



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Hidrólisis de residuos lignocelulósicos derivados de la explotación de palma de aceite hasta azúcares fermentables**

**Nubia Yineth Piñeros Castro**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2012



# **Hidrólisis de residuos lignocelulósicos derivados de la explotación de palma de aceite hasta azúcares fermentables**

**Nubia Yineth Piñeros Castro**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

**Doctorado en Ingeniería Química**

Director:

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

Grupo de Investigación:

Grupo de Procesos químicos y bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2012



*A Dios creador que me ha dado los mejores regalos, mi hijo,  
mi familia, mis amigos... la maravilla de la vida, el amor y  
la mágica naturaleza.*

*De forma especial a mis Juanes*



## **Agradecimientos**

Al profesor Mario Velásquez, a quien considero parte de mi familia.

Al profesor Byron Yopez, por su apoyo y enseñanzas.

A la U. Jorge Tadeo Lozano, un espacio de construcción plena que me ha permitido desarrollarme.

A la U. Nacional, mi alma mater y constructora de mi camino académico.

Al CIEMAT, especialmente a Paloma Manzanera, Ignacio Ballesteros y Mercedes Ballesteros, quien además de su colaboración académica fueron especiales conmigo.

A Colciencias, la Universidad Nacional y UJTL por la financiación del proyecto “Hidrólisis de residuos lignocelulósicos de aceite de palma para la producción de azúcares fermentables”

A Loreal-Unesco-Icetex-Colciencias por el Reconocimiento Nacional “Mujeres en la Ciencia 2010”, por este trabajo.

A los funcionarios de los laboratorios de la U. Nacional y U. Jorge Tadeo Lozano

A Ligia Rodríguez y a mis estudiantes que han compartido experiencias de búsqueda de alternativas de uso para los residuos de palma.

A los profesionales que apoyaron el desarrollo de este trabajo: Lina Rincón, Jose Alejandro Bourdon, Helbert Muñoz, Gloria Velasco y de forma muy especial Carolina Rojas, quien se convirtió en mi mano derecha durante algún tiempo.

A mis compañeros y amigos de lucha.....

A mi amada familia, soporte de mi vida, especialmente a mis Juanes, que son mi inspiración y mi apoyo.

A mis padres y hermanas

A las mujeres científicas que se abren camino en el mundo de la investigación





## Resumen

Durante el proceso de extracción de aceite de palma en Colombia, se generan cerca de 1,2 millones de toneladas de racimos vacíos, materiales lignocelulósicos que pueden considerarse como una fuente local de materias primas para su conversión a azúcares y etanol, lo cual se ha considerado potencial para la producción de combustibles y químicos a partir de fuentes renovables, ante la fuerte disminución de combustibles fósiles. Para su aprovechamiento y considerando la complejidad de estos materiales es necesario realizar pretratamientos previos a la producción de los azúcares. En este contexto, el trabajo doctoral contempló la evaluación de pretratamientos biológicos con hongos degradadores de lignina *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* y tratamiento con enzimas lacasas y lacasa mediador (ABTS). Estos tratamientos fueron estudiados de forma independiente encontrando que el tratamiento con *Pleurotus ostreatus* favorece la producción de los azúcares fermentables a partir de los residuos de palma, a partir de los cuales se logra producir 7,34 g de azúcares por cada 100 gramos de material original un 31% más que lo logrado en material sin tratar. Por otro lado, el tratamiento enzimático con lacasa-ABTS demostró ser más efectivo en modificar la estructura lignocelulósica, de tal forma que se favorece el proceso de hidrólisis enzimática, cuya eficiencia alcanzó un valor de 5,14% valor superior al 3,41% obtenido en material sin tratamiento. Estos dos tratamientos seleccionados se combinaron con el tratamiento con agua caliente (T 180-220°C y 30-60 min) y con explosión con vapor (200 y 220°C, 5 min).

La combinación tratamiento biológico con *Pleurotus ostreatus* por tres semanas seguida de explosión con vapor a 200°C, 5 min, permitió el máximo rendimiento global de azúcares del 49% correspondiente a un 72,76% de recuperación de glucosa y 86,63% de recuperación de xilosa en el material original. Estos valores son muy superiores a los obtenidos en los tratamientos de forma individual con agua caliente (36,15% de recuperación de glucosa y 63,63% de recuperación de xilosa) y con tratamiento biológico (14,9% de glucosa y 7% de xilosa).

Estos resultados indican que la combinación tratamiento biológico-tratamiento hidrotérmico es una alternativa para mejorar la eficiencia enzimática de residuos de palma de aceite para la producción de azúcares.

**Palabras clave:** biomasa lignocelulósica, hidrólisis enzimática, azúcares fermentables, tratamientos biológicos, combinación de tratamientos

## Abstract

During the palm oil extraction process, in Colombia will generate about 1.2 million tons of empty fruit bunches, lignocellulosic materials that can be considered as a local source of raw materials for production of sugar and ethanol, which has considerable potential for production of fuels and chemicals from renewable sources, in front of decline of fossil fuels. For its use and considering the complexity of these materials, is required prior to pretreatment production of sugars. In this context, the doctoral research evaluated the biological pretreatment of these substrates with lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and enzymatic pretreatment with laccases and laccase mediator (ABTS). These treatments were studied independently and found that treatment with *Pleurotus ostreatus* favors the production of fermentable sugars from palm residues, it was found that it is possible to produce 7.34 g of sugars per 100 grams of original material, a value 31% higher than that achieved in untreated material. On the other hand, the enzymatic treatment with laccase-ABTS was more effective in lignocellulosic structure modification, so that favors the enzymatic hydrolysis process, whose efficiency reached a value of 5.14% higher than of 3.41% obtained in untreated material. These two treatments were combined with hot water treatment (T 180-220 ° C and 30-60 min) and steam explosion treatment (200 and 220 ° C, 5 min).

The combination of biological treatment with *Pleurotus ostreatus* of three weeks, followed by steam explosion at 200 ° C, 5 min, showed the maximum overall performance achieved, a value of 49% sugars corresponding to a 72.76% recovery of glucose and 86.63% of xylose in the raw material. These values are much higher than those obtained in the individual treatments with hot water (recovery of 36.15% of glucose and 63.63% of xylose) and biological treatment (14.9% glucose and 7% xylose).

These results indicate that the combination biological treatments with hydrothermal treatments are an alternative for improving enzymatic efficiency sugars production from palm waste.

**Keywords:** lignocellulosic biomass, enzymatic hydrolysis, fermentable sugars, biological pretreatment, pretreatment combination.

# Contenido

	Pág.
Resumen.....	V
Lista de figuras .....	X
Lista de tablas.....	XII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIII
Introducción .....	1
<b>1. Capítulo 1. Contexto General.....</b>	<b>3</b>
1.1 Palma de aceite.....	3
1.1.1 Clasificación taxonómica.....	3
1.2 Industria de la palma de aceite en Colombia.....	3
1.3 Subproductos lignocelulósicos derivados del proceso de extracción del aceite de palma.....	3
1.4 Aprovechamiento de residuos de palma de aceite .....	6
1.5 Estructura de los materiales lignocelulósicos.....	6
1.5.1 Celulosa .....	7
1.5.2 Hemicelulosas.....	8
1.5.3 Lignina .....	9
1.6 Producción de azúcares fermentables a partir de materiales lignocelulósicos.....	10
1.6.1 Pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica .....	11
1.6.2 Compuestos inhibidores de la fermentación producidos en los pretratamientos ..	15
1.6.3 Hidrólisis de lignocelulósico .....	15
1.6.4 Aspectos económicos aprovechamiento biomasa lignocelulósica .....	17
1.7 Antecedentes hidrólisis de residuos de palma.....	18
<b>2. Capítulo 2. Aplicación de tratamientos de deslignificación biológica con hongos de la podredumbre blanca.....</b>	<b>20</b>
2.1 Introducción.....	20
2.1.1 Biodegradación de lignocelulósicos .....	20
2.1.2 Biodegradación de la lignina .....	21
2.1.3 Biodegradación de celulosa y hemicelulosa .....	23
2.1.4 Pretratamientos biológicos.....	24
2.1.5 Taxonomía de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	25
2.1.6 Taxonomía de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	26
2.2 Materiales y métodos.....	26
2.2.1 Materia prima.....	26
2.2.2 Material biológicos e inóculo .....	26
2.2.3 Cultivo en fase sólida .....	27

2.2.4	Diseño experimental.....	28
2.2.5	Hidrólisis enzimática.....	29
2.2.6	Métodos analíticos.....	29
2.2.7	Fotografías SEM.....	30
2.3	Resultados y discusión.....	30
2.3.1	Porcentaje pérdida de peso.....	30
2.3.2	Biodegradación de residuos de palma.....	31
2.3.3	Biodegradación de la lignina.....	33
2.3.4	Cinética de biodegradación de lignina.....	35
2.4	Biodegradación de celulosa y hemicelulosa.....	40
2.5	Producción de azúcares fermentables.....	44
2.6	Análisis FTIR.....	46
2.7	Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	49
2.8	Conclusiones.....	52
<b>3.</b>	<b>Capítulo 3. Aplicación de lacasas y lacasa mediadores como pre-tratamiento biológico a residuos de palma.....</b>	<b>55</b>
3.1	Lacasas.....	55
3.1.1	Oxidación de sustratos fenólicos.....	56
3.1.2	Oxidación de compuestos no fenólicos.....	57
3.1.3	Uso de enzimas en el tratamiento biológico.....	57
3.2	Materiales y métodos.....	59
3.2.1	Materia prima.....	59
3.2.2	Pretratamiento enzimático.....	60
3.2.3	Diseño experimental.....	60
3.2.4	Determinación de actividad lacasa.....	61
3.2.5	Hidrólisis enzimática.....	61
3.2.6	Determinación de compuestos fenólicos.....	61
3.2.7	Análisis FTIR.....	62
3.2.8	Fotografías SEM.....	62
3.3	Resultados y discusión.....	62
3.3.1	Hidrólisis enzimática y generación de compuestos fenólicos.....	62
3.3.2	Análisis FTIR.....	71
3.4	Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	73
3.5	Conclusiones.....	75
<b>4.</b>	<b>Capítulo 4. Combinación de pretratamientos biológicos con tratamientos hidrotérmicos.....</b>	<b>78</b>
4.1	Tratamientos hidrotérmicos.....	78
4.1.1	Agua caliente.....	78
4.1.2	Explosión con vapor.....	79
4.1.3	Combinación de pretratamientos.....	80
4.2	Materiales y métodos.....	81
4.2.1	Materia prima.....	81
4.2.2	Pretratamientos hidrotérmicos.....	81
4.2.3	Diseño experimental.....	82
4.2.4	Hidrólisis enzimática (HE).....	83
4.2.5	Determinación de compuestos inhibidores de la fermentación etanólica.....	83
4.2.6	Pruebas de hidrólisis y fermentación simultánea (SSF).....	84
4.2.7	Análisis FTIR.....	84
4.2.8	Fotografías SEM.....	84
4.3	Resultados y discusión.....	84
4.3.1	Composición de los materiales base.....	84

---

4.3.2	Combinación de tratamientos biológicos con agua caliente .....	85
4.3.3	Combinación de tratamientos biológicos con explosión con vapor .....	98
4.3.4	Prueba de fermentabilidad.....	102
4.3.5	Análisis FTIR.....	103
4.3.6	Análisis SEM .....	106
4.4	Conclusiones .....	108
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>111</b>
5.1	Conclusiones .....	111
5.2	Recomendaciones .....	113
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>115</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1-1 Balance de masa procesamiento de frutos de palma de aceite (García & Pedraza, 1997).....	4
Figura 1-2 Configuración de las células de la madera. Adaptado de Sánchez, 2009. ....	7
Figura 1-3 Estructura de la celulosa .....	8
Figura 1-4 Estructura de los glucomananos.....	8
Figura 1-5 Estructura del glucoronoxilanos.....	9
Figura 1-6 Monómeros de la lignina y sus correspondientes unidades en la lignina.....	9
Figura 1-7 Estructura de la lignina (Pérez et al., 2002). ....	10
Figura 2-1 Fotografía cultivos en cajas de Petri a) <i>P. chrysosporium</i> b) <i>P. ostreatus</i> .....	27
Figura 2-2 Pérdida de componentes principales. Rojo celulosa, negro lignina, azul hemicelulosa, PHM, PHK, PLM, PLK .....	31
Figura 2-3 Datos experimentales (símbolos) y ajustes (líneas) al modelo de Weibull de la fracción degradada de lignina.....	37
Figura 2-4 Gráficas de medias con barras de desviación (95% de nivel de confianza), para los parámetros del modelo de Weibull (a) y (b), y fracción degradada de lignina para las semanas 2 y 3...	39
Figura 2-5 Datos experimentales y ajuste al modelo de Weibull de la fracción degradada de a) celulosa y b) hemicelulosa.....	40
Figura 2-6 Datos comparativos parámetro cinético (b), para la biodegradación de lignina, celulosa y hemicelulosa.....	43
Figura 2-7 Porcentaje de a) eficiencia de la hidrólisis enzimática y b) rendimiento global de azúcares a partir de residuos de palma pretratados biológicamente.....	45
Figura 2-8 Espectros IR (DRIFT) de residuos de palma sin tratar y tratados biológicamente a) Espectro completo y b) amplificación región fingerprint .....	47
Figura 2-9 Fotografías SEM material sin tratar biológicamente .....	50
Figura 2-10 Fotografías de material pretratado biológicamente PH y PL .....	51
Figura 3-1 Estructura cristalina de la lacasa con tres sitios activos de cobre (Martinez et al., 2005) ....	55
Figura 3-2 Mecanismo de oxidación de la lignina por las lacasas (Kawai et al., 1999) reportada en (Wong, 2009). ....	56
Figura 3-3 Oxidación de lignina no fenólica catalizada por el sistema lacasa mediador (Kawai et al., 1999) reportada por reportada en Wong (2009).....	58
Figura 3-4 Superficie de respuesta %HE, tratamiento con lacasas .....	64
Figura 3-5 Superficie de respuesta para % de HE de residuos de palma pretratados con lacasa-ABTS .....	66
Figura 3-6 Correlación entre el % de aumento en la eficiencia de la hidrólisis enzimática y la concentración del ABTS (40 U/g de lacasas).....	67

Figura 3-7 Subunidades de la lignina $\beta$ -O-4 (Wong, 2009).....	69
Figura 3-8 Secuencia de oxidación de unidades de guayacilo por el sistema lacasa-ABTS.....	70
Figura 3-9 a) Espectros IR (DRIFT) de residuos de palma sin tratar y tratados con el sistema lacasa-ABTS b) ampliación de la región fingerprint.....	72
Figura 3-10 Microfotografías de los materiales sin tratar y tratados con lacasa-ABTS.....	74
Figura 4-1 Contornos de la superficie de respuesta para % de celulosa en materiales pretratados con agua caliente. En paréntesis se muestra el % de celulosa del material de partida .....	89
Figura 4-2 Recuperación de hemicelulosa en el líquido de tratamiento, expresada como un porcentaje de la hemicelulosa presente en el material inicial.....	90
Figura 4-3 Generación de compeustos inhibidores, expresados como mg de inhibidor por gramo de material de entrada al tratamiento con agua caliente.....	91
<b>Figura 4-4</b> Hidrólisis enzimática llevada a la materia prima (HEARMP) .....	94
Figura 4-5 Rendimiento global de azúcares obtenidos en el tratamiento con agua caiente (barras superiores corresponden a xilosa mientras las inferiores son las de glucosa) .....	96
Figura 4-6 Diagramas de barras resultado de la optimización de la función deseabilidad, múltiples respuestas.....	96
Figura 4-7 Caracterización de los materiales antes y después del tratamietno con explosión con vapor .....	98
Figura 4-8 Eficiencia de la hidrólisis enzimática de materiales pretratados con explosión con vapor	100
Figura 4-9 Rendimiento global de azúcares obtenidos en el tratamiento de explosión con vapor (barras superiores corresponden a xilosa mientras las inferiores son las de glucosa) .....	102
Figura 4-10 Espectro FTTR ampliación del espectro a) material original y material original tratado con agua caliente b) material original, pretratado con PL y con lacasa-ABTS tratados con agua caliente.	104
Figura 4-11 Espectro FTIR materiales pretratados con explosión con vapor a 200° C (zona de huella digital).....	105
Figura 4-12 Microfotografías de materiales sin tratar y tratados mediante tratamientos biológicos combinados con tratamietnos hidrotérmicos .....	107

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1-1 Residuos generados en el proceso de explotación de la palma de aceite, con base en (Saka, 2005; Singh et al., 1999; Yang et al., 2006).....	5
Tabla 1-2 Composición de los racimos vacíos de palma de aceite.....	5
Tabla 1-3 Características pretratamientos biomasa lignocelulósica.....	12
Tabla 2-1 Principales características de los hongos de podredumbre blanca. Fuente: (Martinez et al., 2005).....	22
Tabla 2-2 Composición de los suplementos de cultivo .....	27
Tabla 2-3 Pérdida de peso durante el tratamiento biológico (%). Valores son el promedio de las replicas y la desviación estándar .....	30
Tabla 2-4 Características de materiales pretratados biológicamente por hongos de la podredumbre blanca.....	34
Tabla 2-5 Valores de los parámetros del modelo de Weibull constante cinética (a) y el factor de forma (b), y la fracción de lignina degradada L(t), (t=3 y t=4). De corresponde a la desviación estándar .....	37
Tabla 2-6 Valores de p, resultado del análisis de varianza de (a), (b), L(3) y L(4) .....	38
Tabla 2-7 Valores de los parámetros (a) y (b) del modelo de Weibull correspondientes a la biodegradación de los polisacáridos celulosa y hemicelulosa.....	41
Tabla 2-8 Valores de p, resultado del análisis de varianza de (a), (b), C(3) y C(4) para celulosa y (a), (b), H(3) y H(4) para hemicelulosa .....	42
Tabla 3-1 Diseño experimental, valores experimentales y codificados a) lacasas y b) lacasa-ABTS ....	60
Tabla 3-2 Resultados análisis estadístico variable de respuesta % hidrólisis enzimática (HE) (g de azúcares reductores/g de azúcares potenciales*100) de material tratado con lacasas .....	63
Tabla 3-3 Resultados de compuestos derivados de la lignina durante el tratamiento con lacasas .....	64
Tabla 3-4 Resultado análisis estadístico variable de respuesta %HE de material tratado con lacasa-ABTS.....	66
Tabla 3-5 Resultados de compuestos derivados de la lignina durante el tratamiento con lacasa-ABTS.....	68
Tabla 4-1 Condiciones experimentales temperatura, tiempo de tratamiento de explosión con vapor, experimentos de explosión con vapor .....	83
Tabla 4-2 Caracterización de materiales base .....	85
Tabla 4-3 Composición de los materiales pretratados (ND No detectable) .....	88
Tabla 4-4 Recuperación de los azúcares por combinación de pretratamientos biológicos con agua caliente .....	93
Tabla 4-5 Resultados del análisis de varianza (ANOVA) (Valores p) y coeficientes de modelo cuadrático .....	94
Tabla 4-6 Condiciones experimentales y resultados obtenidos en los puntos óptimos.....	97



Tabla 4-7 Generación de compuestos inhibidores y recuperación de azúcars hemicelulósicos durante el tratamiento de explosión con vapor .....	99
Tabla 4-8 Resultados prueba de fermentabilidad.....	103

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras latinas, para el modelo cinético de Weibull

Símbolo	Término
$(a)$	Parámetro de escala o constante de velocidad, modelo cinético de Weibull, unidades (semanas <sup>-1</sup> )
$(b)$	Factor de forma modelo cinético de Weibull
$C(t)$	Fracción de celulosa degradada en un tiempo $t$
$H(t)$	Fracción de hemicelulosa degradada en un tiempo $t$
$L(t)$	Fracción de lignina degradada en un tiempo $t$ , definida en Tabla 2.6
$r^2$	Factor de correlación

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ABTS</i>	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
<i>DRIFT</i>	Espectroscopía infrarroja de reflectancia difusa con transformada de Fourier
<i>FTIR</i>	Infrarrojo con transformada de Fourier
<i>G</i>	Unidades de guayacilo
<i>H</i>	Unidades p-hidroxifenilo

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>HAA</i>	ácido 3-hidroxiantranílico
<i>HBT</i>	1-hidroxibenzotriazol
<i>HE AR MP</i>	Azúcares reductores producidos por hidrólisis enzimática llevados a la materia prima
<i>HE</i>	Hidrólisis enzimática
<i>K</i>	Medio Kirk
<i>LMS</i>	Sistema lacasa mediador
<i>M</i>	Medio Mandels
<i>MER</i>	Medida del error relativo
<i>OY</i>	Rendimiento global de azúcares
<i>PH</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>PHK</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i> cultivado con suplemento Kirk
<i>PHM</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> cultivado con suplemento Mandels
<i>PL</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>% HE</i>	Eficiencia de la hidrólisis enzimática
<i>S</i>	Unidades siringilo
<i>SEM</i>	Microscopía electrónica de barrido
<i>SSF</i>	Hidrólisis y fermentación simultánea





## Introducción

Colombia es el quinto productor mundial de aceite de palma. Se ha proyectado para el 2020 un área sembrada de 636.000 hectáreas, para la producción principalmente de aceite de palma y de palmiste. Sin embargo durante el procesamiento y producción de estos aceites se generan grandes cantidades de biomasa, especialmente racimos vacíos o “raquis” y la fibra prensada. Esta biomasa de características lignocelulósicas es quemada en las calderas o dispuesta en campo provocando daños al ambiente. Sin embargo estos materiales pueden ser vistos como una fuente local de materias primas para su conversión a productos de mayor valor incluyendo la posibilidad de su conversión a etanol, considerando las grandes cantidades generadas. La hidrólisis de residuos agrícolas se ha considerado como una forma potencial de producir combustibles y químicos a partir de fuentes renovables, ante la fuerte disminución de combustibles fósiles.

Para lograr la conversión de los materiales lignocelulósicos a azúcares fermentables, es esencial la degradación de la celulosa y la hemicelulosa, proceso que se dificulta por la presencia de lignina y la celulosa cristalina ya que la lignina restringe el acceso enzimático y microbiológico a la celulosa y la cristalinidad restringe la velocidad de ataque sobre la celulosa. Por lo tanto es necesaria la aplicación de pretratamientos fisicoquímicos y/o biológicos para mejorar la hidrólisis enzimática especialmente de la celulosa.

Recientemente la combinación de tratamientos biológicos, químicos o fisicoquímicos se está estudiando con el fin de aumentar la eficiencia de la hidrólisis enzimática, disminuir el tiempo del tratamiento biológico, ahorrar energía, disminuir el uso de compuestos químicos y proponer procesos más limpios. Este trabajo tuvo como propósito producir azúcares fermentables a partir de racimos vacíos de palma de aceite. Para lograrlo, se evaluaron tratamientos biológicos de delignificación con hongos de podredumbre blanca y enzimáticos con lacasas, las cuales son producidas por los hongos y participan de forma natural en la

degradación de la lignina, el componente más resistente a la biodegradación de la matriz lignocelulósica. Hasta el momento sólo se ha estudiado el pretratamiento biológico posterior a tratamientos hidrotérmicos, siendo este el primer estudio en el cual se realizan de forma previa a los tratamientos con agua caliente y explosión con vapor de materiales de palma de aceite, con lo cual se obtuvieron resultados favorables, indicando que esta propuesta es una alternativa de proceso para la producción de azúcares.

El avance en el estudio de estos materiales, permiten revalorizar los desechos de la industria de palma de aceite, convirtiéndolos en materia prima para la obtención de etanol y otros productos y se generan antecedentes importantes en el desarrollo de tecnologías amigables con el medio ambiente y de bajo consumo energético para la producción de azúcares a partir de materiales lignocelulósicos derivados en las agroindustrias.

# 1. Capítulo 1. Contexto General

## 1.1 Palma de aceite

### 1.1.1 Clasificación taxonómica

<b>División:</b>	Angiospermas
<b>Clase:</b>	Monocotiledóneas
<b>Familia:</b>	<i>Arecaceae</i> .
<b>Especie:</b>	<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.

## 1.2 Industria de la palma de aceite en Colombia

Colombia es el quinto productor mundial de aceite de palma y el primero en América Latina. La palmicultura es una de las actividades agrícolas más prometedoras como eje para alcanzar el desarrollo nacional (Fedepalma, 2006). Para el 2007, en Colombia existían alrededor de 316.000 hectáreas sembradas de palma de aceite, las cuales produjeron 3'580.000 toneladas de frutos. La superficie cultivada con palma de aceite en Colombia ha crecido a una tasa anual del 10,5%, para el periodo 1999-2007 (Fedepalma, 2008). La participación promedio del valor agregado de la producción de aceite de palma en el PIB del sector agropecuario fue de 1.6% entre 1996 y 2006. En ese mismo periodo, mantuvo una tendencia creciente, con un crecimiento promedio anual del 3.5%, convirtiéndose en uno de los productos con mayor dinámica en la economía rural del país. Entre 2002 y 2006, la participación de la producción de aceite de palma en el PIB del sector agropecuario creció 21%, al pasar de 1,51% a 1,83%. Es importante destacar que la tendencia de la participación de la producción de palma de aceite en el PIB es creciente (DNP, 2007).

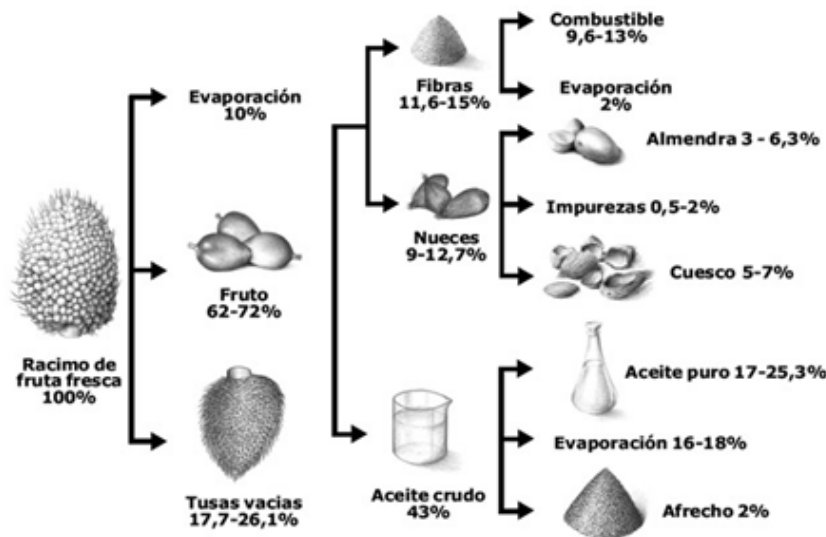
## 1.3 Subproductos lignocelulósicos derivados del proceso de extracción del aceite de palma

Durante el procesamiento y producción en 2007, se procesaron 3'581.781 toneladas de frutos de palma, se produjeron 732.745 toneladas de aceite. Se ha proyectado para el 2020 un área sembrada de 743.000 hectáreas y una producción de aceite de 3,5 millones de toneladas, con una generación de

biomasa lignocelulósica de aproximadamente 4 millones de toneladas, de las cuales 2 millones corresponden a racimos vacíos (Fedepalma, 2000). Anualmente la producción mundial de los residuos de la palma de aceite reportan cantidades de 184,6 millones de toneladas (Kelly-Yong et al., 2007). Sin embargo, estos materiales pueden ser vistos como una fuente local de materias primas para su conversión a productos de mayor valor incluyendo la posibilidad de su conversión a etanol y otros productos a partir de fuentes renovables, ante la fuerte disminución de combustibles fósiles.

En el procesamiento de palma de aceite, los frutos frescos son esterilizados con vapor en una autoclave horizontal de contacto directo, a 140°C por 50 min, la esterilización inactiva las enzimas lipolíticas que causan el desdoblamiento del aceite y afloja los frutos. Los frutos son alimentados a un tambor rotatorio (desfrutador) en el cual se desprenden los frutos y se generan los racimos vacíos, tusas vacías o raquis (17,7-26,1% de la carga inicial). Posteriormente los frutos se transportan a los digestores ó cilindros verticales provistos de agitación a baja revolución donde se adiciona agua a 80°C; allí se liberan las nueces para la extracción del aceite de palmiste y la masa de los frutos pasa al proceso mecánico de prensado. La masa que resulta de la prensa se llama fibra prensada y constituye otro residuo lignocelulósico (11,6-15% de la carga inicial). Luego el aceite pasa al proceso de decantación y clarificación. En la Figura 1-1 se encuentra el balance de masa del proceso (García & Pedraza, 1997).

