Pretratamiento y fermentación de la fibra del palmito *Bactris gasipaes* para la producción de etanol lignocelulósico

Andrea Carolina Rosero Carrera

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2008

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Pretratamiento y fermentación de la fibra del palmito *Bactris gasipaes* para la producción de etanol lignocelulósico

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura.

Presentado por:

Andrea Carolina Rosero Carrera

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2008

Pretratamiento y fermentación de la fibra del palmito *Bactris gasipaes* para la producción de etanol lignocelulósico

Presentado por:

Andrea Carolina Rosero Carrera

Aprobado:

Francisco Javier Bueso, Ph.D. Asesor Principal	Luis Fernando Osorio, Ph.D. Director Carrera Agroindustria Alimentaria
Lonnie Ingram, Ph.D. Asesor	Raúl Espinal, Ph.D. Decano Académico
Mario Contreras, Ph.D. Asesor	Kenneth L. Hoadley, D.B.A. Rector

RESUMEN

Rosero, A. 2008. Pretratamiento y fermentación de la fibra del palmito *Bactris gasipaes* para la producción de etanol lignocelulósico. Proyecto de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 61p.

El objetivo del presente trabajo fue explorar la utilización de la fibra de palmito con 12-13% y 80-85% de humedad como materia prima para la producción de etanol lignocelulósico. En los tres primeros experimentos se usó un diseño experimental de parcelas subdivididas y en el último un DCA. Los resultados fueron analizados estadísticamente por un ANDEVA y por la separación de medias de la prueba Tukey con ($P<0.05$). En el primer experimento se aplicaron 28 tratamientos con ácido diluido a 56 unidades experimentales. Con este experimento se determinó que el ácido y la concentración óptima para la despolimerización de los azúcares de la fibra de palmito fue 0.5% de H_2SO_4. En el segundo experimento se aplicaron cuatro tratamientos a 12 unidades experimentales para comparar la fermentación con *E. coli* de un hidrolizado detoxificado con otro sin detoxificar. El máximo rendimiento de etanol fue 34.4% de 85 g de hidrolizado en 24 hr. En el tercer experimento se aplicaron cuatro tratamientos a ocho unidades experimentales fermentando la celulosa con *K. oxytoca* y con *E. coli*. Esta última generó el mayor rendimiento de etanol con 54.0% de 50 g de fibra en 72 hr. En el cuarto experimento se realizó una fermentación y sacarificación simultanea (SSF) con *E. coli* donde se aplicaron dos tratamientos a cuatro unidades experimentales generando un rendimiento de etanol de 57.8% de 40 g de fibra en 72 hr. Se concluyó que la fibra de palmito puede ser utilizada para la producción de etanol lignocelulósico.

Palabras clave: Detoxificación, fermentación, hidrolizado, lignocelulosa.

CONTENIDO

Portadilla…… i
Pagina de firmas…… ii
Resumen……. iii
Contenido……...…… iv
Índice de cuadros anexos y figuras…….……... v

1. INTRODUCCIÓN……. 1

2. REVISION DE LITERATURA……..…….…… 2

3. MATERIALES Y METODOS……. 16

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN…….. 26

5. CONCLUSIONES.……...…….…… 35

6. RECOMENDACIONES…….. 36

7. BIBLIOGRAFÍA…….. 37

8. ANEXOS…….…….. 41

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS, ECUACIONES Y ANEXOS

Cuadro		Página
1.	Competitividad del etanol lignocelulósico comparado con el etanol de caña de azúcar……...……..	4
2.	Composición de azúcares en la fibra de palmito……...	6
3.	Análisis del pretratamiento con ácido diluido de la fibra con 80-85% de humedad por tipo de ácido y concentración…….	26
4.	Análisis del pretratamiento con ácido diluido de fibra con 12-13% de humedad por tipo de ácido y concentración …….....…….	27
5.	Azúcares totales antes y después de la hidrólisis ácida …	28
6.	Inhibidores totales después de la hidrólisis ácida…..……	28
7.	Pretratamiento con ácido diluido de la fibra de palmito: inhibidores en hidrolizado……..……..	28
8.	Efecto de la detoxificación y el tiempo de fermentación en el etanol, azúcares e inhibidores de fibra con 80-85% de humedad……	29
9.	Efecto de la detoxificación y el tiempo de fermentación en el etanol, azúcares e inhibidores de fibra con 12-13% de humedad……...…….	30
10.	Efecto del tipo de microorganismo y tiempo de fermentación en el etanol, azúcares e inhibidores para la fibra con 80-85% de humedad……...	31
11.	Efecto del tipo de microorganismos en el etanol, azúcares e inhibidores para fibra con 12-13% de humedad……	32
12.	Efecto del tratamiento “one pot” y el tiempo de fermentación en el etanol, azúcares e inhibidores para fibra al 80-85%.……..…	33
13.	Efecto del tratamiento “one pot” y el tiempo en el etanol, azúcares e inhibidores para fibra al 12-13%.……...	33

Figura Página

1. Procesamiento de la fibra de palmito…….…….. 6
2. Estructura de la celulosa……... 7
3. Molécula de la celulosa……. 8
4. Molécula de arabinoxilano…… 8
5. Monómeros de la lignina……... 9
6. Hidrólisis del xilano…….. 10
7. Formación de inhibidores durante el pretratamiento co ácido diluido……. 11
8. Sistema de fermentación……... 24

Ecuación Página

1. Pretratamiento. Cantidad de ácido puro……... 19
2. Pretratamiento. Cantidad de fibra necesaria…… 19
3. Cantidad de agua agregada en la separación de la hemicelulosa y la celulosa .....……. 20

Anexos Página

1. Resultados del pretratamiento con ácido diluido de la fibra con 80% a 85% de humedad……...….. 43
2. Resultados del pretratamiento con ácido diluido de la fibra con 12% a 13% de humedad……..…….. 44
3. Fermentación SSF con *Escherichia coli*. de la fibra con 80% a 85% de humedad…….……... 45
4. Fermentación con *K. oxytoca* de la fibra con 80% a 85% de humedad…….…….. 46
5. Fermentación SSF con *Escherichia coli* “one pot’’ de la fibra con 80% a 85% de humedad…...…….. 47
6. Fermentación SSF con *Escherichia coli* de la fibra con 12% a 13% de humedad….....…… 48
7. Fermentación SSF con *Klebsiella oxytoca* de la fibra con 12% a 13% de humedad…….. 49
8. Fermentación SSF con *Escherichia coli* “one pot’’ de la fibra con 12% a 13% de humedad……...…… 50
9. Fermentación del hidrolizado sin detoxificar con *Escherichia coli* en la fibra con 80% a 85% de humedad. 51
10. Fermentación del hidrolizado detoxificado con *Escherichia coli* en la fibra con 80% a 85% de humedad. 52

11. Fermentación del hidrolizado sin detoxificar con Escherichia coli en la fibra con 12% a 13% de humedad.. 53
12. Fermentación del hidrolizado detoxificado con *Escherichia coli* en la fibra con 12% a 13% de humedad. 54
13. Curvas de calibración para azúcares en el HPLC…….. 55
14. Curvas de calibración para ácidos orgánicos en el HPLC. 57
15. Curva estándar de etanol en el GC……... 58
16. Azúcares totales de la fibra con 80-85% de humedad…. 59
17 Inhibidores totales en la fibra de palmito con 80-85% de humedad ……..……. 60
18 Azúcares totales de la fibra con 12-13% de humedad….. 61
19 Inhibidores totales en la fibra con 12-13% de humedad… 62

1. INTRODUCCIÓN

Mantener un continuo suministro de energía es la clave del desarrollo económico de los países. El mundo demanda cada vez más petróleo para su progreso pero los elevados precios de este combustible, la creciente preocupación sobre la seguridad energética y el cambio climático mundial han intensificado la búsqueda de fuentes de energía alternativas y sostenibles. Con el objetivo de aliviar la demanda de los mercados y mejorar la sustentabilidad de los recursos naturales se ha impulsado el desarrollo de combustibles renovables como el etanol lignocelulósico.

El etanol lignocelulósico es obtenido a través de la fermentación de azúcares presentes en la biomasa residual la cual es una materia prima abundante y de bajo costo. La celulosa, hemicelulosa y lignina son los componentes principales de la lignocelulosa la cual es la estructura principal de la biomasa. El etanol lignocelulósico no contribuye al aumento de CO_2 en la atmósfera ya que su producción es realizada un proceso de continuo reciclaje de carbón. Además, al usar la biomasa presente en los desechos agrícolas no se utilizan tierras destinadas a la producción de alimentos. Una de las grandes productoras de desechos agrícolas es la procesadora de alimentos ecuatoriana PRONACA. Esta compañía es la mayor exportadora a nivel mundial de corazones de palmito *Bactris gasipaes* lo cual genera 70 toneladas diarias de fibra de palmito como desecho agrícola.

El objetivo principal de este estudio fue comprobar si la fibra de palmito era una materia prima eficaz para la producción de etanol lignocelulósico. Otro objetivo fue determinar si la fibra de palmito con 80 a 85% de humedad era mejor materia prima que la fibra con 12 a 13 % de humedad ya que el secado de la fibra representa un gasto para la compañía. Para lograr estos objetivos se modificaron diferentes protocolos de pretratamiento, detoxificación y fermentación los cuales son usados en el bagazo de caña de azúcar. La fibra fue sometida a un pretratamiento con ácido diluido, el hidrolizado fue detoxificado con $Ca(OH)_2$ y la torta fue fermentada con el proceso “one pot” y con el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LA BIOMASA COMO FUENTE DE ETANOL

Bajo el término biomasa se incluye toda la materia orgánica que tiene su origen inmediato en un proceso biológico (Jarabo y Fernández, 1983). La formación de biomasa vegetal está basada en el proceso de fotosíntesis que a partir de dióxido de carbono (CO_2) atmosférico y de una fuente energética de irradiación (luz), llevan a cabo un proceso de síntesis en los vegetales que da lugar a moléculas orgánicas con alto contenido de energía química. La producción de biomasa a escala global es muy alta. Se estima que la fotosíntesis genera anualmente 220 mil millones de toneladas de peso seco de biomasa, lo que supone unas diez veces la demanda energética mundial (Bioenergy, 2008).

La biomasa se puede clasificar en biomasa natural, cultivada y residual. La natural es la que se produce en la naturaleza sin la intervención humana. No es la más adecuada para un aprovechamiento energético masivo ya que puede originar una rápida degradación de los ecosistemas. La biomasa cultivada se produce para obtener biomasa transformable en combustible utilizando tierras que pueden ser utilizadas para cultivos alimenticios como la caña de azúcar en Brasil (FAO, 2008). Por último, la biomasa residual se genera en cualquier actividad humana principalmente en los procesos agrícolas, ganaderos y los del propio hombre tales como desechos y aguas residuales (Ballesteros *et al.*, 2002). Dentro de este tipo de biomasa se encuentran los residuos agroindustriales que pueden ser empleados con fines energéticos. Para este estudio se utilizó fibra de palmito que es generada como desecho agrícola.

2.2 ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN COMO COMBUSTIBLE

El etanol atrajo interés como combustible alternativo para el transporte debido a las crisis petroleras como la producida en 1970 la cual puso en evidencia la dependencia que muchas economías a nivel mundial tienen en la importación de este hidrocarburo (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996). Actualmente, los altos precios del petróleo han incentivado la búsqueda de alternativas de energía renovable. Los biocombustibles de segunda generación basados en: lignocelulosa, desechos de la industria maderera, pastos y hierbas tendrían un impacto fundamental en la oferta energética (Bioenergy, 2008). La diferencia entre el etanol lignocelulósico con respecto a los combustibles actuales es que se elaboran a partir de materias primas que no se destinan a la alimentación. La utilización de biomasa lignocelulósica es, a mediano plazo, la opción más prometedora para la producción de etanol combustible a bajos costos (Bioenergy, 2008). La polémica generada por el etanol a partir de maíz y caña de azúcar por sustituir alimento por carburante quedaría eliminada

(FAO, 2008). El etanol lignocelulósico puede utilizarse como combustible único realizando modificaciones a los motores o en mezclas con la gasolina desde 10 a 85% como el E-85 (15% de gasolina y 85% de etanol). El etanol de segunda generación es un combustible renovable, sostenible y su mercado está en expansión a nivel mundial (Lynd, 1996).

2.3 VENTAJAS AMBIENTALES DEL ETANOL LIGNOCELULÓSICO

Una de las principales ventajas del etanol lignocelulósico es que no contribuye en el aumento de dióxido de carbono en la atmósfera. Esto se debe a que este combustible es producido en un ciclo de continuo reciclaje de carbón en el cual las emisiones producidas por la combustión son absorbidas por las plantas y éstas son después utilizadas para producir etanol repitiendo el ciclo. El etanol lignocelulósico reduce las emisiones de gases de efecto invernadero con respecto a los combustibles fósiles en un 85%, mientras que el del maíz lo hace de un 18 a 29% (Mann, 2004). Otra ventaja importante es que al disponer de una mayor variedad de materias primas no genera competencia con la industria alimenticia. Además, se genera un mayor rendimiento de energía por hectárea, debido a que es posible aprovechar el total de la biomasa. Al producir etanol lignocelulósico se generan desechos como la lignina que puede ser quemada con el fin de generar energía en forma de electricidad o calor (FAO, 2008). Otra ventaja es la fácil biodegradabilidad del etanol que comparado con el petróleo se descompone más fácilmente cuando se presentan accidentes o derrames industriales (Wyman *et al.*, 1990; Bull *et al.*, 1992). Otras propiedades que hacen al etanol un combustible competitivo comparado con la gasolina son: mayor calor de vaporización, mayor expansibilidad durante la combustión, menor temperatura de la llama y un mayor octanaje (Sinor y Bailey, 1993). Éstas cualidades proveen mayor poder, eficiencia y requieren menos sistemas de enfriamiento (Lynd, 1996).

2.4 DESVENTAJAS AMBIENTALES DEL ETANOL LIGNOCELULÓSICO

Una de las desventajas del etanol lignocelulósico es la generación de menor kilometraje por galón. Este problema está siendo resuelto con la fabricación de motores de alta compresibilidad optimizados para etanol (Lynd, 1996). Estos motores son llamados "motores de combustión interna dedicados" y están diseñados para aprovechar al máximo las cualidades del etanol y producir mejor rendimiento del vehículo (Black, 1991). Una de las principales barreras es el costo de producción ya que actualmente no resulta competitivo comparado con el de los combustibles convencionales. Sin embargo, distintas estimaciones señalan que para el año 2010 la innovación tecnológica permitirá alcanzar un costo competitivo. Cuando la tecnología de conversión esté completamente madura, los costos serán incluso menores que los necesarios para competir (Mann, 2004).

2.5 COSTO DE PRODUCIR ETANOL LIGNOCELULÓSICO

Para hacer una comparación económica es necesario tomar en cuenta los costos de producción y recolección de la materia prima, su transporte y los costos de elaboración del etanol (Bioenergy, 2008). Actualmente la gasolina cuesta $0.95/L y el costo de producción de etanol ha bajado a $1.07/L (Hill et al. 2006). Otro costo que se deben tener en cuenta son los ácidos usados en el proceso de pretratamiento. Baddley Chemicals Inc. de Baton Rouge, LA (USA) es una de las compañías que comercializa grandes cantidades de ácidos sulfúrico y fosfórico. El precio en dólares de un contenedor con 50 g de H_2SO_4 es de $810 y el de H_3PO_4 es de $2,251. Estos costos actualmente son reducidos con procesos en los cuales se recircula el ácido en la misma planta de etanol lignocelulósico.

El rendimiento energético de la producción de etanol a partir de maíz en EE.UU. es hasta del 25%, lo que significa que se obtiene menos energía de la invertida. En cambio, con el etanol lignocelulósico el rendimiento es del 45%, es decir, se obtiene más energía de la que se invierte (Sun y Cheng, 2005).

Cuadro 1. Competitividad del etanol lignocelulósico comparado con el etanol de caña de azúcar.

Costos	**Maíz**	**Lignocelulosa**
	($ dólares)	**($ dólares)**
Costo de la materia prima vegetal	1.17	1.00
Producción de productos secundarios	-0.38	-0.10
Enzimas	0.04	0.40
Otros costos	0.62	0.80
Costo de capital	0.20	0.55
Total	**1.65**	**2.65**

Fuente: (Hill *et al*., 2006).

De acuerdo al Cuadro 1, uno de los mayores costos en la producción del etanol lignocelulósico es el costo de la materia prima vegetal, que puede ser eliminado cuando la materia prima es un desecho agrícola.

2.6 EL PALMITO *Bactris gasipaes*

La fibra de palmito es un desecho agrícola generado por la extracción del corazón de la palma *Bactris gasipaes* más conocida como Chontaduro. Esta especie de palma proviene del Amazonas y otras zonas tropicales de Centro y Sur América. Esta palma es más productiva a altitudes medias (menos de 800 msnm), en zonas con dos a cinco metros de lluvia al año y temperaturas promedio de 24ºC (Mora-Urpí, 1997). El palmito florece desde los 4 años de madurez y puede vivir hasta 75 años logrando una altura promedio de 20 metros. Después de convertirse en adulta, el palmito produce unas 10 a 15 ramas secundarias (Mora-Urpí, 1997). Cuando éstas ramas llegan a unos nueve cm de diámetro

y una altura de 30 cm son cortadas y su corazón es removido para ser comercializado como alimento (PRONACA, 2008).

2.7 PRONACA Y LA PRODUCCION DE FIBRA DE PALMITO

La fibra de palmito fue enviada por la empresa ecuatoriana INAEXPO desde Ecuador al Centro de Energía y Químicos Renovables en la Universidad de Florida. Desde 1979 PRONACA, grupo alimentario y agroindustrial ecuatoriano produce y comercializa las marcas líderes en el mercado local. En 1993 PRONACA fundó INAEXPO siendo su primer producto de exportación el palmito cultivado. Desde el 2001 Ecuador es el primer exportador mundial de palmito cultivado (PRONACA, 2008).

El proceso de producción inicia escogiendo las variedades de las semillas, se colocan en germinadores para luego ser plantadas y cosechadas. INAEXPO, después de la extracción del corazón de palmito genera grandes cantidades de fibra. El proceso para la obtención de la fibra se realiza de la siguiente manera: los tallos que llegan a la planta son seleccionados, pelados y descortezados. En este proceso se separan las últimas dos envolturas del tallo, la base y la punta para dejar solamente el corazón de palmito. Estos pedazos son desechados y corresponden a la fibra que contiene de 80-85% de humedad. Esta fibra es picada y pasada por un trapiche en el cual se extrae agua de la fibra obteniendo una fibra semi húmeda con un 50-55% de humedad. Esta fibra semi húmeda llega de 12-13% de humedad al someterla a costosos procesos industriales de secado como el uso de microondas.

En la planta procesadora de PRONACA 70 toneladas de fibra de palmito son desechadas diariamente, esto significa 1,400 toneladas por mes y 16,800 toneladas por año. El problema radica en que actualmente la fibra desechada no cumple ninguna función específica y es apilada en campos de desecho agrícola (INAEXPO, 2007).

Figura1. Procesamiento de la fibra de palmito
Fuente: (INAEXPO, 2007).

2.8 COMPOSICIÓN DE LA FIBRA DE PALMITO

Para conocer la composición de la fibra de palmito, se enviaron muestras a los laboratorios de Verenium Biofuels Corporation. Esta empresa está ubicada en Louisiana. Verenium es una empresa líder en el desarrollo y la comercialización de etanol celulósico como combustible renovable (Verenium, 2008).

La pared celular es el componente que provee rigidez a la fibra de palmito. Está compuesta por una red de polímeros llamados lignocelulosa compuesta por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina (Lavarack *et al*., 2002). Según los resultados obtenidos en el laboratorios de Verenium de 100 g de fibra de palmito el 38.47 % corresponde a la celulosa, 25.95% a las hemicelulosas y 18.80 % a la lignina.

Cuadro 2. Composición de azúcares en la fibra de palmito.

Monómeros	**% Peso seco**	**g/L**
Glucosa	38.47	55.25
Xilosa	18.49	26.56
Galactosa	3.29	4.73
Arabinosa	2.80	4.02
Manosa	1.37	1.97
Total	**64.42**	**92.53**

Fuente: (Verenium Biofuels Corporation, 2008).

En el Cuadro 2 se puede observar que existen 64.42 g de azúcares formando polímeros en 100 g de fibra de palmito. Al utilizar el factor de conversión para convertirlo a etanol

(0.51) se obtiene que la cantidad teórica de etanol es 47.19 g de etanol en 100 g de fibra de palmito. Es decir el rendimiento teórico de etanol es 47.19%.

2.8.1 Celulosa.

Es el material orgánico más abundante en el planeta, no es apto para consumo humano debido a su estructura. Solo puede ser metabolizado por organismos especializados capaces de hidrolizar las uniones entre los monómeros. La celulosa conforma el 40% de la fibra de palmito seca. La celulosa es un polímetro lineal formado por unas 7,000 a 15,000 moléculas de glucosa unidas por enlaces ß-(1,4) (Figura 2). Estos polímeros se asocian de forma paralela y longitudinal formando azúcares dobles denominadas celobiosas (Figura 3) (Rose y Bennett, 1999). La celulosa es la mayor fuente de glucosa en la naturaleza y esta azúcar es fácilmente metabolizada por microorganismos para producir productos orgánicos como etanol. Los enlaces ß de la celulosa forman las cadenas lineales que son altamente estables y muy resistentes al ataque químico debido al alto grado de energía de las uniones del hidrógeno entre las cadenas de la celulosa (Bioenergy, 2008). Por esta razón su despolimerización se realiza mediante reacciones químicas o enzimáticas. Las reacciones químicas no son muy atractivas industrialmente ya que la glucosa liberada es simultáneamente degradada por las condiciones de la reacción. El método más común para despolimerizar la celulosa es a través un coctel de proteínas de reacciones enzimáticas. Con este método la celulosa es desarmada selectivamente sin producir una degradación de los azúcares. En la sección 2.10 se da una descripción detallada de este método.

