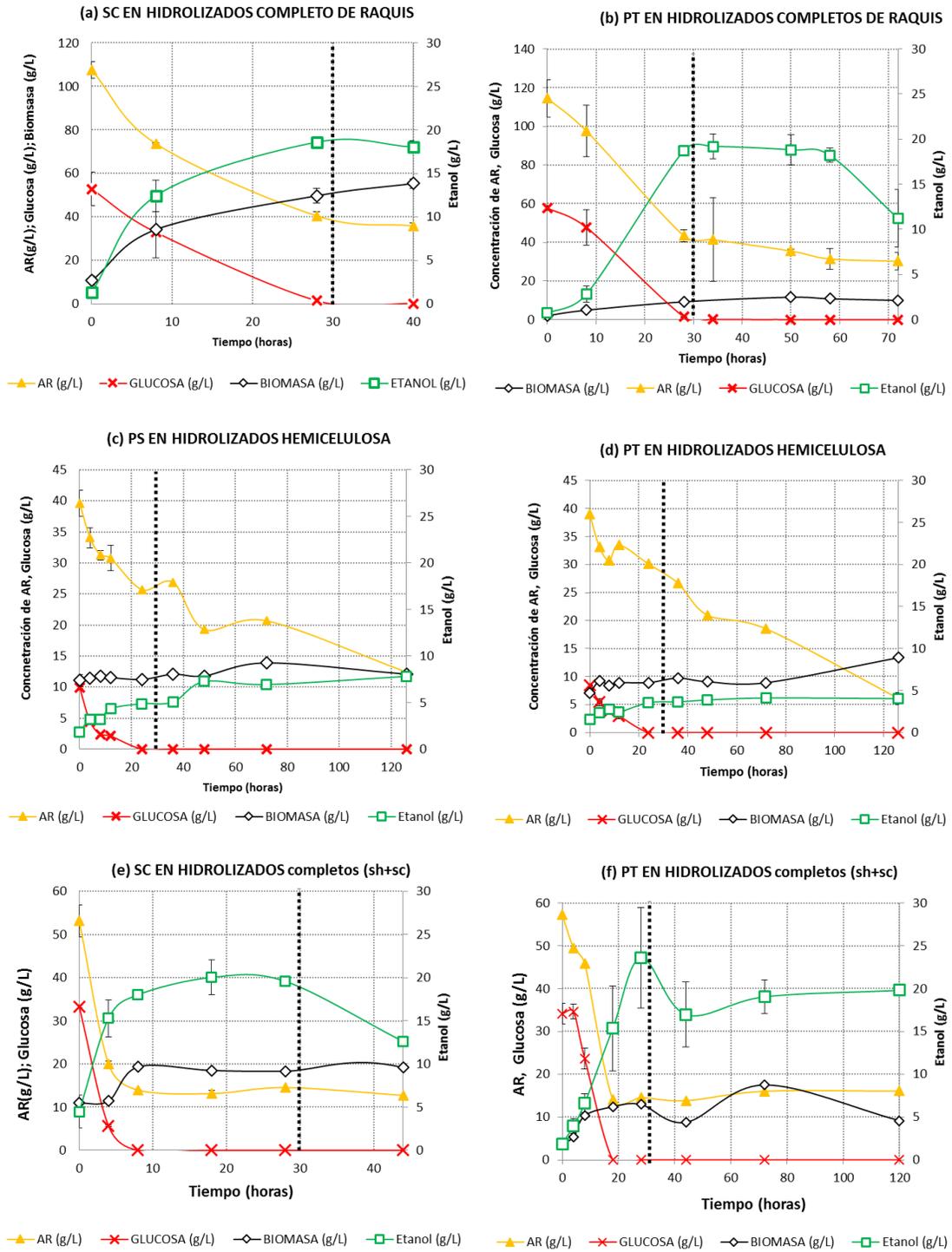
En la Figura 6.3 (a) y (b) se observa que las producciones máximas de etanol de 18.6 ± 0.17 g/L (90.50 mg etanol/g raquis) y 19.2 ± 1.4 g/L (90.95 mg etanol/g raquis), se obtuvieron con SC en C1 y PT en C2, respectivamente. En la misma figura, la producciones de etanol en las configuraciones C5 y C6 fueron de $20,03 \pm 2,4$ g/L y $23,62 \pm 5,8$ g/L, valores superiores a los alcanzados en C1 y C2, los cuales utilizan, respectivamente, las mismas levaduras.

Quintero Suarez, (2011), obtuvo un rendimiento de etanol de 53 mg etanol/g raquis (4 g/L) a partir de hidrolizados de raquis de palma con *S. cerevisiae* en un sistema *SHF*, bajo condiciones similares a las evaluadas en este estudio. Sin embargo, Quintero Suarez, (2011) no aplicó extrusión (previa al pretratamiento) del material, lo cual permite inferir que el pretratamiento físico mejora la obtención de azúcares fermentables y por lo tanto los rendimientos de etanol.

Cheng, (2007) alcanzó una producción de etanol de 15g/L sobre raquis de palma empleando *S. cerevisiae*. Sangwichien & Duangwang, (2013), llevaron a cabo pretratamientos alcalinos de raquis de palma, hidrólisis de celulosa con ácido (en lugar de celulasas) y fermentaciones con una levadura no especificada, en configuración *SHF*; los autores alcanzaron una producción máxima de etanol de 8,49g/L, más baja que la reportada en este estudio. La diferencia principal con respecto al presente trabajo, se presentó en la etapa de hidrólisis, donde se obtuvo una concentración de 33.45g/L de glucosa, mientras que en este estudio fue de 52.8 g/L, mostrando mejores rendimientos en la digestión enzimática.