**Figura 1-1** Balance de masa procesamiento de frutos de palma de aceite (García & Pedraza, 1997)



Los racimos vacíos son generalmente descartados en aéreas abiertas o eliminados en quemas a cielo abierto, lo que genera contaminación (Yusoff, 2006). En otros casos, las fibras y los cuescos son usados como fuente de energía mediante combustión (Yusoff, 2006); sin embargo, el uso de los racimos vacíos como combustible tiene una baja eficiencia energética, teniendo en cuenta la humedad



con la que salen del proceso. En la Tabla 1-1 se presentan los datos de cantidad generada por hectárea por año y composición de residuos de palma de aceite.

**Tabla 1-1** Residuos generados en el proceso de explotación de la palma de aceite, con base en (Saka, 2005; Singh et al., 1999; Yang et al., 2006)

Tipo de residuo	Cantidad generada anualmente (t ha <sup>-1</sup> a <sup>-1</sup> )	Composición (%)				
		Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Extractivos	Cenizas
Racimos de fruta vacíos	4,42	38,3	35,2	22,1	2,7	1,6
Cuescos de palma	1,1	20,8	22,7	50,7	4,8	1
Troncos de palma	2,515	34,5	31,8	25,7	3,7	4,3
Follaje	10,88	30,4	40,4	21,7	1,7	5,8
Fibras de mesocarpio	2,71	33,9	26,1	27,7	6,9	3,5
Total	21,625					

En cuanto a su composición de carbohidratos, en los racimos vacíos se ha encontrado que las mayores azúcares que lo componen son xilosa, glucosa y arabinosa (Sun et al., 1999). Algunos estudios reportan que contiene 0,69 g de azúcares fermentables/g de material seco para los racimos vacíos, mientras que para la fibra el valor es de 0,42, valores prometedores para la producción de etanol (Bio-Biocentrum-DTU, 2006). En la Tabla 1-2, se encuentran numerosos reportes relacionados con la composición de los racimos vacíos de palma de aceite.

**Tabla 1-2** Composición de los racimos vacíos de palma de aceite

Compuesto	(Saka, 2005), (Yang et al., 2006)	(Umikalsom et al., 1997) (Saletes et al., 2004)	(Loboguerrero, 2007)	(Piarpuzan et al., 2011)	(Abdul et al., 2002)	(Lu et al., 2010)
Extractivos	2,7	-	-	-	-	10,2
Lignina	22,1	-	4,15	22,28	20,39	14,2
Celulosa	38,3	-	46,77	39,33	44,19	42,0
Hemicelulosa	35,2	-	17,92	36,58	33,5	30,1
Cenizas	1,6	-	-	1,8	1,91	2,8
Otros	-	-	-	-	-	-
Carbono	-	48,79	-	-	-	-
Nitrógeno	-	0	-	-	-	-
Hidrógeno	-	7,33	-	-	-	-
Azufre	-	0,68	-	-	-	-

Oxígeno	-	36,3	-	-	-	-
Poder calorífico (MJ kg <sup>-1</sup> )	-	18,96	-	-	-	-

## 1.4 Aprovechamiento de residuos de palma de aceite

Generalmente los racimos vacíos se dejan bajo los árboles hasta su descomposición, atrayendo insectos perjudiciales y ocasionando problemas ambientales. Por esta razón las industrias prefieren secarlos y luego quemarlos hasta cenizas generando partículas y gases (SO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CO y NO<sub>x</sub>) que causan contaminación en el aire (Prasertsan & Prasertsan, 1996).

Estudios han encontrado que el cultivo de hongos comestibles usando racimos vacíos como materia prima puede ser una alternativa de aprovechamiento (Cordoba & Piñeros, 2006; Daud et al., 2001; Tabi et al., 2008). Además el residuo obtenido después del cultivo puede ser descompuesto para producir fertilizantes orgánicos (Prasertsan & Prasertsan, 1996).

Las fibras de densidad media de los racimos vacíos también pueden ser utilizadas para fabricar tablas, bloques de construcción y tejas (Prasertsan & Prasertsan, 1996). Los residuos de palma de aceite contienen compuestos furfúricos, los cuales poseen actividad bactericida, fungicida e insecticida, en una concentración potencial del 17%, razón por la cual este proceso puede ser desarrollado industrialmente (Pauli, 1999).

Algunos estudios han mostrado el potencial de estos materiales lignocelulósicos como materia prima para alimentos para animales y papel (Mansor & Ahmad, 1991). También se ha utilizado como sustrato para la producción de enzimas con actividad celulasa (Manjarres & Piñeros, 2007; Rodríguez & Piñeros, 2007; Umikalsom, 1997; Umikalsom et al., 1998) utilizando diversos microorganismos. También se encuentran reportes relacionados con la producción de xilosa a partir de residuos de palma (Rahman et al., 2006; Rahman et al., 2007).

## 1.5 Estructura de los materiales lignocelulósicos

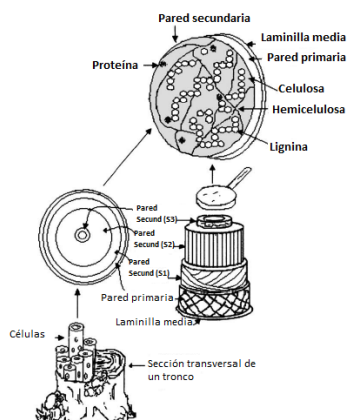
La lignocelulosa es el material más abundante dentro de las biomásas y comprende aproximadamente la mitad de la materia producida por fotosíntesis y representa la más abundante fuente orgánica renovable (Sánchez, 2009). Los materiales lignocelulósicos son una fuente renovable de materias primas que puede ser usada para la producción de biomoléculas y otros químicos (Ghosh & Singh,

1993). Sin embargo, su aprovechamiento se ve limitado debido a que sus componentes (celulosa, hemicelulosa y lignina) se encuentran fuertemente asociados y químicamente unidos por fuerzas no covalentes y por enlaces covalentes (Pérez et al., 2002), lo que los hace resistentes a la degradación por microorganismos y la hidrólisis enzimática. La composición de estos polímeros varía entre especies de plantas y varía con la edad, etapa de crecimiento y otras condiciones (Jeffries, 1994).

Una de las alternativas más prometedoras para su aprovechamiento sería la hidrólisis de la celulosa en ellos contenida para la obtención de azúcares que posteriormente, por fermentación, conducen a productos utilizables como combustibles o como materias primas de interés industrial, sin competir con la producción de alimentos.

En la Figura 1-2, se encuentra un diagrama de la configuración de los materiales lignocelulósicos. Las paredes celulares de las células vegetales contienen tres tipos de capas: Lámina media, es la primera formada durante la división celular, compuesta principalmente por pectina. La pared primaria, formada después de la lámina media, compuesta por un esqueleto de microfibrillas de celulosa incorporados en un gel de compuestos pépticos y hemicelulosa. La pared secundaria es rígida, compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina. La lignina junto con las hemicelulosas forman una matriz amorfa en la que las fibras de celulosa se incrustan y protegen contra la biodegradación (Fengel & Wegener, 1989) (Figura 1-2).

**Figura 1-2** Configuración de las células de la madera. Adaptado de Sánchez, 2009.

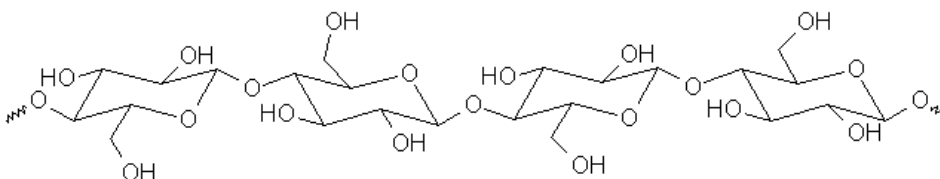


### 1.5.1 Celulosa

La celulosa, es el mayor componente de la madera, es un homopolímero lineal compuesto por más de 14.000 unidades de glucopiranososa anhidra (D-Glucosa). Sin embargo algunos estudios indican que la celobiosa (4-O-β-D-glucopiranosilo-β-D-glucopiranososa) es la unidad estructural de la celulosa (Fengel

& Wegener, 1989). Las cadenas largas de moléculas de D-glucosa están unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos. Cuando la molécula de celulosa está completamente extendida y toma forma de cinta aplanada, con los grupos -OH sobresaliendo lateralmente, se forman puentes de hidrógeno inter e intramoleculares, formando estructuras cristalinas (microfibrillas) de alta resistencia mecánica y estabilidad química, cubiertas por la lignina y hemicelulosa lo que afecta su biodegradación. La celulosa puede aparecer también en cadenas no organizadas llamadas celulosa amorfa, más susceptible a la degradación enzimática (Pérez et al., 2002). En la Figura 1-3, se encuentra la estructura de la celulosa, la cual representa cerca del 50% de los materiales lignocelulósicos.

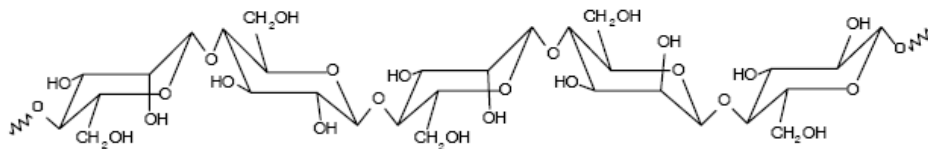
**Figura 1-3** Estructura de la celulosa



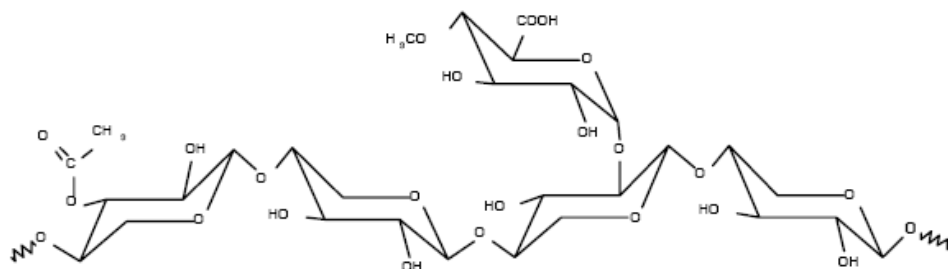
## 1.5.2 Hemicelulosas

La hemicelulosa (poliosas) tiene un grado intermedio de complejidad, y posee un menor peso molecular que la celulosa. Constituye de un 20-30% de la matriz lignocelulósica. Sus constituyentes son D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, y ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico and D-glucurónico, generalmente en cadenas ramificadas. Los azúcares están unidos por enlace  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por  $\beta$ -1,3 glucosídicos (Pérez et al., 2002). Sirve de unión entre la lignina y la celulosa y es un polímero amorfo. Las características de las hemicelulosas definen a los materiales lignocelulósicos como maderas blandas o maderas duras. Típicamente las hemicelulosas de maderas blandas son glucomananos (Figura 1-4) mientras que en maderas duras predominan glucuronoxilanos (Figura 1-5) con porcentajes variables de galactosa, arabinosa, ramnosa y unidades de ácido metilglucurónico y grupos acetilo (Martínez et al., 2005).

**Figura 1-4** Estructura de los glucomananos



**Figura 1-5** Estructura del glucuronoxilanos



### 1.5.3 Lignina

La lignina es una construcción tridimensional, un heteropolímero amorfo, no soluble en agua y ópticamente inactivo conformada por unidades fenilpropano dimetoxiladas (siringilo, S), monometoxiladas (guayacilo, G) y no metoxiladas (p-hidroxifenilo, H), derivadas de su correspondiente alcohol p-hidroxicinámico (Martinez et al., 2005) (Figura 1-6). La estructura heterogénea de la lignina está conformada por enlaces éster C-C y éter C-O-C, de alta resistencia a la acción hidrolítica de ácidos y bases (Van Soest et al., 1985), con estructuras predominantes aril-glicerol y  $\beta$ -arileter (Sánchez, 2009) (Figura 1-7). La relación H:G:S varía entre diferentes grupos de plantas vasculares, las gimnospermas (maderas blandas) tienen un alto contenido de lignina compuesta de forma mayoritaria por unidades G, mientras las angiospermas (maderas duras) consisten de unidades S y G (Pérez et al., 2002).

**Figura 1-6** Monómeros de la lignina y sus correspondientes unidades en la lignina

Alcoholes

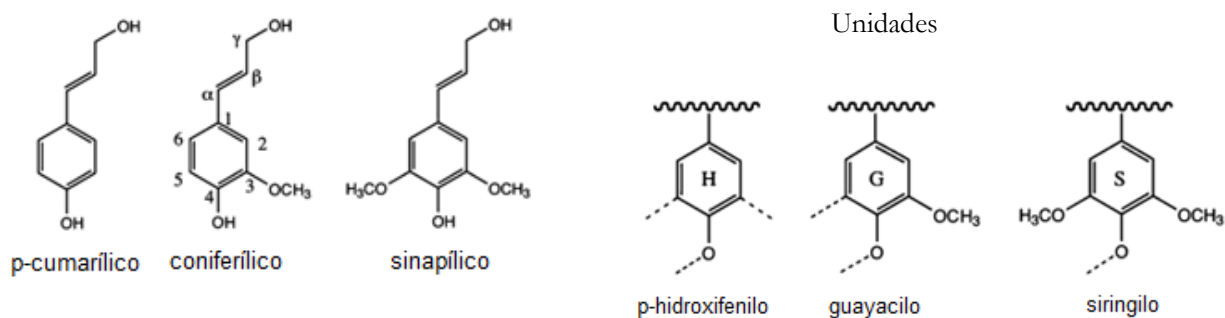
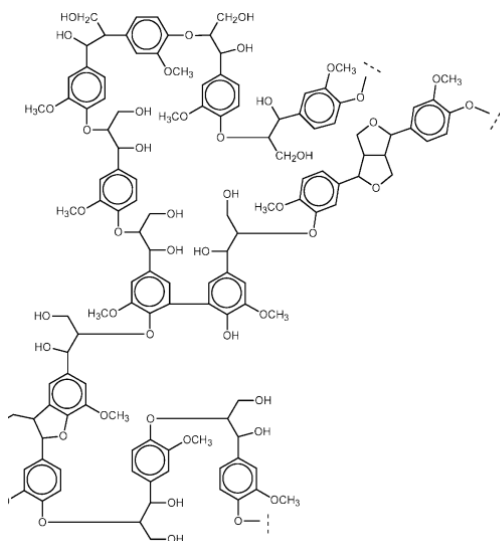


Figura 1-7 Estructura de la lignina (Pérez et al., 2002).



## 1.6 Producción de azúcares fermentables a partir de materiales lignocelulósicos

El proceso para convertir materiales lignocelulósicos a azúcares fermentables consiste en tres etapas: a) pretratamiento previo para que los materiales sean más disponibles para la hidrólisis enzimática b) hidrólisis enzimática o química para romper las moléculas de celulosa y hemicelulosa y c) evaluación de la fermentabilidad de los azúcares. Se ha estimado un valor de 6 para la relación salida/entrada de energía en el caso de la producción de etanol a partir de biomasa (Berg & Licht, 2004), lo cual hace a esta materia prima muy atractiva, en especial en países que no cuentan con la facilidad de producir grandes cantidades de caña de azúcar. El principal reto en la producción de etanol a partir de biomasa

lignocelulósica es el pretratamiento debido a la complejidad de la matriz lignocelulósica. El pretratamiento tiene como objetivo desintegrar esta matriz de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumente la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático. Adicionalmente, la mayor parte de la hemicelulosa se hidroliza durante el pretratamiento y la lignina se libera o puede incluso descomponerse. En una etapa posterior, la celulosa obtenida es sometida a hidrólisis enzimática con celulasas exógenas, lo cual hace que se obtenga una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa, así como pentosas resultantes de la hidrólisis de la hemicelulosa. Estos azúcares son posteriormente convertidos en etanol mediante microorganismos que pueden utilizar uno o varios de los azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado e hidrolizado (Sánchez & Cardona, 2005).

### 1.6.1 Pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica

Un gran número de métodos de pretratamiento han sido investigados sobre una amplia variedad de diferentes tipos de materias primas (Carvalho et al., 2008; Hendriks & Zeeman, 2009; Taherzadeh & Karimi, 2008; Yang & Wyman, 2008). Además de ser considerado un paso crucial en la conversión biológica a etanol, el pretratamiento de la biomasa constituye uno de los principales costos económicos en el proceso. De hecho, ha sido descrito como la segunda unidad más costosa en la conversión de la lignocelulosa a etanol, después de las materias primas para la hidrólisis enzimática (Mosier et al., 2005b).

Considerando que los materiales lignocelulósicos poseen diferentes características físico-químicas, es necesario adoptar tecnologías pertinentes de acuerdo a las propiedades de cada materia prima. La efectividad del pretratamiento está asociada con la digestibilidad de la celulosa, generación de compuestos tóxicos inhibitorios para las levaduras, requerimientos de energía, recuperación de pentosas, entre otros (Galbe & Zacchi, 2007; Sun & Cheng, 2002). Algunos factores claves reportados para un pretratamiento efectivo son (Yang & Wyman, 2008):

- a) Pretratamientos flexibles de acuerdo a las características de la biomasa.
- b) Alta digestibilidad del sólido pretratado (>90%), con bajas cargas enzimáticas baja (10 FPU/g de celulosa).
- c) Mínima degradación de azúcares, máxima recuperación de azúcares celulósicos y hemicelulósicos.
- d) Mínima cantidad de compuestos tóxicos, lo cual depende de la materia prima y de la severidad del pretratamiento.

- e) No necesario reducción de tamaño, ya que estas operaciones son intensivas en uso de energía y requieren tecnologías costosas.
- f) Operación en tamaños razonables y costo de reactores moderados
- g) No producción de residuos sólidos o residuos de fácil disposición.
- h) Obtención de altas concentraciones de azúcares (>10%), para asegurar una adecuada concentración de etanol y mantener costos adecuados en la recuperación.
- i) Recuperación de la lignina, la cual puede ser utilizada para su conversión a productos de mayor valor agregado.
- j) Mínimos requerimientos de calor y energía.

- **Tecnologías de pretratamientos para la biomasa lignocelulósica**

No existen procesos de pretratamiento universales, debido a la diversa naturaleza de las diferentes materias primas, por lo que han propuesto muchas tecnologías. Estos pretratamientos se pueden clasificar en biológicos, físicos, químicos y fisicoquímicos, de acuerdo con las diferentes fuerzas o energías consumidas en el proceso del pre-tratamiento. También se han estudiado la combinación de estos métodos. En la Tabla 1-3, se encuentran las principales características de estos tratamientos.

**Tabla 1-3** Características pretratamientos biomasa lignocelulósica

<b>Pretratamientos biológicos</b>
La degradación de la lignina con hongos de la podredumbre blanca, es el pre-tratamiento biológico más efectivo sobre los materiales lignocelulósicos, ya que ocurre a través de la acción de las enzimas degradadoras de la lignina tales como peroxidasa y lacasa (Kumar et al., 2009b). Varios hongos de la podredumbre blanca, como el <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Ceriporia lacerata</i> , <i>Cyathus stercoreus</i> , <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> , <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> han sido examinados sobre diferentes biomasa lignocelulósicas mostrando una alta eficiencia en la deslignificación (Kumar et al., 2009b; Shi et al., 2008). En general, tales procesos ofrecen ventajas tales como bajo costo de capital, bajo consumo de energía, no requiere químicos y presenta condiciones ambientalmente suaves. Sin embargo, el principal inconveniente para desarrollar los métodos biológicos son las bajas tasas de hidrólisis obtenidas en la mayoría de los materiales biológicos comparados con otras tecnologías (Sun & Cheng, 2002).
<b>Pretratamientos fisicoquímicos</b>



<p>Esta categoría incluye la mayoría de las tecnologías de pretratamiento, tales como pretratamiento con vapor (o explosión con vapor), agua caliente, oxidación húmeda, fibra de amoníaco/explosión congelada, percolación de reciclaje de amoníaco, amoníaco acuoso y organosolventes. Recientemente se han propuesto el uso de líquidos iónicos y el fraccionamiento de la celulosa basado usando solventes (Zhu et al., 2006; Zhu et al., 2009). Estas formas de pretratamiento exploraran el uso de las condiciones y componentes que afectan las propiedades físicas y químicas de la biomasa.</p>	
<p>Explosión con vapor</p>	<p>En la explosión con vapor la biomasa es usualmente tratada con vapor saturado a alta presión de unos 160-240° C y presiones entre 0,7 a 4,8 MPa. La presión se mantiene durante unos segundos para promover la hidrólisis y liberación de la hemicelulosa, logrando un sólido más fácil de hidrolizar. El pretratamiento con vapor (SP) puede ser mejorado efectivamente por la adición de catalizadores como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> o SO<sub>2</sub>, con lo cual se incrementa la recuperación de los azúcares hemicelulósicos, disminuyendo la producción de compuestos inhibitorios y mejorando la hidrólisis enzimática sobre el residuo sólido (Mosier et al., 2005b; Sun &amp; Cheng, 2002). La SP presenta ventajas debidas al uso limitado de químicos, no hay una dilución excesiva de los azúcares resultantes, y el consumo bajo de energía. Como desventajas están la completa destrucción de la matriz lignina-carbohidratos, con el riesgo de la condensación y precipitación de los componentes de la lignina soluble haciendo que la biomasa sea menos digerible, la destrucción de una fracción de los xilanos en la hemicelulosa y la posible generación de inhibidores de fermentación a altas temperaturas.</p>
<p>Agua caliente</p>	<p>Solvólisis, hidrotermólisis, fraccionamiento acuoso y acuosolvente son todos los términos que han sido usados para describir el uso del agua caliente (LHW) para el pre-tratamiento de la biomasa. El pre-tratamiento con agua caliente es similar al SP pero usa agua en estado líquido a elevadas temperaturas en vez de vapor. El pre-tratamiento con agua caliente logra resultados hidrolizando la hemicelulosa y removiendo la lignina, haciendo que la celulosa de la biomasa sea más accesible mientras que evita la formación de los inhibidores de fermentación lo que ocurre a altas temperaturas (Yang &amp; Wyman, 2004). La mayor ventaja del agua caliente son las bajas temperaturas usadas, la minimización de la formación de los productos de degradación. Esto elimina la necesidad de una etapa final de lavado o neutralización ya que el solvente usado en el pre-tratamiento es agua. El bajo costo del solvente es otra ventaja para la aplicación de este proceso a gran escala.</p>

	Dentro de las desventajas que encuentra que la cantidad de biomasa solubilizada es alta, mientras la concentración de estos productos es baja comparada con el SP (Bobleter, 1994). Los procesos de recuperación demandan una gran cantidad de energía debido a los grandes volúmenes de agua involucrados.
<b>Pretratamientos químicos</b>	
Otros tratamientos incluyen NaOH, dióxido de azufre, agua amoniacal, hidróxido de calcio+carbonato de calcio, ácido fosfórico, peróxido de hidrógeno alcalino, sales inorgánicas con propiedades ácidas, sales de amonio, ácidos de Lewis y ácidos orgánicos anhidros, ácido acético, ácido fórmico, ácido sulfúrico, n-butilamina, n-propilamina y alcoholes (metanol, etanol o butanol) en presencia de un catalizador ácido o alcalino (Ramos, 2003).	
Oxidación húmeda	La oxidación húmeda, consiste en exponer los materiales a agua caliente en presencia de oxígeno a temperaturas superiores a 120°C. Ocurren dos reacciones: a temperatura baja la reacción hidrolítica y a temperatura alta la oxidativa (Martin et al., 2007). Este tratamiento se ha combinado con álcalis disminuyendo la producción de inhibidores (Martin et al., 2007), sin embargo sus costos son elevados (Bjerre et al., 1997).
Ozononólisis	El uso de ozono, tiene como propósito eliminar la lignina, no produce inhibidores, temperaturas y presiones bajas pero altos costos. Ha sido efectivo en materiales como paja de trigo, bagazo, pino, algodón y aserrín de chopo (Vidal & Molinier, 1988).
Organosolventes	En el tratamiento con organosolventes, se emplea una mezcla de solventes orgánicos o acuosos junto con un catalizador ácido (clorhídrico o sulfúrico) para romper los enlaces internos de la lignina y la hemicelulosa. Algunos solventes utilizados son metanol, etanol, acetona y etilenglicol (Oliva, 2003) y ácidos orgánicos como el ácido oxálico, acetilsalicílico y salicílico. En este proceso la lignina se separa de la celulosa, favoreciendo su posterior hidrólisis. Algunos estudios sugieren la desintoxicación de los hidrolizados para asegurar su fermentabilidad (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000).

## 1.6.2 Compuestos inhibidores de la fermentación producidos en los pretratamientos

Como consecuencia de las altas temperaturas empleadas en los pretratamientos, los azúcares originados en la hidrólisis, principalmente de la hemicelulosa, se degradan originando dos compuestos derivados del furano: el furfural, formado a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). Además se originan ácido alifáticos (fórmico y levulínico) y ácido acético procedente de la hidrólisis de los restos acetilos de la hemicelulosa (Larsson et al., 2000).

Durante el pretratamiento, una parte de la lignina también se degrada originando una gran variedad de compuestos fenólicos (Larsson et al., 2000), los cuales incluyen ácido 4-hidroxibenzoico, el siringaldehído y el ácido siríngico, 4-hidroxibenzaldehído y los ácidos gentísico, salicílico y protocatéquico. Otros derivados fenólicos identificados tanto en maderas blandas como en maderas duras han sido la vainillina y el ácido vainílico (Oliva, 2003). También se pueden liberar ácidos grasos, terpenoides, esteroides y ceras, flavonoides, taninos, etc. (Ekman & Holmbom, 2000) que a pesar de su baja concentración, también pueden actuar como inhibidores de los microorganismos empleados en la fermentación de los hidrolizados procedentes de materiales lignocelulósicos.

Los compuestos tóxicos pueden producir estrés fermentativo en los microorganismos, disminuyendo la eficiencia en la utilización de los azúcares. Compuestos como el furfural y el hidroximetil furfural pueden inhibir y afectar la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de biomasa/ATP, los compuestos fenólicos, causan pérdida de la integridad de la membrana celular, afectando su habilidad de asimilar azúcares y por lo tanto el crecimiento celular. Otros compuestos como el ácido acético, a pH bajo está disociado, es liposoluble y se difunde a través de la membrana plasmática, afectando el pH interno y dañando la célula (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000). Se han planteado algunas estrategias para minimizar la presencia de inhibidores dentro de los cuales se encuentra evitar la formación de éstos durante la hidrólisis, desintoxicar los hidrolizados, desarrollar microorganismos tolerantes a los inhibidores y convertir los inhibidores en compuestos que no interfieran con el metabolismo celular (Taherzadeh et al., 2000).

## 1.6.3 Hidrólisis de lignocelulósico

- **Hidrólisis ácida**

Los procesos de obtención de azúcares fermentables a partir de biomasa lignocelulósica que utilizan catalizadores ácidos permiten, en condiciones adecuadas de presión y temperatura, una solubilización de la hemicelulosa y la celulosa, quedando prácticamente inalterada la lignina. A temperaturas superiores a los 200°C aparecen productos de descomposición de los azúcares, inhibidores de la fermentación. Los métodos industriales de hidrólisis ácida, utilizan ácidos concentrados y bajas temperaturas ó ácidos diluidos a temperaturas más altas. En los procesos que utilizan ácidos concentrados (ácido sulfúrico al 72% (p/v) o ácido clorhídrico al 41% (p/v)) a baja temperatura, se obtienen altos rendimientos de hidrólisis mayores al 90% (Parisi, 1989). Actualmente los procesos que utilizan ácidos concentrados han adquirido un renovado interés debido a nuevos métodos que mejoran la economía de recuperación de los ácidos desarrollados (Galbe & Zacchi, 2002).

Los procesos que utilizan ácidos diluidos son menos costosos, pero son necesarias altas temperaturas para alcanzar rendimientos aceptables de conversión de celulosa a glucosa. Uno de los inconvenientes es que a mayor temperatura son mayores los problemas de corrosión y aumenta la tasa de degradación de los azúcares hemicelulósicos los cuales pueden afectar a la posterior etapa de fermentación. Se han realizado estudios relacionados con la hidrólisis ácida diluida (ácido fluorhídrico, sulfúrico, nítrico, clorhídrico, sulfuroso, clorhídrico, fosfórico, nítrico y fórmico (Galbe & Zacchi, 2002).

- **Hidrólisis enzimática**

Los problemas mencionados en los procesos ácidos se evitan si se utiliza en el proceso hidrólisis enzimática. Este proceso ha sido más satisfactorio ya que las enzimas son altamente específicas (Word y García, 1990). Sin embargo, una hidrólisis enzimática efectiva depende del pretratamiento (Ghosh & Singh, 1993; Higuchi, 1990).