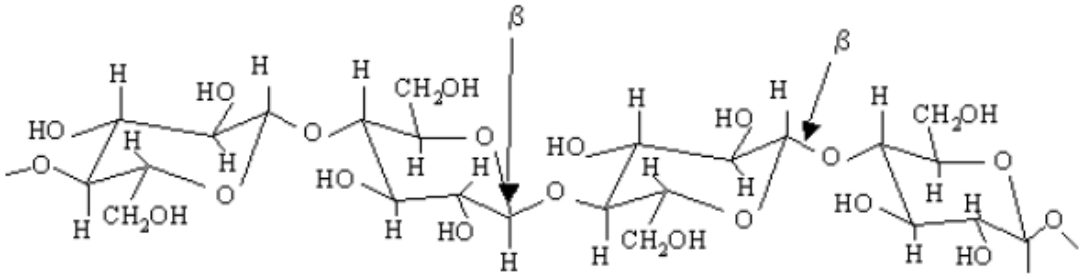


Figura 2. Estructura de la celulosa
Fuente: (Centro de Investigación de bioenería, 2008).

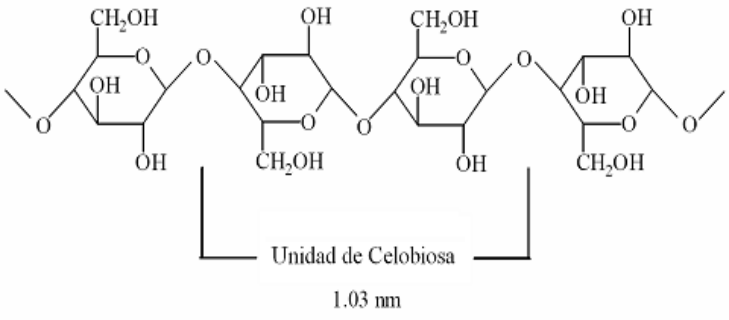


Figura 3. Molécula de la celulosa.
Fuente. (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000)

2.8.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. La hemicelulosa es una red de polímeros heterogéneos compuestos de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (manosa, glucosa y galactosa), y carbohidratos acídicos (Saha, 2003). Su naturaleza ramificada hace que la hemicelulosa sea amorfa y relativamente fácil de hidrolizar por métodos químicos (Bioenergy, 2008). Este proceso se explica en la sección 2.9.

El polímero más abundante en la hemicelulosa es el xilano (McMillan, 1993). El xilano está compuesto por un homopolímero central de ß-D-xylopiranosa unida por enlaces 1,4. Otras moléculas como arabinosa y los ácidos: glucorónico, acético, ferúlico y p-comaúrico se unen al esqueleto de una manera aleatoria y forman ramificaciones (Aspinall, 1980). En la Figura 4 se puede observar el esqueleto de xilano con ramificaciones de arabinosa.

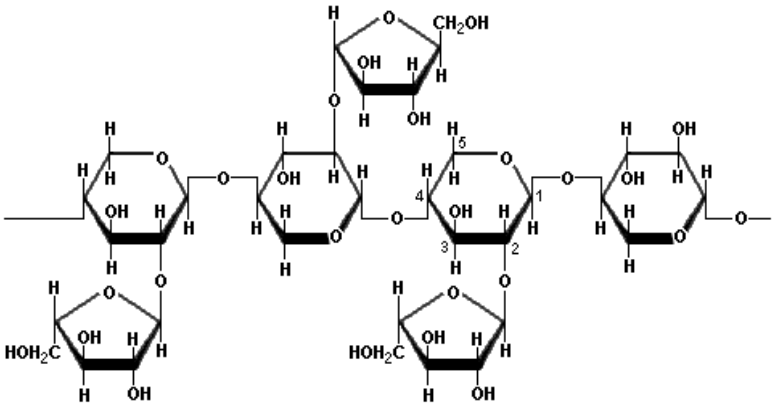


Figura 4. Molécula de arabinoxilano.
Fuente. (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000)

2.8.3 Lignina

La lignina es una sustancia orgánica que se encuentra entre las uniones de las células vegetales y es fundamental en la rigidez de la matriz de celulosa y hemicelulosa. La lignina es un heteropolímero formado por diferentes compuestos aromáticos no fermentables. Los monómeros más comunes en la lignocelulosa son: syringyl y los alcoholes p-comaúrico, coniférico y sináptico (Figura 5). Estas moléculas que conforman la lignina no son fermentables pero pueden ser usadas como combustible para generar calor y electricidad (McMillan, 1993).

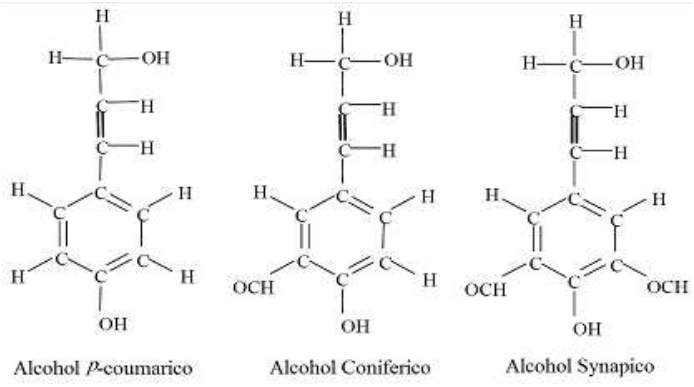


Figura 5. Monómeros de la lignina.
Fuente: (Mann, 2004).

2.9 PRETRATAMIENTO DE LA FIBRA

Pretratamiento es la despolimerización de uno o todos los componentes de la biomasa (hemicelulosa, celulosa y lignina) para que sus azúcares puedan ser fermentadas (Rivers y Emert, 1987). Para liberar los azúcares de la lignocelulosa el pretratamiento se realiza en dos etapas: primero se solubiliza la hemicelulosa con métodos químicos y después se despolimeriza la celulosa con métodos enzimáticos (Sun y Cheng, 2005). Existen múltiples métodos para solubilizar la hemicelulosa como: explosión de vapor (Bownell y Saddler, 1984), explosión de la fibra con amonio (Dale y Moreira, 1982), pulverización (Cadoche y López, 1989), ácido diluido (Torget *et al.*, 1990) entre otros. Después del pretratamiento químico los monómeros de la hemicelulosa quedan disueltos en un líquido llamado hidrolizado (sección 2.9.2) y la celulosa queda presente en una masa insoluble llamada torta. Estos dos componentes son separados y la torta es expuesta al pretratamiento con hidrólisis enzimática (sección 2.10).

2.9.1 Mecanismo de la hidrólisis con ácido diluido

La hidrólisis con ácido diluido es el pretratamiento más utilizado actualmente por la industria. En este método se utilizan ácidos minerales como: ácido sulfúrico, ácido

clorhídrico y ácido fosfórico para ablandar la lignina permitiendo la hidrólisis de los enlaces entre los polímeros de la hemicelulosa. Este pretratamiento no tiene mayor efecto en la despolimerización de la celulosa (Lavarack, *et al.*, 2002). El protocolo de ácido diluido varía dependiendo del tipo de biomasa que se utiliza. En general se usa una temperatura entre 80 y 200ºC, una proporción entre la masa de la fibra y agua de 1:5 a 1:20, una concentración de ácido de 0.25% al 8% de peso seco y un tiempo de reacción de 60 a 120 min (Lavarack, *et al*., 2002). Este proceso requiere una baja concentración de ácido para descomponer la hemicelulosa lo cual disminuye la corrosión de los hornos donde se realiza el pretratamiento y evita posteriores esfuerzos para reciclar el exceso de ácido (Schell *et al*., 1991). El pretratamiento con ácido diluido toma menos tiempo, requiere menor inversión y produce menos contaminación (Schell *et al*., 1998).

La hidrólisis ocurre porque las moléculas de ácido hidratan los enlaces entre los monómeros de los polímeros. En la Figura 6 se observa como el ácido sulfúrico hidroliza el xilano para separar el monómero de xilosa.

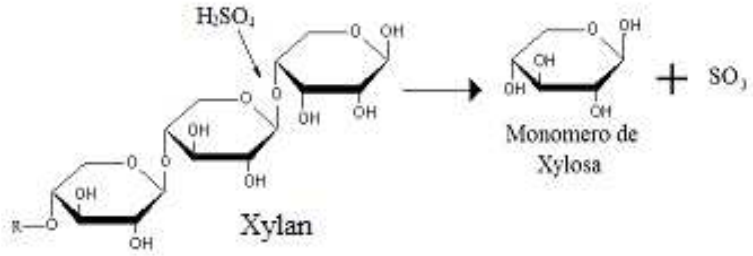


Figura 6. Hidrólisis del xilano.
Fuente: (Lavarack *et al*., 2000).

2.9.2 Hidrolizado

El hidrolizado es la parte líquida que resulta después de exponer la fibra al pretratamiento con ácido diluido. Este líquido es usualmente separado de la parte sólida (torta) por medio de centrifugación o filtrado al vacío. El hidrolizado está compuesto por monómeros de hemicelulosa solubilizados, en su mayoría xilosa y arabinosa, también contiene galactosa, manosa y glucosa (Lavarack *et al*., 2002). Desafortunadamente el hidrolizado debido a la reacción de caramelización forma inhibidores que afectan el crecimiento de las bacterias fermentadoras (Bautista, 2001). El hidrolizado es utilizado como caldo de cultivo para la producción de etanol. Para que las bacterias crezcan en este medio es necesario neutralizar el hidrolizado hasta un pH de 6.5 y adaptar las bacterias a medios con altas concentraciones de inhibidores (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). También se puede realizar un tratamiento de detoxificación con hidróxido de calcio (Chang *et al*., 1998). En un proyecto actualmente llevado a cabo en la Universidad de Florida se está adaptando a la bacteria *Escherichia coli LY180* a condiciones de alta concentración de inhibidores como: furfural y ácido acético (Miller *et al*., publicación pendiente). El acondicionamiento de las bacterias fermentadoras junto con la detoxificación del

hidrolizado tiene el potencial de reducir costos y aumentar la producción de etanol utilizando lignocelulosa.

2.9.3 Inhibidores

Los inhibidores son moléculas que interfieren en el metabolismo de las bacterias fermentadoras. Estas moléculas se forman por caramelización que es una serie compleja de reacciones que comienzan cuando los azúcares se calientan por encima de su punto de fusión en ausencia de proteínas y se ve favorecida por condiciones alcalinas o ácidas (Aqualab, 2001). Al someter el azúcar a temperaturas elevadas se deshidratan formando los inhibidores: furfural y 5-hidroximetil-furfural. Estos compuestos se polimerizan consigo mismos o con otras substancias semejantes para formar macromoléculas de pigmentos llamadas melanoidinas (Lavarack, 2000). Los inhibidores más comunes en su orden de abundancia son acetato, furfural (degradación de pentosas), 5-hidroximetil-furfural (degradación de hexosas), ácido levulínico y productos de la degradación de la lignina (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). El acetato y otros productos fenólicos no identificados son inevitablemente generados porque forman parte integral de la lignocelulosa y se liberan durante el proceso de hidrólisis. Algunos inhibidores como el formato también son producidos por microorganismos pero solo son tóxicos cuando se encuentran presentes en altas concentraciones. En la Figura 7 se muestran los inhibidores a *E. coli*.

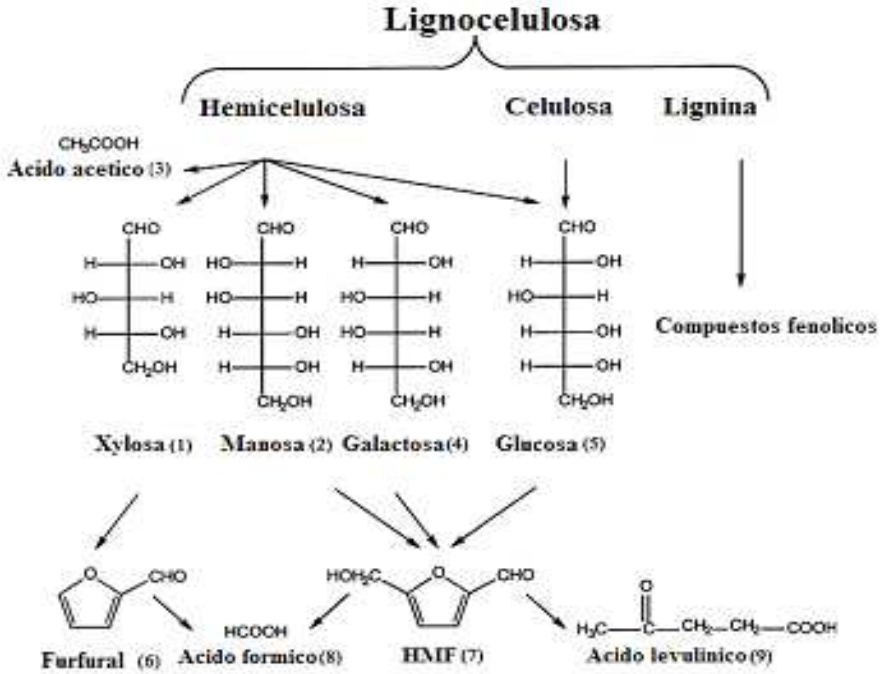


Figura 7. Formación de inhibidores durante el pretratamiento con ácido diluido.
Fuente: (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

Cuando se evalúa la toxicidad del hidrolizado, se debe tener en cuenta el efecto sinérgico de los inhibidores, es decir, el efecto de dos inhibidores presentes es más fuerte que la suma del efecto de los inhibidores por separado. El problema del hidrolizado es que contiene inhibidores derivados de la lignina que no han sido identificados y no pueden ser cuantificados, pero que en su mayoría son alcoholes y ácidos fenólicos.

2.9.3.1 Furfural. Esta molécula es generada a través de la degradación de las pentosas xilosa y arabinosa (Larsson *et al*, 1999). El mecanismo de su toxicidad no ha sido completamente explicado, pero varios estudios concluyen que este furano es altamente tóxico para las baterías fermentadoras ya que reduce su masa celular (Zaldivar *et al*, 1999; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). Se han hecho estudios dedicados a investigar la toxicidad utilizando la bacteria *Escherichia coli* como modelo. Cuando este compuesto está presente con una concentración de 2.4 g/L en un caldo de cultivo de Luria-Bertani (LB) reduce el crecimiento de *Escherichia coli* en un 50% (Zaldivar *et al.*, 1999). Este efecto es más fuerte cuando se utiliza un caldo de cultivo mineral ya que una concentración de dos g/L de furfural es capaz de prevenir el crecimiento de *Escherichia coli* en un 100% (Miller, 2007 publicación pendiente). Cuando esta molécula entra a la parte soluble del citoplasma la bacteria inmediatamente la convierte en furfuryl alcohol a través de alcohol deshidrogenasa (la misma molécula que produce etanol). Esto significa que las enzimas etanologénicas desvían su función y el proceso de fermentación es reducido, causando que las bacterias sean incapaces de dividirse normalmente (Larsson *et al*, 1999). El furfural también previene el correcto funcionamiento de las enzimas glicolíticas y causa la acumulación de otros compuestos tóxicos como acetaldehído (Palmqvist y Hahn-Hägerdal 2000).

2.9.3.2 Hidroximetil-furfural. El hidroximetil-furfural (HMF) es generado por la degradación de las hexosas: glucosa, galactosa y manosa (Larsson *et al.*, 1999). El mecanismo de toxicidad del HMF es similar al del furfural ya que este también es convertido a alcohol cuando entra las células (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). Su efecto nocivo es menos evidente debido a su baja permeabilidad a través de la membrana celular (Zaldivar *et al.*, 1999). Según Zaldivar (1999), este compuesto reduce el 50% del crecimiento celular de las bacterias cuando se encuentra presente a una concentración de 2.7 g/L en LB.

2.9.3.3 Ácido acético. El ácido acético o su forma ionizada acetato es un ácido que se encuentra en el vinagre. Es el principal responsable de su sabor y olor agrio. El ácido acético es generado a través de la hidrólisis de la hemicelulosa ya que el 60-70% de la xilosa presente en este polímero se encuentra acetilada (Timell, 1967). El efecto inhibidor del acetato depende del pH del cultivo. Cuando el pH se acerca al pKa de 4.73 del ácido acético la mayoría de éstas moléculas se convierten en liposolubles penetrando fácilmente la pared celular de las bacterias. Dentro de la célula el ácido acético se disocia liberando hidrógenos que acidifican la parte soluble del citoplasma y genera aniones que interfieren con el metabolismo de las bacterias (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). Diferentes estudios han sido realizados para identificar la concentración de ácido acético tolerable

por *Escherichia coli*. De acuerdo con Zaldivar *et al.* (1999), el ácido acético reduce el crecimiento celular en un 50% cuando se encuentra presente a una concentración de nueve g/L en cultivo LB a un pH de 7. Este efecto se agudiza cuando la fermentación se lleva a cabo en un cultivo mineral a un pH de 6.5 ya que el crecimiento celular es totalmente inhibido cuando el ácido acético llega a siete g/L.

2.9.3.4 Ácido Fórmico. El ácido fórmico es generado debido a la degradación del furfural y HMF (Ulbricht *et al.*, 1984). El mecanismo de toxicidad no ha sido completamente descubierto, pero se presume que es similar al del acetato. El pKa del ácido fórmico es 3.8 y traspasa la pared celular de las bacterias con mayor facilidad que el acetato ya que tiene una menor masa molecular. De acuerdo con Zaldivar *et al.* (1999), el ácido fórmico reduce el crecimiento celular en un 50% cuando se encuentra presente en 2.5 g/L en LB a pH 7. El efecto tóxico del ácido fórmico es más fuerte cuando la fermentación se lleva a cabo en cultivos minerales y a pHs bajos. Aunque este ácido es más tóxico que el acetato, el pretratamiento con ácido diluido no es lo suficientemente severo para degradar cantidades significativas de furfural o HMF. Por el contrario, cuando se encuentra presente en bajas concentraciones este ácido ayuda al metabolismo de las bacterias (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

2.9.3.5 Ácido levulínico. El ácido levulínico es generado por la degradación de HMF (Ulbricht *et al.*, 1984). Sus efectos y mecanismo de inhibición son similares a los del acetato y formato. Este ácido reduce el crecimiento de *Escherichia coli* en un 50% cuando se encuentra presente a una concentración de 7.5 g/L en un cultivo de LB y a un pH 7. El ácido levulínico es más tóxico que el acetato pero el pretratamiento con ácido diluido no es lo suficientemente severo para generar cantidades significativas de este ácido.

2.9.4 Detoxificación del hidrolizado

La toxicidad del hidrolizado es reducida con un tratamiento con hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$. Ni el mecanismo ni la identidad de todas las toxinas removidas han sido identificadas, pero se conoce que este tratamiento remueve en gran parte toxinas como: furfural, HMF y algunos de los compuestos fenólicos producidos por la degradación de la lignina. La detoxificación del hidrolizado con $Ca(OH)_2$ no remueve otros inhibidores como acetato, ácido levulínico o formato. La detoxificación se realiza agregando de 18 a 30 g de $Ca(OH)_2$ deshidratado por kilogramo de hidrolizado mezclando constantemente (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). La mezcla se deja incubar a una temperatura entre 25ºC y 60ºC por 30 min. Después de terminado el proceso de detoxificación el 80% del líquido es decantado dejando en el fondo del recipiente una crema formada por la precipitación de las toxinas junto con el calcio (Olsson y Hahn-Hägerdal 1996). El hidrolizado decantado es luego utilizado como caldo de cultivo.

2.10 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La meta de este pretratamiento es despolimerizar la celulosa. Debido a su naturaleza cristalina e insoluble este polímero no es monomerizado con el pretratamiento de ácido diluido. Para descomponer la celulosa con métodos químicos se necesitan condiciones más severas que incrementan los costos, degradan los azúcares y producen más toxinas, por lo que se recurre a métodos utilizados por la naturaleza para descomponer la celulosa. Este proceso es realizado por microorganismos como *Trichoderma reesei, Trichoderma viride, Aspergillus niger*, etc., los cuales producen enzimas llamadas celulasas que hidrolizan las celulosas. Algunas de las enzimas celulolíticas más importantes son: endoglucanasas, exoglucanasas y β-glucosidasas (Ingram *et al*., 1987). Las endocelulasas son capaces de hidrolizar los enlaces β-(1-4) aleatoriamente a través de las microfibras de celulosa. Las exocelulasas remueven los monómeros de celulosa uno por uno al final del polímero. Las β-glucosidasas rompen los enlaces β-(1-4) entre los monómeros de celulosa pero generan un disacárido llamado celobiosa (Figura 3). Esto hace que otra enzima llamada celobiasa sea usada para separar la celobiosa en glucosas. La hidrólisis enzimática se realiza en la torta a una temperatura de 55ºC por 10 hr. con un pH de 5. Después de la incubación el contenedor es inoculado con un microorganismo para metabolizar los monómeros de glucosa y otros azúcares residuales de la hemicelulosa.

2.11 FERMENTACIÓN

Fermentación es el proceso en el cual los microorganismos generan moléculas para reoxidar los aceptadores de electrones como el NADH en la ausencia de oxígeno. Las reacciones reductivas ocurren en la parte soluble del citoplasma (citosol) y el ATP es producido a través de una fosforilación a nivel de substrato. El azúcar que provee más energía durante el metabolismo es la glucosa. El isómero más común de este monómero es el D-glucosa el cual entra a las células a través de la enzima fosfotransferasa que utiliza ATP para convertir el azúcar en glucosa-6-fosfato. Esta molécula entra al proceso de glicólisis para luego producir etanol.

2.11.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria entérica y es el microorganismo más estudiado en el mundo, su genoma ha sido derivado y múltiples técnicas de ingeniería genética han sido diseñadas para modificar su metabolismo. Este microorganismo es atractivo para la fermentación de etanol porque es una de las bacterias más fáciles de cultivar ya que es capaz de fabricar todos los aminoácidos y lípidos necesarios para su crecimiento. Naturalmente, *Escherichia coli* fermenta simultáneamente diferentes productos orgánicos como acetato, formato, lactato, fumarato, succinato y etanol. Ingram *et al*., (1987) y Yomano *et al*., (2007) modificaron esta bacteria a través de ingeniería genética y evolución metabólica para que fuera homo etanologénica, resistiera altas concentraciones de etanol y creciera en un cultivo mineral. Las modificaciones genéticas más importantes fueron la extracción de los genes productores de ácidos orgánicos al igual que el gen nativo productor de etanol; después se insertaron los genes etanologénicos *pdc* y *adhB* de

Zimomonas mobilis (un organismo homo etanologénico). Estas modificaciones generaron una bacteria capaz de fermentar grandes cantidades de etanol. Con la evolución metabólica se realizaron más de 100 cultivos secuenciales para forzar pequeñas mutaciones que hacen al *Escherichia coli* producir más etanol en menos tiempo. Debido a que estas bacterias deben crecer en un medio con toxinas el laboratorio del Dr. Ingram está adaptando a *E. coli* LY180 a condiciones con altas cantidades de furfural y otras toxinas. La bacteria más resistente hasta ahora es *E. coli EMFR17* la cual fue desarrollada por Elliot Miller (Miller, publicación pendiente) y resiste hasta 2g/L de furfural en un cultivo mineral, por lo que fue utilizada durante la realización de este estudio. Sus condiciones de crecimiento son 37ºC y un pH de 6.5 a 7.