En general, Luego de 30 horas de fermentación, tanto la levadura SC como PT consumieron la glucosa en su totalidad, cesando posteriormente la producción de etanol. SC no presentó consumo del resto de los azúcares disponibles en el reactor, mientras que para el caso de PT, se puede observar, tras 30 horas de fermentación, un consumo posterior de azúcares reductores, diferentes a glucosa (ARdG), de aproximadamente 10g/L. Aunque el consumo de los ARdG es notable en esta cepa, a diferencia de SC, su consumo no fue destinado a producir etanol.

Figura 6.3. Fermentación de hidrolizados de raquis en configuraciones C1 a C6



La capacidad metabólica *S. cerevisie* le permite catabolizar glucosa y galactosa (con menor eficiencia que la glucosa), para producir etanol; sin embargo, no puede consumir xilosa (Kim et al., 2012). A su vez, PT tiene la capacidad para consumir xilosa y producir etanol, pero en ocasiones transforma xilosa en xilitol (Sánchez *et al*, 2004). De esta manera, es posible inferir que los ARdG consumidos por PT fueron eventualmente metabolizados, para atender otras actividades propias de la célula, pero no para la síntesis de producto. Adicionalmente, para el caso de PT, luego de 50 horas de fermentación, se observa una disminución de la concentración de etanol. Usando *P. Tannophilus*, Lee et al., 1986, reportó la transformación de etanol a otros metabolitos entre ellos ácido acético.

En los hidrolizados de hemicelulosa C3 y C4 (Figura 3 (c) y (d)) se usaron las levaduras PS y PT, para la fermentación de los azúcares procedentes de la hidrólisis selectiva de hemicelulosa (ARdG). La máxima concentración de etanol alcanzada fué 7.82 ± 1.43 y 4.12 ± 0.22 g/L para PS y PT, respectivamente. La diferencia entre ambos valores, considerando que se trata de especies distintas, muestra una vez más que PT tiene la capacidad natural de consumir los hidrolizados hemicelulósicos. Sin embargo, en este caso se observa que, a pesar de que PT consume alrededor de un 84% y PS consume un 69% de los azúcares reductores totales, se obtiene cerca de un 50% más de etanol utilizando PS. Lo anterior permite inferir que PT no utiliza la totalidad de los azúcares consumidos para la producción de alcohol; por lo tanto PT tiene la capacidad de modificar la distribución de flujos metabólicos y eventualmente producir otros metabolitos de interés industrial entre ellos xilitol, como lo reporta Sánchez *et al.* (2004). De esta manera PS fué la levadura más adecuada para la fermentación etanólica, en comparación con PT ($p_{C3,C4} = 0,027095$), con una diferencia estadísticamente significativa entre ambas muestras.

Luego de 24 horas de fermentación ambas levaduras PS y PT consumen los ARrdG disponibles. Para PS, este consumo está asociado con la producción de etanol, mientras que en PT no se evidenció un aumento en la producción de etanol, pero si en su crecimiento. Zhao et al, (2008), reportaron que en un medio sintético compuesto por mezclas de glucosa/xilosa, PT preferencialmente consume glucosa; adicionalmente la velocidad de consumo de xilosa para la producción de etanol fue más baja con respecto a glucosa, y por ende, las concentraciones

de etanol obtenidas, son también menores. De igual manera, los autores evidenciaron una disminución en la concentración de etanol asociada al crecimiento de la levadura; un comportamiento similar se presentó en este estudio.

El sólido remanente, luego del procesamiento de hemicelulosa (C3 y C4), rico en celulosa, se hidrolizó con celulasas y se fermentó con SC y PT, configuraciones C5 C6 (Figura 3 (e) y (f)). Las concentraciones máximas de etanol obtenidas para dichas configuraciones fueron $20,03 \pm 2,4$ y $23,62 \pm 5,86$ g/L, para SC y PT, respectivamente. En comparación con la concentración de etanol, producida en las fermentaciones de las configuraciones C1 y C2, correspondientes con C5 y C6, no se observa una diferencia estadísticamente significativa en la utilización de la fracción celulósica, luego de remover parte de su hemicelulosa ($p_{C1,C5} = 0,3585$ y $p_{C2,C6} = 0,2696$, respectivamente).