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un complejo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, compuesto por diferentes enzimas que actúan de forma sinérgica (Montenecourt & Eveleigh, 1979). La endoglucanasa actúa al azar en el interior del polímero, hidrolizando enlaces  $\beta$ -(1,4) y generando nuevos finales de cadena no reductores. Puede actuar sobre celulosa amorfa, pero no actúa ni sobre celulosa cristalina ni sobre celobiosa. La celobiohidrolasa actúa sobre los extremos no reductores de la cadena generados por la endoglucanasa, liberando moléculas de celobiosa. Este enzima tiene actividad sobre celulosa cristalina y amorfa, pero no actúa sobre derivados sustituidos ni sobre celobiosa. Este enzima constituye del 50-80% del complejo celulolítico. La

glucohidrolasa se encuentra en pequeña proporción y actúa sobre los extremos no reductores liberando unidades de glucosa. Tiene actividad sobre celulosa amorfa, celo-oligosacáridos y CMC. La  $\beta$ -glucosidasa hidroliza celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño, y es absolutamente necesaria para evitar la fuerte inhibición que causa la celobiosa sobre las endo y exoglucanasas (Oliva, 2003).

Los factores principales que afectan la hidrólisis enzimática de los lignocelulósicos pueden ser divididos en dos grupos: factores relacionados con las enzimas y los relacionados con el sustrato. Dentro de éstos últimos se encuentran:

- a) La cristalinidad de la celulosa (Chang & Holtzaple, 2000).
- a) El grado de polimerización de la celulosa (Puri, 1984).
- b) El contenido y distribución de la lignina ya que dificulta el acceso de las enzimas a la celulosa (Mansfield et al., 1999), lo que reduce la eficiencia de la hidrólisis.
- c) Contenido de hemicelulosa, ya que su eliminación aumenta el tamaño medio de los poros del sustrato y por lo tanto aumenta la accesibilidad y la probabilidad de que la celulosa sea hidrolizada (Chandra et al., 2007).
- d) Tamaño de partícula de la materia prima, ya que está relacionada con el área superficial disponible en el material (Sun & Cheng, 2002).
- e) La porosidad es el principal factor que limita la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica (Chandra et al., 2007).

#### **1.6.4 Aspectos económicos aprovechamiento biomasa lignocelulósica**

La producción de azúcares a partir de materiales lignocelulósicos, comprende aspectos económicos dentro de los cuales se encuentran los costos de producción y recolección de la materia prima, su transporte, costos de tratamiento, entre otros para lograr finalmente un valor agregado a estos materiales (Hamelinck et al., 2003).

El etanol es uno de los más prometedores biocombustibles, derivado de cualquier material que contenga azúcares simples o complejos. La producción de etanol a nivel industrial se ha producido a partir de caña de azúcar y de productos amiláceos (maíz, trigo, papa). Sin embargo, la materia prima más prometedora está representada por la lignocelulosa, ya que la celulosa es el biopolímero más abundante sobre la tierra y está localmente disponible (Hamelinck et al., 2005)

Algunos estudios reportan que el precio de producción de etanol en USA es de U\$S 0,29/l (Fulton & Hodges, 2004), en Brasil U\$S 0,14 a 0,20/l y menor al de Australia (U\$S 0,27/l) (NAE, 2005). Si bien en Colombia no se produce etanol con origen en materiales lignocelulósicos, el costo estimado actual del mismo en Estados Unidos es de U\$S 0,34/l utilizando el método de hidrólisis ácida y la lignina como fuente de energía para el proceso (Graf & Koehler, 2000).

En general se espera que el costo para la producción de etanol a partir de fuentes lignocelulósicas, tenga fuertes reducciones a partir de los desarrollos biotecnológicos en proceso de implementación, con los que se espera mejorar tanto el rendimiento final de producción como la velocidad del proceso (Patrouilleau et al., 2007), relacionado especialmente con la producción de las enzimas y microorganismos eficientes en la conversión de los azúcares derivados de materiales lignocelulósicos. Se espera que para el 2020 el costo del etanol lignocelulósico sea de U\$S 0,18/litro.

## 1.7 Antecedentes hidrólisis de residuos de palma

En Malasia, se ensayaron diferentes métodos físicos y químicos para deslignificar los racimos vacíos de palma de aceite para ser usados como sustratos en la producción de celulasas con *Chaetomium globosum*, encontrando como máximo un 55% de deslignificación usando un pretratamiento químico con HNO<sub>3</sub> (Umikalsom et al, 1997). La hidrólisis ácida se aplicó sobre residuos de palma, para la obtención de xilosa y su conversión a xilitol, un edulcorante importante en la dieta de personas diabéticas (Rahman et al., 2006; Rahman et al., 2007). Mediante la aplicación de tratamientos químicos se alcanzó un 80% de eficiencia en la hidrólisis enzimática de residuos de palma (Umikalsom et al., 1998). También se ha evaluado el tratamiento de oxidación húmeda y su posterior hidrólisis alcanzando porcentajes del 84% y 96% en la obtención de glucosa y xilosa respectivamente (Bic-Biocentrum-DTU, 2006). La producción de etanol a partir de residuos pretratados químicamente (NaOH y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) también se evaluó (Cheng et al., 2007), alcanzando un rendimiento del 13,8%. También se han realizado estudios para la producción de celulosa mediante digestión con etanol en presencia de catalizadores ácidos y alcalinos (Aziz et al., 2002). Se ha estudiado el efecto de la irradiación gama sobre la digestión enzimática de los racimos vacíos de palma, en combinación con tratamiento alcalino, logrando mejores resultados, produciendo de forma mayoritaria xilosa y glucosa (Matsuhashi et al., 1995).



## 2. Capítulo 2. Aplicación de tratamientos de deslignificación biológica con hongos de la podredumbre blanca

### 2.1 Introducción

Los materiales lignocelulósicos, son la principal fuente de materiales renovables sobre la tierra, por lo que se han estudiado los procesos presentes en la naturaleza para lograr su biodegradación, tomando como base los procesos enzimáticos que actúan sobre la celulosa, hemicelulosa y lignina (Pérez et al., 2002), por lo que la degradación biológica de las paredes celulares se ha convertido en un importante tópico de investigación con el especialmente en procesos para la producción de bioenergía y bioproductos (Singh & Chen, 2008). Las mayores limitaciones de los materiales lignocelulósicos son la alta resistencia a la degradación para convertirlos en azúcares fermentables (Wyman et al., 2005) y la recalcitrancia dada por la fuerte asociación de los polímeros lignina, celulosa, y hemicelulosa. Por lo tanto el primer paso para la utilización de la biomasa es el pretratamiento el cual tiene como objetivo remover la lignina o la hemicelulosa de tal forma que el polímero de celulosa quede expuesto al ataque enzimático y se pueda producir glucosa (Singh & Chen, 2008).

#### 2.1.1 Biodegradación de lignocelulósicos

En la naturaleza, los materiales lignocelulósicos son degradados por una variedad de microorganismos que producen una batería de enzimas que trabajan de forma sinérgica, siendo los hongos basidiomicetos de la podredumbre blanca capaces de degradar la lignina de forma eficiente, logrando la solubilización (formación de fragmentos solubles en agua) y mineralización (transformación a CO<sub>2</sub>) de ligninas naturales y sintéticas. Aunque algunos hongos de podredumbre blanca atacan de forma preferencial la lignina, logrando un sólido enriquecido en celulosa, otros presentan un patrón de descomposición simultánea de todos los componentes de la pared celular. Los hongos considerados como promisorios en el proceso de biodegradación de la lignina son *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phellinus pini*, *Phlebia spp.*, y *Pleurotus spp.* (Wong, 2009). Los hongos de la podredumbre blanca se han aislado predominantemente de las angiospermas, ya que tienen afinidad por este tipo de materiales. En la



industria del papel se han usado hongos de podredumbre blanca para la deslignificación, (Pérez et al., 2002) ya que se considera una tecnología amigable con el medio ambiente.

La habilidad de los hongos para degradar materiales lignocelulósicos se debe a su sistema enzimático altamente eficiente. Los hongos poseen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: un sistema hidrolítico, es decir producen hidrolasas que son responsables de la degradación de los polisacáridos y un único sistema oxidativo y extracelular lignolítico, el cual degrada lignina y abre los anillos fenólicos (Sánchez, 2009).

Entre los hongos de podredumbre blanca estudiados se destacan *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* (Shi, 2007; Taniguchi et al., 2005; Zhang et al., 2007b) que degradan selectivamente la lignina.

### 2.1.2 Biodegradación de la lignina

La lignina está presente en la pared celular y confiere soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano y estrés oxidativo, es altamente resistente a la degradación química y biológica y es la responsable de la resistencia mecánica de la madera. Su mayor concentración se encuentra en la lámina media, donde actúa como agente cementante entre fibras de madera; sin embargo también está presente en la capa secundaria de la pared celular, conformando junto a la hemicelulosa, una matriz amorfa de en la que las fibras de celulosa, se protegen de la biodegradación (Fengel & Wegener, 1984). En general la comprensión de las modificaciones de la lignina o su eliminación durante el tratamiento previo es esencial para desarrollar tecnologías de pretratamiento para reducir el impacto de la recalcitrancia de la lignina a la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa (Singh et al., 2011).

La lignina es un polímero de unidades fenilpropano conectadas por diferentes enlaces C-C y C-O-C, su descomposición es muy difícil (Singh & Chen, 2008); su biodegradación depende del tipo de material, es decir su concentración y tipo de lignina. Por ejemplo las maderas blandas contienen mayoritariamente lignina tipo guayacilo (G) mientras las maderas duras contienen glucoronoxilanos y unidades guayacilo-siringilo (GS) (Sjöström, 1993). La madera de las gimnospermas tiene una mayor concentración de lignina (unidades guayacilo) que la madera de las angiospermas (unidades siringilo y guayacilo). Algunos estudios han encontrado que a nivel de laboratorio el hongo *P. chrysosporium* es capaz de degradar más rápidamente lignina siringilo que guayacilo, por lo que podría degradar angiospermas de forma más eficiente (Faix et al., 1985).

Además de la lignina, los hongos de podredumbre blanca son capaces de degradar contaminantes como aromáticos clorinados, hidrocarburos aromáticos heterocíclicos, colorantes entre otros, debido a la actividad fuertemente oxidativa y baja especificidad del sustrato de sus enzimas lignolíticas (Sánchez, 2009). En la Tabla 2-1, se presentan las principales características de los hongos de podredumbre blanca, reportadas (Martinez et al., 2005).

**Tabla 2-1** Principales características de los hongos de podredumbre blanca. Fuente: (Martinez et al., 2005)

Característica	Descripción	
Aspecto y consistencia	Apariencia blanquecina, madera de color más clara que antes de la colonización, húmeda, suave, esponjosa, pérdida de la fuerza luego de la descomposición avanzada	
Tipo de madera que coloniza	Hongos que degradan lignina, celulosa y hemicelulosa: maderas duras especialmente.	Hongos que degradan lignina de forma selectiva: maderas blandas y duras.
Constituyentes de la pared celular que degradan	Celulosa, lignina y hemicelulosa, fracturas frágiles	Ataque inicial de forma selectiva de la lignina y la hemicelulosa, posteriormente celulosa.
Características anatómicas	Pared celular atacada progresivamente a partir del lumen. Canales erosionados asociados con las hifas.	Degradación de la lignina en la lámina media y pared secundaria. La lámina media se disuelve por mecanismos de difusión (no contacto con hifas), cavidades radiales en las paredes celulares.
Hongos representativos	<i>T. versicolor</i> , <i>P. chrysosporium</i> , <i>Heterobasidium annosum</i>	<i>Ganoderma austral</i> , <i>Phlebia tremellosa</i> , <i>C. subvermispora</i> , <i>Pleurotus</i> spp. Y <i>Phellinus pini</i> .

Actualmente, la existencia de técnicas analíticas modernas ha permitido la investigación a fondo de la degradación y modificación de la lignina, así como el estudio del efecto de las diferentes enzimas oxidoreductasas involucradas en la degradación de la lignina (Martinez et al., 2005). Los hongos de podredumbre blanca producen cuatro grupos de enzimas de forma mayoritaria para degradar lignina: Lignina peroxidasa LiP (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa MnP (EC 1.11.1.13), versátil peroxidasa VP (EC 1.11.1.16) y lacasa LAC (EC1.10.3.2). El proceso aumenta con la acción de otras enzimas que incluyen las glioxal oxidasas (EC 1.2.3.5), aril alcohol oxidasas (veratril alcohol oxidasas EC 1.1.3.7),

piranosa 2-oxidasas (glucosa 1-oxidasa EC 1.1.3.4), celobiosa/quinona oxidoreductasa (EC 1.1.5.1) y celobiosa dehidrogenasa (EC 1.1.99.18) (Wong, 2009).

La lignina peroxidasa (LiP) (EC 1.11.1.14) y manganeso peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1.13) fueron descubiertas en *P. chrysosporium*, se consideran verdaderas ligninasas ya que tienen un alto potencial redox. LiP degrada unidades de lignina no fenólicas (por encima del 90% del polímero), mientras que MnP genera  $Mn^{+3}$ , el cual actúa como un oxidante de las unidades fenólicas y no fenólicas (Jensen Jr et al., 1996). Las lacasas (EC 1.10.3.2) son fenoloxidasas con bajo potencial redox que permite la oxidación directa solamente de unidades fenólicas de lignina, las cuales comprenden menos del 10% del polímero. El interés biotecnológico se incrementó con el descubrimiento de su habilidad para oxidar sustratos con alto potencial redox en presencia de mediadores sintéticos (Bourbonnais & Paice, 1990).

Recientemente la versatil peroxidasa (VP) se ha descrito en *Pleurotus* (Ruiz Dueñas et al., 1999) y combina las propiedades catalíticas de la LiP y MnP que oxidan compuestos fenólicos (Heinfling et al., 1998). Otras enzimas extracelulares involucradas en la degradación de la lignina son la oxidasas generadoras de  $H_2O_2$ , y deshidrogenasas que reducen compuestos derivados de la lignina. Dentro de este grupo se incluyen la aril-alcohol oxidasa (AAO), presente en *Pleurotus eryngii* (Guillén et al., 1992) y la glioxal oxidasa en *P. chrysosporium* (Kersten, 1990). Las aril alcohol deshidrogenasas (AAD) y quinona reductasas (QR) fúngicas también participan en la degradación de la lignina (Guillén et al., 1997). Los hongos degradadores de la madera, presentan rigidez en las hifas, que sumadas a la acción hidrolítica de las enzimas extracelulares, favorece el crecimiento invasivo de los hongos filamentosos (Gooday, 1995).

### 2.1.3 Biodegradación de celulosa y hemicelulosa

La asociación de la celulosa a otras sustancias de las plantas afecta su biodegradación (Pérez et al., 2002). Los microorganismos capaces de degradar celulosa tienen un complejo enzimático compuesto por diferentes actividades hidrolíticas que rompen los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos. Las celulasas se dividen en tres grandes grupos (Rabinovich et al., 2002): Endoglucanasas o endo-1-4- $\beta$ -glucanasas (EC 3.2.1.4), celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21). Las endoglucanasas, también son llamadas carboximetilcelulasas y se considera que inician el ataque de forma aleatoria en múltiples sitios internos de las regiones amorfas de la celulosa, abriendo sitios para el ataque de las exoglucanasas, las cuales están en mayor concentración en el complejo de celulasas y pueden hidrolizar la celulosa cristalina y remover monómeros y dímeros del final de la cadena de glucan $\beta$ . La -

glucosidasa hidroliza celobiosa y en algunos casos oligosacáridos de glucosa. Generalmente las endoglucanasas y la  $\beta$ -glucosidasa trabajan de forma sinérgica en la hidrólisis de la celulosa (Sánchez, 2009).

Considerando la mayor heterogeneidad del polímero de la hemicelulosa, se requiere un mayor número de actividades enzimáticas para degradarla. Los xilanos son los mayores carbohidratos encontrados en la hemicelulosa y por lo tanto las enzimas que más participan son las endo-1,4- $\beta$ -xilanasas ( EC 3.2 .1. 8) y la xilano 1, 4-  $\beta$ -xilosidasas (EC 3.2.1.37) (Jeffries, 1994). Además participan enzimas como las xilano esterasas, la ferúlico y p-cumárico esterasas  $\alpha$ -1-arabinofuranosidasas y las  $\alpha$ -4-O-metilglucoronosidasa, actuando sinérgicamente para hidrolizar xilanos y mananos. Para la degradación del O-acetil-4-O-metil glucoronosidasas, actúan cuatro enzimas: endo-1-4- $\beta$ -xilanasas (endoxilanasas), acetil esterasas, alfa-glucoronidasas y  $\beta$ -xilosidasa. Para O-acetilgalactoglucomananos, la enzima que inicia la ruptura son las endomananasas. Las acetil glucomananos esterasas remueven grupos acetilos y las  $\alpha$ -galactosidasas eliminan residuos de galactosa. Finalmente la  $\beta$ -manosidasas y las  $\beta$ -glucosidasas rompen el enlace  $\beta$ -1,4 oligomérico generado por las endomananasas (Pérez et al., 2002).

#### **2.1.4 Pretratamientos biológicos**

Los pretratamientos biológicos para mejorar la accesibilidad de la celulosa han llamado la atención de investigadores (Shi et al., 2009; Taniguchi et al., 2005; Yu et al., 2009; Zhang et al., 2007b) , aprovechando el potencial de la biodiversidad biológica y la capacidad de los microorganismos para alterar la pared celular de las plantas, mediante la descomposición parcial del complejo lignina-carbohidratos, lo cual se considera requisito previo para la utilización eficiente de los carbohidratos a partir lignocelulosa (Gupta et al., 2011).

El modelo de biodegradación de la lignina, se ha aplicado en el proceso de biopulpado, con lo cual se mejora las características del papel (Kirk et al., 1993). En biopulpado, se usan enzimas (xilanasas o lacasas) u hongos degradadores de lignina para depolimerizar lignina (Viikari, 2002), con el fin de aumentar el acceso a la lignina y reducir el uso de compuestos químicos de blanqueamiento con base en cloro (Eriksson, 1990).

En general, el pretratamiento biológico para la producción de azúcares fermentables, ofrece ventajas tales como bajo costo de capital, bajo consumo de energía, no requiere químicos y no genera contaminación, contrario a los tratamientos fisicoquímicos (Ward & Singh, 2002). Sin embargo, el

principal inconveniente para desarrollar los métodos biológicos son las bajas tasas de hidrólisis obtenidas en la mayoría de los materiales biológicos comparados con otras tecnologías (Sun & Cheng, 2002). También se consideran desventajas la degradación de carbohidratos y el largo tiempo de tratamiento. En este contexto, la biodegradación de la lignina es un proceso lento que puede ser considerado eficaz desde el punto de vista económico si se combina con otros métodos físicos y/o químicos. En la industria del papel se ha combinado con el pulpado termoquímico (Katar *et al.*, 1998), explosión de vapor (Sawada *et al.*, 1995), organosolventes (Itoh *et al.*, 2003), logrando un ahorro significativo de energía en la industria papelera.

Los tratamientos biológicos de degradación se realizan mayoritariamente bajo la técnica de fermentación en fase sólida (SSF) la cual reproduce el proceso natural microbiológico (Pandey *et al.*, 1999) ocurrido en compostaje y ensilaje, sólo que se hace de forma controlada. Esta técnica tiene ventajas sobre la fermentación líquida dentro de las cuales se encuentran mayores rendimientos en menores tiempos, mejor circulación de oxígeno, menor requerimiento de energía, bajo costo (Raimbault, 1998), mayores actividades enzimáticas comparadas con cultivos en fase líquida (Viniégra-González *et al.*, 2003).

La degradación de la lignina con hongos de la podredumbre blanca, es el pretratamiento biológico más efectivo sobre los materiales lignocelulósicos (Kumar *et al.*, 2009b; Lee, 1997; Sun & Cheng, 2002). Varios hongos de la podredumbre blanca, como el *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoreus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus* han sido examinados sobre diferentes biomásas lignocelulósicas mostrando una alta eficiencia en la deslignificación (Kumar *et al.*, 2009b; Shi *et al.*, 2008). Se ha reportado deslignificación selectiva de la madera y paja de trigo por hongos de la podredumbre blanca tales como *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Dichmitus squalens*, *Rigidosporus lignosus* y *Jungua separabilima*. La despolimerización de la lignina por estos hongos tarda semanas para lograr resultados significativos, sin embargo, este pretratamiento es selectivo y eficiente (Hatakka, 1994; Vares *et al.*, 1993).

### 2.1.5 Taxonomía de *Phanerochaete chrysosporium*

*Phanerochaete chrysosporium* como todos los de la podredumbre blanca pertenece al filo de los basidiomicetos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 40°C. Produce esporas asexuales y excreta enzimas para degradar la madera: lignina peroxidasas (LiP), manganeso peroxidasas (MnP), glioxal oxidasas, xilanasas, peroxidasas, celulasas, aril-alcohol deshidrogenasa y celobiosa deshidrogenasa (Singh & Chen, 2008). Estos microorganismos son capaces de degradar lignina de

forma selectiva (Kirk, 1985). Este hongo además de degradar madera, es capaz de degradar alcohol veratrílico y sus metil éster, decolorar aguas residuales de fábricas de textiles, degrada triclorofenol, pentaclorofenol, benceno, tolueno, xileno, rojo congo, amaranto, atrazina, colorantes azo, DDT, y ácidos húmicos entre otros (Singh & Chen, 2008).

### **2.1.6 Taxonomía de *Pleurotus ostreatus***

*Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. (*Pleurotaceae*, *Agaricales*) es un hongo basidiomiceto de la podredumbre blanca que produce fenol oxidasas (lacasas), MnP peroxidasas y versatil peroxidasas como actividades mayoritarias (Saavedra & Vargas, 2000). No se ha detectado LiP en este hongo, confirmado además por estudios genéticos comparativos con el modelo del *Phanerochaete chrysosporium*. Este hongo puede ser considerado como uno de los hongos más eficientes en degradar lignina en la naturaleza especialmente por su selectividad a la lignina sin producir LiP. Además es capaz de degrada una fracción de lignina dejando la celulosa intacta (Santoyo et al., 2008). *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr) *Kummer* es un importante hongo comestible, es utilizado en la bioconversión de residuos agroindustriales y como fuente de enzimas y otros compuestos para la industria química y farmacéutica (Saavedra & Vargas, 2000).

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Materia prima**

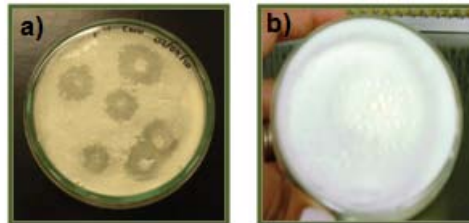
Los racimos vacíos o “raquis” de palma de aceite, fueron suministrados por la Hacienda La Cabaña en Cumaral-Meta-Colombia. El material se lavó, secó y cortó a un tamaño de 2-3 cm aproximadamente. El material se homogenizó y almacenó a 20°C y 70% HR. Previo al tratamiento, se caracterizó en cuanto a su contenido de humedad, extraíbles, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas de acuerdo a la metodología de National Renewable Energy Laboratory NERL (Sluiter et al., 2006).

### **2.2.2 Material biológicos e inóculo**

Se utilizaron los hongos de podredumbre blanca (Colección Española de Cultivos tipo CECT) *Phanerochaete chrysosporium* CECT 2798 (PH) y *Pleurotus ostreatus* CECT 20311 (PL). Las cepas se mantuvieron en medio papa dextrosa agar (PDA), y se cultivaron durante seis días a 30°C, para preparar el inóculo. Para *Phanerochaete chrysosporium* se suspendieron esporas en agua destilada estéril (1,4 x10<sup>8</sup> esporas/mL) y se adicionaron 2 mL a cada unidad experimental y para *Pleurotus ostreatus* se

realizó raspado de 4 cm<sup>2</sup> de la superficie del agar y se homogenizó en 2 mL de agua destilada, los cuales fueron adicionados a cada unidad experimental. En la Figura 2-1 se observan los cultivos en cajas de Petri de los dos hongos utilizados.

**Figura 2-1** Fotografía cultivos en cajas de Petri a) *P. chrysosporium* b) *P. ostreatus*



### 2.2.3 Cultivo en fase sólida

Como unidades experimentales se utilizaron bolsas de polietileno, cada una con 10 gramos de material lignocelulósico (base seca), se ajustó la humedad al 67% (p/p) con el suplemento correspondiente medio Mandels (Mandels & Weber, 1969a) y medio Kirk (Kirk et al., 1986). La composición de los suplementos se presenta en la Tabla 2-2. Posteriormente se esterilizó durante 20 minutos a 121°C y luego de enfriamiento se les adicionó el inóculo. Las unidades experimentales se incubaron a 30° C, durante cuatro semanas, en ambiente saturado con agua. Se tomaron al azar tres muestras con cada hongo y suplemento, cada semana. La muestra se lavó y determinó humedad para analizar la pérdida de peso. Una parte de la muestra se llevó a caracterización del material (lignina, cenizas y carbohidratos estructurales) y la otra para hidrólisis enzimática.

**Tabla 2-2** Composición de los suplementos de cultivo

MEDIO MANDELS (M) (Mandels & Weber, 1969a)		MEDIO KIRK (K) (Kirk et al., 1978)	
Compuesto	Concentración (g/L)	Compuesto	Concentración (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,3	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,4	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,0016	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,03
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,005	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,006
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,002	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,006
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0014	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,006
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4	NaCl	0,06
Urea	0,3	CuSO <sub>4</sub>	0,006

Extracto de levadura	0,25	AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,006
-	-	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,006
-	-	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,006
-	-	Extracto de levadura	0,012
-	-	Diamonio tartrato	0,2
-	-	Tiamina	1 mg
Glucosa	5	Glucosa	5

## 2.2.4 Diseño experimental

El material fue tratado de acuerdo a un diseño factorial cuyos factores fueron el tratamiento (2 hongos-PH y PL) y el suplemento (2 suplementos medio Mandels (M) y medio Kirk (K)). El análisis de varianza (95% nivel de confianza) se realizaron utilizando el programa Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corp, 2001). Las variables de respuesta fueron pérdida de peso, los parámetros cinéticos (a y b) de la degradación de lignina, hemicelulosa y celulosa, la eficiencia de la hidrólisis enzimática (%HE) y el rendimiento global de azúcares. El ajuste de los datos (fracción degradada de lignina, celulosa y hemicelulosa) y obtención de parámetros cinéticos del modelo de Weibull se realizó utilizando el software SciDavis (Benkert y Franke, 2010) utilizando regresión no lineal, método de Levenberg-Marquant (Bates & Watts, 2008).

Las ecuaciones consideradas para los cálculos se presentan a continuación:

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{\text{material inicial} - \text{material pretratado biológicamente (g)}}{\text{material inicial (g)}} \times 100\% \quad (2.1)$$

$$\text{Fracción biodegrada de lignina} = \frac{\text{lignina residual (g)}}{\text{lignina inicial (g)}} \quad (2.2)$$

$$\text{Fracción biodegrada de celulosa} = \frac{\text{celulosa residual (g)}}{\text{celulosa inicial (g)}} \quad (2.3)$$

$$\text{Fracción biodegrada de hemicelulosa} = \frac{\text{hemicelulosa residual (g)}}{\text{hemicelulosa inicial (g)}} \quad (2.4)$$

$$\% \text{ Eficiencia hidrólisis enzimática (\%HE)} = \frac{\text{azúcares reductores por hidrólisis enzimática (g)}}{\text{azúcares potenciales en el material pretratado}} \times 100\% \quad (2.5)$$

$$\% \text{ Rendimiento global de azúcares} = \frac{\text{azúcares reductores por hidrólisis enzimática (g)}}{\text{(material inicial (g))}} \times 100\% \quad (2.6)$$



### 2.2.5 Hidrólisis enzimática

Los sólidos sin tratar y tratados biológicamente fueron hidrolizados enzimáticamente utilizando un complejo enzimático compuesto por celulasas (Celluclast 1.5L - 15 FPU/g sustrato) y B-glucosidasa (NS50010 – 12,6 UI/g sustrato) (Novozymes). La hidrólisis se realizó en buffer de citratos 0,1 M, pH 4,8, a 50°C, en agitación orbital a 150 rpm por 72 horas con una carga de sólidos del 5% (p/v). La hidrólisis se realizó por triplicado y los resultados presentados son el promedio de las réplicas. La cuantificación de azúcares reductores presentes en el hidrolizado se realizó mediante la reacción con el ácido 5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), utilizando glucosa (Sigma-Aldrich) como patrón.