2.11.2 *Klebsiella oxytoca*

Esta bacteria entérica no ha sido tan estudiada como *Escherichia coli* pero su metabolismo es similar. La *K. oxytoca* es fácil de modificar genéticamente, crece en medios minerales y resiste altas concentraciones de etanol. Esta bacteria tiene características que le dan ventajas sobre *Escherichia coli* ya que puede crecer a un pH de 5.2 a 5.8, pH cercano al necesario para la hidrólisis enzimática y produce celobiasa naturalmente. Éstas características hacen que *Klebsiella oxytoca* sea ideal para el proceso de sacarificación y fermentación descrito en la sección 2.13. La desventaja de la *Klebsiella oxytoca* es que cuando el pH esta abajo de seis algunos inhibidores generados por el pretratamiento como el ácido acético son más tóxicos. Sin embargo esta desventaja puede ser superada con procesos de detoxificación y adaptación del microorganismo. Para este estudio se utilizó *Klebsiella oxytoca XZ122*, modificada genéticamente igual que *Escherichia coli LY180* y logra el mismo rendimiento en un cultivo mineral a 37ºC y pH de 5.2.

2.12 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF)

El proceso de fermentación y sacarificación simultánea (SSF) por sus iniciales en inglés, fue diseñado por la compañía Gulf Oil Company (Emert *et al.,* 1983), y se trata de la hidrólisis enzimática de la celulosa llevada a cabo en presencia de microorganismos fermentadores (Wright *et al*., 1987). Este proceso se realiza en un solo contenedor y las condiciones son adaptadas para maximizar el buen desempeño de las enzimas y de los microorganismos. Las enzimas funcionan idealmente en condiciones acídicas (pH 4-5) y altas temperaturas (40-50ºC). Las condiciones óptimas de los microorganismos fermentadores son de pH neutro (pH 5.2-7) y temperaturas moderadas (30-40ºC) (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996). Este proceso ha generado hasta 40 g de etanol por cada litro de medio, usando bagazo de caña como materia prima (Ingram *et al*., 1984). La efectividad de este proceso se basa en que las enzimas celulolíticas no son inhibidas por lo monómeros de glucosa ya que estos son consumidos inmediatamente por los microorganismos (Doran *et al.*, 1994).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

El estudio y análisis de la fibra de palmito fueron realizados en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano, Honduras.

El procedimiento de extracción de alcohol del material lignocelulósico de la fibra de palmito se realizó en el Centro de Química Renovable y Biocombustibles perteneciente al Departamento Celular y de Microbiología de la Universidad de Florida, localizada en el Estado de Florida, Gainesville, USA.

3.2 MATERIALES

- Pipetas; Biohit; 100 um, 200 um, 1000 um.
- Viales target DT^{tm}; national scientific; c4000-1.
- DP CAP and t/rr septa; National Scientific; c400-sig.
- Pipetas de vidrio; Pyrex; 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml.
- Cilindros de vidrio; Pyrex; 100 ml 1000 ml.
- Jeringas; BD Syringe; Luer-Lok Tip, 3 ml, 10 ml, 25 ml.
- Tubo de silicona; Spectrum; 1/8" x 1/16".
- Guantes; Fisher Scientific; Powder-Free Nitrile exam gloves.
- Tubos de vidrio; Fisher Scientific; Boro silicate glass 10 x 75 mm.
- Tubos de vidrio; Fisher Scientific; Boro silicate glass 18 x 150 mm.
- Bandejas azules; Nacional Scientific; 5 x 10 puestos.
- Cinta blanca para marcar frascos; Scienceware; ½" blanca.
- Crimper; Wheaton; Alicate para sellar frascos de HPLC.
- Frascos grandes de tapa anaranjada; Pyrex; 500 ml y 1000 ml.
- Erlenmeyer Flasks; Pyrex; 250 ml.
- Scoopula; Fisher scientific; Stainless.
- Beakers de vidrio; Kimble; 1000 ml.
- Beakers de plástico; Kartell; 100 ml y 3L.
- Bandejas para Vidrio boro silicato 18 x 150 mm; Nalgene; 20 ml 4 x 10 puestos.
- Filtros para esterilizar; Nalgene; 0.45um Pore size, 1L.
- Papel aluminio; Reynolds wrap; 18" de ancho.
- Plástico para envolver; Great Value; 12" de ancho.
- Filtros de microfibras de vidrio; Whatman; 150 mm.

- Puntas de pipetas graduadas; USA Scientific; 100-1000ul. Tubos naturales centrifugadores; Fisher Scientific; 1.5 ml.
- Parafilm; American National can [tm];"M".

3.3 EQUIPO

- Promotor de incubadora; New Brunsick Scientific; Innova 400.
- Agitador vortex; Fisher Scientific; n/a.
- Centrífuga de mesa; Fisher Scientific; Marathon 16 km.
- pH/ORP controller; Jenco; 3671.
- Agitadores eléctricos; Variomac.
- Circulador de agua caliente; Lauda; e100.
- Agitador superior; Emerson Eléctrico. tp/n 2602-015.
- Congelador a -20 ° C; Crosley; Shelvador.
- Balanza; OHAUS; Adventurer [TM] pro.
- Potenciómetro counter-top; Mettler Toledo; seven easy.
- Agitador counter-top; Corning; PC-410.
- Autoclave; Amsco; 3020-s vacamatic.
- Agitador electrónico PIPET-AID; Drummond Scientific co; p-83969.
- Autoclave eléctrica; Flirayama manufacturing corporation; HA/305M.
- HPLC; Agilent; Agilent 110 series.
- Columna de análisis de azúcares HMX1245 de Bio-Rad.
- Columna de análisis de ácidos orgánicos de HPLC; Biorad.
- GC; Agilent; Agilent HPLC 1100 series.
- Capillary column HP-Plot Q. 30 m x 530 um x 40 um. M # JW 19095p-Q 04E 290^{o}C máximo.
- Estimador de peso seco; KERN; MLB° 50-3.
- Máquina de cromatografía de gases; Agilent Technologies; 6890 network gc system.
- Centrifugadora gigante; Beckman; J2-H2 Centrifuge.
- Pipeteador electrónico; Drumond.
- Solenoide; Bio-Chem Calce inc; IS PSI.

3.4 REACTIVOS

- Hidróxido de potasio; Fisher; Solución 45% p/p.
- Ácido O-fosfórico 85%; Fisher Scientific; 500 ml.
- Tryptone; Bacto; Extracto f autoslayed yeast cells.
- Cloruro de sodio; Fisher Scientific.
- Fosfato de amonio; Fisher Scientific; monobásico.
- Fosfato de amonio; Fisher Scientific; dibásico.
- Betaíne clorhídrico; Sigma-Aldrich; Sigma Ultra, Minimum 99%.

- Sulfato de magnesio; Fisher Scientific.
- Solución buffer pH4; Fisher Scientific; Potassium Biphalate.
- Solución buffer pH7; Fisher Scientific; Potassium Phosphate Monobasic-Sodium-Hydroxide.
- Ácido Sulfúrico; Fisher Scientific.
- Alcohol etílico absoluto; Acros; 200 proof, 99.5% ACS.
- Propanol; Fisher scientific; 96.9%.
- Solución formaldehido; Fisher Scientific; 37% p/p.
- Helio comprimido; AIRGAS; UN1046.
- Aire comprimido; Airgas; UN1002.
- Hidrógeno comprimido; Airgas; UN1049.

3.5 MÉTODOS

3.5.1 Determinación de humedad de las fibras.

Para calcular la cantidad de fibra y reactivos en cada proceso fue necesario medir la humedad de la fibra. Esta fue cuantificada utilizando un estimador de peso seco KERN MLB° 50-3. Todas las medidas fueron realizadas en triplicado utilizando dos g de fibra de palmito. Estos pasos fueron realizados para determinar el porcentaje de humedad de todas las fibras durante este proyecto. Las fibras originales (sin ningún tratamiento) tuvieron los siguientes niveles de humedad: un tipo de fibra tuvo 79.1% de agua en 100 g de fibra húmeda de palmito (20.9% de peso seco) y la otra fibra tuvo 12.3% de agua en 100 g de fibra seca de palmito (87.7% de peso seco).

3.5.2 Pretratamiento con ácido diluido de la fibra de palmito.

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño de parcelas divididas. Las parcelas principales fueron: fibra de 80-85% de humedad y fibra con 12-13% de humedad. Cada parcela se dividió de acuerdo al uso de ácido con: H_2SO_4 y H_3PO_4 y cada subparcela se dividió en concentraciones de: 0%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% y 3% de peso seco de cada ácido. Se realizaron dos repeticiones para cada concentración, con un total de 28 tratamientos y 56 unidades experimentales. La humedad de las fibras fue medida usando el protocolo descrito en la sección 3.5.1.

Hidrólisis preliminar con ácido diluido de la fibra seca y húmeda.

Este experimento fue realizado para determinar la concentración ideal de ácido necesaria para liberar los azúcares de la fibra de palmito. Se utilizó ácido sulfúrico (H_2SO_4) porque es el más utilizado por la industria para la degradación de materiales lignocelulósicos, es económico y fácil de adquirir. También se experimentó con el ácido fosfórico (H_3PO_4)

porque es menos severo que el H_2SO_4, genera menos inhibidores y el fosfato sirve como suplemento nutritivo. Aunque el H_3PO_4 es más costoso que el H_2SO_4 su utilidad se basa en la fácil fermentabilidad del hidrolizado ya que este contendría menos inhibidores. Para identificar la concentración ideal de cada ácido para la hidrólisis se prepararon seis concentraciones de cada ácido en botellas de vidrio de un litro. Las concentraciones preparadas para hidrolizar la fibra con 12 a 13% de humedad fueron: 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5% y 3.0% de peso seco de cada ácido. Debido a que la fibra húmeda contiene agua en su interior y con el fin de conservar la normalidad del experimento se utilizaron concentraciones de: 0.56%, 1.67%, 2.23%, 2.7% y 3.34% de peso seco de cada ácido. Para las diluciones con ácido fosfórico se utilizó una botella de ácido de 86.3% de peso seco de pureza. Las diluciones de ácido sulfúrico fueron realizadas con una botella de ácido de 95.7% de peso seco de pureza. La cantidad de ácido puro que se mezcló con agua para lograr la concentración final deseada se calculó con la Ecuación 1:

(Concentración inicial) (Volumen inicial) = (Concentración final) (Volumen final) [1.]

El volumen final en este caso fue un litro y la concentración inicial fue la indicada en cada botella de ácido puro. Para cada concentración se colocó una botella en la balanza, se agregaron 600 g de agua destilada, después se agregó la cantidad de ácido calculada y luego se llenó con agua hasta llegar a un peso total de 1000 g. Luego se pesaron 14 erlenmeyers de 250 ml para cada concentración de ácido, se etiquetó cada uno con el peso y la concentración de ácido que cada uno llevaría. Se midió el porcentaje de fibra seca y se calculó la cantidad necesaria de fibra que se debería agregar a cada erlenmeyer para lograr un peso seco de cinco g utilizando la Ecuación 2.

Cantidad de fibra necesaria = (Peso seco deseado)/ (% de peso seco)*100% [2.]

Se añadió la fibra a cada frasco y se agregó la cantidad de ácido necesaria para cubrir las fibras. Cada frasco fue sellado con una lámina de parafilm y se dejó reposar durante cuatro hr. Luego se utilizó un filtro de tela para remover el exceso de ácido y los recipientes se taparon con papel servilleta para ser cocinados en la autoclave a 145^{o}C durante una hr. Luego de la cocción los frascos se dejaron reposar a temperatura ambiente por una hr. y se les agregó 120 g de agua destilada agitando fuertemente y luego se dejó reposar la mezcla durante dos hr. En este punto del proceso la parte líquida es llamada hidrolizado el cual puede ser utilizado como caldo de cultivo y la parte sólida es llamada torta la cual debe ser descompuesta por medio de la de la hidrólisis enzimática. Luego se tomaron muestras de la parte líquida de cada frasco y se guardaron en tubos de cultivo de 13 ml. Estas muestras fueron utilizadas para preparar frascos de HPLC para analizar la cantidad de azúcares e inhibidores presentes en el hidrolizado. Los azúcares e inhibidores fueron cuantificados de acuerdo a los protocolos descritos en la sección 3.5.6. Los resultados obtenidos por el HPLC fueron sometidos a un análisis estadístico descrito en la sección 3.5.9.

3.5.3 Fermentación de hidrolizado.

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño de parcelas divididas. Las parcelas principales fueron: tratamiento de fibra con 12 a 13% de humedad y tratamiento de fibra con 80 a 85% de humedad. Cada parcela se subdividió en los tratamientos: fermentación del hidrolizado detoxificado y fermentación del hidrolizado sin detoxificar. Cada tratamiento se monitoreó a las 0, 24, 48, 72 y 96 de la inoculación. Se obtuvieron cuatro tratamientos y se realizaron tres repeticiones, para un total de 12 unidades experimentales. La humedad de las fibras fue obtenida de acuerdo al protocolo en la sección 3.5.1.

Separación de celulosa y hemicelulosa de la fibra seca y húmeda.

Se analizó la humedad de la fibra y se utilizó la Ecuación 2 para determinar la cantidad de fibra necesaria para obtener 250 g de peso seco. También se pesaron cinco beakers de vidrio de un litro. La fibra fue depositada en una cubeta plástica y después se le añadió siete litros de ácido sulfúrico con una concentración de 0.5% peso seco. La cubeta fue cubierta con plástico y se dejó reposar por un periodo de cuatro hr. para que el ácido penetrara en las fibras de palmito. Luego del periodo de reposo las fibras fueron escurridas con un filtro de micro fibras de vidrio sobre un embudo y se utilizó succión al vacío para remover el exceso de ácido. Luego se tomó una muestra de dos g de la fibra escurrida para obtener nuevamente el porcentaje de peso seco. Se volvió a utilizar la Ecuación 2 para determinar la cantidad de fibra escurrida necesaria para obtener 50 g de peso seco. Esta fue la cantidad de fibra escurrida colocada en cada uno de los cinco beakers de vidrio de un litro previamente pesados que serían usados para la cocción. Las fibras de palmito fueron cocidas en una autoclave a 145^{o}C durante una hr. Al finalizar la cocción, se dejó enfriar los beakers y se tomó su peso (ácido + fibra + peso del beaker). Luego se usó la Ecuación 3 para determinar la cantidad de agua que se agregó a cada beaker.

$$\text{Agua} = (6x \text{ fibra seca g}) - (\text{PBC} + \text{PI}) \quad [3.]$$

Donde;

PBC = peso del beaker (g) después de cocción
PI = peso inicial del beaker

Se añadió la cantidad calculada de agua mezclando simultáneamente para que el agua penetrara en las fibras. Luego se dejó reposar la mezcla durante dos hr.. Después del periodo de reposo la parte líquida fue separada de la parte sólida utilizando un filtro de micro fibras de vidrio. La parte líquida fue llamada hidrolizado el cual contenía la hemicelulosa descompuesta y la parte sólida fue llamada torta la cual contenía la celulosa, la lignina y algunos residuos de hemicelulosa.

Fermentación del hidrolizado sin detoxificar.

En este experimento se prepararon tres fleakers de 300 ml de capacidad y en cada fleaker se colocaron 85 g de hidrolizado. El pH fue elevado a 6.5 utilizando KOH con una concentración de 45% p/v. Cada fleaker fue llenado con 10 ml de LB (10 g/L de extracto de hongos, 5 g/L de clorato de sodio y 7 g/L de triptona) y fue inoculado con cinco ml de cultivo de *Escherichia coli EMFR17*. Los tres fleakers fueron incubados a baño María a 37ºC por cuatro días. El control del pH y el sistema de control de fermentación está representado en la Figura 8. Se tomó una muestra de las cero hr. del cultivo y se tomaron muestras cada 24 hr. durante cuatro días de cultivo. Las muestras fueron analizadas en el GC y el HPLC de ácidos y de carbohidratos.

Detoxificación del hidrolizado con $Ca(OH)_2$.

Para reducir la toxicidad del hidrolizado, se utilizó la técnica de detoxificación con $Ca(OH)_2$. Para este proceso, se utilizaron 100 ml de hidrolizado en un beaker de vidrio adaptado con un medidor de pH y sobre un plato calentador con mezclador magnético. El hidróxido de calcio fue agregado paulatinamente manteniendo la temperatura a 55ºC hasta que se formó una precipitación en forma de crema blanca en el fondo del recipiente. El pH final del líquido fue de 10. Luego se decantó el hidrolizado detoxificado en una botella, se neutralizó su pH con ácido sulfúrico y fue usado como caldo de cultivo siguiendo los mismos pasos que la fermentación del hidrolizado no detoxificado. Los azúcares e inhibidores fueron cuantificados de acuerdo a los parámetros de la sección 3.5.6. El etanol producido fue cuantificado de acuerdo a la sección 3.5.8. Los análisis estadísticos fueron realizados de acuerdo a la sección 3.5.9.

3.5.4 Fermentación de la torta.

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño de parcelas divididas. Las parcelas principales fueron: tratamiento con fibra de 12 a 13% de humedad y tratamiento con fibra de 80 a 85% de humedad. Cada parcela se subdividió en los tratamientos: fermentación de la torta sin lavar con *E. coli EMFR17* y fermentación de la torta lavada con *K. oxytoca XZ122*, que se monitorearon a las 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hr. de la inoculación. Se obtuvieron cuatro tratamientos y se realizaron dos repeticiones con un total de ocho unidades experimentales. La humedad de las fibras fue determinada siguiendo los pasos de la sección 3.5.1. El hidrolizado fue separado de la torta siguiendo los pasos de la sección 3.5.3. El sistema de fermentación usado fue el mismo que se explicó en la sección 3.5.7.

Fermentación de la torta sin lavar de la fibra seca y húmeda.

Se tomó el peso inicial de dos fleakers de 500 ml y se midió nuevamente el porcentaje de peso seco de la torta después del pretratamiento. Después se usó la Ecuación 2 para

determinar la cantidad de torta necesaria para obtener 50 g de peso seco. Se depositó la fibra en cada fleaker y se esterilizaron en la autoclave a 121ºC durante 20 min. Después se dejó reposar los fleakers durante una hr. a temperatura ambiente y se pesaron nuevamente. Sabiendo el peso después de la esterilización, se determinó la cantidad de agua que debería llevar cada fleaker usando la Ecuación 3.

Se agregó agua destilada esterilizada en una cámara de flujo laminar para evitar contaminación. El pH fue elevado a 5.5 con KOH de 45% p/v. Los fleakers fueron colocados a baño María a 37ºC por una hr. para regular la temperatura. Luego se añadieron las enzimas: 5 ml de biocelulasa Kerry W y 1 ml de β-glucosidasa Novozyme. Después los fleakers fueron colocados en una incubadora de rotación durante dos hr. a una velocidad de 200 rpm y una temperatura de 55^{o}C. Después de la incubación, se sacaron los fleakers y en la cámara de flujo laminar se agregó: 0.75 ml de 1 M $MgSO_4$, 0.75 ml de minerales y 15.33 ml de 10X AM1 para enriquecer el medio para la bacteria *Escherichia coli EMFR17*. La fermentación fue controlada por el sistema mostrado en la Figura 8 y se llevó a cabo a 37^{o}C con un pH de 6.5. Se tomaron muestras de la hora cero y cada 24 hr. hasta llegar a 144 hr. Las muestras fueron analizadas en el GC, HPLC con columna para ácidos orgánicos y HPLC con columna para carbohidratos siguiendo los protocolos de la sección 3.5.2 y 3.5.5. Los análisis estadísticos fueron realizados según la sección 3.5.4.

Fermentación de la torta lavada de la fibra seca y húmeda

Luego del pretratamiento y separación del hidrolizado la torta fue colocada en un recipiente de plástico y se le agregó agua tibia revolviendo simultáneamente. La fibra fue escurrida con un filtro de microfibras de vidrio y se midió el pH del líquido que salía. El proceso fue repetido hasta que el pH del agua filtrada llegara a 6. Se tomó el peso de dos fleakers de 500 ml y se midió el porcentaje de peso seco de la fibra lavada y escurrida. La cantidad de fibra seca deseada fue el 10% del total del volumen, se usó la Ecuación 2 para calcular la cantidad de torta lavada y escurrida necesaria para obtener 50 g de peso seco de torta. La fibra fue colocada en los fleakers y esterilizada en la autoclave a 121^{o}C durante 20 min. Al finalizar el proceso de esterilización se dejó reposar los fleakers a temperatura ambiente durante una hr. y se pesaron nuevamente. Luego la cantidad de agua que se debía agregar fue calculada con la Ecuación 3. Se agregó agua destilada esterilizada en una cámara de flujo laminar para evitar contaminación. El pH fue elevado a 5.5 con KOH de 45% p/v. Los fleakers fueron colocados a baño María a 37ºC por una hr. para regular la temperatura. Luego se agregó cinco ml de la enzima biocelulasa Kerry W y los fleakers fueron colocados en una incubadora de rotación durante dos hr. a una velocidad de 200 rpm y una temperatura de 55^{o}C. Después de la incubación se sacaron los fleakers y en la cámara de flujo laminar se añadió: 0.4 ml de 1000X $FeCl_3$, 0.4 ml 1000X $NiCl_3$, 4 ml de 100X fosfato, 4 ml de 100X Urea y 20 ml de CSL. Después los fleakers fueron instalados en el sistema de fermentación mostrado en la Figura 8. Luego de una hr. en el sistema de fermentación a una temperatura de 37^{o}C y un pH de 5.5 los fleakers fueron inoculados con 2.5 ml de cultivo de *Klebsiella oxytoca XZ122*. Se tomó muestras de la hora cero y cada 24 hr. hasta llegar a 144 hr. Las muestras fueron analizadas en el GC, HPLC de ácidos orgánicos y HPLC de carbohidratos. Los azúcares e inhibidores

fueron cuantificados de acuerdo a los parámetros de la sección 3.5.6. El etanol producido fue cuantificado de acuerdo a la sección 3.5.8. Los análisis estadísticos fueron realizados de acuerdo a la sección 3.5.9.