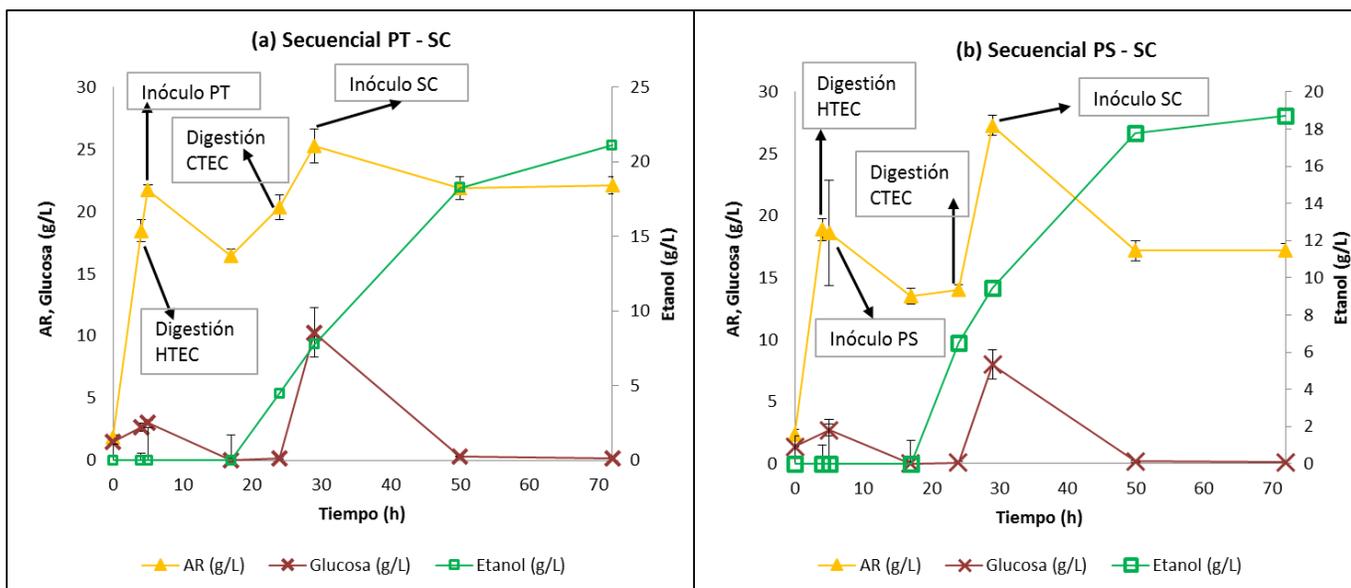
6.3.2. Evaluación de los sistemas secuenciales utilizando las configuraciones C7 y C8

Los resultados de etanol obtenidos para los sistemas secuenciales C7 y C8 PT-SC y PS-SC (Figura 6.4 (a) y (b)) fueron $21,1 \pm 1,70$ g/L (102,3 mg etanol/g raquis) y $18,73 \pm 1,27$ g/L (90,8 mg etanol/g raquis), respectivamente. Sin embargo, en este estudio se lograron mejores resultados usando las configuraciones C10 (126,12 mg etanol/g etanol) y C12 (112,61 mg etanol/g etanol), las cuales consideran la aplicación de sistemas SHF en unidades diferentes, para cada fracción del raquis. Igualmente, se observa consumo de ARdG en ambos sistemas, C7 y C8 (aproximadamente 3 g/L en PT y 5 g/L en PS), más no se evidencia producción de etanol, como resultado de la actividad catabólica sobre estos azúcares.

A la fecha de redacción de este documento, no se han reportado estudios sobre hidrolizados de raquis de palma, haciendo uso de la levadura PT. Lopez-Abelairas et al. (2013), obtuvieron, sobre hidrolizados de paja de trigo, un rendimiento de 163 mg etanol/g biomasa, en un sistema secuencial que consistió de una etapa de hidrólisis de hemicelulosa y fermentación con PT, seguido de un sistema *SSF* con levadura PT. Este resultado supera en un

29% el valor alcanzado en una configuración similar a la que se hizo en este estudio, C10 (126,12 mg etanol/g etanol).

Figura 6.4. Perfiles de la concentración de AR, glucosa y etanol de las fermentaciones en configuraciones de los sistemas secuenciales C7 y C8.



6.3.3. Comparación de las configuraciones evaluadas

La Tabla 6.2 presenta los rendimientos y productividades logradas a partir de las diferentes configuraciones evaluadas en este estudio. Las mayores productividades sobre la fracción celulósica se lograron con la levadura SC (C1, y C5). Aunque la levadura PT también es reportada por su capacidad fermentativa, la productividad alcanzó valores hasta un 20% más bajos que los reportados para SC (Gírio et al., 2010). Sin embargo, PT presentó un mayor rendimiento en el sistema C6.

Comparando las configuraciones C3 y C4, PS presentó un mejor aprovechamiento de los azúcares provenientes de la hemicelulosa para la producción de etanol, tanto en términos de

productividad como de rendimiento. Esto hace que al considerar las configuraciones C9 y C10 se obtengan los mayores rendimientos de etanol (113,84 y 126,12 mg de etanol/ gr de raquis). Sin embargo, cabe anotar que en C9 y C10 las fermentaciones de cada fracción tiene lugar en unidades separadas lo que hace que operacionalmente el sistema sea menos viable; varios estudios soportan las ventajas operacionales y técnicas de usar sistemas integrados como el SSF (Olofsson, et al., 2008). Adicionalmente, los tiempos de operación en las configuraciones C9, C10, C11 y C12 son más altos; considerando el carácter aditivo de los experimentos que las conforman, se observa que las productividades son más bajas.

De esta manera, a partir de los resultados obtenidos se encontró que el sistema secuencial C7 es el que permitió el mayor aprovechamiento de la fracción holocelulósica del raquis, cuando de manera concatenada se aprovecha la capacidad metabólica de PT + SC y su eventual efecto sinérgico durante el cocultivo. (Lopez-abelairas, 2013) en su estudio, fermentaron, de manera secuencial, la pentosas y hexosas de hidrolizados de paja de trigo y alcanzaron los mayores rendimientos de etanol (163 mg etanol/g) con PT.

Tabla 6.2. Rendimientos y productividades de etanol logradas a partir de las diferentes configuraciones.