### 2.2.6 Métodos analíticos

- Determinación de humedad: Se determinó utilizando una balanza de humedad Mettler Toledo HB43-S Halogen Classic Plus a 105° C.
- Determinación de cenizas: Se realizó por gravimetría mediante calcinación (0,5 gramos en crisol tarado), a 600°C durante 3 horas.
- Determinación de lignina insoluble: Se colocaron 0,3 gramos de biomasa molida con 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72%, en agitación constante en baño termostatado a 30°C, durante 1 hora. Luego se transfirió de forma cuantitativa a Erlenmeyer de 100 mL y se adicionaron 84 mL de agua para ajustar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 3%. Posteriormente se llevó a 121°C durante 30 minutos. Se dejó enfriar y se filtró en crisol Gosh tarado. El líquido se aforó a 100 mL y el sólido fue lavado tres veces con agua destilada. Los crisoles se secaron a 105°C durante 16 horas y se determinó su peso. Luego se calcinaron para determinar lignina insoluble libre de cenizas. El líquido se utilizó para la determinación de azúcares estructurales (para determinar el contenido de celulosa y hemicelulosa).
- Determinación de azúcares estructurales: Se cuantificaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando patrones (glucosa, xilosa, galactosa, manosa, arabinosa) reactivos grado analítico marca Sigma-Aldrich. Se utilizó una columna Aminex HPX-87H (Biorad), fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0005 M, flujo 0,6 mL/min, temperatura de la columna 65° C, detector índice de refracción. La determinación de la concentración y análisis de cromatograma se realizó utilizando el software Galaxy.

## 2.2.7 Fotografías SEM

Se realizaron fotografías por microscopía electrónica de barrido en un equipo FEI QUANTA 200, de las muestras metalizadas (sputter SDC-050 Balzers prevacío (<10<sup>-1</sup> torr), usando argón como gas de ataque (plasma) sobre una placa (cátodo) de oro-paladio (8:2).

## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Porcentaje pérdida de peso

En la Tabla 2-3, se presentan los datos de % de pérdida de masa ocasionada por el tratamiento biológico de residuos de palma. Durante la primera semana de cultivo no se presenta diferencia significativa en la pérdida de peso entre tratamientos. Posteriormente se encontró mayores pérdidas de peso con el hongo PH, especialmente con el suplemento M.

**Tabla 2-3** Pérdida de peso durante el tratamiento biológico (%). Valores son el promedio de las replicas y la desviación estándar

Semana	<i>P. chrysosporium</i>		<i>P. ostreatus</i>	
	Mandels	Kirk	Mandels	Kirk
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	3,70 ± 0,01	3,24 ± 0,03	3,96 ± 0,13	3,33 ± 0,03
2	24,52 ± 1,12	23,24 ± 0,61	8,60 ± 0,12	6,63 ± 0,27
3	35,02 ± 1,95	27,48 ± 3,08	9,95 ± 0,48	14,63 ± 0,57
4	42,35 ± 2,06	33,43 ± 2,24	37,53 ± 1,24	42,69 ± 2,37

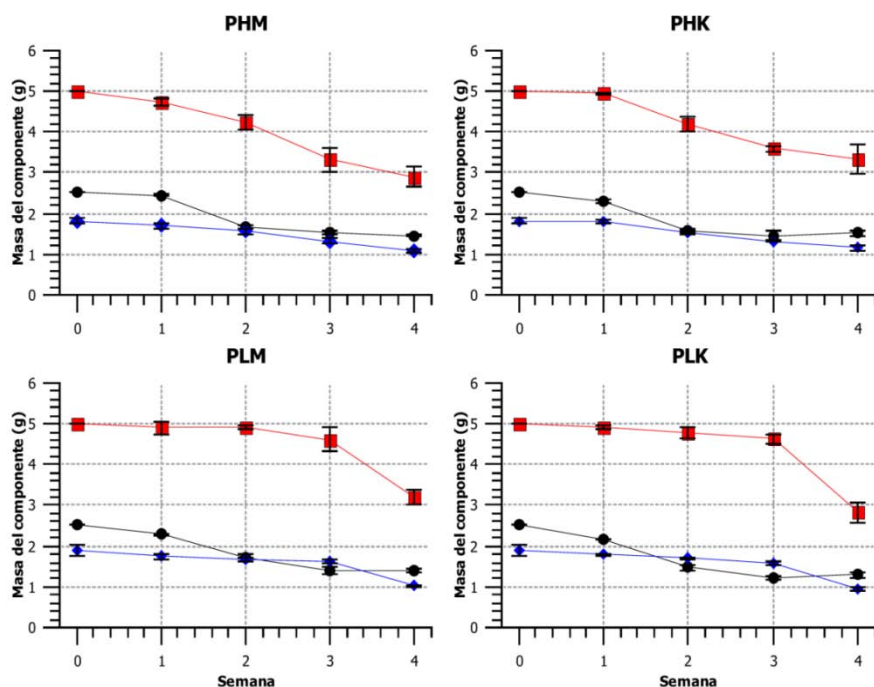
En residuos de trigo, se ha reportado que el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, causa considerable pérdida de peso dada por el ataque simultáneo de lignina y polisacáridos y el hongo *Pleurotus eryngii* causa degradación preferencial de la lignina y xilanos atacando la celulosa levemente (Camarero, 1994). A los 30 días de tratamiento con *Phanerochaete chrysosporium* se perdió el 39% mientras que con *Pleurotus eryngii* la pérdida fue de 18% a los 80 días de incubación. Este comportamiento es similar al obtenido en este trabajo sobre residuos de palma, donde se alcanzó una pérdida de peso promedio del 31,25% para el hongo PH, mucho mayor a lo obtenido con PL (12,30% en promedio) a las 3 semanas de tratamiento. Al finalizar el seguimiento, en los porcentajes de pérdida de peso no se presentan

diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ), alcanzando un valor promedio de degradación de 40% en cuatro semanas. Con otros hongos de la podredumbre blanca, se han reportado pérdidas de peso en eucalipto tratado con *C. subvermispora* del 11, 2% (40 días), pastos del 20% (2 semanas) y 33% (6 semanas) (Akin et al., 1995). Con los hongos *T. versicolor* y *T. hirsuta*, la pérdida de peso de caucho durante 18 semanas fue del 53,8% y 63,6% con cada uno respectivamente (Pandey & Nagveni, 2007) y en hojas de roble con *Ganoderma colossum* a 35°C, la pérdida de peso fue de 6,1% a las 4 semanas (Adaskaveg et al., 1995).

### 2.3.2 Biodegradación de residuos de palma

En la Figura 2-2, se encuentra representada la degradación de los componentes de los residuos de palma de acuerdo al diseño experimental. Se encontró que tanto el hongo PL como el PH, son capaces de degradar lignina, de forma similar, pero también degradan polisacáridos bajo las condiciones evaluadas, sin encontrar diferencias significativas entre suplementos evaluados ( $p > 0,05$ ). Se ha reportado que los hongos de la podredumbre blanca son capaces de degradar todos los componentes celulares, pero existen cepas selectivas, que degradan hemicelulosa y lignina antes que la celulosa (Taniguchi et al., 2005). Dentro de los hongos selectivos se encuentra *P. ostreatus*, característica que se comprobó en este trabajo. Este hongo inicia el ataque agresivo de la celulosa luego de 3 semanas de tratamiento. En contraste, los no selectivos, dentro de los cuales se encuentra el *P. chrysosporium* remueven lignina y carbohidratos estructurales a la misma velocidad, resultando en un material homogéneamente degradado (Pandey & Nagveni, 2007), como sucedió en este trabajo con el hongo PH.

**Figura 2-2** Pérdida de componentes principales. Rojo celulosa, negro lignina, azul hemicelulosa, PHM, PHK, PLM, PLK



En la Tabla 2-4 se encuentra la caracterización de los residuos de palma tratados biológicamente durante tres semanas, y se compara con otros reportes científicos. Los resultados de biodegradación obtenidos son similares a los obtenidos por Rolz et al en 1986 y Camarero en 1994 pero contrarios a los reportados en la biodegradación de residuos de limonaria y citronela, ya que se reporta una mayor pérdida de peso con *Pleurotus flabellatus* comparado con *Phanerochaete chrysosporium*. En la Tabla 2-4 se presentan además datos recientes obtenidos sobre paja de trigo (Salvachúa et al., 2011), trabajo en el cual se evaluaron 21 cepas de hongos de podredumbre blanca entre los cuales estuvieron *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus*, sin lograr deslignificación con el hongo PH. Es importante resaltar que el nivel de biodegradación de la lignina depende de la fuente (Agosin et al., 1985).

Se ha reportado que los hongos de podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolus versicolor* son los microorganismos más eficientes para degradar lignina (Lopez et al., 2006). En este trabajo con residuos de palma el PL tiene un comportamiento similar al PH en cuanto a la biodegradación de la lignina.

Estudios han reportado la biodegradación de residuos de arroz (*Oriza sativa* L.) y de maíz (*Zea mizze* L.) utilizando los microorganismos *Cyrrathus stercoreus*, *Dichomitus squalens* y dos cepas de *Phanerochaete chrysosporium* en fase sólida durante 30 días (Karunanandaa & Varga, 1996). Se encontró que ambas cepas de *P. chrysosporium* degradan celulosa y hemicelulosa indiscriminadamente, disminuyendo la

materia disponible para su digestión. Resultados similares a los encontrados en este trabajo con materiales de palma de aceite con la cepa de PH.

### 2.3.3 Biodegradación de la lignina

El proceso de biodegradación de la lignina y por lo tanto la producción de enzimas ligninolíticas está influenciada por las condiciones de cultivo y la composición del medio (Ikehata et al., 2004), el microorganismo y el sustrato. En este trabajo se logró un % máximo del 51,91% de degradación de lignina con el hongo PL, suplementado con el medio Kirk, a la tercera semana de tratamiento comparada. Este medio de cultivo se reportó para la producción de ligninasas por *P. chrysosporium* (Kirk et al., 1978) y se ha utilizado en la producción de ligninasas sobre tusas de maíz (Asgher et al., 2006) y residuos de trigo (Fujian et al., 2001).

La biodegradación de lignina ha sido ampliamente estudiada usando el hongo basidiomiceto de la podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium*, cuyo mecanismo de degradación incluye el rompimiento oxidativo de las cadenas laterales y anillos aromáticos de unidades de lignina

**Tabla 2-4** Características de materiales pretratados biológicamente por hongos de la podredumbre blanca

Parámetro	MATERIAL																	
	Residuos de palma (suplemento Mandels)			Residuos de palma (Suplemento Kirk)			Residuos de trigo			Limonaria			Citronela			Paja de trigo		
	Control	PH <sup>a</sup>	PL <sup>b</sup>	Control	PH <sup>a</sup>	PL <sup>b</sup>	Control	PH <sup>c</sup>	PL <sup>d</sup>	Control	PH <sup>e</sup>	PL <sup>f</sup>	Control	PH <sup>e</sup>	PL <sup>f</sup>	Control	PH <sup>g</sup>	PL <sup>h</sup>
% lignina	25,17	23,72	15,45	25,17	20,24	14,25	15,9	14,4	10,2	11,0			11,1			24,0		
% celulosa	49,95	50,97	51,36	49,95	53,73	54,23	40,7	24,6	42,8	29,9			28,5			36,9		
% hemicelulosa	18,91	20,23	18,03	18,91	19,81	18,43	20,5	14,7	14,6	28,5			30,0			23,0		
% de degradación de lignina		39,07	44,97		42,09	51,91		45	47		40,90	42,60		32,01	30,03		0	27
% de degradación de hemicelulosa		28,01	11,08		27,70	13,77		50	43		1,73	32,35		15,65	44,96		70	52
% de degradación de celulosa		33,77	7,75		28,24	7,63		63	14		15,76	22,58		18,11	36,57		35	22
Pérdida de peso		35,02	9,95		27,48	14,62		39	18		6,66	16,06		6,31	17,37			
Digestibilidad enzimática										12,8	16,51	28,72	19,32	26,31	36,99			
Referencia	Piñeros, 2011						(Camarero, 1994).			(Rolz et al., 1986)						(Salvachúa et al., 2011)		

- a. *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, 3 semanas a 30°C
- b. *Pleurotus ostreatus*, 3 semanas a 30°C
- c. *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, 30 días
- d. *Pleurotus eryngii*, 60 días
- e. *Phanerochaete chrysosporium*, 8 semanas, 30°C
- f. *Pleurotus flabellatus*, 8 semanas, 30°C
- g. *Phanerochaete chrysosporium*, 3 semanas, 30
- h. *Pleurotus ostreatus*, 3 semanas, 30°C

(Kirk & Farrell, 1987). En Malasia, se estudió la deslignificación de los racimos vacíos de palma de aceite mediante tratamientos químicos (NaOH 2% p/v) y fermentación en fase sólida y líquida con *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 32629. Partiendo de un 20,4% de lignina se logró remover el 71,12% de la misma (Hamisan et al., 2009) mediante fermentación en fase sólida durante 7 días, valor muy superior al encontrado en este trabajo con materiales de palma colombianos del 42,09% a las 3 semanas con el mismo hongo. No se describen más detalles que permitan comparar a fondo estos resultados.

El porcentaje de biodegradación de la lignina de los residuos de palma con PH es similar al obtenido en la biodegradación de residuos hortícolas utilizando *Phanerochaete flavido-alba* del 46% con una relación C/N de 21 a los 90 días de cultivo (Nunes et al., 2001). Otros reportes muestran valores de la degradación con *P. chrysosporium* del 70% en residuos de oliva durante 23 días de compostaje (Tomati et al., 1995), 30% en residuos de trigo (Tuomela et al., 2000) y 15% en eucalipto (del Ri'o & Gutiérrez, 2001).

Relacionado con PL, este hongo se evaluó sobre materiales de bambú, en la cual se logró un 2,67% de degradación de lignina, 4,38% de degradación de celulosa y 12,59% de hemicelulosa a las 4 semanas (Zhang et al., 2007b). Sobre residuos de palma se obtuvieron valores similares en cuanto a la biodegradación de polisacáridos, pero el hongo PL, fue muy superior en la degradación de lignina.

Sobre eucalipto se evaluaron hongos de la podredumbre blanca dentro de los cuales se estudió *Pleurotus pulmonarius*, con el cual se logró un 1% de degradación de lignina, con una pérdida del 2,2 % en peso del material y *Phanerochaete chrysosporium* un 15% de degradación de lignina con un 5,8% de pérdida de masa (del Ri'o & Gutiérrez, 2001), lo que indica una mayor pérdida de peso con el hongo PH, resultado que es similar al obtenido en este trabajo. Sin embargo el % de deslignificación obtenido con residuos de palma de aceite entre los dos hongos PH y PL es similar.

### 2.3.4 Cinética de biodegradación de lignina

En la Figura 2-3, se encuentra las gráficas donde se representa la fracción de lignina biodegradada, en los diferentes tratamientos. Estos valores se ajustaron al modelo cinético de Weibull, el cual tiene un interés potencial para describir cinéticas de degradación química, microbiana o enzimática, considerando (a) el parámetro de escala o constante de velocidad de reacción y (b) el factor de forma (Cunha et al., 1998) el cual puede ser mayor o menor a 1, si es cóncava o convexa (Ecuación 2.7). El modelo se reduce a una cinética de primer orden de degradación/crecimiento cuando (b)=1. Una de

las ventajas de este modelo es la flexibilidad en el ajuste de los datos experimentales con número mínimo de parámetros (van Boekel, 2002).

La distribución de Weibull ha sido aplicada de forma satisfactoria a estudios de vida útil (Duyvesteyn et al., 2001; Schmidt & Bouma, 1992), curvas de desactivación microbiana (Peleg, 2000; Unluturk et al., 2010), degradación de antioxidantes y vitaminas (Oms-Oliu et al., 2009; Zheng & Lu, 2011), secado por deshidratación osmótica (Corzo & Bracho, 2008) entre otros. También se ha evaluado en la cinética de degradación de monosacáridos (Khajavi et al., 2005) y la hidrólisis de disacáridos (Oomori et al., 2004) bajo condiciones supercríticas. Durante la búsqueda de antecedentes, no se encontraron reportes del uso del modelo de Weibull para la biodegradación de materiales lignocelulósicos.

$$n(t) = \int_t^{\infty} f(t)dt = 1 - F(t) = 1 - \exp(-at)^b \quad (2.7)$$

En la Ecuación 2.7, si se considera que  $\eta_i$  corresponde a la cantidad fraccional del componente X, el cual cambia desde un valor inicial  $X_0$  hasta un valor final en equilibrio  $X_e$  y el tiempo requerido para alcanzar cierto valor de  $\eta_i$  es representado por la  $f(t)$ , donde  $f(t)$  es la distribución de Weibull.  $\eta(t)$  puede definirse como la probabilidad de tener una cierta cantidad fraccional del componente X, a un tiempo  $t$ , bajo las condiciones experimentales (Cunha et al., 1998). Para este trabajo, la fracción acumulada de lignina degradada ( $L(t)$ ) se expresa en la Ecuación 2.8.

$$L(t) = \frac{Lt - Le}{Lo - Le} = \exp(-(at)^b) \quad (2.8)$$

Donde  $L_0$ ,  $L_t$  y  $L_e$ , son la fracción de lignina inicial, la lignina a un tiempo  $t$  y el contenido de lignina de equilibrio ( $t=\infty$ ) respectivamente,  $(a)$  es la constante crítica de velocidad y  $(b)$  el parámetro de forma del modelo de Weibull. Para evaluar el mejor ajuste del modelo, se tienen en cuenta el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) y la medida del error relativo (MER), la cual es una medida de la bondad de ajuste, definido como  $\text{Chi}^2/\text{grados de libertad}$ , cuyo valor debe ser menor a 1. El modelo se considera bueno si MER está por debajo de 0.1 (Krokida & Marinos-Kouris, 2003). Los valores predichos del modelo de Weibull se presentan en la ecuación 2.9.

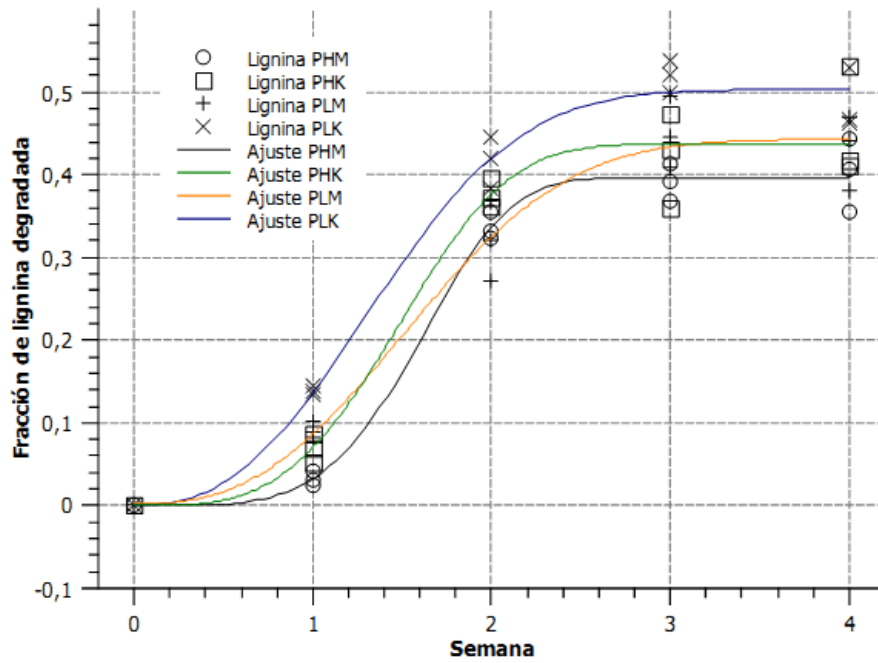
$$L(t) = Le + (Lo - Le)\exp(-(at)^b) \quad (2.9)$$

Los datos de la fracción acumulativa de lignina degradada en los residuos de palma de aceite se presentan en la Figura 2-3, donde además se puede apreciar las curvas de ajuste al modelo propuesto. Los valores de los parámetros del modelo de Weibull constante cinética  $(a)$  y el factor de forma  $(b)$ , y



la fracción de lignina degradada  $L(t)$ , ( $t=3$  y  $t=4$ ) con los dos hongos bajo los dos suplementos se presentan en la Tabla 2-5.

**Figura 2-3** Datos experimentales (símbolos) y ajustes (líneas) al modelo de Weibull de la fracción degradada de lignina



**Tabla 2-5** Valores de los parámetros del modelo de Weibull constante cinética (a) y el factor de forma (b), y la fracción de lignina degradada  $L(t)$ , ( $t=3$  y  $t=4$ ). De corresponde a la desviación estándar

Hongo suplemento	(a)	de	(b)	de	$r^2$	MER	L (3)	de	L (4)	de
PHM	0,577	0,022	4,466	0,824	0,988	0,00051	0,391	0,018	0,420	0,016
PHK	0,608	0,040	3,497	0,735	0,967	0,00167	0,421	0,047	0,407	0,018
PLM	0,556	0,022	2,638	0,506	0,972	0,00129	0,449	0,035	0,431	0,037
PLK	0,632	0,027	2,512	0,275	0,988	0,00069	0,519	0,016	0,486	0,031

Como se observa en la Tabla 2-5, en todos los casos se encontró un factor de correlación ( $r^2$ ) mayor a 0,97 y bajos valores de la medida del error, por lo que se considera que el ajuste es adecuado. Relacionado con los valores de los parámetros cinéticos, los valores de (a) están entre 0,555 y 0,6321 ( $\text{semanas}^{-1}$ ) y los de (b) entre 2,51 y 4,46. Los valores del parámetro de forma  $>1$  indican que la función de Weibull va en aumento, dado por el mayor grado de biodegradación de lignina en el

tiempo. Los parámetros fueron sujetos a análisis de varianza tomando como factores el hongo y el suplemento. Los resultados se muestran en la Tabla 2-6.

**Tabla 2-6** Valores de p, resultado del análisis de varianza de (a), (b), L(3) y L(4)

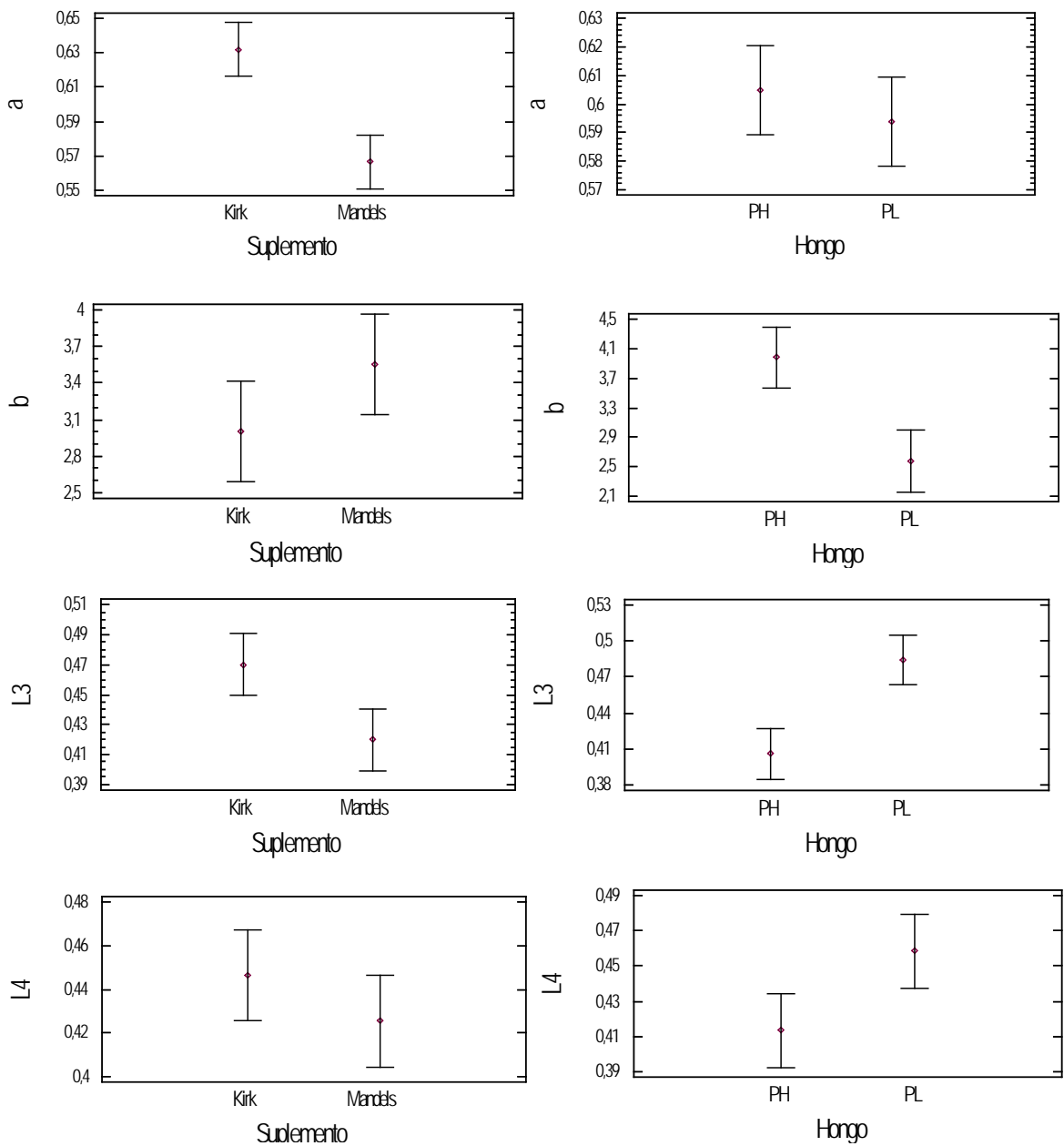
Variable de respuesta	Factor	
	Hongo	Suplemento
(a)	0,4533	0,0010
(b)	0,0040	0,1700
L3	0,0021	0,0237
L4	0,0392	0,2884

Los resultados muestran que la degradación de los residuos de palma hasta la semana 3 (L3) es afectada por el tipo de hongo y medio de cultivo ( $p < 0,05$ ). El mayor valor de biodegradación se obtuvo con el medio Kirk y el hongo PL. El parámetro (a), asociado con la resistencia a la biodegradación, fue afectada de forma estadísticamente significativa únicamente por el suplemento. Valores más bajos de la constante (a), han sido reportados como una mayor resistencia de las bacterias a su inactivación (Peleg, 2000; Unluturk et al., 2010), por lo que podría decirse que utilizando el suplemento Mandels, la lignina es más estable o el hongo tiene menos afinidad por este componente. Estos resultados son coherentes con lo reportado en investigaciones para la producción de ligninasas por hongos de la podredumbre blanca (Asgher et al., 2006; Fujian et al., 2001), utilizando el medio de cultivo de Kirk (Kirk et al., 1978). El suplemento promueve la producción de estas enzimas y por lo tanto se obtiene un mayor nivel de biodegradación de lignina. El medio Mandels ha sido reportado en la producción de enzimas por cepas del hongo de podredumbre blanca *T. versicolor*, en los cuales se encontró actividad de enzimas fenol oxidasas (Salvachúa et al., 2011). En este trabajo se demuestra superioridad del suplemento Kirk para la biodegradación de la lignina.

Relacionado con el parámetro (b), aunque se considera el factor de forma también está relacionado con la velocidad. Se ha reportado relación con la velocidad de transferencia de masa, a más bajos valores de (b), más rápida es la pérdida de agua en procesos de secado (Corzo & Bracho, 2008) y en procesos de degradación de capacidad antioxidante en patilla (melón de agua), a menores valores de (b) más rápida es la velocidad de degradación (Oms-Oliu et al., 2009). Realizando una analogía, se podría decir que con más bajos valores de b, se obtiene la mayor velocidad de pérdida de lignina. Por lo tanto el hongo que posee una mayor capacidad de degradar lignina es el PL con suplemento el

medio Kirk, ya que los menores valores de  $b$ , se obtienen bajo estas condiciones como se observa en la Figura 2-4. Sin embargo el ANOVA demostró influencia estadísticamente significativa sólo del hongo ( $p < 0,05$ ), lo que indica que el suplemento no influye de forma importante sobre la velocidad de biodegradación de lignina presente en los residuos de palma. Sin embargo, el nivel de biodegradación de la lignina en la semana 3 fue superior para el hongo PL con suplemento Kirk, y en la semana 4, no existe diferencias significativas con los suplementos, lo que se verifica en la Figura 2-4. Considerando el ajuste al modelo y los resultados obtenidos, se puede considerar que el Modelo de Weibull como apropiado en los procesos de biodegradación de lignina utilizando hongos de podredumbre blanca.