3.5.5 Sacarificación y fermentación simultánea: tratamiento "one pot."

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). Se analizó fibra con 12-13% de humedad y fibra con 80-85% de humedad. Cada una se fermentó con *E. coli* EMFR17 y se monitoreó la producción de etanol a las 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hr. de la inoculación. Se obtuvo un total de dos tratamientos y dos repeticiones para un total de cuatro unidades experimentales. Se tomó la humedad de las fibras siguiendo los parámetros de la sección 3.5.1. El hidrolizado y la torta fueron separados siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.5.3. El sistema de fermentación usado en este experimento fue descrito en la sección 3.5.7.

Fermentación "one pot" con la fibra seca y húmeda.

Como se indicó en la revisión de literatura este sistema consiste en la fermentación del hidrolizado junto con la torta. Para este proceso se prepararon dos litros de H_2SO_4 con una concentración de 0.5% p/p. Se tomó el peso inicial de dos fleakers de 500 ml y se midió el porcentaje de peso seco de la fibra (fibra sin pretratamiento). Se usó la Ecuación 2 para calcular la cantidad de torta lavada y escurrida necesaria para obtener 100 g de peso seco de fibra. Esta fibra fue colocada en una cubeta de plástico y fue cubierta con H_2SO_4 diluido durante cuatro hr. para que el ácido penetrara las fibras de palmito. Después de las cuatro hr. las fibras fueron escurridas con un filtro de microfibras de vidrio para remover el exceso de ácido. Luego se midió el porcentaje de peso seco de la fibra escurrida. La cantidad de fibra seca deseada fue del 10% del total del volumen, se usó la Ecuación 2 para calcular la cantidad de fibra lavada y escurrida necesaria para obtener 40 g de peso seco de fibra. Se colocó la cantidad calculada de fibra en cada fleaker y se cocinaron a 145^{o}C durante una hr. Al finalizar el periodo de cocción los fleakers reposaron a temperatura ambiente durante una hr. y fueron pesados nuevamente. La cantidad de agua que se debería agregar fue determinada usando la Ecuación 3. El agua calculada fue agregada en una cámara de flujo laminar para evitar contaminación y se elevó el pH a 5.5 con KOH de 45% p/v. La temperatura de los fleakers fue regulada a 37^{o}C al baño María durante una hr.. Luego se añadieron las enzimas: 4 ml de biocelulasa Kerry W y 0.8 ml de β-glucosidasa Novozyme. Luego los fleakers fueron colocados en una incubadora de rotación durante seis hr. a una velocidad de 200 rpm y una temperatura de 55^{o}C. Después de la incubación, se sacaron los fleakers y en la cámara de flujo laminar se añadió: 0.4 ml de 1 M betaíne, 0.6 ml de 1 M $MgSO_4$, 0.6 ml de minerales y 15.33 ml de 10X AM1 para enriquecer el medio para la bacteria *Escherichia coli EMFR17*. Luego se incrementó el pH con gotas de KOH de 45% p/v hasta llegar a 6.5 y los fleakers fueron instalados en el sistema fermentador mostrado en la Figura 8. Luego de una hr. de incubación en el sistema fermentador, cada fleaker fue inoculado con 2.5 ml de cultivo de la bacteria

EMFR17. Se tomó muestras de la hora cero y cada 24 hr. hasta llegar a 144 hr. Los azúcares e inhibidores fueron cuantificados de acuerdo a los parámetros de la sección 3.5.6. El etanol producido fue cuantificado de acuerdo a la sección 3.5.8. Los análisis estadísticos fueron realizados de acuerdo a la sección 3.5.9.

3.5.6 Sistema de fermentación.

El sistema de fermentación que se usó en este proyecto es ilustrado en la Figura 8. El sistema consistió de un recipiente de vidrio llamado fleaker el cual fue sellado con una tapa de caucho para mantener una condición anaeróbica. La temperatura del cultivo fue mantenida estable en un baño maría controlado por un termostato. El pH del cultivo fue medido con un pH-metro el cual fue insertado a través de un pequeño agujero en la tapa de caucho. El sistema contó con un controlador de pH el cual abría una válvula cuando el cultivo bajaba de un límite de acidez preestablecido. Cuando la válvula se abría, 2 N KOH bajaba lentamente por gravedad a través de un tubo de silicona el cual fue conectado a una aguja en la tapa del fleaker, esto ocurría hasta que el pH subía al preestablecido causando que el controlador cerrara la válvula. Otros componentes de gran importancia fueron la barra magnética y el plato magnético ya que estos mezclaban el cultivo y prevenían la sedimentación.

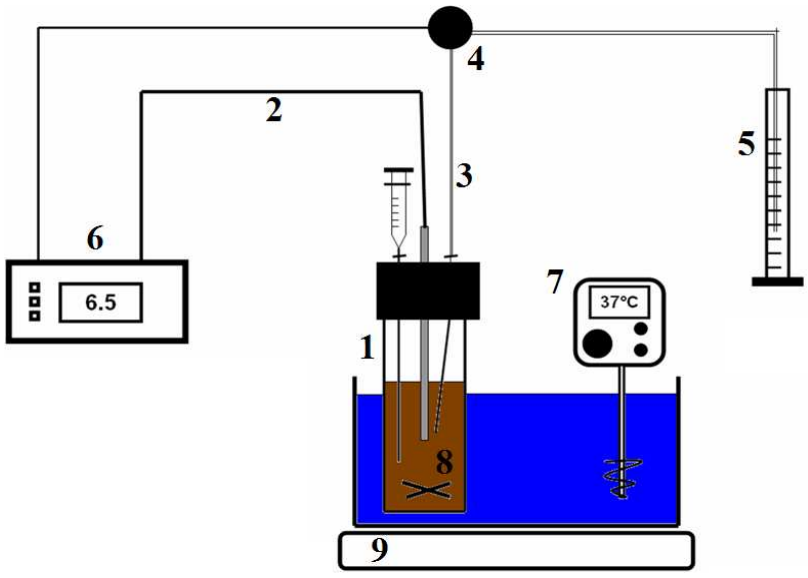


Figura 8. Sistema de fermentación.
Adaptado de Beall *et al*., 1991
1-Fleaker de vidrio, de 350 ml o 500 ml. 2-Medidor de pH. 3-tubo transportador de base. 4-Válvula. 5-cilindro contenedor de base. 6-controlador de pH y controlador de válvula. 7-termostato. 8-barra magnética. 9-plato magnético.

3.5.7 Cuantificación de azúcares e inhibidores.

Se tomó una muestra de cultivo de 1 ml y se depositó en un tubo de centrifugación de 1.5 ml. Para remover las bacterias y otras partículas la muestra se centrifugó a 6000 rpm durante 2 min. Se mezcló 500 ul de la muestra con 1500 ul de agua nanopurificada y posteriormente fue purificada con un filtro de 45 um adaptado al final de una jeringa. Esta muestra diluida y purificada fue depositada en un contenedor de vidrio cerrado con tapa metálica. La máquina de HPLC utilizada fue de Agilent Technologies 1100. Los azúcares, el HMF y el furfural fueron analizados con una columna de carbohidratos de Biorad. Los ácidos orgánicos fueron analizados en la misma máquina pero se utilizó una columna de Biorad para ácidos orgánicos. Para la identificación de cada compuesto se comparó su tiempo de retención con el de los estándares preestablecidos. Para la cuantificación de cada compuesto se reemplazó el área de cada curva en la ecuación correspondiente (predeterminada por los estándares). Los estándares preestablecidos con sus respectivas ecuaciones y tiempos de retención se encuentran en los Anexos 13 y 14.

3.5.8 Cuantificación de etanol

Se tomó una muestra de cultivo de 1 ml y se depositó en un tubo de centrifugación de 1.5 ml. Para remover las bacterias y otras partículas. La muestra se centrifugó a 6000 rpm durante 2 min. Después 500 ul de la muestra fueron mezclados con 500 ul de 10% p/v de 1-propanol (el estándar interno). Esta mezcla fue depositada en un contenedor de vidrio herméticamente cerrado con tapa rosca. La cantidad de etanol fue medida por cromatografía de gases (GC) y calculada utilizando una curva estándar (Anexo 15).

3.5.9 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con los análisis obtenidos y una separación de medias mediante la prueba Tukey con un nivel de significancia $P \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statistical Analysis System (SAS® versión 9.1).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PRETRATAMIENTO DE LA FIBRA DE PALMITO CON ÁCIDO DILUIDO

A través del análisis de varianza se establecieron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre la fibra con 80-85% de humedad y la fibra con 12-13% de humedad, entre los ácidos H_2SO_4 y H_3PO_4 y la concentración de cada uno de estos ácidos. La razón de estas diferencias se debió al proceso de secado necesario para que la fibra alcanzara 12-13% de humedad, este proceso consistió en un secado en el que la fibra fue sometida a altas temperaturas que facilitaron la despolimerización de los azúcares. La diferencia entre los ácidos se debió a que la hidrólisis con H_2SO_4 fue más severa que la hidrólisis con H_3PO_4. El incremento en la concentración del ácido generó más monómeros de azúcares y a la vez mayor cantidad de inhibidores que redujeron la eficiencia de las bacterias para metabolizar los azúcares. Estos resultados coincidieron con las conclusiones que publicó Lavarack, *et al*. (2002) respecto al efecto de la hidrólisis ácida. Es importante recalcar que al igual que la temperatura, la concentración de ácido fue directamente proporcional a la despolimerización de los azúcares y a la formación de inhibidores.

Cuadro 3. Análisis del pretratamiento con ácido diluido de la fibra con 80-85% de humedad por tipo de ácido y concentración.

Concentración de Ácido	Azúcares[§] + DE	Inhibidores[§] + DE
1.5% H_2SO_4	28.9±3.5 [a]	7.1±0.4 [b]
1.0% H_2SO_4	27.8±0.1 [a]	5.8±0.5 [c]
2.0% H_2SO_4	25.8±0.2 [ab]	7.2±0.1 [b]
0.5% H_2SO_4	25.6±0.2 [ab]	5.1±0.2 [cd]
3.0% H_2SO_4	23.8±1.8 [ab]	8.2±0.1 [a]
3.0% H_3PO_4	23.7±0.0 [ab]	5.2±0.3 [cd]
2.5% H_3PO_4	23.5±0.5 [ab]	4.5±0.1 [cde]
2.5% H_2SO_4	22.9±1.6 [ab]	7.5±0.1 [ab]
2.0% H_3PO_4	22.7±0.4 [ab]	4.6±0.1 [de]
1.5% H_3PO_4	22.7±3.2 [ab]	4.6±0.3 [de]
1.0% H_3PO_4	19.5±0.8 [bc]	3.9±0.1 [e]
0.5% H_3PO_4	13.9±0.1 [c]	2.6±0.2 [f]
0.0% H_2SO_4	5.2±4.1 [d]	0.9±0.1 [g]
0.0% H_3PO_4	1.7±0.0 [d]	0.7±0.0 [g]

§Medias con diferente letra en la columna son significativamente diferentes ($P<0.05$)
*% peso seco= g/100g de fibra de palmito
Condiciones: 1h 145°C, ~10% sólidos

En el Cuadro 3 se puede observar que en la fibra con 80-85% de humedad las concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0% de H_2SO_4 y las concentraciones de 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0% de H_3PO_4 fueron estadísticamente iguales en rendimiento de azúcares. Sin embargo los que combinaron bajos inhibidores con alta concentración de azúcares fueron 1.5, 2.5% de H_3PO_4 y 0.5 y 1% de H_2SO_4. Es decir que estadísticamente estas fueron las mejores concentraciones según el tipo de ácido.

Cuadro 4. Análisis del pretratamiento con ácido diluido de fibra con 12-13% de humedad por tipo de ácido y concentración.

Concentración + Ácido	**Azúcares[§] + DE**	**Inhibidores[§] + DE**
3.0% H_3PO_4	46.4±0.2 ^{a}	8.7±0.4 ^{cd}
2.5% H_3PO_4	45.9±1.5 ^{a}	7.6 ±0.8 ^{cde}
2.0% H_3PO_4	45.5±1.0 ^{a}	7.6±0.4 ^{cde}
1.5% H_3PO_4	44.5±0.9 ^{ab}	6.8±0.1 ^{de}
0.5% H_2SO_4	43.7±0.1 ^{ab}	7.7±0.1 ^{cde}
1.5% H_2SO_4	42.5±1.2 ^{ab}	9.5±0.5 ^{abc}
1.0% H_3PO_4	41.9±0.7 ^{ab}	6.6±1.1 ^{d}
1.5% H_2SO_4	41.5±0.2 ^{ab}	10.7±0.2 ^{ab}
2.0% H_2SO_4	41.1±0.3 ^{ab}	11.1±0.4 ^{ab}
1.0% H_2SO_4	41.1±4.7 ^{ab}	9.3±0.1 ^{bc}
3.0% H_2SO_4	39.2±0.6 ^{b}	11.3±0.2 ^{a}
0.5% H_3PO_4	31.9±0.8 ^{c}	4.4±0.7 ^{f}
0.0% H_2SO_4	11.1±0.0 ^{d}	1.1±0.1 ^{g}
0.0% H_3PO_4	8.2±0.3 ^{d}	1.0±0.0 ^{g}

[§] Medias con diferente letra en la columna son significativamente diferentes ($P<0.05$)
*% peso seco= g/100g de fibra de palmito
Condiciones: 1h 145°C, ~10% sólidos

En el Cuadro 4 se puede observar que en la fibra con 12-13% de humedad las concentraciones desde 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0% de H_3PO_4 y 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 de H_2SO_4 fueron estadísticamente iguales en rendimiento de azúcares. Sin embargo, los que combinan bajos inhibidores fueron 1.5, 1% de H_3PO_4 y 0.5 ,1.5% de H_2SO_4. Es decir que estadísticamente estas fueron las mejores concentraciones según el tipo de ácido.

La mejores concentraciones que se repitieron tanto en la fibra con 80-85% y en la fibra con 12-13% fueron 1.5% H_3PO_4 y 0.5% de H_2SO_4. Para conocer cuál de las dos concentraciones se debía usar se cuantificó la cantidad de monómeros de azúcares e inhibidores. Los resultados dados por el HPLC se encuentran en los Anexos: (16, 17, 18 y 19).

Cuadro 5. Azúcares totales antes y después de la hidrólisis ácida

	Fibra con 80 a 85% de humedad*[§]		**Fibra con 12 a 13% de humedad*[§]**	
Ácido	**Azúcar[@]**	**Por despolimerizar**	**Azúcar[@]**	**Por despolimerizar**
0.5% de H_2SO_4	22.7[b]	41.7	43.7[a]	20.7
1.5% de H_3P0_4	25.6[a]	38.8	43.4[a]	21.0

[§] Medias con diferente letra en la columna son significativamente diferentes (P<0.05)
*% peso seco= g/100g de fibra de palmito
[@] = Azúcar inicial fue de 64.4 % de peso seco

Cuadro 6. Inhibidores totales después de la hidrólisis ácida.

	Fibra con 80 a 85% de humedad*	**Fibra con 12 a 13% de humedad***
Ácido	**Inhibidores[§]**	**Inhibidores[§]**
0.5% de H_2SO_4	7.9[a]	5.1[a]
1.5% de H_3P0_4	6.7[b]	4.5[b]

[§] Medias con diferente letra en la columna son significativamente diferentes (P<0.05)
*% peso seco= g/100g de fibra de palmito

Se puede observar en los Cuadros 5 y 6 que la diferencia en cuanto a concentración de azúcares e inhibidores fue mínima. Sin embargo en los experimentos realizados en este estudio se utilizó 0.5% de H_2SO_4 debido a que con esta concentración se obtuvo una elevada cantidad de azúcares y baja cantidad de inhibidores. Se escogió el H_2SO_4 debido a su fácil uso, las bajas concentraciones que se necesitaban en la hidrólisis y su bajo costo comparado con H_3PO_4. Esta concentración se encontró dentro de las concentraciones óptimas citadas por Lavarack, *et al*. (2002) quien explicó la importancia del uso de bajas concentraciones de ácido en la hidrólisis para prevenir la formación de inhibidores.

Cuadro 7. Pretratamiento con ácido diluido de la fibra de palmito: inhibidores en hidrolizado.

Ácido	**Fibra con 80-85% de humedad**				**Fibra con 12-13% de humedad**			
% ps	H_2SO_4[§]		H_3PO_4[§]		H_2SO_4[§]		H_3PO_4[§]	
	Acetato*	Otros*[&]	Acetato*	Otros*[&]	Acetato*	Otros*[&]	Acetato*	Otros*[&]
0.5	3.9[b]	1.1[b]	2.3[b]	1.9[a]	6.3[a]	1.6[b]	3.6[b]	0.8[b]
1.5	4.6[a]	2.5[a]	3.7[a]	0.7[b]	6.4[a]	3.2[a]	5.6[a]	1.3[a]

[§] Medias con diferente letra en la columna son significativamente diferentes (P<0.05)
*% peso seco= g/100g de fibra de palmito
[&] Suma de formato, ácido levulínico, furfural, y HMF
% ps = % peso seco

Uno de los inhibidores más comunes en la lignocelulosa es el ácido acético. En el Cuadro 7 se tomó en cuenta la concentración del ácido acético y la suma de otros inhibidores. Se puede observar que la fibra con 80-85% de humedad contenía menor cantidad de ácido acético y otros inhibidores. Esto se debió a que durante el pretratamiento con ácido diluido de la fibra con 80-85% de humedad el agua actuó como buffer protegiendo la fibra de la hidrólisis con H_2SO_4. Esta protección no fue total ya que existió la presencia de inhibidores como el acidó acético pero en menor cantidad que en la fibra con 12-13% de humedad (Lavarack, *et al*. 2002).

4.2 FERMENTACIÓN DEL HIDROLIZADO.

El Análisis de Varianza (ANDEVA) indicó que existió diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) entre el tipo de fibra, el hidrolizado detoxificado, el hidrolizado sin detoxificar y el tiempo de fermentación. Esta diferencia se debió al proceso de detoxificación ya que las bacterias en un hidrolizado con presencia de inhibidores reducen la velocidad de fermentación.

Cuadro 8. Efecto de la detoxificación y el tiempo de fermentación en el etanol, azúcares e inhibidores de fibra con 80-85% de humedad.

Tiempo de fermentación y detoxificación		**%Etanol[§] + DE**	**%Azúcares[§] + DE**	**%Inhibidores[§] + DE**
24	Detoxificada	34.4±0.5 ^{a}	38.0±1.3 ^{b}	18.7±0.7 ^{ab}
48	Detoxificada	33.4±0.4 ^{a}	27.4±0.3 ^{b}	19.6±0.6 ^{a}
96	Detoxificada	32.9±0.5 ^{a}	26.7±0.5 ^{b}	20.2±2.4 ^{a}
72	Detoxificada	32.8±0.3 ^{a}	27.3±0.8 ^{b}	19.2±0.4 ^{a}
72	Sin detoxificar	29.0±0.9 ^{a}	16.9±4.6 ^{b}	17.6±1.0 ^{ab}
96	Sin detoxificar	28.6±1.4 ^{ab}	18.9±7.2 ^{b}	18.1±1.2 ^{ab}
48	Sin detoxificar	17.5±11.8 ^{b}	48.6±33.2 ^{b}	16.2±0.4 ^{e}
24	Sin detoxificar	4.6±2.8 ^{c}	89.7±9.1 ^{a}	15.8±0.7 ^{bc}
0	Detoxificada	0.0±0.0 ^{c}	86.7±0.1 ^{a}	17.7±0.2 ^{ab}
0	Sin detoxificar	0.0±0.0 ^{c}	95.9±1.3 ^{a}	14.4±0.4 ^{c}

§ Medias con diferente letra en la columna son significativamente diferentes ($P<0.05$)
*% peso seco= g/100 g de fibra de palmito

El Cuadro 8 indica que el proceso de detoxificación redujo significativamente el tiempo de fermentación logrando un rendimiento de etanol del 34.4 % de 85 g de fibra de palmito con 80 a 85% de humedad en 24 hr. Se observó que sin el proceso de detoxificación el proceso de fermentación duró hasta 72 hr. También se observó que a partir de las 72 hr. de fermentación la cantidad de etanol fue disminuyendo pero esta reducción no represento una perdida significativa. Esto se debe a que el etanol es un líquido volátil, que por efecto de la temperatura se fue evaporando a medida que pasó el tiempo. Además se pudo apreciar que el proceso de detoxificación no disminuyó significativamente la cantidad de

inhibidores medidos en este estudio sino que removió otros compuestos de de la lignina aún no identificados.

Cuadro 9. Efecto de la detoxificación y el tiempo de fermentación en el etanol, azúcares e inhibidores de fibra con 12-13% de humedad.

Tiempo de fermentación y detoxificación		**Etanol[§] + DE**	**Azúcares[§] + DE**	**Inhibidores[§] + DE**
24	Detoxificada	27.6±0.7 ^{a}	23.5±5.2 ^{c}	17.1±0.2 ^{bcd}
72	Sin detoxificar	27.3±2.0 ^{a}	21.8±16.1^{c}	15.1±0.4 ^{de}
96	Sin detoxificar	26.8±1.1 ^{a}	6.0±1.5 ^{c}	16.4±0.3 ^{cde}
48	Detoxificada	26.1±1.2 ^{a}	26.1±0.9 ^{c}	17.8±0.2 ^{abc}
72	Detoxificada	24.7±1.0 ^{a}	6.1±0.9 ^{c}	14.9±0.2 ^{de}
96	Detoxificada	23.5±0.9 ^{a}	5.9±0.4 ^{c}	16.3±2.6 ^{cde}
48	Sin detoxificar	9.0±7.1 ^{b}	73.1±21.2 ^{b}	14.2±0.9 ^{e}
24	Sin detoxificar	0.9±0.0 ^{c}	97.5±1.5 ^{ab}	15.3±0.3 ^{cde}
0	Detoxificada	0.0±0.0 ^{c}	98.5±0.5 ^{a}	19.8±0.1 ^{a}
0	Sin detoxificar	0.0±0.0 ^{c}	98.7±1.1 ^{a}	19.2±0.1 ^{ab}

§ Medias con diferente letra en la columna son significativamente diferentes (P<0.05)
*% peso seco= g/100g de fibra de palmito

En el Cuadro 9, se puede observar que el proceso de detoxificación aceleró el tiempo de fermentación obteniendo un máximo rendimiento de 27.6% de etanol de 85 g de hidrolizado de palmito en 24 hr. Al comparar este rendimiento con el obtenido con la fibra con 80-85% de humedad se concluyó que la fibra con mayor cantidad de agua generó mayor cantidad de etanol. Este resultado se comprobó con el ANDEVA donde se analizó que la detoxificación generó significativamente más etanol al usar fibra con 80-85% de humedad que la fibra con 12-13% de humedad. Además, con la fibra seca se produjeron significativamente más inhibidores que en la fibra con 80-85% de humedad.