Configuración	Digestión	Etanol (g/L)	Tiempo (h)	Productividad (g/L.h)	Rendimiento (mg etanol / g raquis crudo)	
C1	:SC	Completa	18,59±0,17	28	0,66	90,50
C2	:PT	Completa	19,20±1,4	34	0,56	90,95
C3	:PS	DH	7,82±0,50	48	0,15	29,99
C4	:PT	DH	4,12±0,22	72	0,06	16,48
C5	:SC	DH+DC	20,03±2,4	18	1,11	83,85
C6	:PT	DH+DC	23,62±5,8	28	0,84	96,13
C7	:PT+SC	Secuencial	21,1±1,70	72	0,29	102,30
C8	:PS+SC	Secuencial	18,73±1,3	72	0,26	90,81
C9	:PS-DH+SC	SHF				113,84
C10	:PS-DH+PT	SHF				126,12
C11	:PT-DH+SC	SHF				100,33
C12	:PT-DH+PT	SHF*				112,61

(Yadav et al., 2011) estudiaron la producción de etanol sobre hidrolizados de paja de arroz y alcanzaron, luego de 36h de cultivo, 7,5 g etanol/L (0,3 g/ g; 0,20 g/L.h) con SC y 12,5 g

etanol/L (0,4g/g; 0,33g/L.h) en el cocultivo de SC y PS. Este incremento del 60% de la producción de etanol se atribuye específicamente al consumo de las pentosas presentes en los hidrolizados, los cuales son metabolizados por PS y no por SC. El uso de PT en cocultivo fue estudiado por Fu y Peiris (2008) en mezclas de xilosa y glucosa; la fermentación de PT con *Zymomonas mobilis* permitió un incremento en el rendimiento de etanol desde xilosa de 0,15 a 0,17 g/g, por parte de PT. Estos resultados en conjunto con los resultados del presente estudio evidencian el hecho de que el uso en cocultivo de microorganismos con capacidad para fermentar pentosas y hexosas favorece notablemente el aprovechamiento de los hidrolizados de materiales lignocelulósicos.

6.4. Conclusiones

Este estudio permitió evaluar diferentes sistemas de fermentación (SHF y SSF, de manera independiente y secuencial) y la valoración de tres levaduras diferentes (SC, PS y PT) para metabolizar los azúcares presentes en los hidrolizados de raquis, con miras a lograr mejores rendimientos de etanol. Todas estas configuraciones y tipos de levadura se ven ampliamente beneficiados por una mayor disponibilidad de azúcares como materia prima. Así, la extrusión del material lignocelulósico, previo al pretratamiento alcalino, permite una mayor recuperación de azúcares aprovechables en el proceso de producción de etanol.

La hidrólisis selectiva de la hemicelulosa del raquis de palma permitió la recuperación y aprovechamiento de los azúcares presentes para la producción de etanol. De esta manera, utilizando un sistema SHF, PT y PS consumieron 84 y 69%, de los azúcares disponibles y permitieron obtener $7,82 \pm 1,43$ y $4,12 \pm 0,22$ g etanol/L, respectivamente.

Adicionalmente, se observó que implementar un sistema secuencial con PT y SC para la fermentación etanólica de los azúcares de cada fracción de raquis de palma, permite alcanzar mayores rendimientos de etanol (102,3 mg etanol/g raquis), en comparación con los sistemas donde se fermentaron los hidrolizados de la fracción completa de holocelulosa, con las levaduras SC y PT (90,50 y 90,95 mg etanol/g raquis, respectivamente).

A pesar de la selectividad de PS para fermentar azúcares de hemicelulosa para la producción de etanol, el rendimiento global de los sistemas secuenciales evaluados permitió establecer que la mejor combinación de microorganismos evaluados fue la que incluía PT y posteriormente SC (C7). Este aspecto resalta la capacidad metabólica de PT para producir etanol y confirma la eficiencia de los sistemas SSF.

Capítulo 7



Capítulo 7

Conclusiones y recomendaciones

7.1. Conclusiones

La industria del aceite de palma en Colombia constituye una de las principales actividades agroindustriales con más de 1 tonelada toneladas anuales de producción. Como resultado de su procesamiento se producen 1,2 toneladas de material lignocelulósico residual, parcialmente utilizado. El carácter recalcitrante de estos residuos ha limitado su aprovechamiento a escala industrial. Para atender esta problemática, y tomando en consideración la tendencia marcada por el desarrollo de las refinerías y su propósito de obtener productos de interés industrial, a partir de la biomasa residual, se planteó esta propuesta de investigación. En primera instancia, esta propuesta estuvo orientada a encontrar alternativas químicas y biológicas para el pretratamiento del raquis y, seguidamente, a evaluar los productos obtenidos, como potencial materia prima para la producción de etanol.

En este capítulo final, se consignan los resultados más relevantes del desarrollo del proyecto, al igual que las recomendaciones, cuya eventual ejecución, permitirá establecer las bases para su implementación a escala piloto y/o industrial.

En relación con el procesamiento de raquis, el pretratamiento biológico con hongos permitió demostrar su capacidad metabólica para remover la lignina presente en el residuo vegetal.

Pleurotus eryngii fue la especie más promisoría, dada a su alta selectividad, reflejada en la menor accesibilidad a la fracción holocelulósica; igualmente, este hongo permitió aumentos en la digestibilidad del material pretratado, respecto del material crudo. El cultivo de *Pleurotus eryngii* permitió obtener extractos de enzimas ligninolíticas lacasa y manganeso peroxidasa, ampliamente utilizadas en el procesamiento de macromoléculas de difícil biodegradabilidad.