**Figura 2-4** Gráficas de medias con barras de desviación (95% de nivel de confianza), para los parámetros del modelo de Weibull (a) y (b), y fracción degradada de lignina para las semanas 2 y 3.

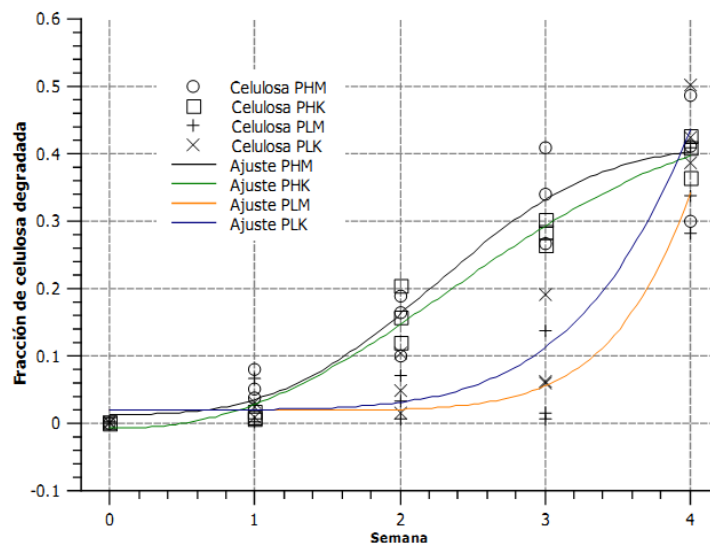


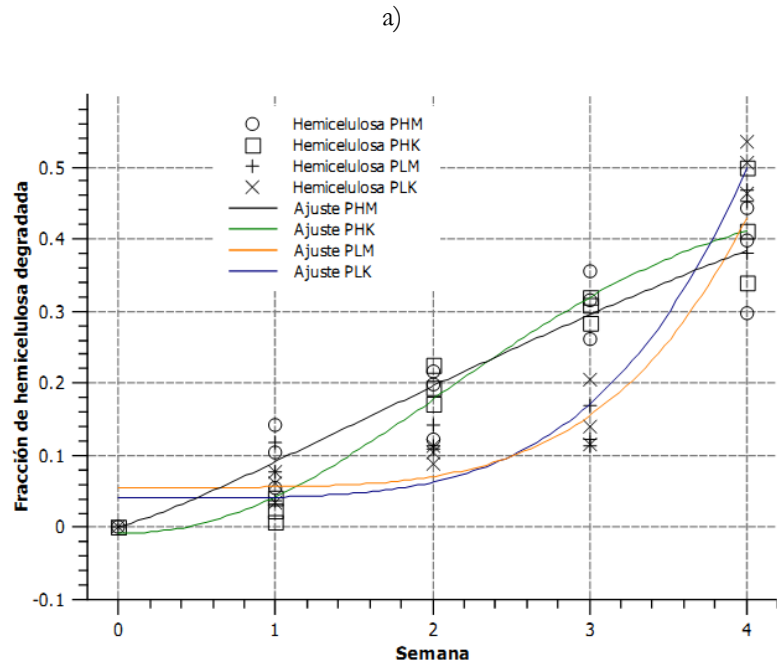
## 2.4 Biodegradación de celulosa y hemicelulosa

En las Figuras 2-5 a y b se encuentran los datos experimentales y ajustados al modelo de Weibull para los polisacáridos celulosa y hemicelulosa respectivamente. Se evidencia la mayor capacidad de degradar polisacáridos por el hongo PH comparados con el PL. El hongo PH, degrada ambos polisacáridos de forma simultánea como lo hace con la lignina, demostrando que es capaz de degradar todos los componentes del material lignocelulósico. Se ha reportado que la degradación de polisacáridos es mayor sin suplemento de glucosa (Andric et al., 2010) en bagazo de caña cultivado por *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767; en este trabajo, a pesar de que el suplemento contenía glucosa (5 g/L), el nivel de degradación de los polisacáridos fue importante. En eucalipto también se encontró degradación de los polisacáridos por parte del hongo PH (del Ri'o & Gutiérrez, 2001).

En la Tabla 2-7 se encuentran los datos de los parámetros del modelo cinético de Weibull para la degradación de la celulosa y la hemicelulosa y en la Tabla 2-8, los valores de  $p$ , resultado del análisis de varianza. Los parámetros cinéticos y el nivel de biodegradación tanto de la celulosa como de la hemicelulosa en la semana 3, fueron afectados de forma significativa únicamente por el hongo, alcanzando los mayores valores con el hongo PH, con valores promedio de degradación de celulosa del 31,07% en la semana 3 y 39,99% en la semana 4 y de hemicelulosa de 30,62% y 39,81% en las semanas 3 y 4 respectivamente.

**Figura 2-5** Datos experimentales y ajuste al modelo de Weibull de la fracción degradada de a) celulosa y b) hemicelulosa





b)

**Tabla 2-7** Valores de los parámetros (a) y (b) del modelo de Weibull correspondientes a la biodegradación de los polisacáridos celulosa y hemicelulosa

CELULOSA										
Hongo suplemento	(a)	de	(b)	de	r <sup>2</sup>	MER	C (3)	de	C (4)	de
PHM	0,389	0,044	3,050	0,756	0,912	0,00051	0,338	0,057	0,399	0,076
PHK	0,337	0,051	2,324	0,516	0,977	0,00076	0,283	0,016	0,399	0,0255
PLM	0,087	0,044	4,443	0,966	0,953	0,00317	0,078	0,055	0,343	0,05153
PLK	0,130	0,051	6,796	0,976	0,975	0,00082	0,077	0,028	0,437	0,04868
HEMICELULOSA										
Hongo suplemento	(a)	de	(b)	de	r <sup>2</sup>	MER	H (3)	de	H (4)	de
PHM	0,168	0,085	1,215	0,342	0,9554	0,00139	0,308	0,036	0,379	0,061
PHK	0,301	0,091	1,960	0,497	0,9744	0,00101	0,305	0,015	0,417	0,065
PLM	0,077	0,040	4,337	0,769	0,9305	0,00224	0,145	0,019	0,434	0,037
PLK	0,066	0,031	3,874	0,588	0,9667	0,00143	0,171	0,028	0,501	0,030

**Tabla 2-8** Valores de p, resultado del análisis de varianza de (a), (b), C(3) y C(4) para celulosa y (a), (b), H(3) y H(4) para hemicelulosa

CELULOSA		
	Factor	
Variable de respuesta	Hongo	Suplemento
(a)	0,0000	0,8812
(b)	0.0020	0.2633
C3	0.0000	0.2864
C4	0.7750	0.1871
HEMICELULOSA		
	Factor	
Variable de respuesta	Hongo	Suplemento
(a)	0,0047	0,1972
(b)	0,0001	0,7118
H3	0,0354	0,0967
H4	0,0000	0,4642

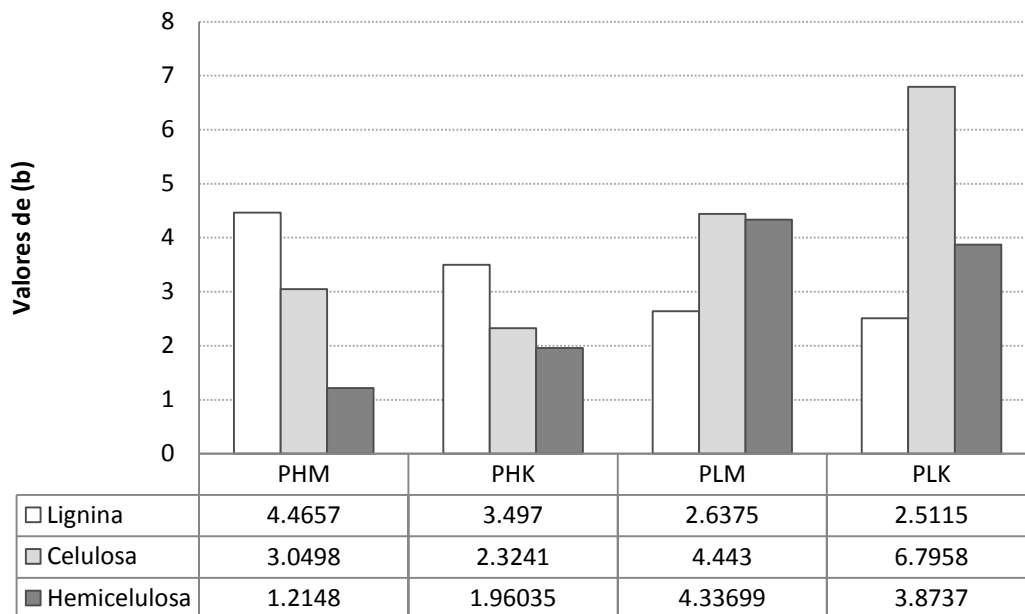
Considerando los resultados estadísticos, presentados en la Tabla 2-8 el suplemento no tiene influencia significativa sobre el nivel de degradación de los polisacáridos, bajo las condiciones evaluadas. Los valores más bajos de (a), se obtienen con el hongo PL, indicando que éste hongo tiene menor afinidad con los polisacáridos que el hongo PH. En cuanto al parámetro (b), los menores valores tanto para celulosa como para hemicelulosa se encuentran con el hongo PH, y por lo tanto éste tiene una mayor velocidad de degradación de los polisacáridos.

En la Figura 2-6, se encuentran la gráfica comparativa de los valores de (b), para los diferentes componentes celulares, los cuales en todos los casos sólo fueron influenciados por el hongo. Para el hongo PH, los menores valores se encontraron para la biodegradación de la hemicelulosa, seguidos de la celulosa y finalmente la lignina. Algunos estudios reportan que las enzimas fúngicas esterases juegan un rol importante en la degradación de paredes celulares en pastos (Kuhad et al., 1997). Estas enzimas

actúan de forma sinérgica con xilanasas para romper la asociación con la lignina (Fillingham et al., 1999), por lo que se considera que la degradación de la hemicelulosa es requerida antes para lograr una remoción de lignina eficiente, lo que pudo ocurrir en este trabajo con residuos de palma de aceite, ya que la velocidad de degradación de la hemicelulosa fue mayor que la de lignina con este hongo. Sin embargo otros reportes indican una mayor velocidad de degradación de lignina comparada con la celulosa, utilizando el hongo PH sobre residuos de trigo (Huang et al., 2008).

En cuanto al hongo PL, los valores más bajos son para lignina, seguidos de hemicelulosa y luego celulosa, por lo que se confirma la mayor afinidad de este hongo por la lignina. Se ha reportado alta actividad de xilanasas con *Pleurotus ostreatus* sin detectar actividad de exocelulasas, durante el proceso de biodegradación de paja de trigo (Camarero et al., 1994), confirmándose una mayor degradación de la hemicelulosa que de celulosa, como sucedió en este trabajo. Sobre residuos de trigo y los hongos *Euc-1* y *Irpex lacteus* las actividades xilanasas y celulolíticas fueron moderadas en comparación con las ligninasas (Dias et al., 2010). Con estos dos hongos las actividades xilanasas y CMCasa fueron mayores que la avicelasa, lo que indica una mayor degradación de la hemicelulosa en residuos de trigo, comportamiento similar al obtenido con residuos de palma de aceite y el hongo PL con suplemento Kirk. También se encontró una mayor velocidad de degradación de lignina comparada con celulosa por parte del hongo PH, lo cual se ha reportado en la deslignificación biológica de residuos de arroz, utilizando *Phanerochaete chrysosporium* (Huang et al., 2008).

**Figura 2-6** Datos comparativos parámetro cinético (b), para la biodegradación de lignina, celulosa y hemicelulosa



## 2.5 Producción de azúcares fermentables

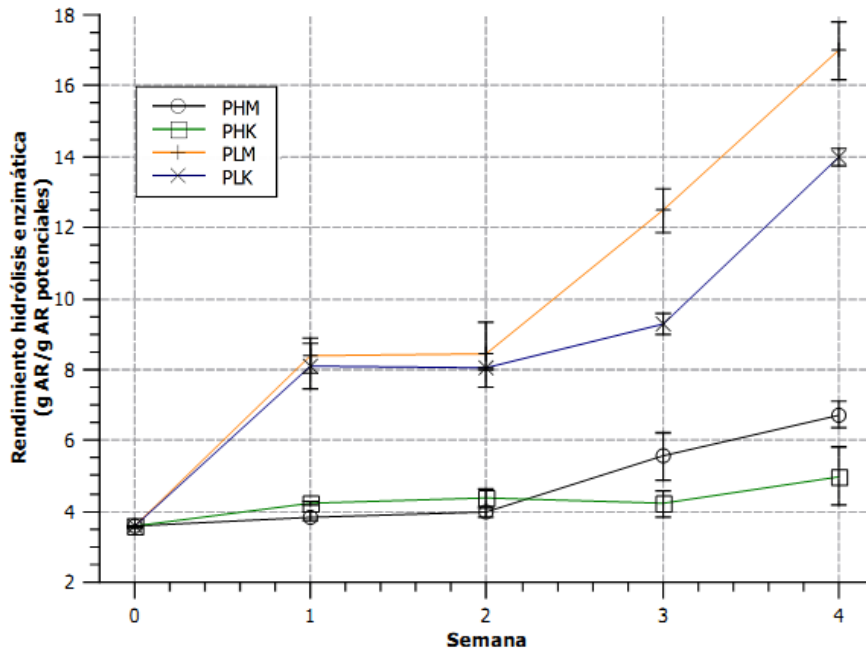
En la Figura 2-7 a) se presenta la gráfica con los datos experimentales de la eficiencia de la hidrólisis enzimática (%HE) de los materiales pretratados biológicamente, en la cual se observa superioridad de la misma en materiales pretratados con el hongo PL, especialmente cuando se cultiva con suplemento Mandels. Mientras en el control, es (material sin pretratar) se logró una eficiencia de la hidrólisis enzimática del 3,6%, mediante el tratamiento biológico con PL y suplemento Mandels se logró aumentar a 12,6 y 17%, a las 3 y 4 semanas de tratamiento respectivamente, es decir un aumento de 3,5 y 4,72 veces. En otros estudios se ha logrado incrementar la hidrólisis enzimática de residuos de arroz con hongos como *Pleurotus ostreatus* (35%), *Pycnoporus cinnabarinus* (54,6%), valores 2,91 y 4,55 veces el control (12%), después de 5 semanas de tratamiento (Manjarrés et al., 2011). Se puede concluir que a pesar de que se logró un aumento en la digestibilidad, el material tiene una alta recalcitrancia a la biodegradación. Con el hongo PH no se logró mejorar la hidrólisis enzimática de forma importante, a pesar de haber logrado niveles de deslignificación similares a las obtenidas con PL, por lo que no se correlacionó el nivel de deslignificación con la mayor digestibilidad del material, pero si con la degradación de la hemicelulosa.

Otros estudios reportan que se obtuvieron %HE del 35% utilizando pretratamiento con *P. ostreatus* durante 60 días (Taniguchi et al., 2005) y 37% en bambú pretratado con *Coriolus versicolor* (Zhang et al., 2007a). Con residuos de palma se han presentado reportes con pretratamiento biológico con rendimientos cercanos al 30% (Watanabe & Kuwahara, 2002). Sobre bagazo de caña también se ha explorado el tratamiento biológico utilizando diferentes bacterias y hongos, con lo cual se incrementó la accesibilidad de los azúcares para la hidrólisis enzimática (Singh et al., 2008). En paja de trigo se mejoró la digestibilidad de la celulosa mediante tratamiento con PL pasando de un 35% al 55%, mientras que con PH disminuyó a un 15% (Salvachúa et al., 2011), resultados que presentan una tendencia similar a la obtenida en este trabajo. Sin embargo otros trabajos reportan que residuos de trigo pretratados con *P. chrysosporium* por 15 días (Bak et al., 2009) presentan un 64,9% de digestibilidad.

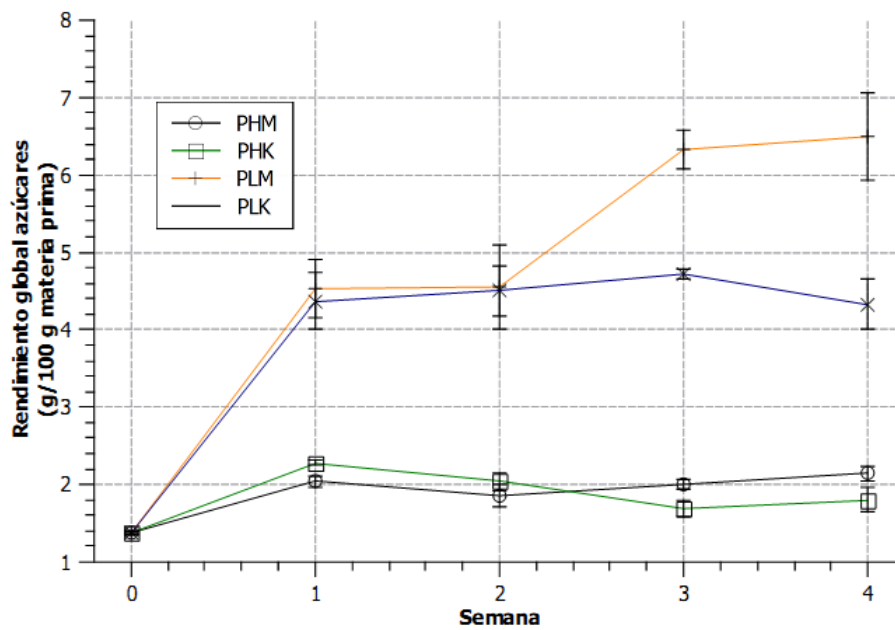
En este trabajo con residuos de palma, a pesar de lograr niveles similares en la biodegradación de lignina, se logró una mayor digestibilidad de la celulosa con el hongo PL, que fue el hongo que menos afectó los carbohidratos, por lo que no se correlacionó la pérdida de lignina con un aumento en la digestibilidad enzimática, a pesar de que se considera que el ataque de la lignina es esencial para aumentar el %HE. Estos resultados están de acuerdo con lo previamente reportado (Capelari y Tomás-Pejo, 1997) (Shi et al., 2008).



**Figura 2-7** Porcentaje de a) eficiencia de la hidrólisis enzimática y b) rendimiento global de azúcares a partir de residuos de palma pretratados biológicamente



a)



b)

Relacionado con el rendimiento global de azúcares reductores, presentado en la Figura 2-7 b), se encontró un máximo de 6,4%, valor superior al control de 1,44% con PLM. Teniendo en cuenta que

el objetivo del trabajo planteado es la producción de azúcares fermentables, se seleccionó como tratamiento biológico el cultivo con el hongo PL, suplemento Mandels durante tres semanas, tiempo en el cual se logró la menor degradación de celulosa.

En general la biodegradación es un complejo proceso que depende de muchos factores dentro de los que se encuentran la cepa, condiciones de cultivo, secreción de enzimas y mecanismos oxidativos (Wan & Li, 2010), por lo que es necesario un análisis completo del proceso, para seleccionar los mejores hongos y condiciones para obtener la máxima cantidad de azúcares fermentables.

Aunque se han logrado mejorar los rendimientos, todavía el pretratamiento biológico presenta una baja eficiencia, se pierden carbohidratos por el precultivo y los tratamientos son extensos en el tiempo. Por lo tanto se deben plantear nuevas estrategias para superar los inconvenientes. Para la obtención de azúcares fermentables se debe considerar los valores de digestibilidad y la pérdida de carbohidratos durante el tratamiento biológico.

## 2.6 Análisis FTIR

Considerando que los análisis fisicoquímicos de los materiales lignocelulósicos se consumen tiempo, la espectroscopía FTIR es una herramienta para una rápida caracterización con pequeñas cantidades y una mínima preparación de la muestra; además ha sido usada para la caracterización de materiales lignocelulósicos e identificar cambios debido a la aplicación de tratamientos químicos y diferentes condiciones ambientales (Moore & Owen, 2001). Algunos estudios han utilizado FTIR para la caracterización de material de pino escocés degradado por los hongos de podredumbre parda *F. pinicola* y *C. puteana* (Korner et al., 1992), pino y eucalipto por *P. radiata* y *E. globulus* (Ferraz et al., 2000) y maderas blandas y duras degradadas por hongos degradadores de lignina (Pandey & Pitman, 2003).

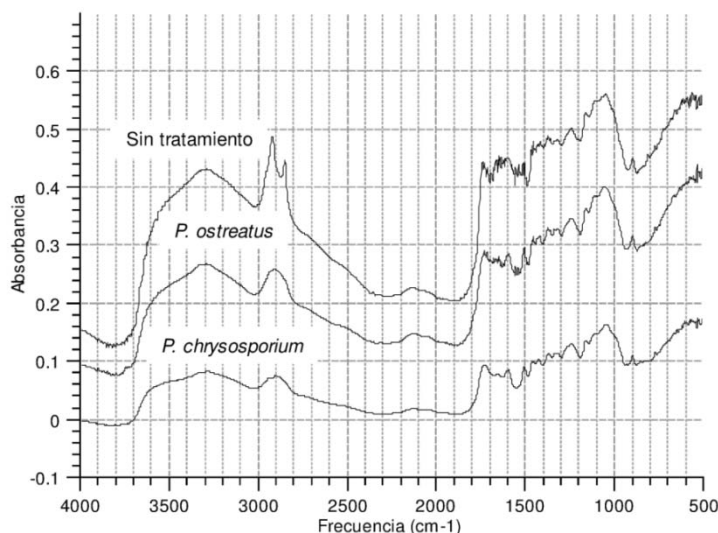
A pesar de que esta técnica DRIFT (reflectancia difusa) es usada con frecuencia para el estudio de pulpas y maderas, la información cuantitativa es difícil de obtener por la naturaleza heterogénea de las muestras lignocelulósicas. La reflectancia en las muestras varía no sólo con los coeficientes de absorción y dispersión sino también con el espesor de la muestra lo que causa que la luz de absorba de manera irreproducible, causando fluctuaciones en la línea base (Agarwal et al., 2003). Por lo tanto en este trabajo se realizó una comparación cualitativa de las muestras.

El espectro FTIR de residuos de palma sin tratar y tratados biológicamente durante tres semanas se encuentra en la Figura 2-8. Realizando comparación de los espectros, se observa que el pico a 3345  $\text{cm}^{-1}$  disminuyó notablemente con el tratamiento biológico. Esta banda corresponde al grupo  $-\text{OH}$

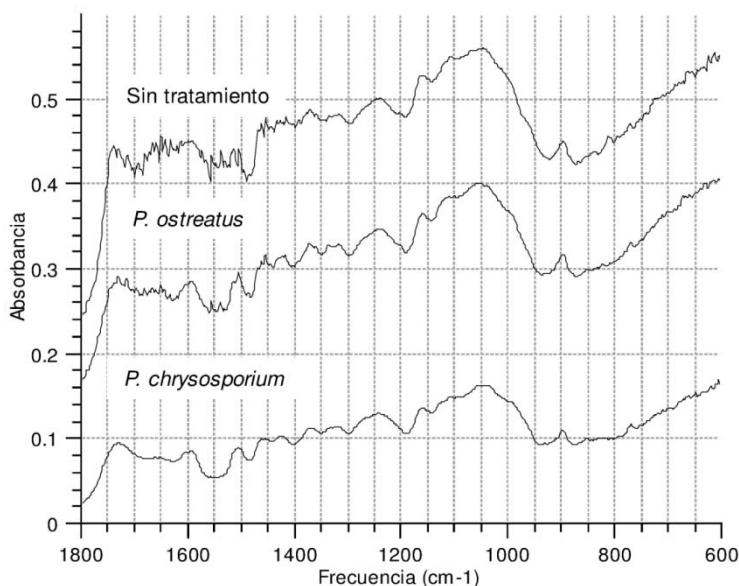
presente en los anillos fenólicos (Hinkova et al., 2002), los cuales disminuyeron en el proceso de degradación de lignina realizado por los hongos. La intensidad de la banda fue menor con el hongo PH, lo que indica que este hongo degradó en mayor medida lignina de características fenólicas, comparado con PL, probablemente debido a la producción de LiP, enzima caracterizada por la oxidación de unidades fenólicas y que el PL no produce (Yan et al., 2009). En todo caso, a pesar de que ambos hongos lograron niveles similares de biodegradación de lignina en masa, los mecanismos de biodegradación de la lignina por los dos hongos fueron diferentes.

Comportamiento similar tienen las bandas a 2923 y 2848 correspondientes a la vibración del enlace C-H en grupos  $\text{CH}_2$  (2923  $\text{cm}^{-1}$ ) y  $\text{CH}_3$  (2848  $\text{cm}^{-1}$ ), los cuales disminuyeron con el tratamiento biológico; estas bandas pueden corresponder a ceras o grasas presentes en los materiales, las cuales disminuyen por el tratamiento biológico. Uno de los efectos del tratamiento biológico utilizado en la industria del papel es el control del “pitch”, o resinas que son compuestos lipofílicos presentes en la madera (2-8%) y que afectan la calidad del papel (Karode et al., 2000). Se han evaluado los hongos de podredumbre blanca *Trametes versicolor* y *Bjerkandera* spp (Dornier et al., 1994) y *Pleurotus ostreatus* (Saha et al., 2006), los cuales fueron capaces de remover compuestos extractivos lipofílicos. Previamente se ha reportado que cepas de *P. chrysosporium* son capaces de degradar grandes cantidades de ácidos grasos insaturados (oleico) mejor que ácidos grasos saturados (mirístico, palmítico y esteárico) (Asther et al., 1987). El aceite de palma, contiene principalmente ácidos grasos saturados (40-48% principalmente palmítico), ácidos grasos insaturados (47-56%, principalmente oleico), el cual queda residual sobre estos residuos luego del proceso de desfrutado.

**Figura 2-8** Espectros IR (DRIFT) de residuos de palma sin tratar y tratados biológicamente a) Espectro completo y b) ampliación región fingerprint



a)



b)

La banda a 1737  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la tensión del grupo  $\text{C}=\text{O}$ , cetona no conjugada, carboxilo y grupos éster (Agarwal et al., 2003), la cual disminuye notablemente con el tratamiento, debido al rompimiento de los enlaces éster que unen la lignina con la hemicelulosa, durante el proceso de biodegradación, ocurrida por acción de las esterasas producidas por los dos hongos estudiados (Hinkova et al., 2004). Esta banda está relacionada con la degradación de la hemicelulosa (Pandey & Nagveni, 2007) (Jacob & Jaffrin, 2000).

Las bandas correspondientes a la modificación de la lignina se pueden apreciar de mejor forma en la figura donde se amplía la zona del “fingerprint” o huella digital (2-8 b)). La banda de 1643  $\text{cm}^{-1}$  disminuyó con el tratamiento biológico con PL y prácticamente desapareció con PH. Esta banda corresponde a la tensión del  $\text{C}=\text{C}$  conjugado con el anillo en alcoholes coniferílico y sinapílico, lo que está relacionado con el consumo de las unidades G, S y H.

Las bandas a 1596  $\text{cm}^{-1}$  y 1506  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a la vibración del anillo aromático, usualmente sirven de bandas referencia en estudios de lignina (Bujanovic et al., 2005). La banda a 1506 debida al estiramiento del anillo aromático asimétrico (unidades guayacilo), disminuyó en el tratamiento con PL y no se observa con PH, aunque su señal es muy débil; este efecto ocurre en lignina degradada por hongos de podredumbre blanca indicando el consumo de lignina tipo G. Una disminución de esta banda fue reportada en pino chir (*Pinus roxburghii*) y caucho (*Hevea brasiliensis*) degradado por hongos

de podredumbre blanca *Trametes versicolor* y *Trametes hirsuta* los cuales degradan lignina de forma selectiva (Pandey & Nagveni, 2007). La banda a 1596 cm<sup>-1</sup> corresponde al estiramiento del anillo aromático simétrico (unidades siringilo); la mayor intensidad de la banda se obtuvo con PL seguida de PH y finalmente el control. Este aumento en la intensidad se debe principalmente al consumo de unidades G, especialmente por PL. Se ha demostrado que el hongo PH degrada preferiblemente unidades G en paja de trigo (Singh et al., 2011). Sin embargo otros reportes indican degradación de unidades G,H, y S en paja de trigo, con los hongos *Pleurotus eryngii* y *Phanerochaete chrysosporium* (Hussain et al., 2006) y sobre eucalipto mayor remoción de unidades S, utilizando los hongos *Poria (Ceriporiopsis) subermispora*, *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* (del Río & Gutiérrez, 2001). Los cambios en la absorción a 1659 cm<sup>-1</sup> indican un alto grado de modificación de la lignina (Gonçalves et al., 1998).