La detoxificación con $Ca(OH)_2$ del hidrolizado mejoró significativamente la rapidez y la efectividad de la fermentación tal como fue descrito por Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000). El acondicionamiento de las bacterias junto con la detoxificación del hidrolizado tiene el potencial de reducir costos y aumentar la producción de etanol utilizando lignocelulosa.

4.3. FERMENTACIÓN DE LA TORTA.

El Análisis de Varianza (ANDEVA) mostró que existieron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre la fibra con 80-85% de humedad y la fibra con 12-13% de humedad, el uso de las bacterias *E. coli* y *K. oxytoca* y el tiempo de fermentación en la producción de etanol. Esto se debió a que la cantidad de etanol que se produce depende de

las azúcares iniciales que la fibra posee. La humedad de la fibra fue importante ya que a mayor contenido de agua las modificaciones en el pretratamiento con ácido incrementan.

Cuadro 10. Efecto del tipo de microorganismo y tiempo de fermentación en el etanol, azúcares e inhibidores para la fibra con 80-85% de humedad.

Tiempo de fermentación y microorganismo		**Etanol[§] + DE**	**Azúcares[§] + DE**	**Inhibidores[§] + DE**
72	*E.coli*	54.0±1.7 ^{a}	9.3±0.4 ^{f}	8.3±0.3 ^{a}
144	*E.coli*	47.2±0.8 ^{b}	9.2±0.3 ^{f}	8.8±0.3 ^{a}
120	*E.coli*	45.4±0.2 ^{bc}	10.7±2.7 ^{f}	8.6±0.4 ^{a}
144	*K. oxytoca*	43.7±1.4 ^{bc}	26.2±4.2 ^{e}	3.4±0.3 ^{c}
96	*E.coli*	43.2±0.9 ^{bc}	8.9±0.2 ^{f}	0.6±0.1 ^{a}
120	*K. oxytoca*	42.2±1.0 ^{cd}	25.7±3.6 ^{e}	3.0±0.2 ^{c}
96	*K. oxytoca*	38.2±1.5 ^{d}	28.0±3.7 ^{e}	2.8±0.0 ^{c}
48	*E.coli*	32.6±0.4 ^{e}	26.3±4.4 ^{e}	8.1±0.1 ^{a}
72	*K. oxytoca*	32.0±1.2 ^{e}	29.7±2.7 ^{de}	3.1±0.0 ^{c}
48	*K. oxytoca*	24.2±1.0 ^{f}	33.8±0.3 ^{de}	3.1±0.3 ^{c}
24	*K. oxytoca*	14.2±0.6 ^{g}	38.9±0.5 ^{d}	2.7±0.3 ^{cd}
24	*E.coli*	10.5±2.1 ^{g}	69.5±1.1 ^{b}	6.5±0.2 ^{b}
0	*E.coli*	0.0±0.0 ^{h}	85.1±1.9 ^{a}	6.8±0.3 ^{b}
0	*K. oxytoca*	0.0±0.0 ^{h}	50.2±2.9 ^{c}	1.8±0.1 ^{d}

§ Medias con diferente letra en la columna son significativamente diferentes ($P<0.05$)
*% peso seco= g/100g de fibra de palmito

En el Cuadro 10 se puede observar que en la fibra con 80-85% de humedad la bacteria *E .coli* fue más eficiente en la fermentación para producir etanol con un rendimiento del 54% de etanol en 50 g de fibra de palmito en 72 hr. Este tiempo de fermentación fue muy bueno debido a que el tiempo de fermentación rentable industrialmente es a las 72 hr. La mayor diferencia entre los dos tipos de bacteria es que la *E. coli* es resistente a inhibidores tóxicos como el furfural que afecta al metabolismo de las bacterias (Ingram, 2006).

En el Cuadro 10 también se puede observar que la cantidad de inhibidores en el rendimiento máximo de las bacterias fue diferente. La fermentación a las 72 hr. con *E. coli* produjo 8.3% de peso seco de inhibidores, mientras en la fermentación a las 144 hr. del rendimiento máximo con *K. oxytoca* se redujo la cantidad de inhibidores al 3.4% de peso seco debido al proceso de lavado de la fibra a la que fue sometida antes de la fermentación.

Cuadro 11. Efecto del tipo de microorganismos en el etanol, azúcares e inhibidores para fibra con 12-13% de humedad.

Tiempo de fermentación y microorganismo		Etanol[§] + DE	Azúcares[§] + DE	Inhibidores[§] + DE
144	*K. oxytoca*	48.3±3.7 [a]	14.6±0.9 [ef]	2.5±0.3 [c]
120	*E.coli*	47.8±1.4 [a]	8.5±0.0 [f]	8.7±0.5 [a]
144	*E.coli*	47.1±2.1 [a]	10.2±0.3 [ef]	9.1±0.5 [a]
96	*E.coli*	45.8±0.4 [ab]	7.8±0.4 [f]	8.8±0.6 [a]
72	*E.coli*	44.4±1.3 [ab]	7.7±0.2 [f]	8.3±0.2 [a]
120	*K. oxytoca*	40.7±4.3 [ab]	15.3±2.0 [ef]	2.2±0.2 [c]
48	*E.coli*	38.4±3.9 [ab]	18.3±10.3 [def]	8.0±0.3 [a]
96	*K. oxytoca*	38.4±7.5 [ab]	15.3±0.4 [ef]	2.0±0.0 [c]
72	*K. oxytoca*	34.3±2.6 [bc]	22.3±2.1 [def]	2.2±0.2 [c]
48	*K. oxytoca*	24.9±2.3 [c]	28.2±2.1 [de]	2.5±0.1 [c]
24	*K. oxytoca*	12.2±1.0 [d]	36.7±2.6 [cd]	2.2±0.2 [c]
24	*E.coli*	12.1±3.7 [d]	61.8±13.9 [b]	6.5±0.0 [b]
0	*E.coli*	0.0±0.0 [d]	82.8±2.8 [a]	6.7±0.3 [b]
0	*K. oxytoca*	0.0±0.0 [d]	50.2±2.9 [bc]	1.8±0.1 [c]

§ Medias con diferente letra en la columna son significativamente diferentes ($P<0.05$)
*% peso seco= g/100g de fibra de palmito

En el Cuadro 11, se puede observar que los mejores rendimientos de etanol se produjeron a las 144 y 120 hr. La bacteria *K. oxytoca* produjo el mayor rendimiento con 48.3% de etanol de 50 g de fibra de palmito en 144 hr. Sin embargo la *E. coli* siguió siendo la mejor a las 72 hr. con un rendimiento de 38.4% de etanol de 50 g de fibra de palmito. Estos resultados demostraron que la fermentación con fibra con 80-85% de humedad con *E. coli* fue más eficiente en cuanto a la cantidad de etanol y al tiempo de fermentación. Además se puede observar que la cantidad de inhibidores con el máximo rendimiento de etanol con *K. oxytoca* a las 144 hr. fue de 2.5 % de peso seco. Mientras que la fermentación con el máximo rendimiento de etanol con *E. coli* a las 120 hr. fue de 8.7% de peso seco.

4.4 FERMENTACIÓN "ONE POT".

El Análisis de Varianza (ANDEVA) mostró que existió diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) entre el uso de fibra con 80 a 85% de humedad y la fibra con 12 a 13% de humedad y el tiempo de fermentación en la producción de etanol.

Cuadro 12. Efecto del tratamiento “one pot” y el tiempo de fermentación en el etanol, azúcares e inhibidores para fibra al 80-85% de humedad.

Tiempo	Etanol[§] + DE	Azúcares[§] + DE	Inhibidores[§] + DE
120	61.5±1.8 [a]	8.0±0.4 [b]	12.7±0.3 [a]
144	61.0±2.2 [a]	8.7±1.4 [b]	12.4±0.2 [a]
96	56.7±3.6 [a]	7.6±0.2 [b]	12.0±0.5 [a]
72	52.8±1.9 [a]	10.0±4.2 [b]	12.1±0.2 [a]
48	17.6±6.0 [b]	72.1±12.9 [b]	11.4±0.1 [a]
24	2.5±0.8 [b]	95.7±1.1 [a]	12.1±0.6 [a]
0	0.0±0.0 [b]	98.7±1.3 [a]	11.8±0.0 [a]

§ Medias con diferente letra en la columna son significativamente diferentes (P<0.05)
*% peso seco= g/100 g de fibra de palmito

En el Cuadro 12 se puede observar que a 120 hr. se obtuvo un rendimiento de 61.5% de etanol de 40 g de fibra de palmito. Es importante notar que el tiempo de fermentación fue muy largo. En 72 hr. el tiempo óptimo de fermentación, se consiguió un rendimiento del 52.8% de etanol de 40 g de fibra de palmito.

Cuadro 13. Efecto del tratamiento “one pot” y el tiempo en el etanol, azúcares e inhibidores para fibra al 12-13% de humedad.

Tiempo	Etanol[§] + DE	Azúcares[§] + DE	Inhibidores[§] + DE
72	57.8±13.0 [a]	7.8±2.6 [c]	10.9±1.4 [a]
120	52.5±2.2 [a]	7.1±1.1 [c]	11.9±2.2 [a]
144	50.9±2.9 [a]	4.7±1.9 [c]	11.9±1.4 [a]
96	49.3±3.8 [a]	7.4±0.9 [c]	10.9±2.0 [a]
48	43.7±3.8 [b]	15.3±7.8 [b]	10.8±0.8 [a]
24	9.5±1.5 [c]	75.5±7.3 [a]	9.4±1.0 [a]
0	0.0±0.0 [c]	91.8±5.1 [a]	11.0±0.5 [a]

§ Medias con diferente letra en la columna son significativamente diferentes (P<0.05)
*% peso seco= g/100g de fibra de palmito

Con la fibra con 12-13% de humedad se logró obtener un rendimiento de 57.8% de etanol en 40 g de fibra de palmito en 72 hr. En el Cuadro 13 se puede observar que a medida que incrementó la cantidad de etanol, los azúcares disminuyeron y la cantidad de inhibidores se mantuvo estable.

En los resultados de los Cuadros 12 y 13 se puede observar que la cantidad de inhibidores que se encontraron al inicio de la fermentación no cambiaron significativamente con el tiempo, esto se debe a que en esta fermentación no existieron factores extremos que generaran inhibidores. Esta estabilidad en la presencia de inhibidores podría representar una gran ventaja al momento de someter a las bacterias a un proceso de adaptación en un medio de fibra de palmito para procesos de sacarificación y fermentación simultánea.

La fibra con 12-13% de humedad produjo 4% menos de etanol a las 72 hr. que la fibra con 80-85% de humedad. Esta diferencia se dio debido a que la fibra con 12-13% de humedad pasó por un proceso de secado el cual facilitó la liberación de toxinas de la lignina y estas disminuyeron la producción de etanol.

5. CONCLUSIONES

- En este experimento se demostró que la fibra de palmito puede ser usada como materia prima para la producción de etanol lignocelulósico.

- La mejor concentración de ácido para el pretratamiento con ácido diluido de la fibra de palmito fue 0.5% de H_2SO_4.

- La fibra con 12-13% de humedad se adaptó mejor al pretratamiento con ácido diluido y al proceso de sacarificación y fermentación simultánea “one pot”.

- La fibra con 80-85% de humedad se adaptó mejor a los procesos de detoxificación y fermentación de la torta.

- El proceso de detoxificación aceleró el proceso de fermentación de 72 a 24 hr. en el hidrolizado de la fibra de palmito.

- El lavado de la torta antes de la fermentación disminuyó significativamente la cantidad de inhibidores durante la fermentación.

6. RECOMENDACIONES

- Adaptar las bacterias a un medio de fibra de palmito para poder obtener mayor cantidad de etanol. Ya que las bacterias utilizadas en este proyecto de tesis fueron adaptadas a un medio de bagazo de caña de azúcar.

- Investigar nuevos protocolos de pretratamiento de materiales lignocelulósicos.

- Mejorar e investigar nuevos procesos de detoxificación del hidrolizado, adaptación de las bacterias a los inhibidores y procesos de sacarificación y fermentación simultanea. Adelantos en estas áreas acortarían significativamente el tiempo de fermentación.

- Realizar un análisis de costos para determinar la rentabilidad de una planta de etanol lignocelulósico basada en la utilización de fibra de palmito como materia prima.

7. BIBLIOGRAFIA

ASPINALL, G.O. 1980. Chemistry of cell wall polysaccharides. En: The biochemistry of plants a comprehensive treatise. Carbohydrates: structure and function. Academic Press, New York. Vol. 3: p.473–500

AQUALAB. 2001. Actividad de agua en alimentos (en línea). Consultado el 30 de Julio de 2008. Disponible en: http://www.lab-ferrer.com/documentacio/awymai11.pdf

BALLESTEROS I., J. M. OLIVA, M. J. NEGRO, P. MANZANARES, M. BALLESTEROS. 2002. Proceso de sacarificación y fermentación simultáneas para la conversión de la fracción celulósica del residuo de la extracción del aceite de oliva en etanol. Grasas y Aceites, Vol. 53: p.282-288

BAUTISTA-JUSTO M., GARCIA-OROPEZA, J.E. BARBOZA-CORONA, L.A. PARRA-NEGRETE. 2001. El Agave tequilana Weber y la producción de tequila. Acta Universitaria, Vol. 11: p.26-34

BIOENERGY RESEARCH CENTERS: An Overview of the Science, U.S. Department of Energy, February 2008. DOE/SC-0104

BLACK F. 1991. An Overview of the Technical Implications of Methanol and Ethanol as Highway Motor Vehicle Fuels: SAE Tech. Vol. 100: número 4, p.1161

BOWNELL, H.H. y SADDLER, J. N. 1984. Steam explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 14: p. 55-68

BULL, S. R., RILEY, C. J., TYSON, K. S., y COSTELLO, R. 1992. Total fuel cycle and emissions analysis of biomass to ethanol production. Energy from Biom. and Wastes Vol. 16: p.113-119

CADOCHE, L., LOPEZ, G. D. 1989. Assement of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. Biol. Wastes. Vol. 30: p.153-157

CHANG, V.S., NAGWANI, M., HOLTZAPPLE, M.T. 1998. Lime pretreatment of crop residues: bagasse and wheat straw. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 74: p.135–159.

DALE, B.E. y MOREIRA, M.J., 1982. A freeze explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering Symp. Vol. 12: p.31–43.

DORAN, J.W., LINN, D.M., 1994. Microbial ecology of conservation management systems. En: Hatfield, J.L., Stewart, B.A. (Eds.), Soil Biology: Effects on Soil Quality. Advances in Soil Science. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. p. 1–27

ECOSAL. Escherichia coli and Sallmonella. Cellular and Molecular Biology. (en línea). Disponible en: http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp.

EMERT, G. H., R. KATZEN, R. E. FREDRICKSON, K. F. KAUPISCH, y C. E. YEATS. 1983. Update on the 50 T/D cellulose-to-ethanol. Plant. J. Appl. Poly. Sci. Appl. Polymer Symp. Vol. 37: p.787-795

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Biocombustibles (en línea). Consultado el 30 de agosto del 2008. Disponible en:
http:// www.rlc.fao.org/es/prensa/activi/agroenergia/cavieres.pdf

HILL, JASON. ERIK NELSON, DAVID TILMAN, STEPHEN POLASKY, y DOUGLAS TIFFANY. 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. PNAS. Vol. 103 no. 30: p11206-11210

INAEXPO. 2007. Perfil del producto palmito. En línea. Consultado el 20 de Julio del 2008. Disponible en: http://www.inaexpo.com/webinaexpo/index.jsp

INGRAM, L. O., T. CONWAY, D. P. CLARK, G. W. SEWELL, J. F. PRESTON. 1987. Genetic Engineering of Ethanol Production in Escherichia coli. Applied Environmental Microbiology. Vol. 53(10): p.2420-2425.

JARABO, F.; FERNÁNDEZ, J. 1983. Energías alternativas renovables: ¿un futuro para Canarias? Secretariado de Publicaciones. Universidad de La Laguna. Tenerife

KRÄSSIG, H.1985. Structure of cellulose and its relation to properties of cellulose fibers. in Cellulose and its Derivatives. Chemistry, Biochemistry and Applications. Vol. 23: p. 3–25.

LARSSON S, PALMQVIST E, HAHN-HÄGERDAL B, TENBORG C, STENBERG K, ZACCHI G, NILVEBRANT N-O. 1999a. The generation of inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. Enzyme Microb Technol. Vol. 24: p.151–159.

LAVARACK, B. P., GRIFFIN, G. J., y RODMAN, D. 2000. Measured kinetics of the acid-catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to produce xylose. Catalysis Today. Vol. 63: p.257–265

LAVARACK, B.P., GRIFFIN, G.J., RODMAN, D., 2002. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. Biomass and Bioenergy Vol. 23: p.367–380.

LYND LEE R. 1996. Overview and Evaluation of Fuel Ethanol from Cellulosic Biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy. Annual review of energy and the environment. Vol. 21: p.403-466

MANN, C. 2004. "Ethanol from Biomass," Memorandum to the National Commission on Energy Policy, Appendix IV.4e of NCEP report, Ending the Energy Stalemate: A Bipartisan Strategy to Meet America's Energy Challenges

MCMILLAN JD. 1993. Pretreatment of lignocellulosic biomass. En: Himmel ME, Baker JO, Overend RP (editores) Enzymatic conversion of biomass for fuel production. American Chemical Society, Washington, D.C. p.292–323

MORA-URPÍ, JORGE, JOHN C. WEBER y CHARLES R. CLEMENT. 1997. Peach palm. Bactris gasipaes Kunth. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 20. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 83p

OLSSON, L., HAHN-HÄGERDAL, B., 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production: Enzyme Microb. Technol. Vol. 18: p.312–331.

O'SULLIVAN, A.C. 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. Cellulose. Vol. 4: p.173–207

PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. 2000a. Fermentation of lignocellulosics hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. Bioresource Technology. Vol. 74: p.17–24.

PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. 2000b. Fermentation of lignocellulosics hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology. Vol. 74: p.25–33.

PRONACA. Inaexpo. (en línea). Consultado el 25 de Junio del 2008. Disponible en: http://www.inaexpo.com/webinaexpo/inaexpo.

RIVERS B. DOUGLAS y EBERT H. GEORGE. 1987. Lignocellulose pretreatment: A comparison of wet and dry ball attrition. Springer Netherlands. Vol. 9: p. 365-368

ROSE, J. BENNETT, A. 1999. Cooperative disassembly of the cellulose–xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening, Trends Plant Sci. Vol. 4: p.176–183.

SAHA, B.C. 2003. Hemicellulose bioconversion. J Ind Microb. Biotec. Vol. 30: p.279–291.

SCHELL, D.J., TORGET, R., POWER, A., WALTER, P.J, GROHMANN, K., HINMAN, N.D. 1991. A technical and economic analysis of acid-catalyzed steam explosion and dilute sulfuric acid pretreatments using wheat straw or aspen wood chips. Appl Biochem Biotechnol. Vol. 97: p.28-29

SCHELL, D., NGUYEN, Q., TUCKER, M., BOYNTON, B. 1998. Pretreatment of softwood by acid-catalysed steam explosion followed by alkali extraction: Appl Biochem Biotechnol. Vol. 72: p.17–24

SINOR J, BAILEY BK. 1993. Current and Potential Future Performance of Ethanol Fuels. SAE Tech. Ser. 930376. Warrendale, PA: Soc. Automót. Eng.

SUN, Y. CHENG, J. J. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production: Bioresource Technology. Vol. 96: p.1599-1606.

TIMELL, T.E. 1967 Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Sci Technol. Vol. 1: p.45–70.

TORGET, R., WALTER, P., HIMMEL, M., GROHMANN, K., 1990. Dilute acid pretreatment of short rotation woody and herbaceous crops: Appl. Biochem. Biotechnol., 24/25: p.115-126.

TSAO, G. T., LADISCH, M. R., VOLOCH, M., y BIENKOWSKI, P. 1982. Production of ethanol and chemicals from cellulosic materials. Proc. Biochem. Vol. 17: p.34-38

ULBRICHT, R.J., SHARON, J., THOMAS, J. 1984. A review of 5-hydroxymethylfurfura HMF in parental solutions. Fundam. Appl. Toxicol. Vol. 4: p.843-853.

VERENIUM CORPORATION. 2008. Análisis de biomasa (en línea). Consultado el 20 Junio del 2008. Disponible en: http://www.diversa.com/

WYMAN, C. E. Y HINMAN, N. D. 1990. Ethanol--Fundamentals of production from renewable feedstocks and use as a transportation fuel: Appl. Biochem. BiotechnoL, 24/25: p.735-753

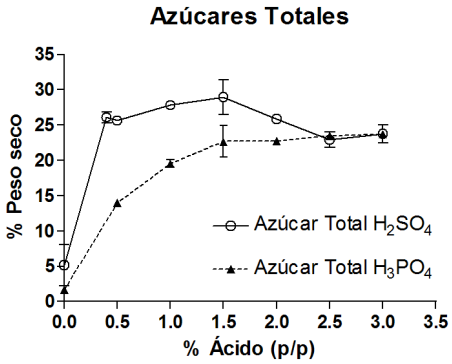
YOMANO, L. S YORK, S ZHOU, K SHANMUGAM, L INGRAM. 2007. Re-engineering Escherichia coli B for ethanol production from xylose in mineral salts medium: Metabolic Eng. In Press.

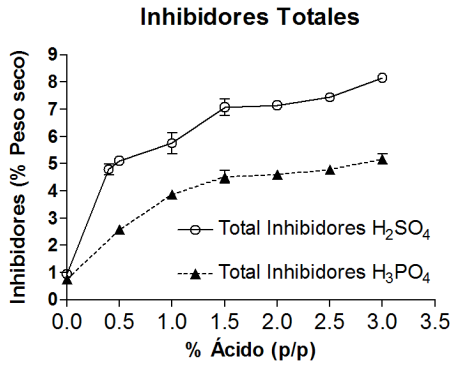
ZALDIVAR J, MARTINEZ A, INGRAM L.O. 1999. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic Escherichia coli. Biotechnol Bioeng. Vol. 65: p.24–33.