Haciendo uso de técnicas analíticas, modernas y altamente confiables, se demostró que el uso de extractos crudos de lacasa y MnP modifica la estructura química de la lignina y contribuye a reducir su carácter recalcitrante. Como caso específico, el uso de extractos de peroxidasa como MnP, permitió mejorar la digestibilidad de la fracción de hemicelulosa presente en el raquis. Estos procesos enzimáticos requieren menos tiempo de pretratamiento, en comparación con los biológicos; si se le comparan con los procesos químicos, que hacen uso de soluciones alcalinas, son amigables con el ambiente y presentan bajos requerimientos de energía y de reactivos.

El uso de procesos físicos como la extrusión de raquis, es un buen complemento al pretratamiento alcalino y permite mejorar el proceso de digestión enzimática. Así mismo, favorece la digestión en cargas de sólidos del 13%, dando lugar a mayores concentraciones de azúcares en los hidrolizados.

La enzima comercial HTEC actúa efectivamente sobre el material de raquis y promueve la recuperación de azúcares procedentes de la hemicelulosa; estos azúcares pueden ser potencialmente usados en la producción de etanol, mediante microorganismos con capacidad metabólica específica.

La estrategia de hidrolizar selectivamente la hemicelulosa, fermentarla y secuencialmente, en la misma unidad, implementar un sistema SSF para celulosa, permitió alcanzar mayores rendimientos de etanol y un uso más integral de toda la fracción holocelulósica del raquis.

Estos y otros resultados presentados a lo largo del documento de tesis, dan cuenta del potencial del raquis como materia prima, pero sobre todo de la factibilidad técnica de su pretratamiento y el eventual aprovechamiento de su contenido energético en diversos procesos de biorefinación, específicamente en producción de etanol de segunda generación. Es claro que las preguntas de investigación que inicialmente orientaron el desarrollo de este trabajo han sido ampliamente discutidas y respondidas con resultados experimentales contundentes.

Por supuesto, esta es una modesta contribución a los promisorios y excelentes trabajos (artículos y tesis) ya presentados a la comunidad académica. Quedan muchas preguntas sin resolver y con ellas algunas recomendaciones importantes que buscan, no solo orientar, sino a la vez promover el desarrollo de trabajos relacionados, específicamente con la reducción en el uso de combustibles fósiles, la promoción de nuevas formas de energía y el uso de tecnologías más amigables con el ambiente.

7.2. Recomendaciones

Complementar los estudios de pretratamiento haciendo uso de extractos crudos de enzimas ligninolíticas, en combinación con otros pretratamientos, más amigables ambientalmente.

Estudiar más en detalle el sistema secuencial para la obtención de etanol a partir de raquis de palma, con miras a mejorar los rendimientos en el proceso fermentativo.

Hacer una valoración económica y ambiental considerando los resultados logrados en este estudio, puede orientar la implementación del sistema más adecuado en las diferentes etapas del uso del proceso de producción de etanol, a partir de raquis de palma.

Desarrollar un estudio de prefactibilidad que permita evaluar la viabilidad técnica y económica para construir en Colombia una planta de producción de etanol, a partir de material de raquis pretratado.

Bibliografía

- Ahmad, M. H., Jamil, A. A. A., Ahmad, H., Piah, M. A. M., Darus, A., Arief, Y. Z., & Bashir, N. (2012). Oil palm empty fruit bunch as a new organic filler for electrical tree inhibition. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 213–218.
- Alonso, D. M., Bond, J. Q., & Dumesic, J. a. (2010). Catalytic conversion of biomass to biofuels. *Green Chemistry*, 12(9), 1493.
- Anderson, G., Nel, M. P., & Lucía, P. M. (2012). Segunda generación Banana pseudocaule Açúcares : uma opção para obtenção de álcool a partir de segunda geração solução paradar para a crise energética . A transformação desses produtos químicos traz fonte potencial de biomassa lignocelulósica , utilizáveis para a produção de açúcares para a partir do ponto de vista da produção em larga escala de etanol e outros produtos químicos, 10(1), 39–51.
- Arora, D. S., Chander, M., & Gill, P. K. (2002). Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(2), 115–120.
- Azizan, M. T., Yusup, S., Laziz, F. D. M., Ahmad, M. M., Petronas, U. T., & Tronoh, S. I. (2012). Production of bio-oil from oil palm's empty fruit bunch via pyrolysis, *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 228–233.
- Bak, J. S., Ko, J. K., Choi, I.-G., Park, Y.-C., Seo, J.-H., & Kim, K. H. (2009). Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw. *Biotechnology and bioengineering*, 104(3), 471–82.

- Bakar, N. A. (2010). Briquetting of empty fruit bunch fibre and palm shells using piston press technology. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 6(6), 446-451.
- Balat, M., Balat, H., & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551-573.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858-875.
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., & Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass, 36, 91-106.
- Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. M., & Sani, R. K. (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource technology*, 128, 751-759.
- Binod, P., Sindhu, R., Singhania, R. R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., ... Pandey, A. (2010). Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology*, 101(13), 4767-74.
- BP statistical review. (2013). BP Statistical Review of World Energy About this review Contents, (June).
- Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., del Río, J. C., Gutiérrez, A., ... Martínez, Á. T. (2004). Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 113-120.
- Cañas, A. I., & Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology advances*, 28(6), 694-705.
- Caspeta, L., Caro-bermúdez, M. A., Ponce-noyola, T., & Martinez, A. (2014). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol, 113, 277-286.