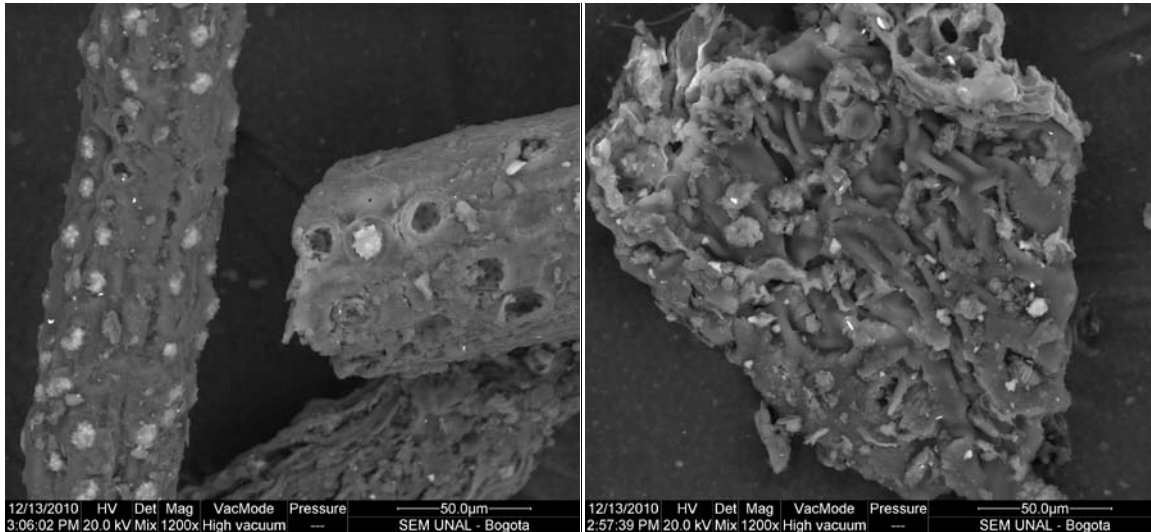
Las bandas a 1160, 1108, 1070, 895, y 811, pueden ser atribuidas a la absorbancia de arabinoglucaronoxilanos y galactoglucomanos los cuales son componentes de la hemicelulosa (Kauráková et al., 2000). Las bandas características de la celulosa son 1161, 1112, 1060, 1031, 982 y 989 cm<sup>-1</sup>, valores muy similares a los reportados para hemicelulosa. Por lo tanto la disminución en estas bandas puede atribuirse a la degradación de hemicelulosa y celulosa, considerando que la absorbancia de la tensión C-OH y C-O-C (enlaces glucosídicos presentes en celulosa y xilanos) tiene una desviación de  $\pm 10$  cm<sup>-1</sup>, para los diferentes polisacáridos debido al efecto de los grupos adyacentes a estos (Kauráková et al., 2000).

La disminución en la banda de 898 cm<sup>-1</sup> indica el rompimiento de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos (Kauráková et al., 2000) ocurridos especialmente con el hongo PH. Este análisis confirma la mayor biodegradación de los polisacáridos llevada a cabo por PH, lo que coincide con los resultados de composición presentados en la Tabla 2-4.

En general se observa que los carbohidratos, extraíbles lipofílicos y lignina en los residuos fueron gradualmente degradados durante el pretratamiento biológico con los hongos PH y PL. Los carbohidratos de cadena larga fueron degradados a cadenas cortas, por lo que los grupos hidroxilos, grupos metileno y carboxilo incrementaron, lo mismo que las estructuras aromáticas sustituidas. Como resultado el material puede ser hidrolizado de forma más eficiente como se ha reportado por otros investigadores (Karunanandaa et al., 1995).

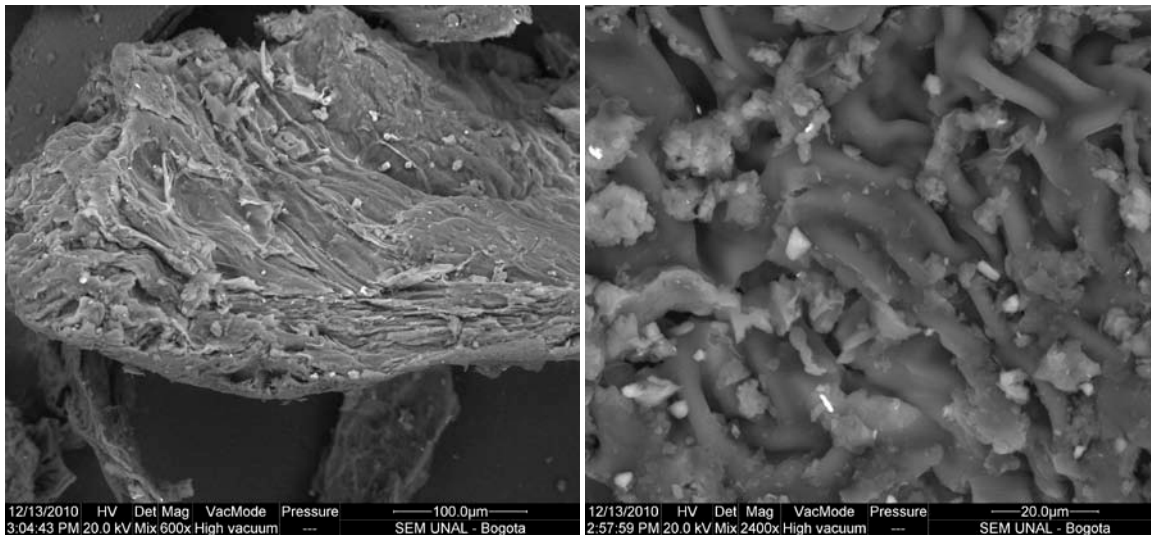
## 2.7 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)

En las Figuras 2-9 y 2-10 se encuentran las fotografías de microscopía electrónica de los materiales control y pretratados biológicamente con PH y PL.

**Figura 2-9** Fotografías SEM material sin tratar biológicamente

A

B



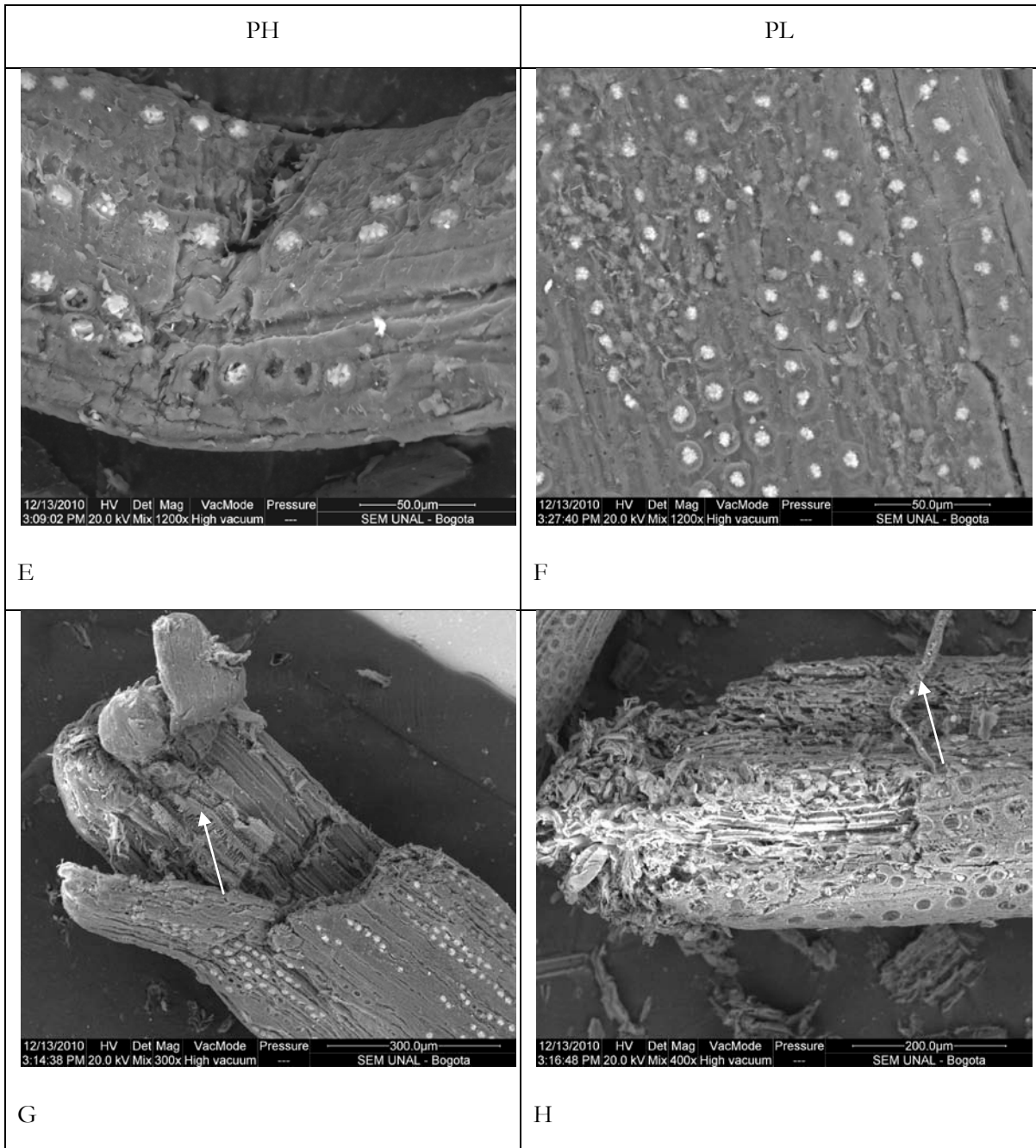
C

D

En la Figura 2-10 a) se representan las fotografías del material sin tratar, donde se observan fibras con partículas de silica en su superficie de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y otras fibras con ausencia de éstas. Se observan cráteres (indicados con la flecha blanca) donde las partículas de silica se han caído, probablemente durante el proceso de molienda del material (Law et al., 2007) (A). Se considera que la silica se forma intracelularmente, por lo que al retirarse dejan perforaciones que pueden mejorar

el proceso de pulpado (Hong et al., 2010) y la hidrólisis enzimática. En las fotografías (B, C y D) se observan partículas amorfas cubiertas por capas de grasas por grasas o ceras, de acuerdo a lo reportado con otros materiales lignocelulósicos (Reddy & Yang, 2007), sin exposición de los haces vasculares.

**Figura 2-10** Fotografías de material pretratado biológicamente PH y PL



En el material pretratado con ambos hongos PH y PL (Figura 2-10), se observa la aparición de numerosos agujeros de  $< 1\mu\text{m}$  sobre la superficie de los materiales probablemente debido a la acción de las enzimas (ligninasas y hemicelulasas). También se observa la limpieza de la superficie de resinas o grasas realizada por los hongos, especialmente por PL, lo que se confirma los resultados del análisis de FTIR. La barrera de cera que comprende la cutícula de hierbas y cortezas de arboles impiden la penetración de las enzimas (Chang & Holtzapfle, 2000), por lo que la eliminación de estos extractivos aumenta la hidrólisis enzimática.

La limpieza de la superficie hace visibles algunos hoyos que son propios del material dados por la sílice presente sobre la superficie (Law et al., 2007). En todo caso, las fibras pretratadas con PL poseen una mayor densidad de hoyos, por lo que puede ser la causa de la mayor digestibilidad obtenido con este material (E vs. F). Estudios previos han concluido que el tamaño de poro del sustrato en relación con el tamaño de las enzimas es uno de los factores principales que limitan la hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica (Chandra et al., 2007). Por otro lado se observa un aumento en el área superficial del material debido a la extracción de la lignina, proceso por el cual se exhiben las fibras de celulosa (G y H), especialmente con PL. Sobre residuo de palma, el crecimiento de las hifas del hongo PL penetran el sustrato, destruyen la estructura de las células logrando que las éstas colapsen (Hong et al., 2010) como se observa en la Figura 2-9 H. Con PL el proceso de biodegradación se inició con el consumo de lignina y hemicelulosa, descubriendo los polisacáridos menos expuestos (celulosa) e iniciar su consumo en una etapa posterior (Figura 2.2). *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* crecieron inicialmente atacando los tejidos no lignificados de paja de trigo tales como el parénquima y el floema (Barrasa et al., 1995). Similar comportamiento al obtenido con residuos de palma de aceite, usando PH.

## 2.8 Conclusiones

Se logró la biodegradación de los residuos de palma utilizando los hongos *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus*, con los cuales se obtuvo una pérdida de peso del 31,25% y 12,29% en promedio respectivamente. Aunque se lograron valores de deslignificación biológica similares 39,07-42,09% para PL y 44,97-51,91% para PH, no se correlacionó este valor con la digestibilidad de la celulosa y por consiguiente el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

Por otro lado, los datos obtenidos de fracción biodegradada de lignina, celulosa y hemicelulosa, obtenidos durante cuatro semanas de tratamiento, se ajustaron al modelo de Weibull, con coeficientes de correlación cercanos a 1 y bajos valores de medida del error relativo. Con este modelo cinético se



pudo demostrar que el hongo PL presenta una mayor velocidad de degradación de lignina comparada con PH. En cuanto a la degradación de la hemicelulosa y hemicelulosa, se logró una mayor velocidad con PH que con PL.

En este trabajo aunque se utilizó una concentración de glucosa en el suplemento, ésta no fue suficiente para proteger la celulosa a la biodegradación.

Se logró obtener una máxima recuperación de azúcares por hidrólisis enzimática de 6,4 gramos de azúcares reductores/100 gramos de material inicial, valor superior al control de 1,44 gramos de azúcares reductores/100 gramos de material inicial, realizando tratamiento con PL, suplemento Mandels durante tres semanas, condición bajo la cual se logró la menor degradación de celulosa.



## 3. Capítulo 3. Aplicación de lacasas y lacasa mediadores como pre-tratamiento biológico a residuos de palma

### 3.1 Lacasas

Las lacasas (EC 1.10.3.2, benzenediol:oxígeno oxireductasa) pertenecen a la familia de las enzimas multicobre. Se han investigado principalmente en los hongos de podredumbre blanca, pero también es producida por bacterias y por las plantas para la síntesis de la lignina. La primera estructura molecular de una lacasa fúngica completa fue publicada hasta 2002, de los hongos *Trametes versicolor* (Piontek et al., 2002) y *Melanocarpus albomyces* (Hakulinen et al., 2002). El sitio activo de las lacasas incluye cuatro iones de cobre (Tipo 1, 1 átomo de cobre, Tipo 2, 1 átomo de cobre y Tipo 3 con 2 átomos de cobre) por molécula, los cuales se encuentran en estado de oxidación  $\text{Cu}^{+2}$ . En la Figura 3-1 se encuentra la estructura de esta enzima.

**Figura 3-1** Estructura cristalina de la lacasa con tres sitios activos de cobre (Martinez et al., 2005)



El ciclo catalítico de la lacasa comprende varios pasos: el primero es la reducción del sustrato por el cobre ( $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ ) en el sitio 1, el cual es el aceptor primario de electrones. Los electrones sustraídos del sustrato (fenoles o aminas) son transferidos a los sitios T2 y T3, pasando la enzima de un estado de oxidación a un estado totalmente reducida, para lo cual son necesarias cuatro moléculas de sustrato. El cobre de tipo II, transfiere los electrones al aceptor final,  $\text{O}_2$ , el cual es reducido a agua, mediante la formación de peróxido intermedio que actúa como un puente entre los sitios de cobre T3 oxidado y

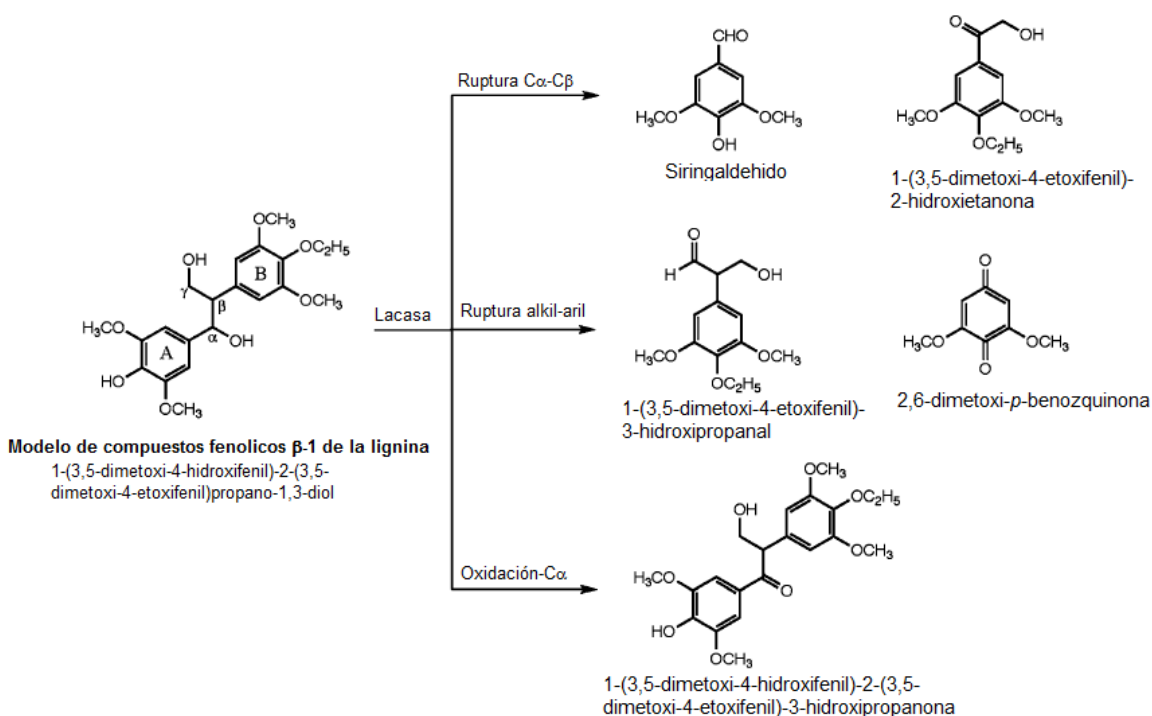
T2 reducido. Posteriormente el peróxido se reduce formando una molécula de agua y oxidando nuevamente los cuatro punto de cobre (Piontek et al., 2002; Wong, 2009).

La lacasa puede utilizar el oxígeno atmosférico como aceptor final de electrones, lo cual representa una considerable ventaja desde el punto de vista de las aplicaciones industriales y ambientales comparada con las peroxidasa, las cuales requieren un suministro continuo de  $H_2O_2$  (Martínez et al., 2005).

### 3.1.1 Oxidación de sustratos fenólicos

Las lacasas catalizan la sustracción de un electrón de grupos hidroxilo presenten en compuestos fenólicos de lignina, tales como vainillil glicol, 4,6-di (t-buti) guayacol y siringaldehído, formando radicales fenoxilo, que generalmente se polimerizan vía unión de radicales. La degradación de los compuestos fenólicos de la subestructura  $\beta$ -1 de la lignina, ocurre vía formación de radicales fenoxilo que conducen al rompimiento  $C\alpha$ -  $C\beta$ , oxidación de  $C\alpha$ , rompimiento de alquil-aril, y rompimiento del anillo aromático (Kawai et al., 1988). En la Figura 3-2 se presenta el mecanismo de oxidación de lignina tipo  $\beta$ -1, por parte de las lacasas.

**Figura 3-2** Mecanismo de oxidación de la lignina por las lacasas (Kawai et al., 1999) reportada en (Wong, 2009).



### 3.1.2 Oxidación de compuestos no fenólicos

Se ha encontrado que la lacasa es capaz de oxidar compuestos no fenólicos y dímeros de lignina  $\beta$ -1, en presencia de un mediador, por lo que se considera muy importante en los procesos de depolimerización de la lignina y delignificación de pulpa (Bourbonnais & Paice, 1990). También se han encontrado cientos de moléculas que actúan como mediadores de lacasas, los cuales tienen la habilidad de oxidar lignina o moléculas modelo lignina a través de una oxidación selectiva de sus grupos hidroxilo bencílicos (Bourbonnais et al., 1997). Los mediadores más efectivos para la degradación de la lignina son los que poseen N heterocíclico con grupos N-OH (Riva, 2006). Algunas moléculas reportadas son ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), HBT (1-hidroxibenzotriazol) y HAA (ácido 3-hidroxiantranílico) (Bourbonnais et al., 1997). Otras moléculas derivadas de la lignina como siringaldehído y acetosiringona, también se consideran efectivas para remover compuestos lipofílicos de pulpa de papel y son producidos de forma natural aumentando la actividad de la lacasa durante la biodegradación por hongos (Gutiérrez et al., 2007).

La demanda de oxígeno por la lacasa es más alta con ABTS que con HBT. La oxidación mediada por ABTS de sustratos no fenólicos se da por transferencia de electrones (Fabbrini et al., 2002). Primero el ABTS es oxidado por la lacasa al catión radical (ABTS<sup>•+</sup>) y luego al dicatión (ABTS<sup>2+</sup>) con un potencial redox de 472 mV (ABTS/ABTS<sup>•+</sup>) y 885 mV (ABTS<sup>•+</sup>/ABTS<sup>2+</sup>) respectivamente (Bourbonnais et al., 1998). El dicatión es el intermediario activo responsable de la oxidación de sustratos no fenólicos. Bourbonnais and Paice (1990) estudiaron la oxidación del alcohol veratrílico (un modelo similar al guayacol) por el sistema lacasa-ABTS, reacción bajo la cual se formó el aldehído.

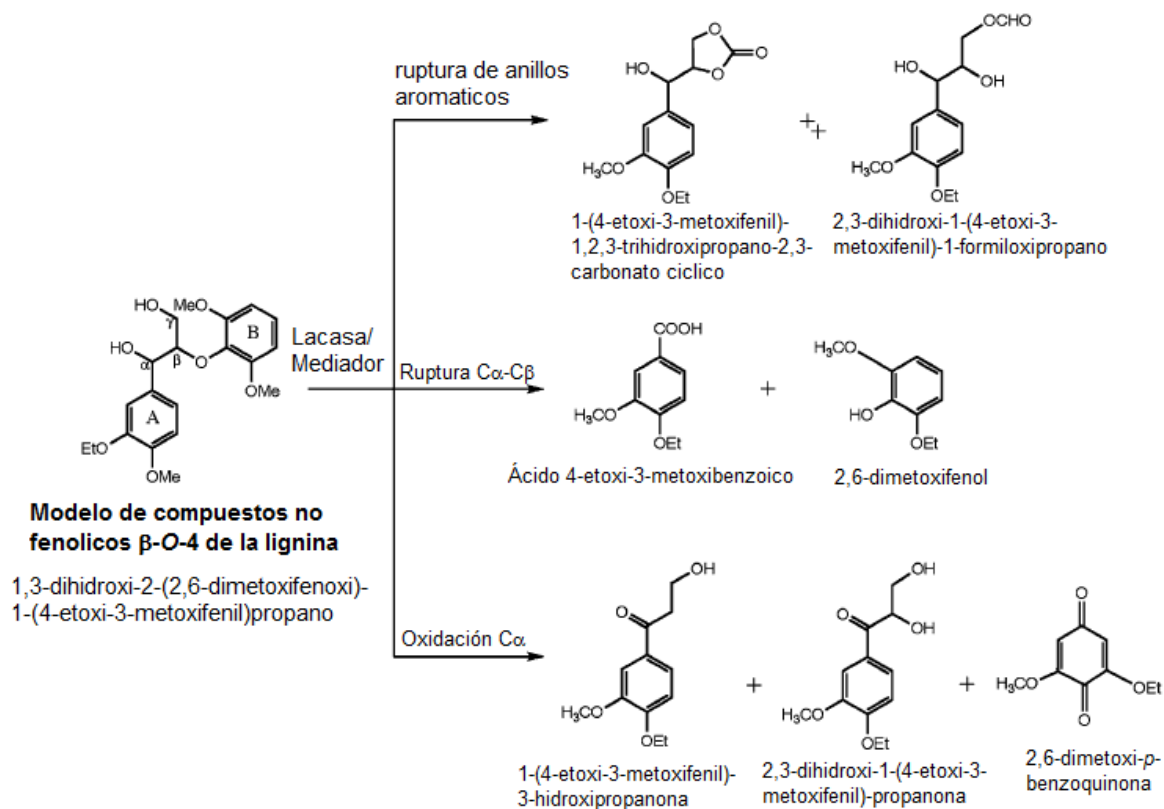
La degradación de compuestos no fenólicos modelo  $\beta$ -O-4, (que corresponde a la mayor subestructura de la lignina), ha sido estudiada utilizando sistemas lacasa mediador, encontrando cuatro tipos de reacciones, rompimiento del enlace  $\beta$ -éter, rompimiento C $\alpha$ -C $\beta$ , oxidación del C $\alpha$  y rompimiento del anillo aromático, como se presenta en la Figura 3-3, lo que hace que se formen variados productos con diferentes estructuras y pesos moleculares. Estos productos se pueden polimerizar como mecanismo natural mediado por las lacasas (Shleev et al., 2006).

### 3.1.3 Uso de enzimas en el tratamiento biológico

Las enzimas también son utilizadas para mejorar no solamente el proceso de pulpado sino también el proceso de hidrólisis enzimática para la producción de azúcares, por ejemplo el uso de xilanasas (Jeffries, 1996). En cuanto al uso de peroxidasas degradadoras de lignina es limitado debido al costo

de las enzimas y la baja velocidad de reacción enzimática (Singh & Chen, 2008), por lo que no se encuentran muchos estudios al respecto. Algunos se enfocan en la producción de lacasas, precisamente por las limitaciones existentes relacionadas con su disponibilidad (Ancín Viguiristi, 2008; Arora et al., 2002; Bichsel & Sandre, 1982; Madaeni et al., 2004; Ojeda & Kafarov, 2009; Sanhueza, 2009). En la búsqueda de antecedentes no se encontraron reportes relacionados con el uso de del sistema lacasa-mediador, como pretratamiento para la producción de azúcares fermentables sobre materiales lignocelulósicos sin tratar.

**Figura 3-3** Oxidación de lignina no fenólica catalizada por el sistema lacasa mediador (Kawai et al., 1999) reportada por reportada en Wong (2009).



La aplicación más desarrollada del tratamiento biológico con lacasas, se encuentra en la industria papelera. En el proceso de producción de pasta de papel es necesario remover la lignina ya sea por métodos mecánicos o químicos, para lo cual es necesario el uso de compuestos de cloro ( $\text{Cl}_2$  y  $\text{Cl}_2\text{O}$ ) que actualmente están restringidos. Esta situación ha hecho que se desarrollen nuevos métodos para la degradación de la lignina usando un complejo de enzimas oxidativas incluyendo las lacasas en presencia de mediadores (Gupta et al., 2011; Ojeda et al., 2011; Rosen & Dincer, 2003; Rosen &

Dincer, 2001). El sistema lacasa mediador (LMS), se patentó para su uso en el proceso de elaboración del papel con el nombre comercial “Lignozym process” (Call & Mucke, 1997).

También el LMS se ha introducido en la industria de textiles (Telke et al., 2011), específicamente para la oxidación de índigo, utilizando lacasa recombinante de *Myceliophthora thermophila*, aplicada con el mediador metil éster de ácido siríngico (Bujanovic et al., 2005; Vikineswary et al., 2006), para la remoción de agentes contaminantes, biosensores, nanobiotecnología, entre otros (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006).

La deslignificación previa de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol sigue siendo un gran desafío (Palmer, 2007). Este proceso mediante el uso de lacasas se ha planteado como promisorio, ya que las lacasas se han logrado producir a mayor escala a costos razonables y además se han encontrado mejores resultados en la degradación de lignina artificial comparando con otras fenoxidasas (LiP y MnP) (Singh Arora & Kumar Sharma, 2010). Además el uso de lacasas tiene algunas ventajas comparado con el uso de catalizadores químicos, ya que los procesos se llevan a cabo a bajas condiciones de temperatura sin generar contaminación (Riva, 2006). Por otra parte, los efectos inhibitorios causados por los derivados de furano, ácidos débiles y compuestos fenólicos después de la destrucción de lignina podrían reducirse mediante el uso de lacasas (Almeida et al., 2007).