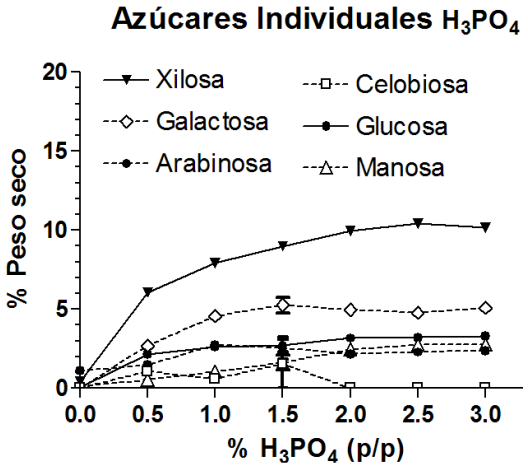
8. ANEXOS

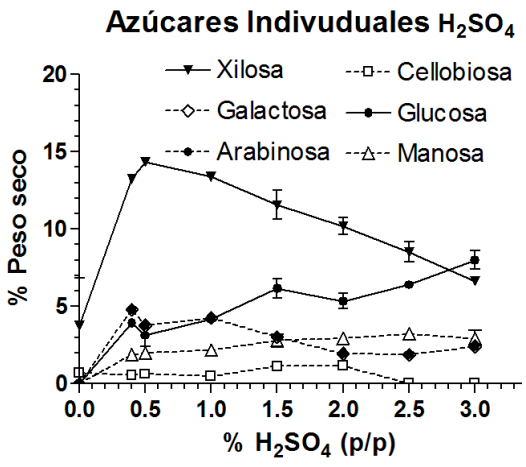
Anexo 1. Resultados del pretratamiento con ácido diluido de la fibra con 80% a 85% de humedad**.**

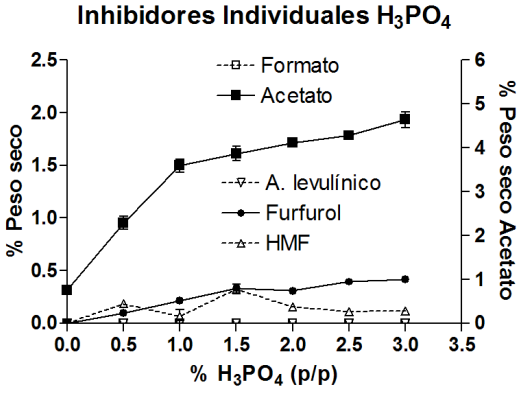
Fibra de palmito (peso seco= 20.94%)
Comparación de pretratamiento entre H_3PO_4 y H_2SO_4
1h 145°C, ~10% sólidos

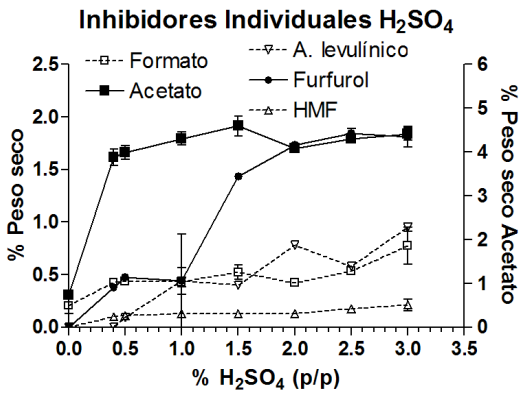






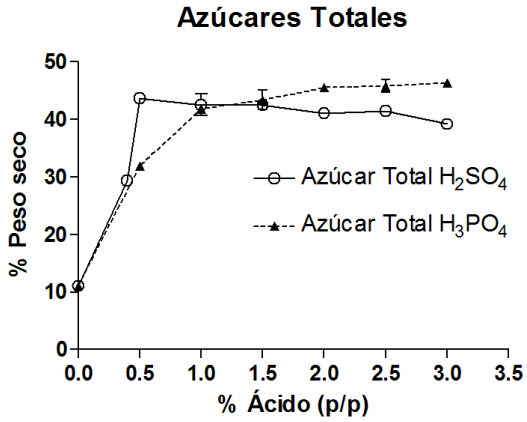


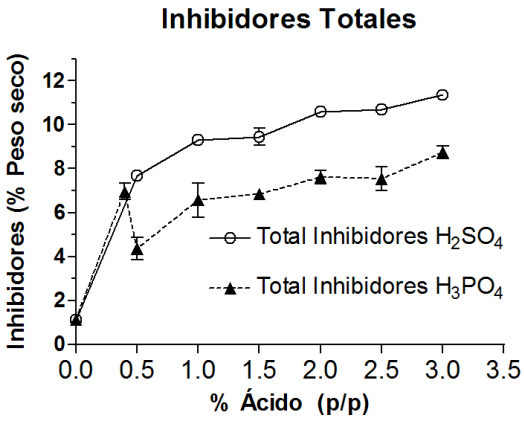


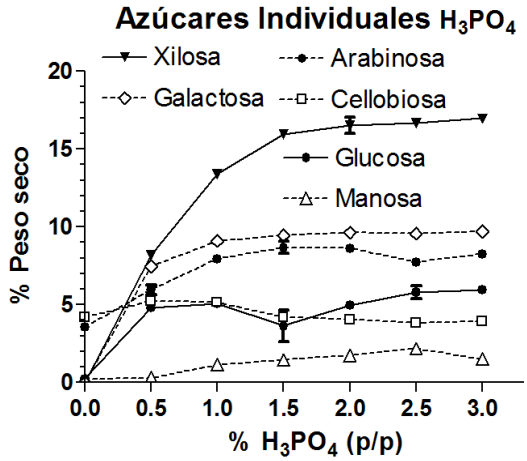


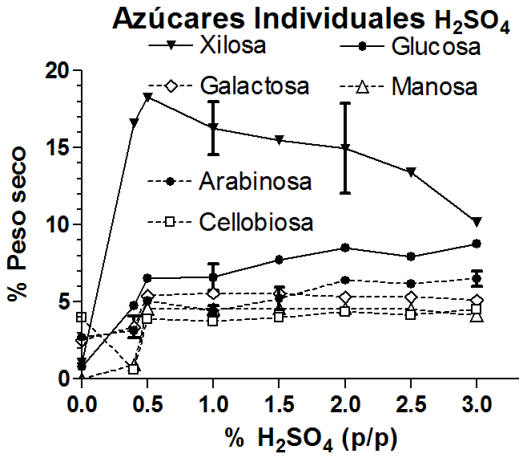
Anexo 2. Resultados del pretratamiento con ácido diluido de la fibra con 12% a 13% de humedad.

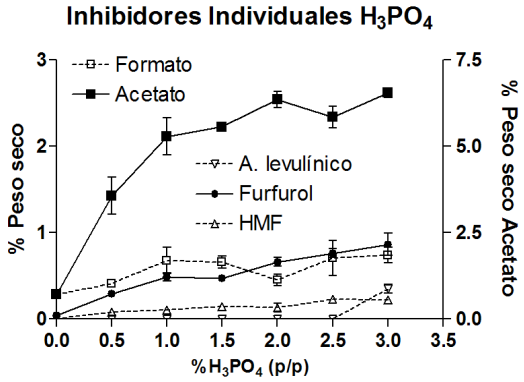
Fibra de palmito (peso seco= 87.68%)
Comparación de Pretratamiento entre H_3PO_4 y H_2SO_4
1h 145°C, ~10% sólidos

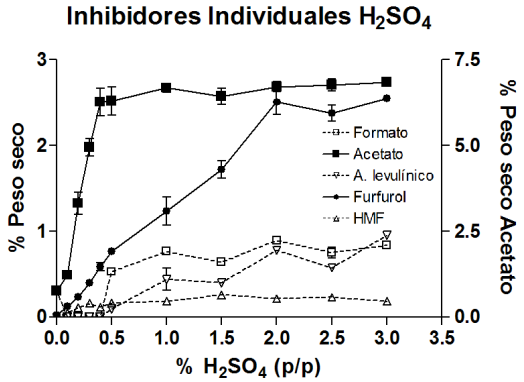






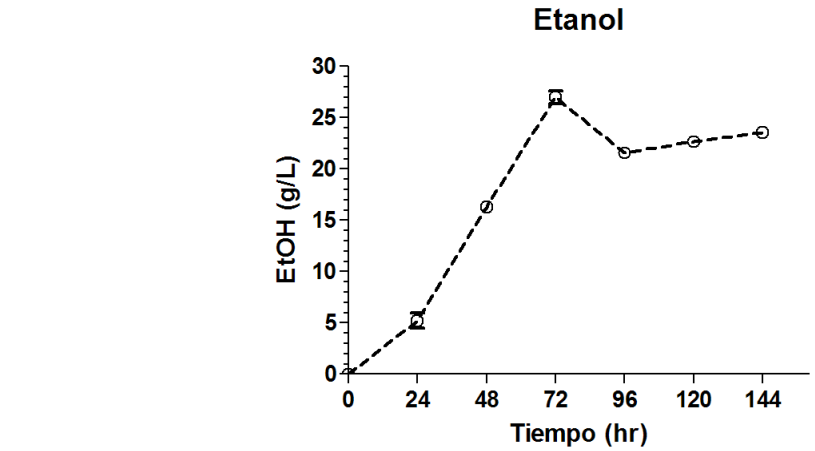


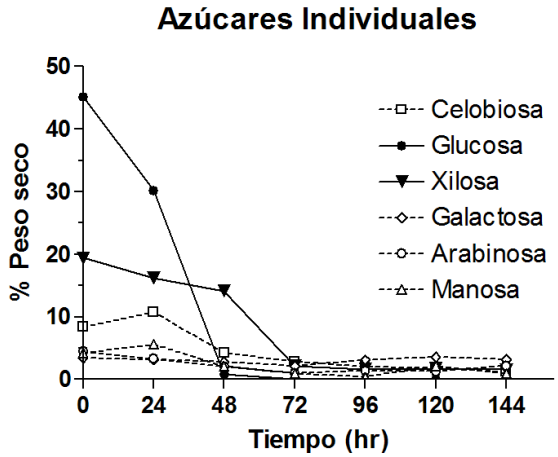


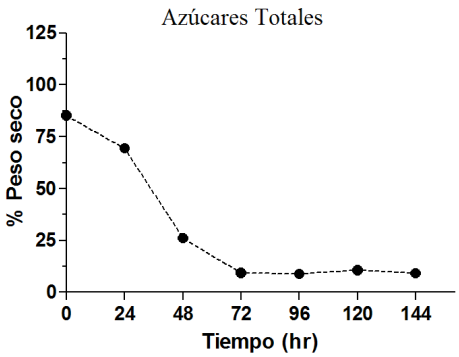


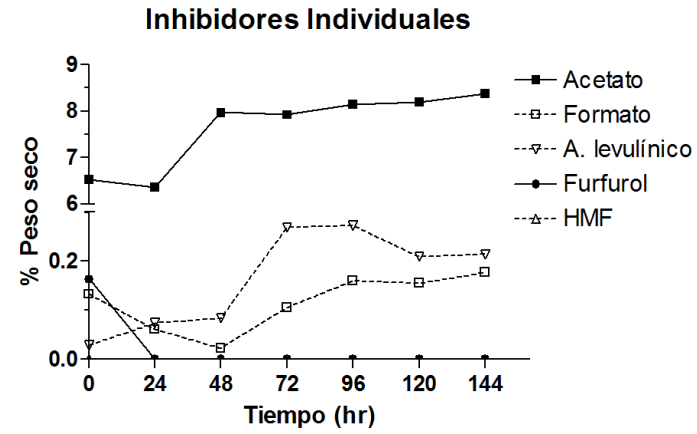
Anexo 3. Fermentación SSF con *Escherichia coli*. de la fibra con 80% a 85% de humedad.

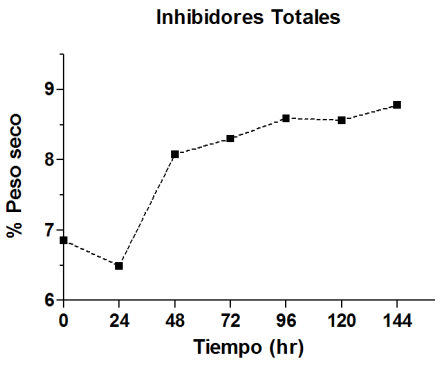
Fibra de palmito (peso seco = 20.94%)
SSF *E. coli EMFR17*, 10% sólidos
10% peso seco. de Biocelulasa Kerry W, 2% peso seco. de β-glucosidasa Novozyme.





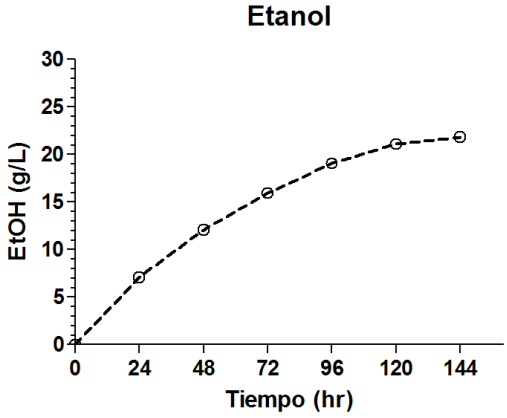


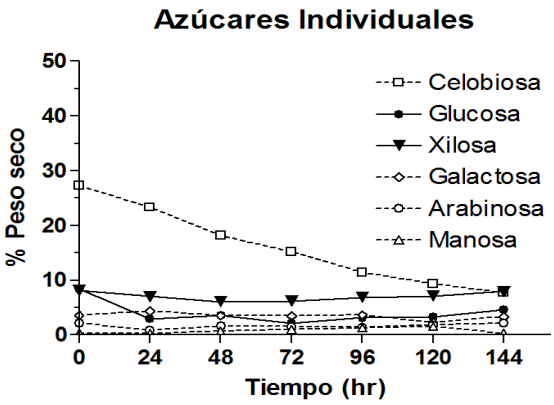


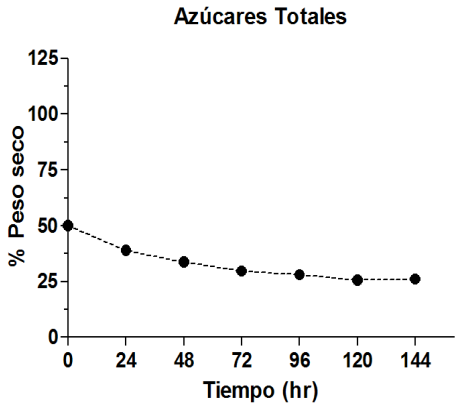


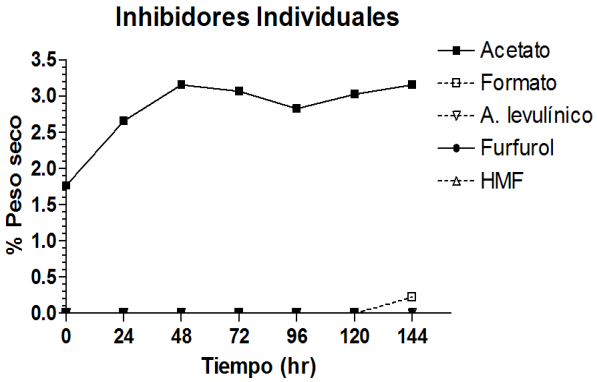
Anexo 4. Fermentación con K. oxytoca de la fibra con 80% a 85% de humedad.

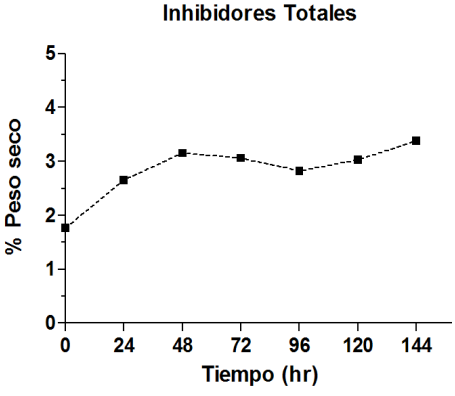
Fibra de palmito (peso seco= 20.94%)
SSF *K. oxytoca XZ122*, 10% sólidos
10% peso seco. de Biocelulasa Kerry W





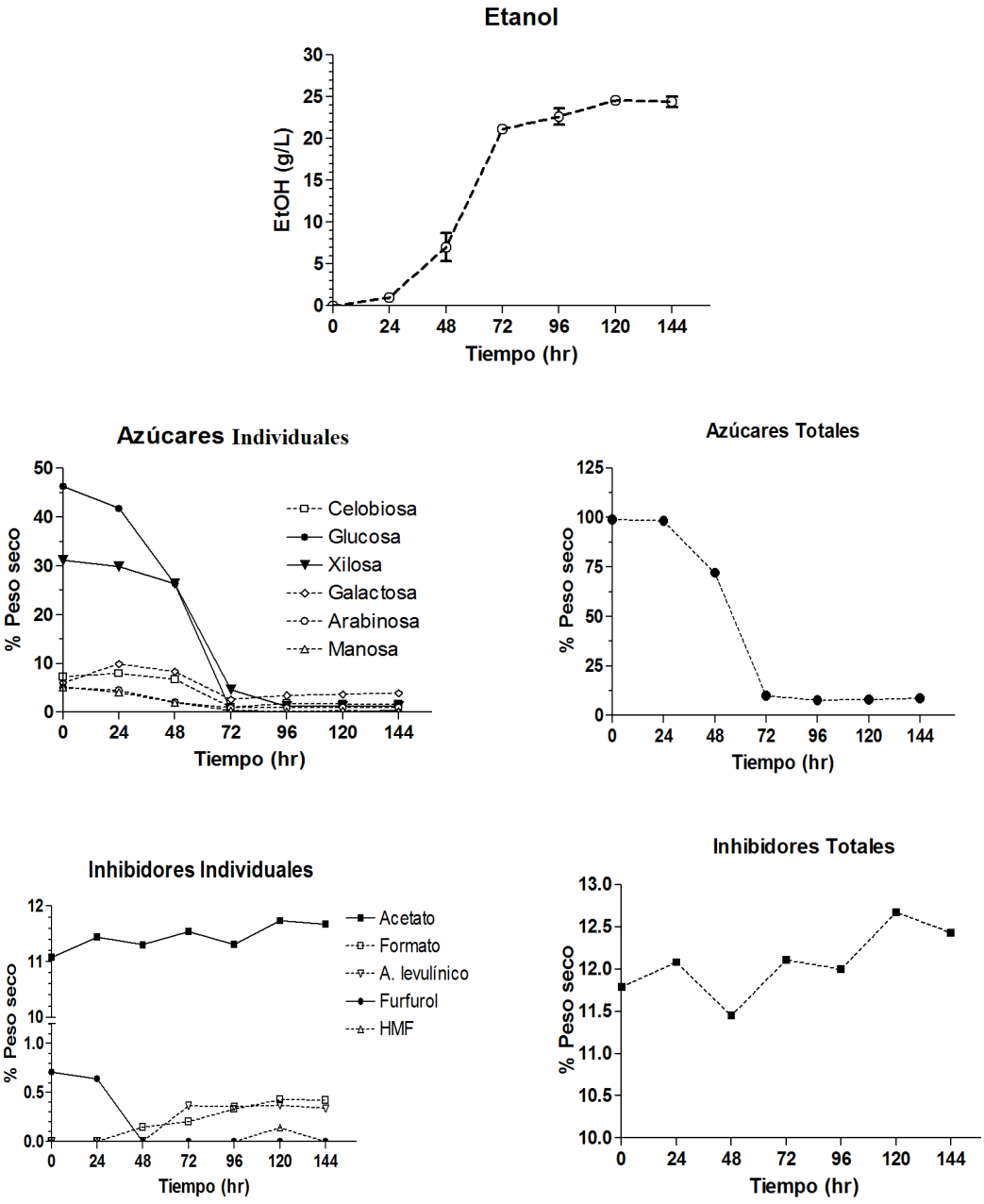






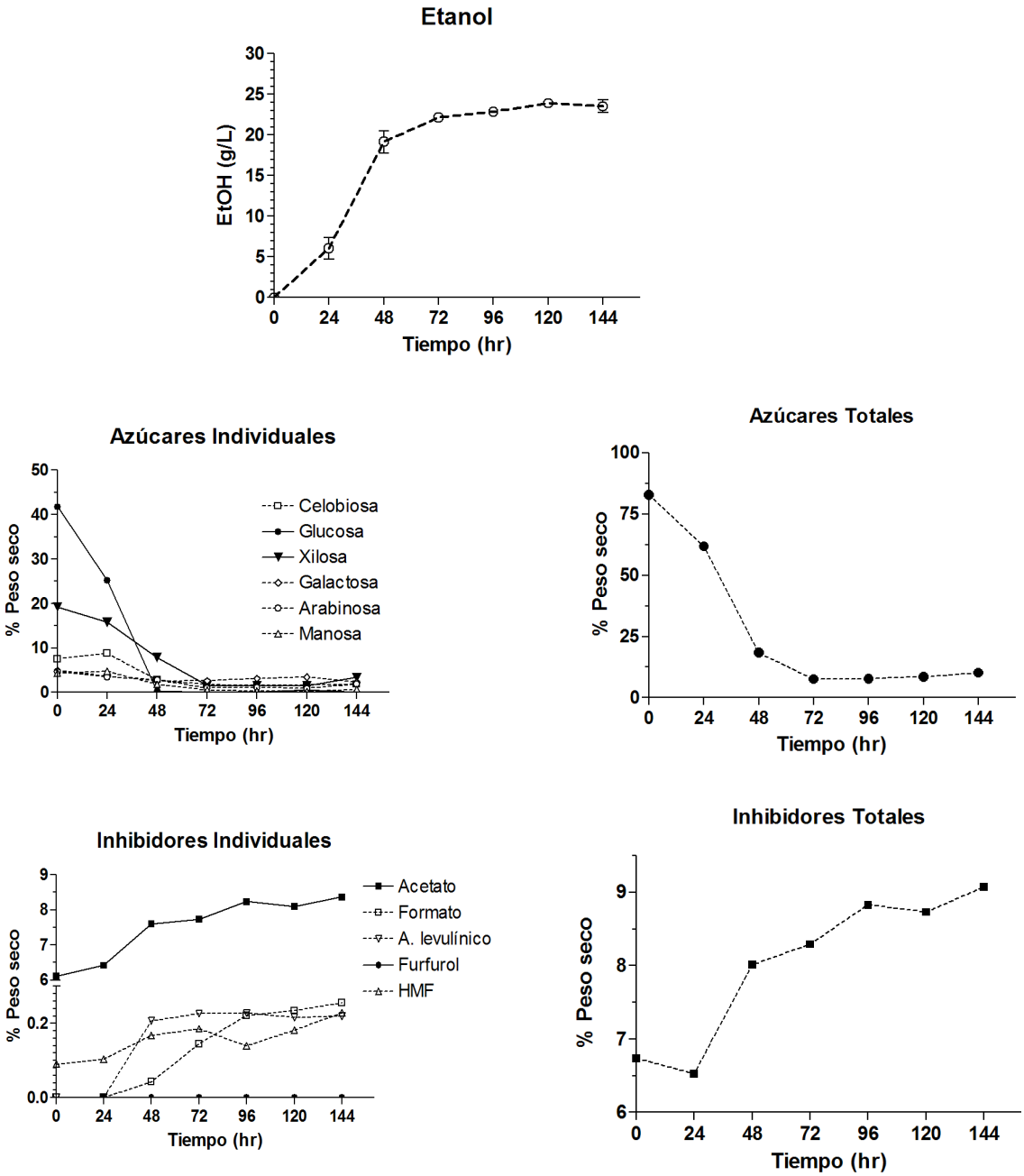
Anexo 5. Fermentación SSF con *Escherichia coli* "one pot'' de la fibra con 80% a 85% de humedad.