- Chang, S. H. (2014). An overview of empty fruit bunch from oil palm as feedstock for bio-oil production. *Biomass and Bioenergy*, 2, 2–9.
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421.
- Damartzis, T., & Zabaniotou, a. (2011). Thermochemical conversion of biomass to second generation biofuels through integrated process design—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), 366–378.
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49(8), 2106–2116.
- Demirbas, A. (2009). Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*, 86, 108–117.
- Deswal, D., Gupta, R., Nandal, P., & Kuhad, R. C. (2014). Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars. *Carbohydrate polymers*, 99, 264–269.
- Dias, A. a, Freitas, G. S., Marques, G. S. M., Sampaio, A., Fraga, I. S., Rodrigues, M., Bezerra, R. M. F. (2010). Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 101(15), 6045–50.
- Doherty, J. (2012). Fossil Fuels : Examination and Prediction of Future Trends.
- Dowe, N., & McMillan, J. (2008). SSF Experimental Protocols-Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation Laboratory Analytical Procedure (LAP) SSF Experimental Protocols-Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation Laboratory Analytical Pro, (January).
- EEA report. (2013). EU bioenergy potential from a resource-efficiency perspective. ISSN 1725-9177

- Elisashvili, V., & Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, *144*(1), 37–42.
- Eun, J., Kyou, S., Hee, D., Ryu, S., Kim, M., Lee, S., & Ok, S. (2014). Enzymatic degradation of lignocellulosic biomass by continuous process using laccase and cellulases with the aid of scaffoldin for ethanol production, *49*, 1266–1273.
- Fedepalma. (2013). Minianuario Estadístico 2013 Principales cifras de la agroindustria de la palma de aceite en Colombia.
- Feng, C., Zeng, G., Huang, D., Hu, S., Zhao, M., Lai, C., ... Li, N. (2011). Effect of ligninolytic enzymes on lignin degradation and carbon utilization during lignocellulosic waste composting. *Process Biochemistry*, *46*(7), 1515–1520.
- Fierobe, H.-P., Bayer, E. a, Tardif, C., Czjzek, M., Mechaly, A., Bélaïch, A., ... Bélaïch, J.-P. (2002). Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. Substrate targeting versus proximity of enzyme components. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(51), 49621–30.
- FitzPatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M. F., & Whitney, R. a. (2010). A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource technology*, *101*(23), 8915–8922.
- Fu, N., & Peiris, P. (2008). Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(7), 1091–1097.
- Geng, A. (2011). Conversion of Oil Palm Empty Fruit Bunch to Biofuels. Cap. 16. Conversion of Oil Palm Empty Fruit Bunch to Biofuels.
- Ghazali, A., Rosli, W. D. W. A. N., & Law, K. N. (2009). Pre-treatment of oil palm biomass for alkaline peroxide pulping. *Cellulose chemistry and technology*, *43*, 331–338.

- Gileva, T. (2010). *Econometrics of Crude Oil Markets* (tesis Master en economía). Universidad Panthéon-Sorbonne
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4775–4800.
- Goldemberg, J., & Teixeira Coelho, S. (2004). Renewable energy—traditional biomass vs. modern biomass. *Energy Policy*, *32*(6), 711–714.
- Gutiérrez, L. F., Sánchez, O. J., & Cardona, C. A. (2007). Integrated production of biodiesel from palm oil using in situ produced bioethanol. *Proceedings of European Congress of Chemical Engineering*, 16–20.
- Gutiérrez, L. F., Sánchez, O. J., & Cardona, C. a. (2009). Process integration possibilities for biodiesel production from palm oil using ethanol obtained from lignocellulosic residues of oil palm industry. *Bioresource technology*, *100*(3), 1227–37.
- Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *27*, 77–93.
- Hakala, T. K., Lundell, T., Galkin, S., Maijala, P., Kalkkinen, N., & Hatakka, A. (2005). Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme and Microbial Technology*, *36*(4), 461–468.
- Hammel, K. E., & Cullen, D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current opinion in plant biology*, *11*(3), 349–355.

- Hassan, A., Salema, A. A., Ani, F. N., & Bakar, A. A. (2010). A Review on Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber-Reinforced Polymer Composite Materials. *Polymer Composites*, *3*, 2079-2101.
- Hassan, O., Ling, T. P., Maskat, M. Y., Illias, R. M., Badri, K., Jahim, J., & Mahadi, N. M. (2013). Optimization of pretreatments for the hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber (EFBF) using enzyme mixtures. *Biomass and Bioenergy*, *56*, 137–146.
- Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J., & Kondo, A. (2013). Bioresource Technology A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology*, *135*, 513–522.
- Hendriks, a T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *100*(1), 10–18.
- Hodge, D. B., Karim, M. N., Schell, D. J., & McMillan, J. D. (2009). Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *152*(1), 88–107.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, *30*(4), 454–466.
- Ibrahim, M. F., Abd-Aziz, S., Yusoff, M. E. M., Phang, L. Y., & Hassan, M. A. (2015). Simultaneous enzymatic saccharification and ABE fermentation using pretreated oil palm empty fruit bunch as substrate to produce butanol and hydrogen as biofuel. *Renewable Energy*, *77*, 447–455.
- Ibrahim, M. N. M., Nadiyah, M. Y. N., & Amirue, A. A. (2005). Extraction of tannin from oil palm empty fruit bunch as a rust deactivator. *Material Sciences and Engeneering*, *1*, 197–201.