Además, teniendo en cuenta los inconvenientes del tratamiento biológico realizado por hongos de la podredumbre blanca, el uso directo de sus enzimas, es un proceso potencial para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica previo a la hidrólisis enzimática, ya que éste consume menos tiempo y evita la pérdida de polisacáridos.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Materia prima

Los racimos vacíos o “raquis” de palma de aceite, fueron suministrados por la Hacienda La Cabaña en Cumaral-Meta-Colombia. El material se lavó, secó y cortó a un tamaño de 2-3 cm aproximadamente. El material se homogenizó y almacenó a 20°C y 70% HR. Previo al tratamiento, se caracterizó en cuanto a su contenido de humedad, extraíbles, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas de acuerdo a la metodología de National Renewable Energy Laboratory NERL (Sluiter et al., 2006).

### 3.2.2 Pretratamiento enzimático

Los materiales fueron sometidos a tratamiento con lacasas utilizando enzimas comerciales (Suberase) proveniente de *Myceliophthora thermophila* producida en *Aspergillus niger* (Novozymes), con y sin la presencia del mediador ABTS, a 30°C, agitación orbital 150 rpm. Se utilizó solución amortiguadora de tartratos 50 mM, pH 5,0, con una carga de sólidos (base seca) del 5%. Luego del tratamiento, se ajustó una concentración de NaOH al 1,5% (p/v) con el fin de extraer los residuos de lignina afectados por el tratamiento enzimático, durante 60 minutos con agitación cada 10 min, a 60°C. Este procedimiento se realizó a todas las muestras incluyendo los controles (lacasas desactivada). Posteriormente los líquidos se neutralizaron y aforaron a 100 mL para su determinación de compuestos fenólicos; los sólidos se neutralizaron y pesaron previo a su hidrólisis enzimática.

### 3.2.3 Diseño experimental

El tratamiento con lacasas se realizó un diseño factorial 2<sup>3</sup>, utilizando la metodología de superficie de respuesta con tres repeticiones en el punto central, estudiando el efecto de la dosis de enzima (2-40 U/g), la concentración de ABTS (0,1-2%), y tiempo de tratamiento (3-23 horas). La variable de respuesta fue la eficiencia de hidrólisis enzimática (%HE), definida en la ecuación 2.5 y la generación de compuestos fenólicos en mg por gramo de material pretratado. También se realizó la evaluación con lacasa sin mediador. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Design-Expert V 8.0.1 (Stat-ease, 2010). En la Tabla 3-1, se presentan los datos del diseño experimental, para el tratamiento con lacasas y lacasa-ABTS.

**Tabla 3-1** Diseño experimental, valores experimentales y codificados a) lacasas y b) lacasa-ABTS

a) Experimento con lacasas

Variables (Valores experimentales)		Valores codificados	
Dosis (U/g)	Tiempo (h)	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>
21	13	0	0
21	13	0	0
2	23	-1	1
21	13	0	0
40	3	1	-1
2	3	-1	-1
40	23	1	1



## b) Experimento lacasa-ABTS

Variables de respuesta (Valores experimentales)			Valores codificados		
Dosis (U/g)	Concentración (%)	Tiempo (h)	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>
21	1,05	13	0	0	0
21	1,05	13	0	0	0
2	2	3	-1	1	-1
21	1,05	13	0	0	0
2	0,1	3	-1	-1	-1
2	0,1	23	-1	-1	1
40	2	3	1	1	-1
40	0,1	3	1	-1	-1
40	0,1	23	1	-1	1
2	2	23	-1	1	1
40	2	23	1	1	1

### 3.2.4 Determinación de actividad lacasa

La determinación de la actividad lacasa, se realizó mediante la oxidación del ABTS, con un volumen de reacción de 2 mL (200  $\mu$ L de ABTS 1 mM (Sigma), 600  $\mu$ L de buffer acetato 0,1M pH 5 y 1200  $\mu$ L dilución de enzima), a 30°C. La absorbancia fue leída antes y después de 3 min de reacción, a 420 nm. Los cálculos de actividad (U/L) se realizaron utilizando un coeficiente de extinción de 36000 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Szkklarz et al., 1989), donde una unidad (U) es la cantidad de enzima que oxida un micromol de de ABTS por minuto.

### 3.2.5 Hidrólisis enzimática

Los sólidos sin tratar y tratados biológicamente fueron hidrolizados enzimáticamente utilizando un complejo enzimático compuesto por celulasas (Celluclast 1.5L - 15 FPU/g sustrato) y B-glucosidasa (NS50010 – 12,6 UI/g sustrato) (Novozymes). La hidrólisis se realizó en buffer de citratos 0,1 M, pH 4,8, a 50°C, en agitación orbital a 150 rpm por 72 horas con una carga de sólidos del 5% (p/v). La hidrólisis se realizó por triplicado y los resultados presentados son el promedio de las réplicas. La cuantificación de azúcares reductores presentes en el hidrolizado se realizó mediante la reacción con el ácido 5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), utilizando glucosa (Sigma-Aldrich) como patrón.

### 3.2.6 Determinación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido vainillínico, ácido siríngico, vainillina, siringaldehído, ácido p-cumárico y ácido ferúlico) y derivados del furano (5-hidroximetilfurfural y furfural) se determinaron por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC,

utilizando patrones reactivos grado analítico marca Sigma-Aldrich. Se utilizó una columna Chromolith C18 (Merck), temperatura de la columna 30° C, fase móvil compuesta por metanol (40%), ácido acético (1%) y agua (59%) a un flujo de 2 mL/min, gradiente de t=0 min 100% fase móvil, t=9 min 40% metanol y 60% fase móvil, t=10 min 40% metanol y 60% fase móvil y t=12 min 100% fase móvil, detector de UV a una longitud de onda de 270 nm. El ácido acético se determinó utilizando la columna HPX 87H (Biorad), con un flujo de 0,6 mL/min de solución 0,05M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y detector de índice de refracción. Los datos se procesaron en el software Galaxy.

### 3.2.7 Análisis FTIR

A los sólidos tratados se les realizó análisis de espectroscopía de reflectancia difusa, en espectrofotómetro FTIR Shimadzu Prestige – 21, detector DLATGS y una resolución de 4 cm<sup>-1</sup> y 100 scan, rango 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>. Las muestras fueron diluidas a 1% en KBr grado espectroscópico. Las muestras se secaron a 50 ° C durante 48 h antes del análisis.

### 3.2.8 Fotografías SEM

Se realizaron fotografías por microscopía electrónica de barrido en un equipo FEI QUANTA 200, de las muestras metalizadas (sputter SDC-050 Balzers prevacío (<10<sup>-1</sup> torr), argón como gas de ataque (plasma) sobre una placa (cátodo) de oro-paladio (8:2).

## 3.3 Resultados y discusión

### 3.3.1 Hidrólisis enzimática y generación de compuestos fenólicos

En la Figura 3-4 se encuentra la gráficas de los resultados de la hidrólisis enzimática de materiales pretratados con lacasas y en la Tabla 3-2, los resultados del análisis estadístico de acuerdo con el diseño experimental y la metodología de superficie de respuesta. En los experimentos realizados con lacasas, los datos de hidrólisis enzimática se ajustaron a un modelo lineal significativo ( $p < 0,05$ ) con un factor de correlación de 0,76 y una pérdida de ajuste no significativa ( $p > 0,05$ ), lo que indica un buen ajuste de los datos. La Ecuación 3.1, representa el modelo lineal encontrado para %HE en material pretratado con lacasas. La dosis de lacasa fue la única variable independiente que afectó de forma significativa la variable de respuesta % de hidrólisis enzimática (HE) ( $p < 0,05$ ), con un 95% de nivel de confianza como se observa en la Tabla 3-2.

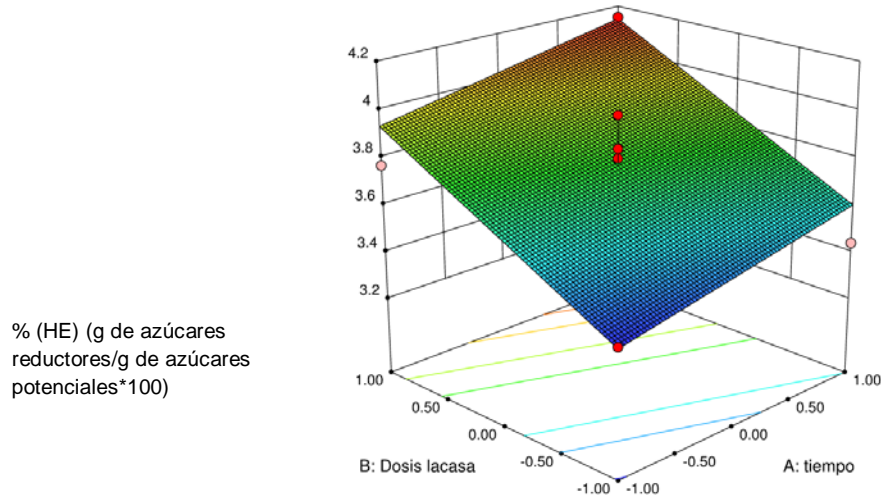
$$\% HE = 3,76857143 + 0,105 \times tiempo + 0,27 \times Dosis lacasa \quad (3.1)$$

En la Figura 3-4 se observa que a mayor dosis de enzima mayor %HE, alcanzando un valor máximo de 4,14%, lo que significa un aumento del 21,41% comparado con el control (%HE=3,41), con un tiempo de 23 horas. Moilanen et al. (2011) aplicaron el tratamiento con lacasas (*Cerrena unicolor*, 1000 nkat/g, 24 h) en materiales de caña común (*Arundo donax*) y abeto rojo (*Picea abies*) pretratados previamente con explosión con vapor, con el cual se logró un aumento en el %HE del abeto rojo y un efecto adverso con la caña. En abeto se logró un aumento del 12% en %HE a las 48 horas comparado con el material sin tratamiento con lacasas, lo que indica que la estructura de la lignina residual tiene un papel importante en la hidrólisis enzimática y que el tratamiento con lacasa afecta la estructura de la lignina aportando de manera positiva o negativa a la hidrólisis enzimática. Palonen and Viikari (2004) estudiaron tratamiento enzimático con lacasas sobre maderas blandas pretratadas con explosión con vapor, logrando un aumento del 13% en la hidrólisis enzimática. El resultado obtenido sobre los residuos de palma no se puede comparar ya que se realizó sobre material original, sin embargo puede deducirse que el tratamiento con lacasas afecta la lignina de tal forma que se obtiene un efecto positivo sobre la hidrólisis enzimática.

En materiales de higuera se optimizó el tratamiento con lacasas (*Pleurotus* sp.) e hidrólisis enzimática (celulasas de *Trichoderma reesei* RUT C30) (pH, temperatura, concentración de enzima, carga de sólidos, tiempo de tratamiento) con lo cual se logró producir 656,92 mg de azúcares reductores/g de material vegetal, es decir 2,28 veces el obtenido en material sin tratamiento con lacasas (Mukhopadhyay et al., 2011). Este valor es muy superior al obtenido con materiales de palma de aceite en el rango de las variables independientes estudiadas, por lo que sería importante estudiar otras variables de proceso.

**Tabla 3-2** Resultados análisis estadístico variable de respuesta % hidrólisis enzimática (HE) (g de azúcares reductores/g de azúcares potenciales\*100) de material tratado con lacasas

	Valor de p
Modelo lineal	0,050
A-tiempo	0,264
B-Dosis lacasa	0,029
Lack of Fit	0,171
r <sup>2</sup>	0,763

**Figura 3-4** Superficie de respuesta %HE, tratamiento con lacasas

En la Tabla 3-3 se reportan los compuestos derivados de la lignina que se detectaron en los líquidos luego del tratamiento enzimático y extracción alcalina. Aunque en este trabajo se determinaron los compuestos presentados en la sección de materiales y métodos (reportados como productos de oxidación de la lignina en los racimos vacíos de palma de aceite (Ibrahim et al., 2005; Mandels & Weber, 1969b)) en la Tabla se presentan sólo los compuestos detectados.

**Tabla 3-3** Resultados de compuestos derivados de la lignina durante el tratamiento con lacasas

Valores experimentales		Valores codificados		Compuestos fenólicos derivados de la lignina mg/g material pretratado						
Dosis lacasa (U/g)	Tiempo (h)	x1	x2	Ácido 4-hidroxibenzoico	Ácido vainillínico	Ac. siríngico	Ac. P-cumárico	Siringaldehído	Ac. ferúlico	Total
21	13	0	0	0,424	0,000	0,000	0,000	0,000	0,235	0,659
21	13	0	0	0,404	0,008	0,021	0,023	0,006	0,079	0,543
2	23	-1	1	0,392	0,019	0,013	0,031	0,011	0,126	0,591
21	13	0	0	0,372	0,005	0,014	0,015	0,186	0,000	0,591
40	3	1	-1	0,416	0,012	0,031	0,027	0,007	0,085	0,578
2	3	-1	-1	0,472	0,026	0,015	0,040	0,026	0,371	0,950
40	23	1	1	0,393	0,014	0,030	0,027	0,000	0,137	0,602
Control		3 h		0,378	0,027	0,026	0,036	0,845	0,243	1,554
		13 h		0,474	0,032	0,125	0,179	0,686	0,560	2,077

	23 h	0,328	0,033	0,117	0,302	0,400	0,469	2,037
--	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

En el tratamiento con lacasas se presenta una fuerte reducción en los ácidos siríngico, cumárico y ferúlico y del siringaldehído, comparados con el blanco, no hay cambios apreciables en el ácido 4-hidroxibenzoico ni en el ácido vainillínico. Como se observa en la Tabla 3-3 la suma de estos compuestos disminuyó en todos los experimentos.

Agarwal et al. (2003) demostró que el tratamiento de pasta de papel con lacasa por sí sola no cataliza la degradación de la lignina, sino que lleva sólo con algunos cambios estructurales y repolimerización. Estos cambios pudieron ocasionar una mejor configuración del material de palma de aceite para la hidrólisis enzimática. En un estudio realizado para identificar la interacción de lacasa y lacasa mediadores (ABTS y HBT) con diversos tipos de lignina, se encontró que con sólo lacasa la cantidad de compuestos de bajo peso molecular derivados de la lignina disminuyeron, debido a la condensación y polimerización de éstos, que ocurre de forma natural para proteger a los hongos de la toxicidad de éstos compuestos (Shleev et al., 2006). Similares resultados se reportaron en el tratamiento con lacasas de maderas blandas pretratadas con vapor, en el cual disminuyó la cantidad de compuestos fenólicos solubles debido a la polimerización (Palonen & Viikari, 2004). Considerando los resultados presentados en la Tabla 3-3, se puede concluir que efectivamente durante el tratamiento con lacasas sobre los residuos de palma se presentó efecto de polimerización de los compuestos derivados de la lignina de bajo peso molecular.

Por otro lado, no se encontró una correlación apropiada para los derivados de la lignina en función de las variables de proceso dosis de lacasa y tiempo de tratamiento, probablemente debido a que la polimerización se realiza de forma aleatoria, considerando la formación de radicales libres durante el proceso de oxidación con lacasas.

Relacionado con el experimento en presencia del mediador ABTS se observó un aumento en el %HE en la medida que aumenta la concentración del mediador (Figuras 3-5 A, B, y C), hasta alcanzar un máximo de 5,1 gramos de glucosa/100 gramos de glucosa potencial en el material hidrolizado, es decir un aumento del 49,6%, bajo las máximas condiciones del experimento (2% de ABTS, 23 horas de tratamiento y 40 U/g de lacasa). La respuesta %HE en los experimentos con lacasa-ABTS se ajustaron a un modelo lineal significativo ( $p < 0,05$ ) con un factor de correlación de 0,74 y una pérdida de ajuste no significativa ( $p > 0,05$ ), lo que indica un buen ajuste de los datos (Tabla 3-4). La Ecuación 3.2, representa el modelo lineal encontrado.

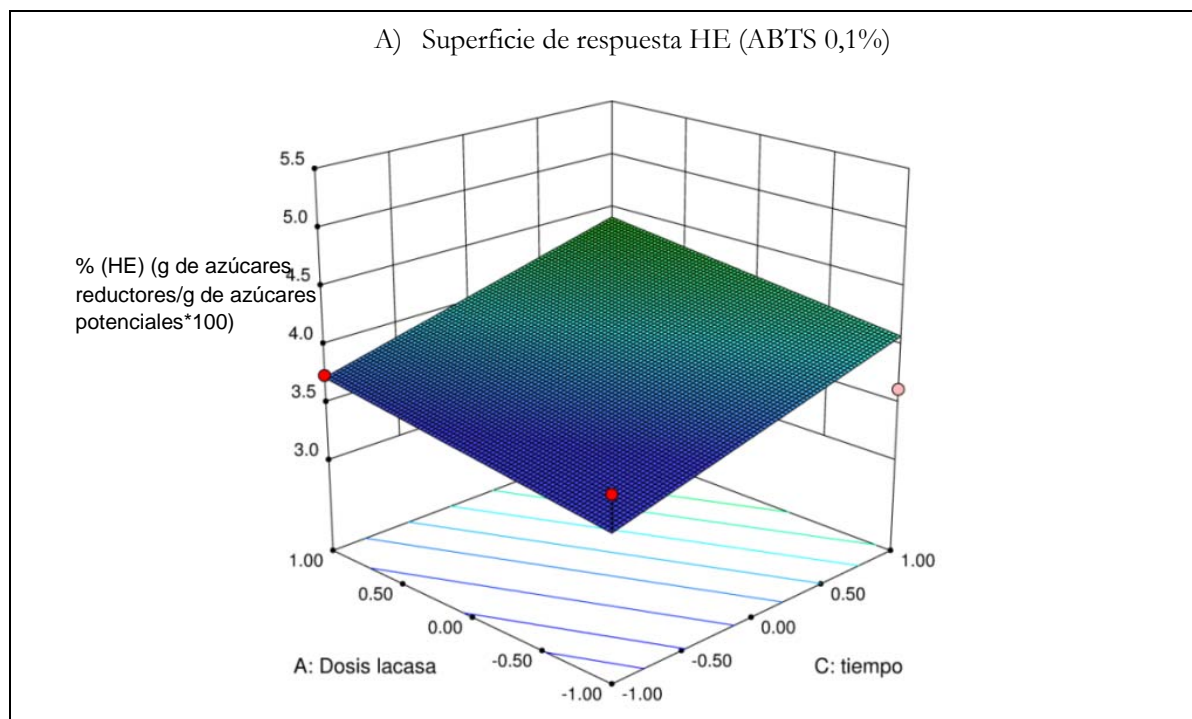
$$\% HE = 4,221839827 + 0,165110714 \times \text{Dosis lacasa} + 0,313644048 \times \text{Concentración ABTS} + 0,345472619 \times \text{tiempo} \quad (3.2)$$

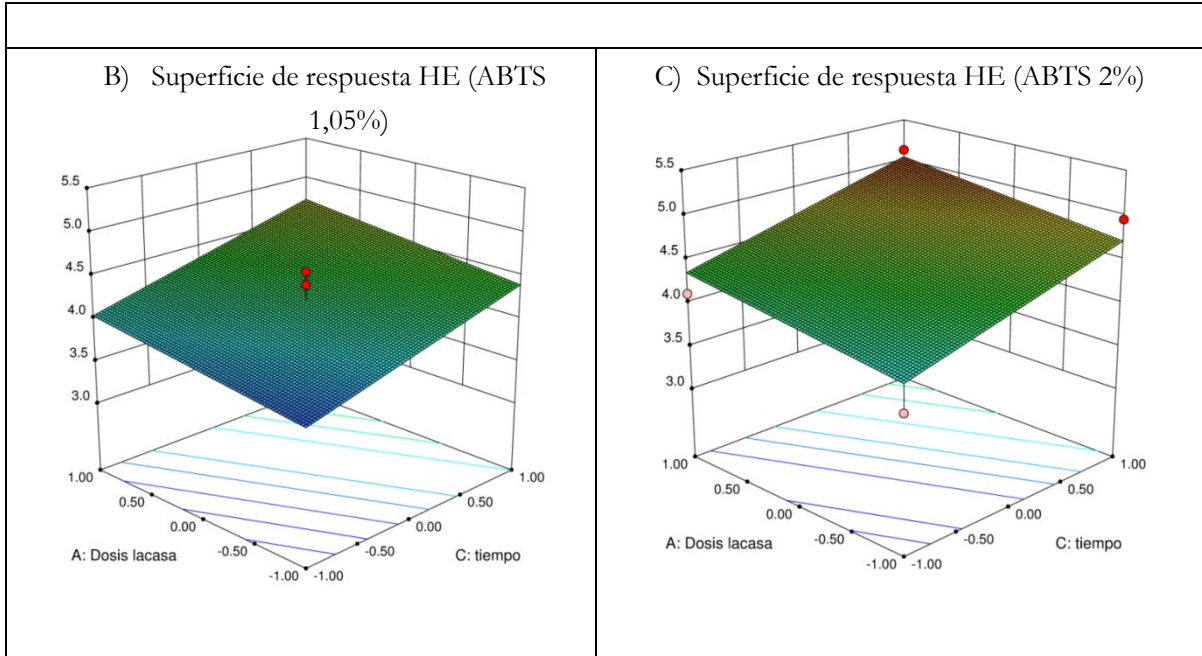
En este experimento los factores que influyeron de forma significativa sobre %HE fueron el tiempo de tratamiento y la concentración del mediador ( $p < 0,05$ ), con un nivel de confianza del 95% (Tabla 3-4). La dosis de lacasa, ya no fue significativa, por lo que se puede concluir que en el tratamiento con lacasa-ABTS, la presencia y concentración del mediador afectan de forma importante el material aumentando la hidrólisis enzimática.

**Tabla 3-4** Resultado análisis estadístico variable de respuesta %HE de material tratado con lacasa-ABTS

	Valor de p
Modelo	0,018
A-Dosis lacasa	0,178
B-Dosis ABTS	0,025
C-tiempo	0,017
Lack of Fit	0,237
R <sup>2</sup>	0,742

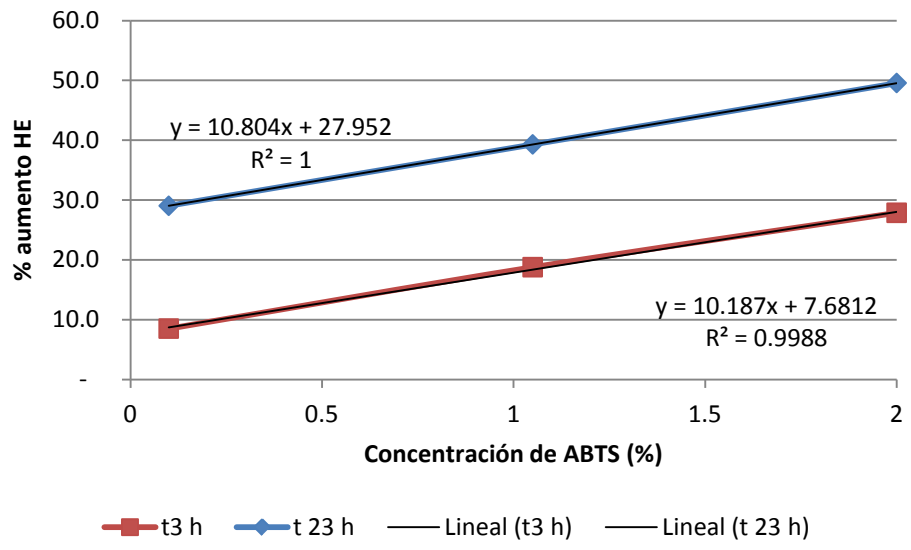
**Figura 3-5** Superficie de respuesta para % de HE de residuos de palma pretratados con lacasa-ABTS





Existe una relación constante entre el aumento en el %HE y la concentración de ABTS, a los tiempos máximo y mínimo estudiados (3 y 23 h) y 40 U/g de lacasa, como se muestra en la Figura 3-6. La pendiente, indica que la diferencia entre el aumento en la %HE/diferencia entre la concentración de ABTS=10,5 en promedio.

**Figura 3-6** Correlación entre el % de aumento en la eficiencia de la hidrólisis enzimática y la concentración del ABTS (40 U/g de lacasas)



Palonen and Viikari (2004) estudiaron el efecto del tratamiento con lacasa-NHA (N-hidroxi-N-fenilacetamida) sobre la hidrólisis enzimática de maderas blandas pretratadas con explosión con vapor,

con lo cual se logró un aumento del 21% en la en la HE. El análisis que se realizó a la superficie del sustrato antes y después del tratamiento reveló un incremento de los grupos carboxílicos sobre el residuo hidrolizado. Debe considerarse que el tratamiento se realizó sobre materiales pretratados con explosión con vapor y la lignina ya se había modificado por lo que no son resultados comparables con los obtenidos con residuos de palma de aceite.

En la Tabla 3-5, se encuentran los resultados de la generación de compuestos fenólicos durante el tratamiento con lacasa-ABTS. Se encontró una disminución significativa de los ácidos siríngico, cumárico y ferúlico y del siringaldehído, comparados con el blanco, de forma similar a lo ocurrido en el tratamiento únicamente con lacasas, por lo que puede deducirse que también ocurrió el efecto de repolimerización de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular. Sin embargo se encontró aumento considerable del ácido vainillínico, el cual puede formarse como resultado de la oxidación del guayacol y ácido sinapínico (Singh Arora & Kumar Sharma, 2010).

**Tabla 3-5** Resultados de compuestos derivados de la lignina durante el tratamiento con lacasa-ABTS

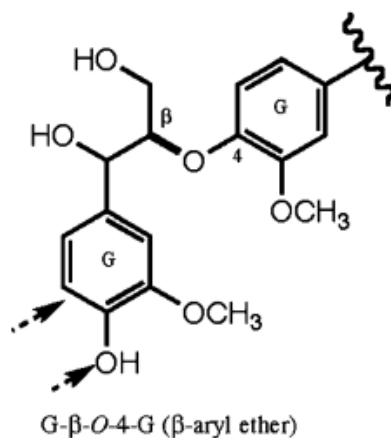
Valores experimentales			Valores codificados			Compuestos fenólicos derivados de la lignina mg/g material pretratado						
Dosis lacasa (U/g)	Concent. ABTS % peso	Tiempo (h)	x1	x2	x3	Ácido 4-hidroxibenzoico	Ácido vainillínico	Ac. siríngico	Ac. P-cumárico	Siringaldehído	Ac. ferúlico	Total
21	1.05	13	0	0	0	0,280	0,280	0,018	0,017	0,000	0,049	0,645
21	1.05	13	0	0	0	0,367	0,367	0,021	0,019	0,000	0,082	0,857
2	2	3	-1	1	-1	0,393	0,393	0,014	0,033	0,019	0,378	1,230
21	1.05	13	0	0	0	0,314	0,314	0,021	0,015	0,104	0,064	0,833
2	0.1	3	-1	-1	-1	0,412	0,412	0,012	0,037	0,013	0,404	1,291
2	0.1	23	-1	-1	1	0,380	0,380	0,011	0,021	0,000	0,106	0,899
40	2	3	1	1	-1	0,347	0,347	0,037	0,015	0,014	0,069	0,829
40	0.1	3	1	-1	-1	0,336	0,336	0,032	0,015	0,000	0,090	0,808
40	0.1	23	1	-1	1	0,411	0,411	0,034	0,031	0,000	0,105	0,991
2	2	23	-1	1	1	0,404	0,404	0,039	0,043	0,020	0,336	1,245
40	2	23	1	1	1	0,366	0,366	0,041	0,024	0,000	0,274	1,072
Control			3 h			0,378	0,027	0,026	0,036	0,845	0,243	1,554
			13 h			0,474	0,032	0,125	0,179	0,686	0,560	2,077
			23 h			0,328	0,033	0,117	0,302	0,400	0,469	2,037

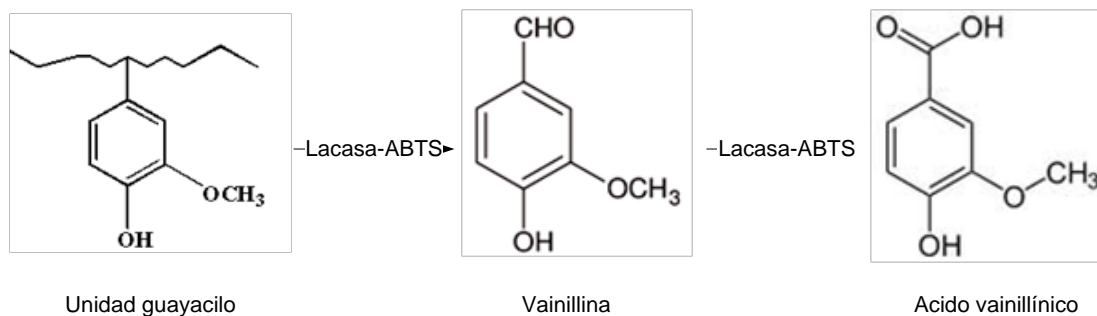


El aumento considerable del ácido vainillínico en los líquidos del tratamiento con lacasas+ABTS, luego de extracción alcalina, indica una fuerte oxidación de los derivados del alcohol coniferílico, es decir unidades guayacilo de la lignina presente en los residuos de palma. Lu et al. (2010) reportó que en la oxidación de las tres unidades monoméricas constituyentes de la lignina p-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo(S), se producen p-hidroxibenzaldehído, vainillina y siringaldehído respectivamente.