Fibra de palmito (peso seco= 20.94%)
SSF "one pot'' *E. coli EMFR17*, 8% sólidos
10% peso seco de Biocelulasa W, 2% peso seco de β-glucosidasa Novozyme



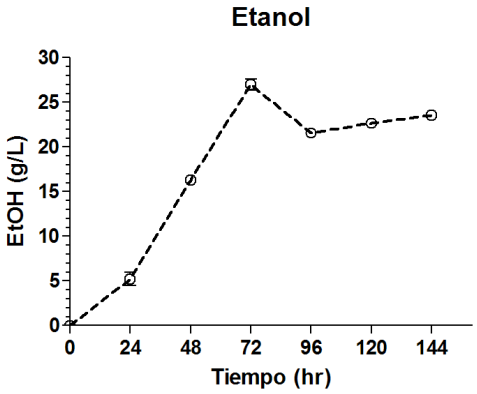
Anexo 6. . Fermentación SSF con *Escherichia coli* de la fibra con 12% a 13% de humedad.

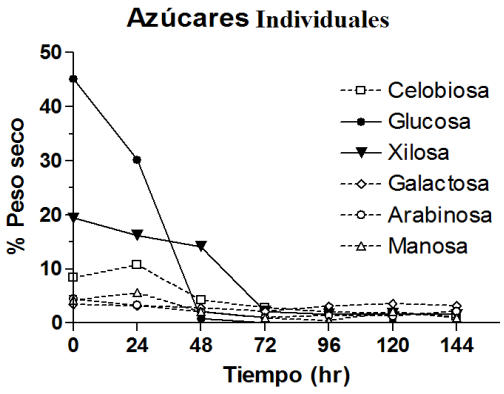
Fibra seca del palmito (peso seco= 87.68%)
SSF *E. coli EMFR17*, 10% sólidos
10% peso seco. de Biocelulasa Kerry, 2% peso seco. de β-glucosidasa Novozyme

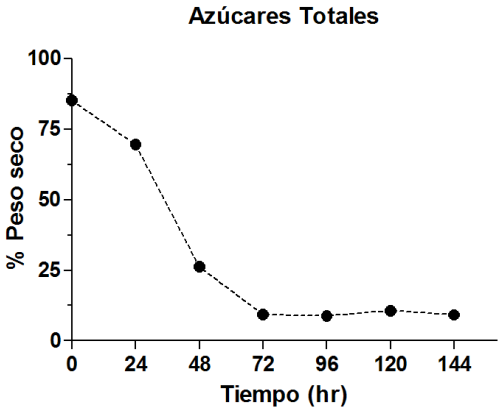


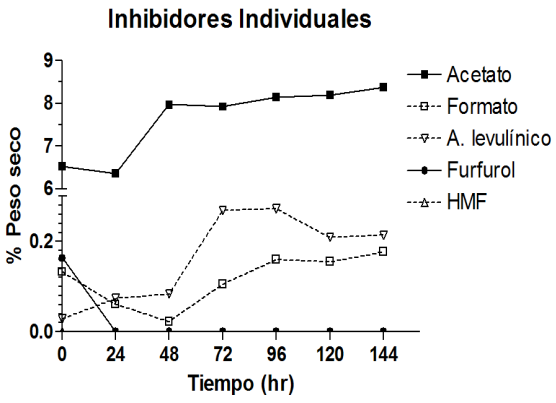
Anexo 7. Fermentación SSF con *Klebsiella oxytoca* de la fibra con 12% a 13% de humedad.

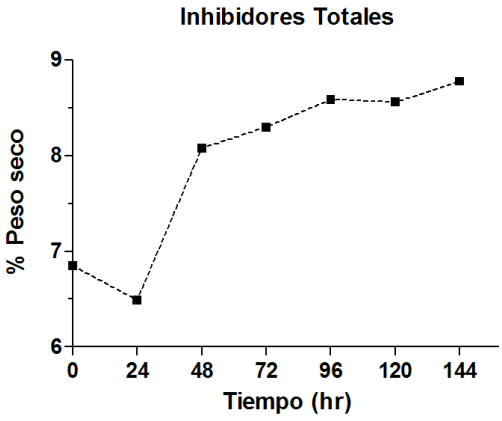
Fibra de palmito (peso seco= 87.68%)
SSF *K. oxytoca XZ122*, 10% sólidos
10% peso seco. de Biocelulasa Kerry W





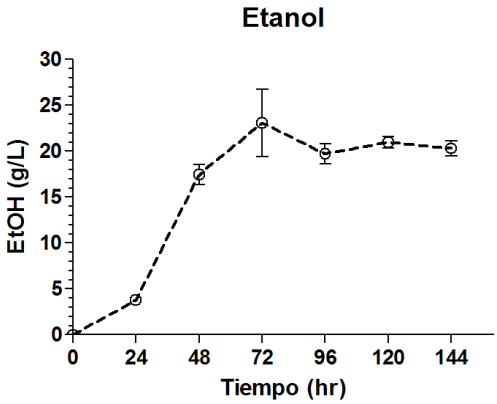


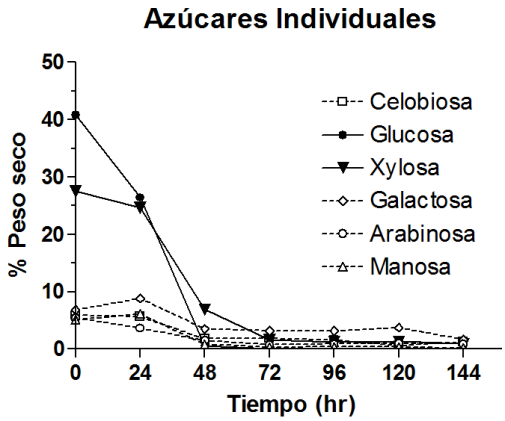


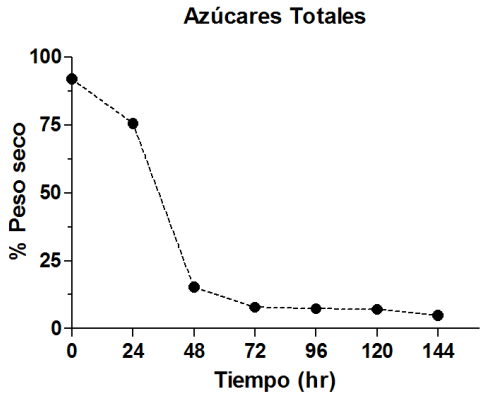


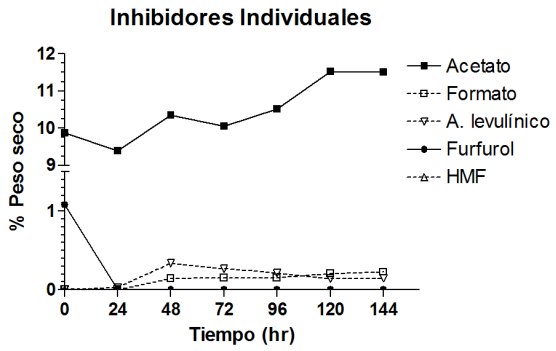
Anexo 8. Fermentación SSF con *Escherichia coli* "one pot'' de la fibra con 12% a 13% de humedad.

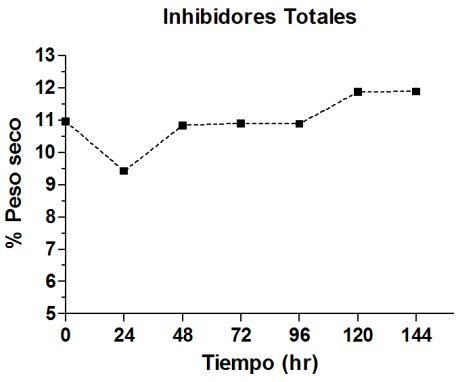
Fibra de palmito (peso seco = 87.68%)
SSF "one pot'' *E. coli EMFR17*, 8% sólidos
10% peso seco de Biocelulasa Kerry W, 2% peso seco. de β-glucosidasa Novozyme





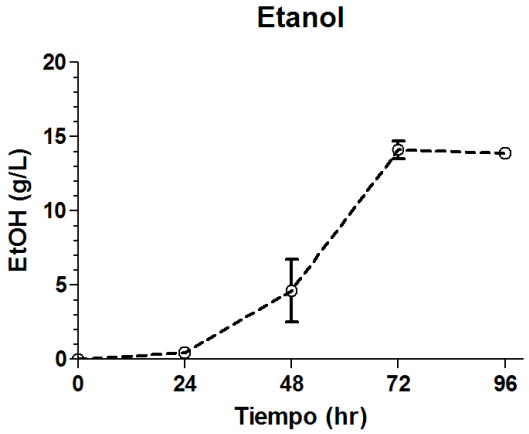


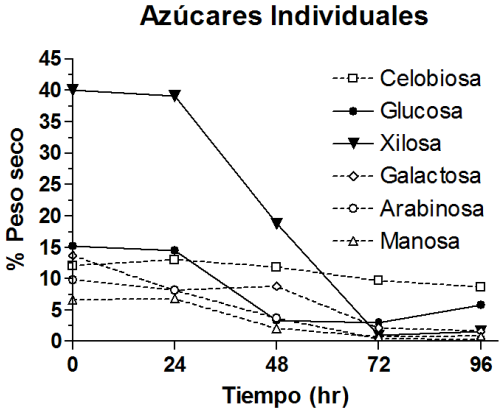


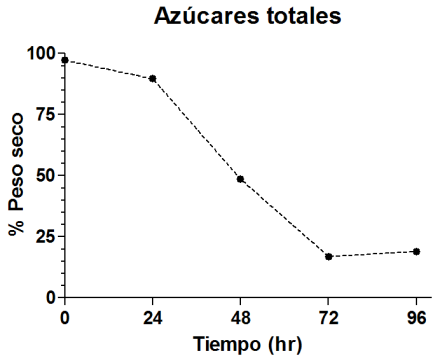


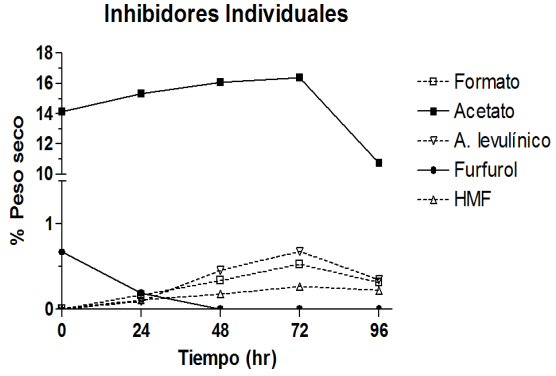
Anexo 9. Fermentación del hidrolizado sin detoxificar con *Escherichia coli* en la fibra con 80% a 85% de humedad.

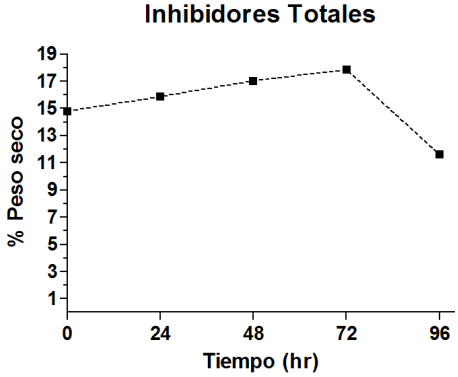
Fibra Húmeda de palmito (peso seco= 87.68%)
E. coli EMFR17, 85% Hidrolizado, 10% LB





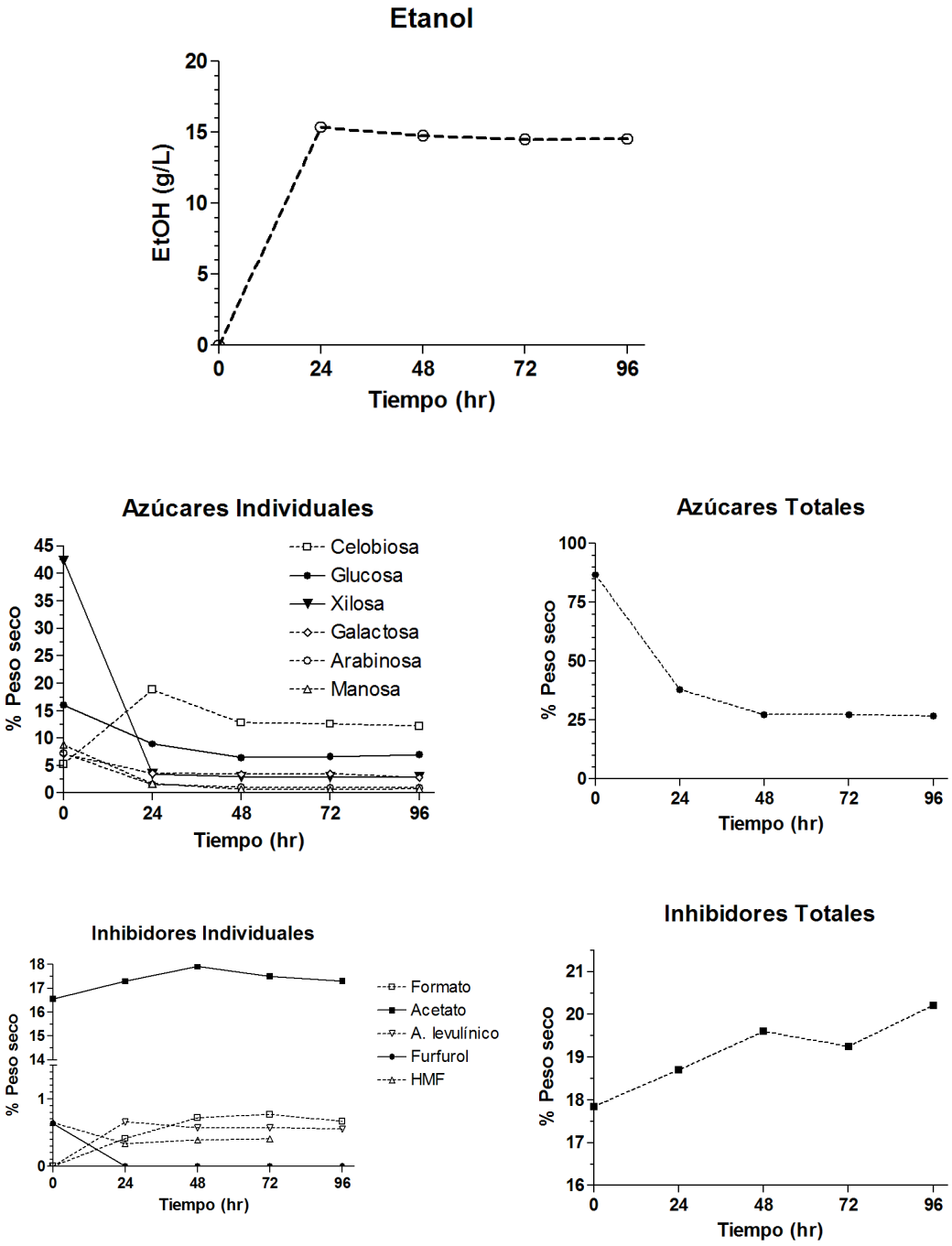






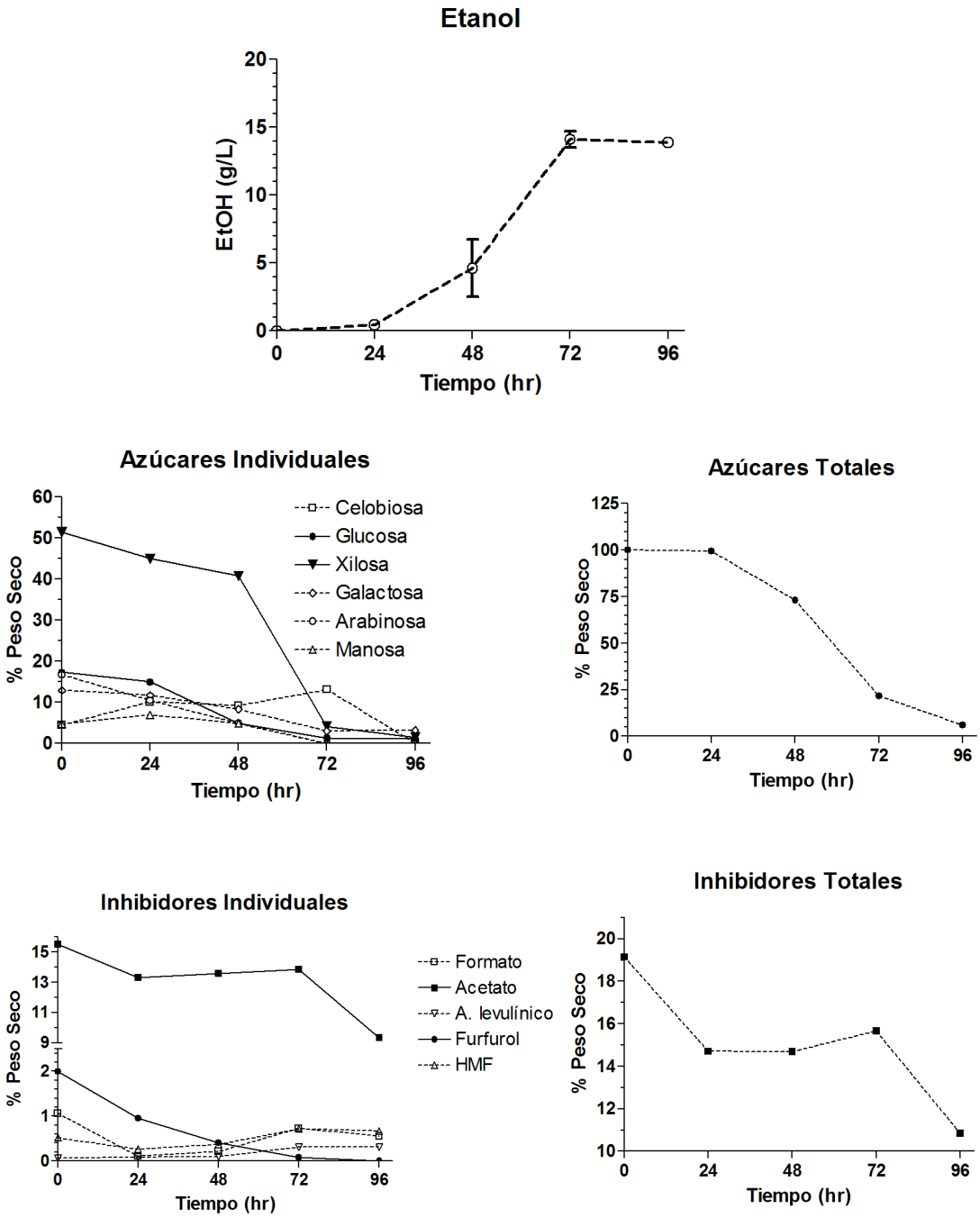
Anexo 10. Fermentación del hidrolizado detoxificado con *Escherichia coli* en la fibra con 80% a 85% de humedad.

Fibra de palmito (peso seco= 87.68%)
Hidrolizado Detoxificado con $Ca(OH)_2$
E. coli EMFR17, 85% Hidrolizado, 10% LB



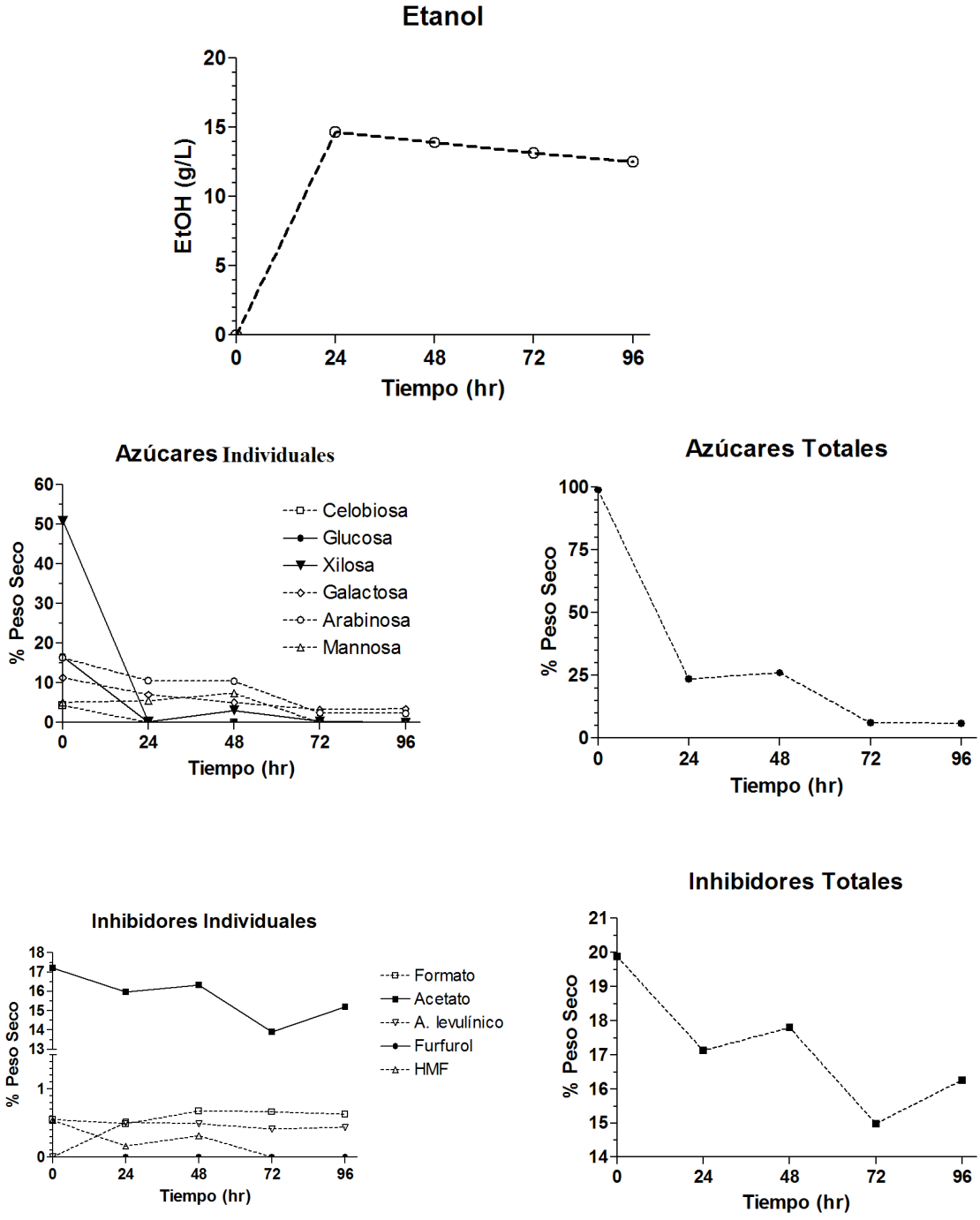
Anexo 11. Fermentación del hidrolizado sin detoxificar con *Escherichia coli* en la fibra con 12% a 13% de humedad.