- Ibrahim, S. M. (2012). A Study on Glycerolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber. *Sains Malaysiana*, 41(12), 1579–1585.
- Isroi, Ishola, M. M., Millati, R., Syamsiah, S., Cahyanto, M. N., Niklasson, C., & Taherzadeh, M. J. (2012). Structural changes of oil palm empty fruit bunch (OPEFB) after fungal and phosphoric acid pretreatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(12), 14995–5002.
- Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M., & Paszczynski, A. J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme and microbial technology*, 52(1), 1–12.
- Jung, Y. H., Kim, I. J., Kim, J. J., Oh, K. K., Han, J.-I., Choi, I.-G., & Kim, K. H. (2011). Ethanol production from oil palm trunks treated with aqueous ammonia and cellulase. *Bioresource Technology*, 102(15), 7307–7312.
- Katinonkul, W., Lee, J.-S., Ha, S. H., & Park, J.-Y. (2012). Enhancement of enzymatic digestibility of oil palm empty fruit bunch by ionic-liquid pretreatment. *Energy*, 47(1), 11–16.
- Kerdsuwan, S., Laohalidanond, K., & Waste, T. (2010). Renewable energy from palm oil empty fruit bunch. *Renewable Energy, Trends and Applications*, 1, 23-190.
- Kim, S. R., Ha, S.-J., Wei, N., Oh, E. J., & Jin, Y.-S. (2012). Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends in biotechnology*, 30(5), 274–82.
- Kimura, Y., Asada, Y., & M, K. (1990). Screening of basidiomycetes for lignin peroxidase genes using a DNA probe. *Applied microbiology and biotechnology*, 32, 436 – 442.
- Kirk, T. K. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb. Technol.*, 8(27e32).

- Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F. J., & Alcalde, M. (2007b). Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications, 233–245.
- Lamsal, B., Yoo, J., Brijwani, K., & Alavi, S. (2010). Extrusion as a thermo-mechanical pretreatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 34(12), 1703–1710.
- Lahijani, P., Najafpour, G. D., Alimuddin Zainal, Z., & Mohammadi, M. (2011). Air gasification of palm empty fruit bunch in a fluidized bed gasifier using various bed materials. *Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences*, 3269–3276.
- Law, K. (2007). Morphological and chemical nature of fibers strands of oil palm empty-fruit-bunch. *Bio Resources*, 2, 351–362.
- Liu, C., van der Heide, E., Wang, H., Li, B., Yu, G., & Mu, X. (2013). Alkaline twin-screw extrusion pretreatment for fermentable sugar production. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 97.
- Lopez, M. J., Vargas-García, M. D. C., Suárez-Estrella, F., Nichols, N. N., Dien, B. S., & Moreno, J. (2007). Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 794–800.
- Lopez-Abelairas, M. (2013). Fermentation of biologically pretreated wheat straw for ethanol production: comparison of fermentative microorganisms and process configurations. *Appl Biochem Biotechnol*, 170(8), 1838–1852.
- López-Abelairas, M., Álvarez Pallín, M., Salvachúa, D., Lú-Chau, T., Martínez, M. J., & Lema, J. M. (2013). Optimisation of the biological pretreatment of wheat straw with white-rot fungi for ethanol production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(9), 1251–1260.

- Lu, T. A., Moreira, T., Pablo, A., Lema, J. M., & Feijoo, G. (2008). Evaluation of the Enzyme Manganese Peroxidase in an Industrial Sequence for the Lignin Oxidation and Bleaching of Eucalyptus Kraft Pulp.
- Luo, L., van der Voet, E., & Huppes, G. (2010). Biorefining of lignocellulosic feedstock-- Technical, economic and environmental considerations. *Bioresource technology*, *101*(13), 5023–5032.
- Mcginn, D.;(2013). REN21. *Renewables 2013 Global Status Report* (Paris: REN21 Secretariat). ISBN 978-3-9815934-0-2
- Menon, V., & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, *38*(4), 522–550.
- Milovanovic, I., Stajic, M., Lonc, N., & Jasmina, C. (2013). Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology*, *138*, 117–123.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemical.*, *31*(3), 426–428.
- Minhee H., Yule, S. Wook, G. (2011). High efficiency bioethanol production from. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *86*(12), 1527-1534.
- Ministerio de minas y energía. (2007). *El programa de biocombustibles en Colombia*. Colombia.
- Modenbach, A. A., & Nokes, S. E. (2013). Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. *Biomass and Bio Energy* *56*(6), 526-544.
- Moya, L. A., & Torres, E. (2012). Hydrolysis of cellulose and oil palm empty fruit bunches by using consortia of fungi isolated from the soil of Colombian high andean forest. *Soils, fertilization and management of water*, *30*(3), 411–418.

- Nafissa, A., Tabi, M., Zakil, F. A., Fauzan, W, Fauzai, M., Ali, N., & Hassan, O. N. N. (2008). The usage of empty fruit bunch (efb) and palm pressed fibre (ppf) as substrates for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Jurnal Teknologi*, 49, 189–196.
- Nigam, J. (2001). Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*, 87(1), 17–27.
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52–68.
- Nieves, D. C., Karimi, K., & Horváth, I. S. (2011). Improvement of biogas production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB). *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1097–1101.
- Octave, S., & Thomas, D. (2009). Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*, 91(6), 659–664.
- Ohara, H. (2003). Biorefinery. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(5-6), 474–477.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., & Lidén, G. (2008). A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for biofuels*, 1,1-7.
- Piarpuzán, D., Quintero, J. a., & Cardona, C. a. (2011). Empty fruit bunches from oil palm as a potential raw material for fuel ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 35(3), 1130–1137.
- Pinto P., et al. (2012). Influence of ligninolytic enzymes on straw saccharification during fungal pretreatment. *Bioresource Technology*, 111, 261 – 267.
- Piñeros-Castro, Y., & Velásquez-Lozano, M. (2014). Biodegradation kinetics of oil palm empty fruit bunches by white rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 91, 24-28.

- Qing, Q., Yang, B., & Wyman, C. E. (2010). Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology*, *101*(24), 9624–9630.
- Qiu, W., & Chen, H. (2012). Bioresource Technology Enhanced the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat straw after combined steam explosion and laccase pretreatment, *118*, 8–12.
- Rahman. (2007). Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. *Bioresource Technology*, *98*(3), 554–559.
- Rosli, W., Daud, W., & Law, K. (2011). Oil palm fibers as papermaking material: potentials and challenges. *BioResources*, *6*, 901–917.
- Salomón, M., Gomez, M. F., & Martin, A. (2013). Technical polygeneration potential in palm oil mills in Colombia: A case study. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, *3*, 40–52.
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (2011). Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource technology*, *102*(16), 7500–7506.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*, *27*(2), 185–194.
- Sandoval Z., E. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal* (Primera ed.). México, D.F.
- Sant, A., Sposina, R., Teixeira, S., Ferreira-leitão, V. S., Olivieri, R., Ferrara, M. A., & Pinto, E. (2013). Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production. Cap 3.
- Sathesh-Prabu, C., & Murugesan, a G. (2011). Potential utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, *102*(3), 2788–92.

- Schiesser, A., Filippi, C., Totani, G., & Lepidi, A. A. (1989). Fine structure and mechanical properties of straw filaments invaded by pleurotus ostreatus micro-organism. *Biological wastes*, 27, 87–100.
- Singh, B. R., & Singh, O. (2004). Global Trends of Fossil Fuel Reserves and Climate Change in the 21st Century.
- Singh, D., Zeng, J., Laskar, D. D., Deobald, L., Hiscox, W. C., & Chen, S. (2011). Investigation of wheat straw biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biomass and Bioenergy*, 35(3), 1030–1040.
- Siyamak, S., Ibrahim, N. A., Abdolmohammadi, S., Yunus, W. M. Z. W., & Rahman, M. Z. A. (2012). Effect of Fiber Esterification on Fundamental Properties of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber/Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Biocomposites. *International journal of molecular sciences*, 13(2), 1327–46.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Nrel, D. C. (2011). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, 2011(July).
- Sudiyani, Y., Styarini, D., Triwahyuni, E., Sembiring, K. C., Aristiawan, Y., Abimanyu, H., & Han, M. H. (2013). Utilization of Biomass Waste Empty Fruit Bunch Fiber of Palm Oil for Bioethanol Production Using Pilot–Scale Unit. *Energy Procedia*, 32, 31–38.
- Tan, L., Yu, Y., Li, X., Zhao, J., Qu, Y., Choo, Y. M., & Loh, S. K. (2012). Pretreatment of empty fruit bunch from oil palm for fuel ethanol production and proposed biorefinery process. *Bioresource technology*, 135, 275–282.
- Unbehaun, H., Konig, S., Spindler, D., & Kerns, G. (2008). Enzymatic modification of lignocellulosic substances for the production of fiberboards. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 63(2), 126–130.

- Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes--factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1458–1480.
- Wan, A., Wan, R., Azhari, S., Ahmad, T., Alawi, S., Nazli, M., Hassan, A., Y. S. (2012). Degradation of oil palm empty fruit bunches (OPEFB) fibre during composting process using in-vessel composter, 7(4), 4786–4805.
- Wan, C., & Li, Y. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology advances*, 30(6), 1447–1457.
- Wan, C., & Li, Y. (2010). Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(1-2), 31–36.
- Wan, C., & Li, Y. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology advances*, 30(6), 1447–1457.
- Wang, F., Xie, H., Chen, W., Wang, E., Du, F., & Song, A. (2013). Bioresource Technology Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis, 144, 572–578.
- Wang, H.-L., Li, Z.-Y., Guo, W.-Y., Wang, Z.-Y., & Pan, F. (2005). Cooperation between ligninolytic enzymes produced by superior mixed flora. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 17(4), 620-622.
- Wang, K., & Sun, R. (2012). Biorefinery Straw for Bioethanol, 700.
- Wen, X., Jia, Y., & Li, J. (2010). Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), 924–928.
- Xiros, C., & Christakopoulos, P. (2009). Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. *Biotechnology for Biofuels*, 2(1), 4.

- Xu, C., Ma, F., & Zhang, X. (2009). Lignocellulose degradation and enzyme production by *Irpex lacteus* CD2 during solid-state fermentation of corn stover. *Journal of bioscience and bioengineering*, *108*(5), 372–375.
- Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., & Wang, D. (2013). Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Applied Energy*, *104*, 801–809.
- Yadav, K. S., Naseeruddin, S., Prashanthi, G. S., Sateesh, L., & Rao, L. V. (2011). Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Bioresource technology*, *102*(11), 6473–6478.
- Yang, X., Ma, F., Zeng, Y., Yu, H., Xu, C., & Zhang, X. (2010). Structure alteration of lignin in corn stover degraded by white-rot fungus *Irpex lacteus* CD2. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *64*(2), 119–123.
- Yu, H., Zhang, X., Song, L., Ke, J., Xu, C., Du, W., & Zhang, J. (2010). Evaluation of white-rot fungi-assisted alkaline/oxidative pretreatment of corn straw undergoing enzymatic hydrolysis by cellulase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *110*(6), 660–664.
- Zahari, M. W., Alimon, A. R., & Wong, H. K. (2009). Utilization of oil palm co-products as feeds for livestock in Malaysia. *Biofuel co-products as livestock feed – Opportunities and challenges*, 243–302.
- Zheng, J., & Rehmann, L. (2014). Extrusion Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(10), 18967–18984.