Fibra seca de palmito (peso seco= 87.68%)
Hidrolizado Detoxificado con $Ca(OH)_2$
E. coli EMFR17, 85% Hidrolizado, 10% LB



Anexo 12. Fermentación del hidrolizado detoxificado con *Escherichia coli* en la fibra con 12% a 13% de humedad.

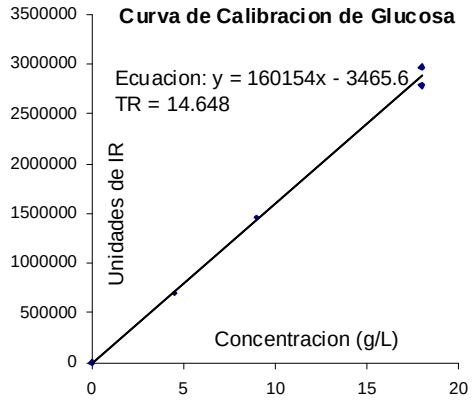
Fibra seca del palmito (Peso Seco =87.68%)
Hidrolizado Detoxificado con $Ca(OH)_2$
E. coli EMFR17, 85% Hidrolizado, 10% LB

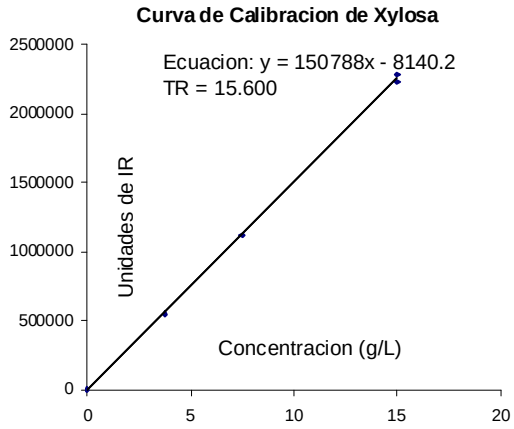


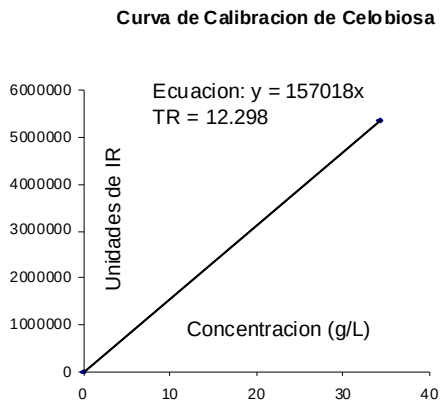
Anexo 13. Curvas de calibración para azúcares en el HPLC.

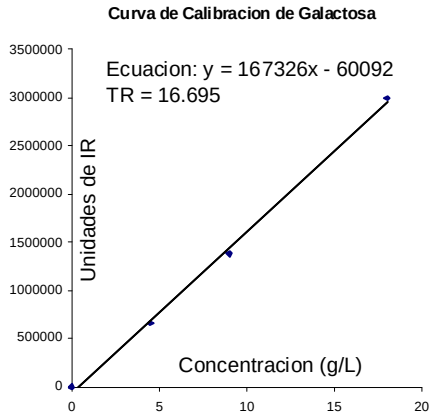
Columna: HMX1245 de Bio-Rad

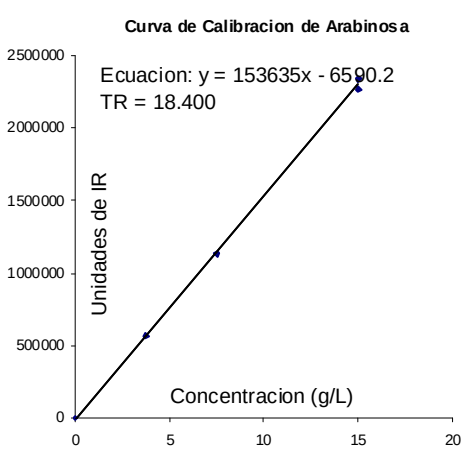
TR = Tiempo de Retención
IR = Índice de Refracción (min)

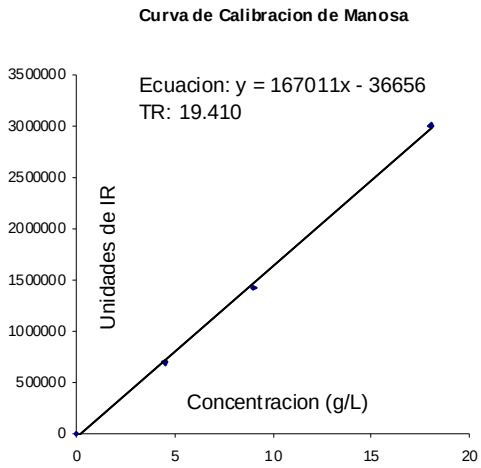








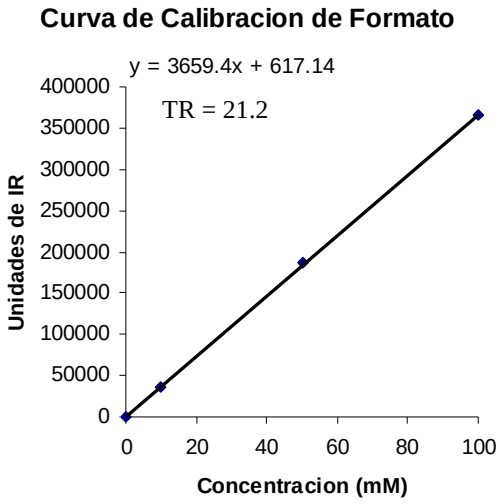

Curva de Calibracion de Arabinosa
Ecuacion: y = 153635x - 6590.2
TR = 18.400
Unidades de IR
Concentracion (g/L)
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
5
10
15
20

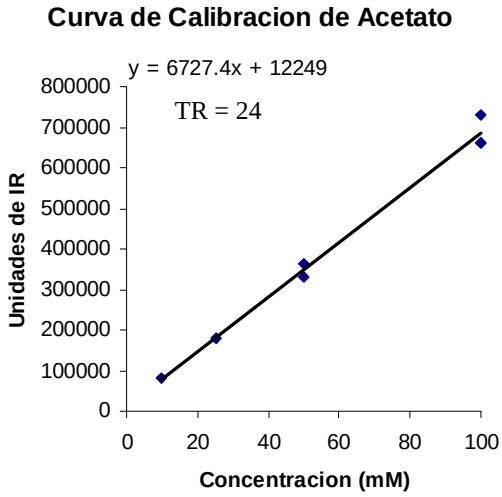

Curva de Calibracion de Manosa
Ecuacion: y = 167011x - 36656
TR: 19.410
Unidades de IR
Concentracion (g/L)
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
5
10
15
20

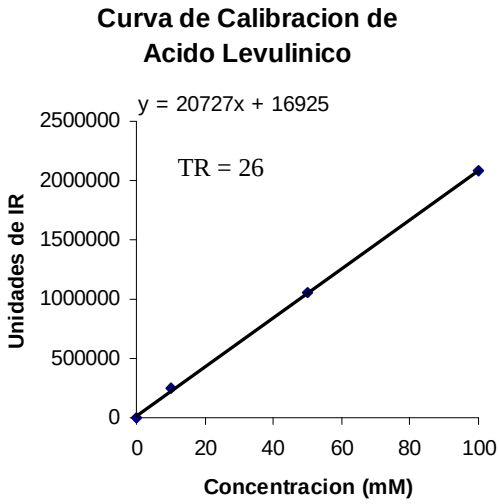
Anexo 14. Curvas de calibración para ácidos orgánicos en el HPLC

Columna: Carbohidratos de Bio-Rad

TR = Tiempo de Retención
IR = Índice de Refracción (min)

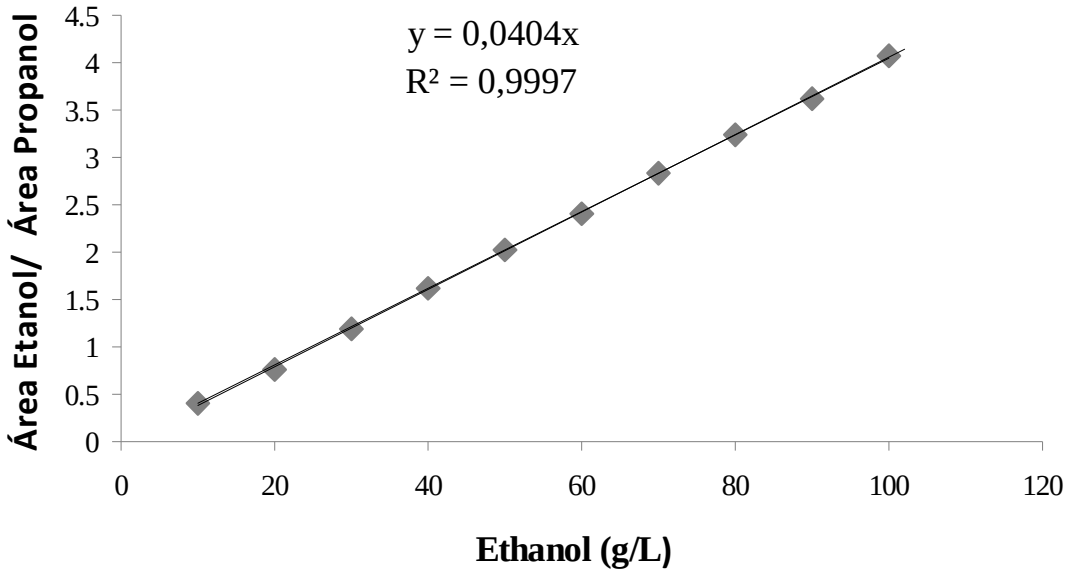






Anexo15. Curva estándar de etanol en el GC**.**

Columna: Capillary Column HP-Plot Q



Anexo 16. Azúcares totales de la fibra con 80-85% de humedad.
Condiciones: Hidrólisis con H_2SO_4 – H_3PO_4
1hr. 145 °C 10% sólidos
HPLC (CARBO-CA/metod Column)

Azúcares después del pretratamiento con H_2SO_4. Fibra con 80-85% de humedad (% de peso seco)

Rep	%H_2SO_4	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Galactosa	Arabinosa	Manosa	%Azúcares Totales
1	0	0.55	0.00	6.84	0.00	0.71	0.00	8.10
2	0	0.84	0.00	0.70	0.00	0.73	0.00	2.27
1	0.5	0.61	3.84	14.13	3.58	1.72	1.86	25.74
2	0.5	0.63	2.40	14.58	3.98	1.83	2.09	25.51
1	1	0.50	4.10	13.62	4.20	3.22	2.25	27.89
2	1	0.48	4.32	13.18	4.32	3.30	2.11	27.72
1	1.5	1.21	6.80	12.51	3.12	4.58	3.21	31.44
2	1.5	1.08	5.52	10.62	2.93	3.96	2.38	26.48
1	2	1.29	5.85	9.66	1.90	3.98	3.00	25.68
2	2	1.04	4.84	10.74	1.97	4.53	2.89	26.01
1	2.5	0.00	6.48	7.89	1.75	2.64	3.02	21.79
2	2.5	0.00	6.34	9.17	1.99	3.11	3.40	24.01
1	3	0.00	8.60	6.71	2.43	3.87	3.44	25.04
2	3	0.00	7.43	6.61	2.39	3.62	2.41	22.46

Azúcares después del pretratamiento con H_3PO_4. Fibra con 80-85% de humedad (% de peso seco)

Rep	%H_3PO_4	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Galactosa	Arabinosa	Manosa	%Azúcares Totales
1	0	0.00	0.02	0.49	0.00	1.12	0.10	1.73
2	0	0.00	0.08	0.39	0.00	1.11	0.08	1.67
1	0.5	1.14	2.14	5.89	2.73	1.43	0.54	13.88
2	0.5	1.01	2.14	6.25	2.64	1.53	0.53	14.10
1	1	0.59	2.49	7.86	4.44	2.60	1.00	18.98
2	1	0.61	2.76	8.03	4.71	2.89	1.11	20.11
1	1.5	3.12	3.09	8.99	5.76	1.86	2.11	24.93
2	1.5	0.00	2.33	8.98	4.78	3.22	1.14	20.45
1	2	0.00	3.28	9.95	4.85	2.19	2.14	22.42
2	2	0.00	3.08	9.96	5.06	2.16	2.78	23.04
1	2.5	0.00	3.09	10.36	4.69	2.20	2.73	23.07
2	2.5	0.00	3.36	10.48	4.87	2.39	2.74	23.84
1	3	0.00	3.54	9.92	5.15	2.34	2.76	23.71
2	3	0.00	3.04	10.43	5.05	2.43	2.75	23.71

Anexo 17. Inhibidores totales en la fibra de palmito con 80-85% de humedad
Condiciones: Hidrólisis con H_2SO_4 – H_3PO_4
1hr. 145 °C 10% sólidos
HPLC (CARBO-CA/metod Column)

Inhibidores después del pretratamiento con H_2SO_4. Fibra con 80-85% de humedad (% de peso seco)

Rep	%H_2SO_4	Formate	Acetato	Levulínico	Furfural	HMF	% Inhibidores Totales
1	0	0.13	0.73	0.00	0.00	0.00	0.86
2	0	0.28	0.75	0.00	0.00	0.00	1.04
1	0.5	0.43	3.84	0.13	0.47	0.11	4.97
2	0.5	0.45	4.14	0.06	0.48	0.11	5.25
1	1	0.38	4.15	0.57	0.88	0.15	6.13
2	1	0.48	4.45	0.31	0.00	0.11	5.36
1	1.5	0.59	4.82	0.39	1.42	0.16	7.39
2	1.5	0.46	4.36	0.41	1.44	0.09	6.76
1	2	0.43	4.06	0.75	1.73	0.12	7.11
2	2	0.41	4.11	0.81	1.73	0.14	7.20
1	2.5	0.54	4.25	0.56	1.80	0.19	7.34
2	2.5	0.53	4.35	0.59	1.89	0.16	7.53
1	3	0.95	4.27	0.99	1.71	0.16	8.08
2	3	0.60	4.55	0.91	1.91	0.27	8.24

Inhibidores después del pretratamiento con H_3PO_4. Fibra con 80-85% de humedad (% de peso seco)

Rep	%H_3PO_4	Formate	Acetato	Levulínico	Furfural	HMF	% Inhibidores Totales
1	0	0.00	0.79	0.00	0.00	0.00	0.79
2	0	0.00	0.73	0.00	0.00	0.00	0.73
1	0.5	0.00	2.44	0.00	0.11	0.15	2.70
2	0.5	0.00	2.14	0.00	0.09	0.22	2.45
1	1	0.00	3.44	0.00	0.20	0.13	3.78
2	1	0.00	3.74	0.00	0.23	0.00	3.97
1	1.5	0.00	4.03	0.00	0.36	0.37	4.75
2	1.5	0.00	3.70	0.00	0.30	0.28	4.28
1	2	0.00	4.22	0.00	0.34	0.13	4.70
2	2	0.00	4.02	0.00	0.28	0.18	4.49
1	2.5	0.00	4.31	0.00	0.40	0.12	4.83
2	2.5	0.00	4.25	0.00	0.39	0.10	4.74
1	3	0.00	4.82	0.00	0.43	0.12	5.37
2	3	0.00	4.46	0.00	0.40	0.11	4.97

Anexo 18. Azúcares totales de la fibra con 12-13% de humedad.
Condiciones: Hidrólisis con H_2SO_4 – H_3PO_4
1hr. 145 °C 10% sólidos
HPLC (CARBO-CA/metod Column)

Azúcares después del pretratamiento con H_2SO_4. Fibra con 12-13% de humedad (% de peso seco)

Rep	%H_2SO_4	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Galactosa	Arabinosa	Manosa	%Azúcares Totales
1	0	4.016	0.821	1.052	2.511	2.698	0.000	11.098
2	0	3.949	0.836	1.058	2.512	2.730	0.000	11.085
1	0.5	3.918	6.407	18.445	5.338	5.026	4.681	43.816
2	0.5	3.879	6.655	18.105	5.487	5.126	4.390	43.642
1	1	3.802	5.752	14.518	5.395	4.051	4.181	37.699
2	1	3.680	7.459	18.003	5.717	4.775	4.820	44.455
1	1.5	4.006	7.744	15.391	5.547	4.472	4.531	41.691
2	1.5	3.950	7.740	15.562	5.545	5.965	4.632	43.393
1	2	4.345	8.568	12.029	5.326	6.307	4.754	41.329
2	2	4.376	8.463	11.864	5.287	6.522	4.412	40.924
1	2.5	4.111	8.099	13.408	5.304	6.301	4.435	41.658
2	2.5	4.194	7.831	13.363	5.325	6.064	4.584	41.363
1	3	4.481	8.755	10.077	5.093	6.009	4.387	38.802
2	3	4.539	8.828	10.271	5.139	7.011	3.873	39.660

Azúcares después del pretratamiento con H_3PO_4. Fibra con 12-13% de humedad (% de peso seco)

Rep	%H_3PO_4	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Galactosa	Arabinosa	Manosa	%Azúcares Totales
1	0	4.04	0.21	0.00	0.00	3.60	0.20	8.05
2	0	4.35	0.31	0.00	0.00	3.56	0.21	8.43
1	0.5	5.30	4.84	8.45	7.66	6.27	0.00	32.52
2	0.5	5.18	4.74	7.98	7.27	5.63	0.58	31.39
1	1	5.22	5.16	13.53	9.11	8.18	1.17	42.37
2	1	5.09	5.00	13.30	9.08	7.75	1.11	41.33
1	1.5	4.35	4.68	16.24	9.46	9.06	1.36	45.13
2	1.5	4.07	4.83	15.68	9.47	8.30	1.56	43.91
1	2	4.00	5.01	16.03	9.64	8.39	1.74	44.81
2	2	4.09	4.91	17.03	9.63	8.88	1.73	46.27
1	2.5	3.68	5.40	16.62	9.47	7.60	2.00	44.77
2	2.5	3.96	6.22	16.74	9.67	7.89	2.40	46.88
1	3	3.96	5.92	16.95	9.69	8.34	1.37	46.24
2	3	3.92	6.02	16.99	9.74	8.19	1.61	46.47

Anexo 19. Inhibidores totales en la fibra con 12-13% de humedad

Condiciones: Hidrólisis con H_2SO_4 – H_3PO_4
1hr. 145 °C 10% sólidos
HPLC (CARBO-CA/metod Column)

Inhibidores después del pretratamiento con H2SO4. Fibra con 12-13% de humedad (% de peso seco)

Rep	%H_2SO_4	Formate	Acetato	Levulínico	Furfural	HMF	% Inhibidores Totales
1	0	0.32	0.82	0.00	0.06	0.00	1.20
2	0	0.31	0.70	0.00	0.04	0.00	1.05
1	0.5	0.56	5.89	0.13	0.80	0.19	7.57
2	0.5	0.50	6.33	0.06	0.73	0.14	7.77
1	1	0.78	6.81	0.57	1.07	0.16	9.39
2	1	0.75	6.55	0.31	1.40	0.20	9.21
1	1.5	0.60	6.20	0.39	1.62	0.26	9.07
2	1.5	0.68	6.66	0.41	1.82	0.26	9.83
1	2	0.93	6.56	0.75	2.36	0.22	10.81
2	2	0.86	6.86	0.81	2.65	0.21	11.39
1	2.5	0.69	6.58	0.56	2.47	0.23	10.54
2	2.5	0.81	6.95	0.59	2.28	0.23	10.86
1	3	0.87	6.96	0.99	2.54	0.16	11.51
2	3	0.80	6.73	0.91	2.55	0.21	11.20

Inhibidores después del pretratamiento con H3PO4. Fibra con 12-13% de humedad (% de peso seco)

Rep	%H_3PO_4	Formate	Acetato	Levulínico	Furfural	HMF	% Inhibidores Totales
1	0	0.27	0.68	0.00	0.05	0.01	1.01
2	0	0.29	0.74	0.00	0.04	0.00	1.06
1	0.5	0.42	3.03	0.00	0.32	0.09	3.85
2	0.5	0.41	4.11	0.00	0.27	0.07	4.87
1	1	0.83	5.83	0.00	0.54	0.14	7.34
2	1	0.53	4.75	0.00	0.44	0.08	5.79
1	1.5	0.59	5.61	0.00	0.51	0.18	6.88
2	1.5	0.73	5.52	0.00	0.44	0.11	6.80
1	2	0.39	6.12	0.00	0.61	0.19	7.30
2	2	0.52	6.59	0.00	0.71	0.08	7.91
1	2.5	0.50	5.54	0.00	0.71	0.26	7.01
2	2.5	0.91	6.15	0.00	0.82	0.20	8.08
1	3	0.83	6.69	0.30	0.99	0.21	9.02
2	3	0.65	6.42	0.40	0.74	0.24	8.45