Las unidades G en el polímero de lignina están principalmente unidas por enlace  $\beta$ -O-4 y  $\beta$ -5, y la unión de oligómeros se da por enlaces 5-5 y 4-O-5. El enlace  $\beta$ -O-4 (enlace éter Figura 3-6) es el más abundante en la lignina de maderas duras, estando presente hasta en un 80% (Adler, 1977). Este enlace es el más fácil de romper durante el proceso de deslignificación química en el proceso del papel (Wong, 2009). En el tratamiento de oxidación de unidades no fenólicas de lignina model  $\beta$ -O-4 con lacasa-mediador de unidades, se producen reacciones de rompimiento del enlace  $\beta$ -éter, rompimiento  $C\alpha$ - $C\beta$ , oxidación del  $C\alpha$  y rompimiento del anillo aromático (Figura 3-3). Con los resultados obtenidos con los residuos de palma y el tratamiento con lacasa-ABTS, se puede vislumbrar que la reacción más importante es de rompimiento del enlace  $\beta$ -éter, enlace  $C\alpha$ - $C\beta$  (marcados con flechas en la Figura 3-7) y oxidación del  $C\alpha$ . En la Figura 3-8, se encuentra representada la posible secuencia de oxidación ( $C\alpha$ ) de las unidades guayacilo no condensadas de la lignina presente en los residuos de palma hasta ácido vainillínico. Algunos estudios reportan que en el proceso de biodegradación por hongos, el inicio de la formación de radicales fenoxilo en la superficie de la lignina por la lacasa se produce por la oxidación de grupos guayacilo (Malovík et al., 1984), situación que se pudo presentar durante el tratamiento con lacasa-ABTS sobre residuos de palma de aceite.

**Figura 3-7** Subunidades de la lignina  $\beta$ -O-4 (Wong, 2009).



**Figura 3-8** Secuencia de oxidación de unidades de guayacilo por el sistema lacasa-ABTS

Algunos reportes en los que se ha estudiado la heterogeneidad de la lignina de los EFB, mediante la técnica destructiva de oxidación alcalina con nitrobenzeno, se encontró que el mayor componente de los monómeros es el siringaldehído, el cual comprende entre el 39,4-52,7% del total de los productos de oxidación de la lignina y resulta de la degradación de unidades siringilo no condensadas. El segundo producto de la degradación fue la vainillina (28,3-31,6%), resultado de la degradación de unidades guayacilo no condensadas (Almeida et al., 2007). El pretratamiento de lacasa-ABTS al parecer afecta principalmente las unidades guayacilo (G) no condensadas en los residuos de palma, a pesar de su mayor composición de unidades (S). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado en la deslignificación de pulpa de papel proveniente de eucalipto (rica en unidades S), utilizando lacasas y los mediadores HBT, siringaldehído y acetosiringona, proceso en el cual aumentó la relación S/G debido a la remoción preferente de las unidades G (Gutiérrez et al., 2007), confirmado por la técnica de pirólisis acoplada a cromatografía de gases-masas (Py-GC-/MS).

Mandels and Weber (1969b) Por otro lado, se ha reportado que con tratamiento alcalino (5% NaOH) la fracción de lignina del racimos vacíos de palma de aceite extraída se compone principalmente por unidades asociadas al enlace éter -O-4 de unidades S, es decir ácido siringico y siringaldehído (Mandels & Weber, 1969b), como se observa en los blancos, que presentan una alta concentración de siringaldehído. Considerando esta información, no se puede establecer con certeza si el tratamiento con lacasa-ABTS afectó las unidades S, formando ácido siringico y siringaldehído, ya que éstos fueron posteriormente polimerizados por acción de la lacasa, sin poderse cuantificar.

Relacionado con las unidades H, presentes en los residuos de palma de aceite se considera que éstas se encuentran dentro del "núcleo" de la lignina y pueden ocasionar p-hidroxibenzaldehído y el ácido p-

hidroxibenzoico por oxidación del ácido p-cumárico (Lu et al., 2010). Los resultados indican que el tratamiento con lacasa-ABTS no afecta las unidades H, precisamente por impedimentos en la configuración del material. Sin embargo mediante la extracción alcalina se logran obtener algunos derivados de las unidades H.

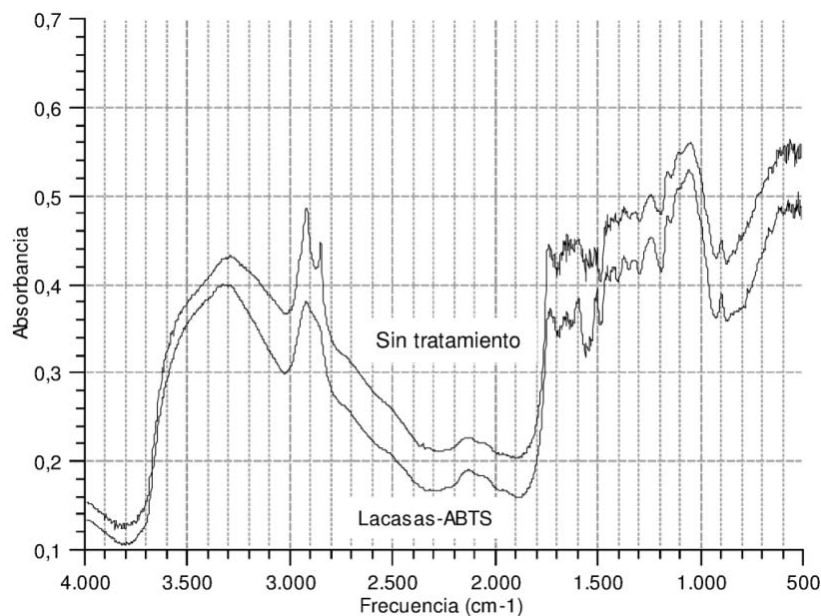
En general, el pretratamiento de lacasa-ABTS, sobre los residuos de palma de aceite provocó un proceso de depolimerización de la lignina, ya que se identificó la formación de compuestos de bajo peso molecular, como lo reportado con diferentes fuentes de lignina (Kraft, pino, organosolventes, alcalina y fragmentos de lignina) y los mediadores ensayados (ABTS, HBT, y SPP (1-(3 -sulfofenil)-3-metilpirazolona) y lacasas de *T. hirsuta*, *Trametes ochracea* y *Trametes pubescens*) (Shleev et al., 2006).

Sin embargo la presencia de lacasa, permitió que se llevara a cabo el proceso de polimerización de los derivados de la lignina, considerando la disminución en algunos de compuestos de bajo peso molecular derivados de la misma. Esto se comprueba ya que la composición de lignina en los materiales sin tratar y tratados es similar (22,10 y 22,63% respectivamente), por lo que en el análisis de lignina insoluble se pudieron cuantificar también fracciones de lignina de menor peso molecular. En un estudio de delignificación con lacasa-HBT de pulpa reciclada de maderas blandas, no se encontraron diferencias en la composición de lignina y carbohidratos (Da Silva et al., 2007).

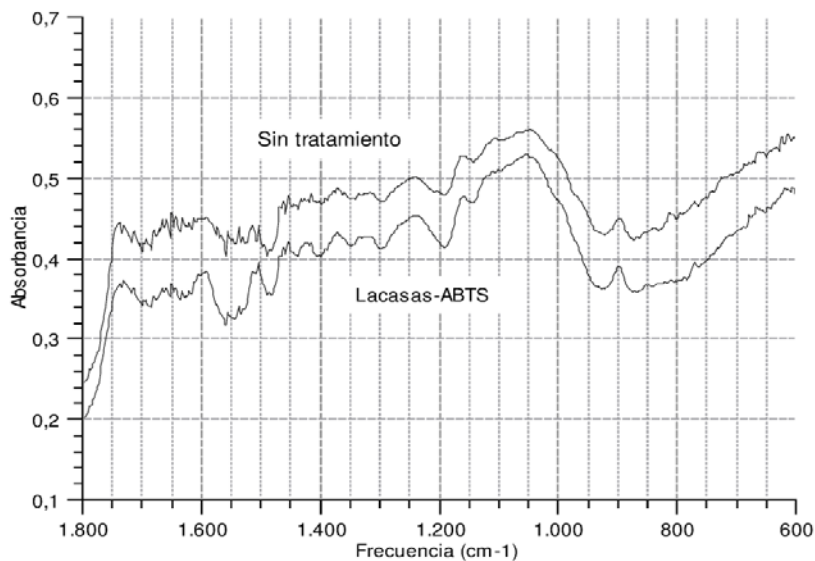
### 3.3.2 Análisis FTIR

En la Figura 3-9 se encuentran los espectros FTIR del material sin tratar y tratados con lacasa-ABTS (2% ABTS, 23 horas, 40 U/g de lacasa). Se observa una disminución leve en la banda a 3345 cm<sup>-1</sup> correspondiente al grupo -OH presente en los anillos fenólicos (Hinkova et al., 2002), los cuales pueden afectarse durante el pretratamiento con lacasa-ABTS, debido a la formación de radicales fenoxilo, los cuales inician el proceso catalítico de las lacasas y que posteriormente se polimerizan vía radicales libres (Gupta et al., 2011).

**Figura 3-9** a) Espectros IR (DRIFT) de residuos de palma sin tratar y tratados con el sistema lacasa-ABTS b) ampliación de la región fingerprint



a)



b)

También se observa una disminución en las bandas a 2923 y 2848 correspondientes a la vibración del enlace C-H en grupos CH<sub>2</sub> (2923 cm<sup>-1</sup>) y CH<sub>3</sub> (2848 cm<sup>-1</sup>), los cuales pueden corresponder a

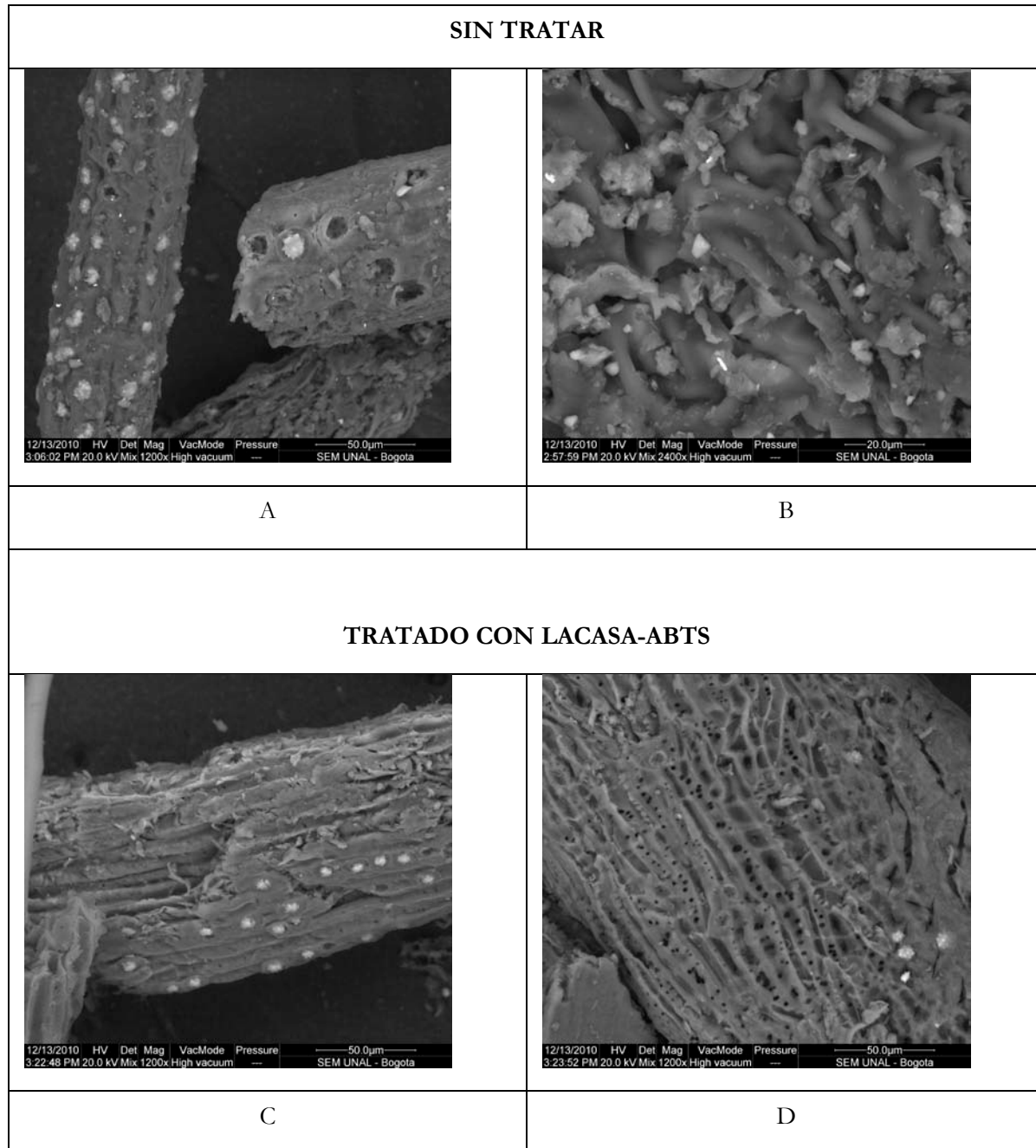
compuestos lipofílicos que se afectaron con el tratamiento con lacasas-mediador. El sistema lacasas/HBT se ha usado en el blanqueamiento de pulpas de papel y para remover extractivos lipofílicos (Gutiérrez et al., 2006; Gutiérrez et al., 2007). En este trabajo también se logró remover parcialmente las capas del material conformado por resinas y materiales lipofílicos, propios de los racimos vacíos de palma de aceite, lo que ocasionó una disminución en la intensidad de las bandas. La remoción de estos compuestos pudo aportar al aumento en la eficiencia de la hidrólisis enzimática.

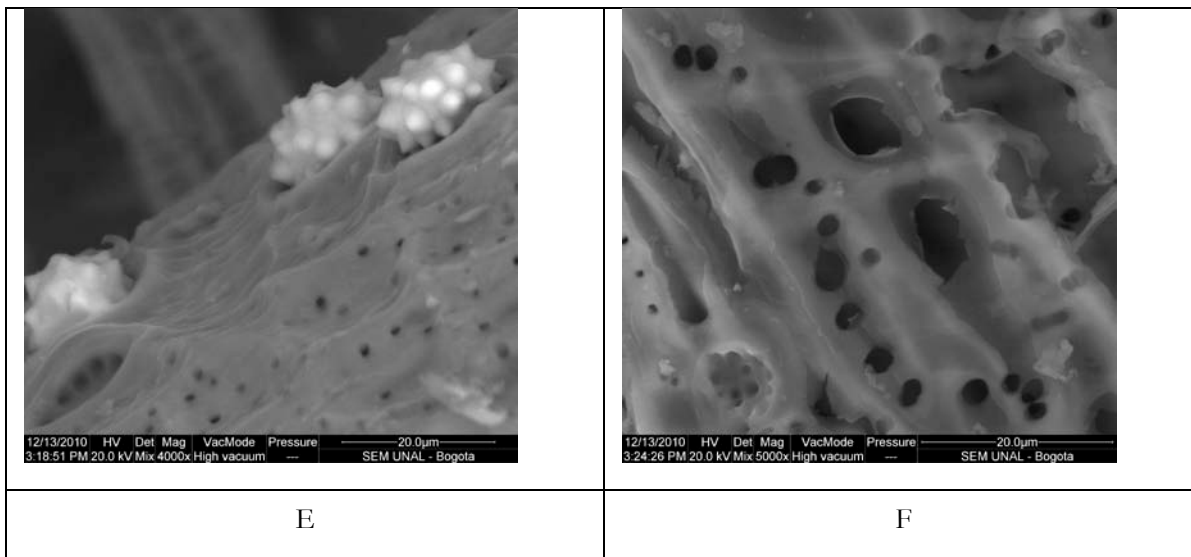
En la Figura 3-8 b se puede observar que la banda de  $1643\text{ cm}^{-1}$  disminuyó con el tratamiento lacasa-ABTS. Esta banda corresponde a la tensión del C=C conjugado con el anillo en alcoholes coniferílico y sinapílico, lo que está relacionado con el consumo de las unidades G, S y H y el rompimiento del enlace  $C\alpha-C\beta$ , durante el pretratamiento.

Las bandas a  $1596\text{ cm}^{-1}$  y  $1506\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a la vibración del anillo aromático, usualmente sirven de bandas referencia en estudios de lignina (Bujanovic et al., 2005). La banda a  $1506\text{ cm}^{-1}$  debida al estiramiento del anillo aromático asimétrico (unidades guayacilo), disminuyó en el tratamiento con lacasa-ABTS, lo cual confirma la afectación de éstas unidades por el tratamiento. La banda a  $1596\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento del anillo aromático simétrico (unidades siringilo), cuya intensidad aumenta debido a la remoción de las unidades G. A  $1659$  y  $1662\text{ cm}^{-1}$  se observa disminución de estas bandas indicando oxidación de cadenas laterales y reacciones de rompimiento del anillo aromático (Gonçalves et al., 1998). La zona de  $1500-1550\text{ cm}^{-1}$  corresponde a derivados aromáticos de la lignina (Behbood, 2005), en la cual se observa disminución en los picos de  $1505$  y  $1515\text{ cm}^{-1}$  y aumento a  $1540\text{ cm}^{-1}$ , debido a la oxidación de estos compuestos durante el tratamiento lacasa-ABTS.

### 3.4 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la Figura 3-10, se pueden observar las diferencias entre los materiales originales: en la superficie de materiales sin tratar se observa la capa cerosa y rugosidades que cubre el material (A y B), mientras que en el material tratado con lacasa-ABTS la superficie se ve más lisa y suavizada, con una reducción significativa de la capa cerosa (C). En el material pretratado se pueden visualizar de mejor forma las perforaciones (D y E) debido a que el borde se encuentra oxidado (F) y degradado por la acción de la lacasa-ABTS. Esto ocasiona que el material tratado se torne de color violeta. Mukhopadhyay et al. (2011) también encontraron degradación de las superficies de los tejidos en materiales de higuera luego de tratamiento de deslignificación con lacasas.

**Figura 3-10** Microfotografías de los materiales sin tratar y tratados con lacasa-ABTS



### 3.5 Conclusiones

Se aplicó tratamiento con lacasa y lacasa-ABTS, con los cuales se modificó la estructura de la lignina, de tal forma que se logró mejorar la eficiencia de la hidrólisis enzimática de los racimos vacíos de palma de aceite. Se logró aumentar un 21,41% de la HE con tratamiento con lacasas mientras que con lacasa-ABTS aumentó en un 49,6%. En los dos tratamientos evaluados (lacasa y lacasa-ABTS) se presentó repolimerización de los derivados de bajo peso molecular, debido a la presencia de lacasas.

En el tratamiento con lacasa-ABTS se logró oxidar unidades G no condensadas, se rompió en enlace  $\beta$ -éter, rompimiento  $C\alpha$ - $C\beta$  y oxidación del  $C\alpha$  por lo que se aumentó de forma considerable ácido vainillínico, como producto final. La afectación de las unidades G, se pudo confirmar por FTIR. En las fotografías de microscopía electrónica, se observa la complejidad de los materiales y cómo el tratamiento enzimático lacasa-ABTS remueve compuestos lipofílicos y oxida y degrada el material principalmente por las perforaciones expuestas.

Este trabajo, muestra los primeros resultados relacionados con la modificación de los residuos de palma de aceite con el sistema lacasa-ABTS, como pretratamiento para la producción de azúcares fermentables.







## 4. Capítulo 4. Combinación de pretratamientos biológicos con tratamientos hidrotérmicos

### 4.1 Tratamientos hidrotérmicos

#### 4.1.1 Agua caliente

Este tratamiento se conoce como autohidrólisis o hidrotermólisis, el cual utiliza agua caliente comprimida (presión por encima del punto de saturación), a temperaturas que oscilan entre 150 y 230 °C (Garrote et al., 1999a) y el tiempo de reacción puede variar desde unos segundos hasta horas, dependiendo de la temperatura. El tratamiento con agua caliente tiene un mecanismo similar a la hidrólisis con ácido diluido, ya que por efecto de la temperatura los iones H<sup>+</sup> derivados de la autoionización del agua causa la despolimerización de la hemicelulosa y la ruptura de los grupos acetilos y formación de ácido acético (Garrote & Parajó, 2002), por lo que se considera que es un tratamiento efectivo para recuperar la hemicelulosa (Sabiha-Hanim et al., 2010) sin presentar inhibición (Laser et al., 2002; Wormeyer et al., 2010).

La solubilización de la hemicelulosa lograda en el tratamiento ocasiona un rompimiento de la estructura lignina-hemicelulosa-celulosa, favoreciendo la posterior hidrólisis hasta azúcares (Ballesteros et al., 2002; Mosier et al., 2005a). En general, el pretratamiento con agua caliente es atractivo debido a que provee un medio reactivo sin la necesidad de catalizadores (Mosier et al., 2005a) por lo que se pueden establecer procesos menos costosos, más seguros y menos contaminantes (Goh et al., 2010).

Mosier et al (2005a) demostraron que en el tratamiento con agua caliente se remueve hasta el 80% de la hemicelulosa, se disuelve el 50% del material de partida utilizando fibra de maíz con un porcentaje de inhibidores menor al 1% y permite alcanzar un 90% de hidrólisis de la celulosa. El tratamiento con agua caliente (170 y 230°C y tiempos entre 1 y 46 minutos) se aplicó sobre bagazo de caña por Laser et al. (2002), encontrando una conversión del 80% de los azúcares presentes en el material, 80% de recuperación de xilanos, sin presencia de niveles significativos de inhibidores de la fermentación. Resultados similares fueron reportados por Dien et al.(2006), para el tratamiento de tusas de maíz, sin embargo se observó que al incrementar la temperatura sobre 160°C, se iniciaba la generación de

inhibidores. En el caso del tratamiento de ramas de palma de aceite Goh et al.(2010) reportó que con bajo condiciones de tratamiento de 178°C y tiempo de 11,1 minutos con una relación solido-líquido 9:6, se obtiene una eficiencia de la hidrólisis enzimática del 92,69%. El mismo grupo de investigación estudió el tratamiento con agua-etanol caliente sobre las hojas de palma de aceite, encontrándose como condiciones óptimas temperatura (180°C), tiempo de reacción (42 min) y porcentaje de etanol (26,4% p/p), bajo las cuales se logró un recuperación del 90,39% de la glucosa potencial de las hojas de palma (Goh et al., 2010b).

Otras condiciones que han sido probadas para el pretratamiento de residuos de arroz y palma son temperaturas de 160 a 220°C, presión de 4 MPa, relación sólido-líquido 1:20 y agitación de 500 rpm. En el caso particular de los materiales de cubiertas de semillas de palma se alcanzó un 58% de eficiencia en la hidrólisis enzimática con tratamiento a 200°C (Zhuang et al., 2009).

### 4.1.2 Explosión con vapor

En este pretratamiento el material lignocelulósico se somete a temperaturas entre 190-230 °C, mediante la inyección directa de vapor, durante un intervalo de tiempo entre 1 y 10 minutos. Tras el tiempo de tratamiento, se somete el material a una rápida despresurización. En el pretratamiento se desagregan y rompen las fibras, ocurre un proceso de depolimerización y se destruyen parcialmente los enlaces lignina-carbohidrato (Moniruzzaman, 1996). Como resultado, se obtiene un producto fibroso cuya celulosa es más accesible a la hidrólisis enzimática. Una de las ventajas de este pretratamiento es el tamaño de partícula requerido (1,5 a 3 cm), reduciendo los costos por molienda (Ballesteros et al., 2001).

La explosión por vapor ha sido reconocida como un método efectivo para el pretratamiento de maderas duras y residuos agrícolas (Oliva, 2003). Este pretratamiento se ha aplicado a múltiples materiales: pastos (Viola et al., 2008a), residuos de trigo (Montane et al., 1998), residuos de olivo (Conde et al., 2009), residuos de cereales trigo avena y cebada (Viola et al., 2008b), bagazo de caña (Laser et al., 2002) y maderas (Castro et al., 2008) entre otros. En la Tabla 4-1 se presentan algunos resultados de la aplicación de este tratamiento sobre diversas biomásas lignocelulósicas. (Quintana et al., 2008) estudiaron la explosión con vapor de racimos vacíos de palma de aceite con el fin de obtener pulpa para papel.

En paja de trigo Bauer et al. (2009) estudiaron el tratamiento de explosión (T 160, 180 y 200° C y t de 10,15 y 20 min) encontrando rendimientos de glucosa 0,135 -0,445 kg kg<sup>-1</sup> materia seca de paja (24-80% de eficiencia de la hidrólisis enzimática). Asada et al. (2011c) reportaron el tratamiento con

explosión con vapor (67 atm y 281° C, t 1-10 min), obteniendo un máximo de 49,6 g de glucosa por cada 100 g de producto pretratado con vapor a presión de 45 atm y 3 min. Este mismo grupo evaluó el tratamiento sobre residuos de álamo 20 atm (214° C), 25 atm (225° C) y 30 atm (235° C) por 5 min, obteniendo como máximo 598 mg de glucosa/g de material original a 25 atm y 25 min (Asada et al., 2011b).

### 4.1.3 Combinación de pretratamientos

Algunos reportes indican que para obtener resultados efectivos del tratamiento biológico con hongos basidiomicetos para la producción de azúcares es necesario combinarlos con otros tratamientos (Salvachúa et al., 2011), por lo que el tratamiento biológico con hongos se ha estudiado previo a tratamiento con explosión con vapor en paja de trigo (Taniguchi et al., 2010; Zhang et al., 2008), tratamiento de ultrasonido sobre cascarilla de arroz (Yu et al., 2009), químico con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre cascarilla de arroz (Yu et al., 2009), ácido diluido (0,25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sobre residuos de jacinto (Ma et al., 2010) y agua caliente sobre residuos de soya y tallos de maíz (Wan & Li, 2011).

De forma posterior al tratamiento biológico se ha evaluado recientemente la combinación con tratamientos alcalinos en tallos de maíz (Yu et al., 2010; Zhong et al., 2011) y paja de trigo (Salvachúa et al., 2011). Con organosolventes sobre aserrín (Itoh et al., 2003) para la producción de azúcares aunque también esta combinación se ha estudiado con el fin de producir pulpa para papel (Ferraz et al., 1996, 1998; Gliese et al., 1996; Mendonça et al., 1997).

Relacionado con la combinación con tratamientos enzimáticos con lacasas mediadores para la producción de azúcares, sólo se encontró el reporte de Palonen y Viikary (2004) quienes estudiaron el tratamiento de explosión con vapor combinado con tratamiento lacasa-NHA (N-hidroxi-N-fenilacetamida) en maderas blandas. Con el fin de producir pulpa para papel esta combinación fue estudiada por Martín-Sampedro et al. (2011).

No se encontraron antecedentes del uso del tratamiento lacasa-ABTS, ni con *Pleurotus ostreatus* en combinación con tratamientos hidrotérmicos con agua caliente y explosión con vapor para la producción de azúcares fermentables.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Materia prima

Los racimos vacíos de palma de aceite, fueron suministrados por la Hacienda La Cabaña en Cumaral-Meta-Colombia. El material se lavó y secó (60°C por 1 semana). Posteriormente se cortó (2-3 cm aproximadamente) y se almacenó a 20°C y 70% HR. Antes de los experimentos se caracterizó en cuanto a su contenido de humedad, extraíbles, celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas de acuerdo a la metodología de la National Renewable Energy Laboratory (NERL) (Sluiter et al., 2006). Los tratamientos hidrotérmicos se realizaron sobre materiales sin tratar y pretratados con: a) *Pleurotus ostreatus* durante tres semanas y b) lacasas-ABTS, 2% de ABTS, 23 h y 21 U/g de lacasa, condiciones seleccionadas de la evaluación de pretratamientos biológicos presentada en los capítulos 2 y 3.

### 4.2.2 Pretratamientos hidrotérmicos

- **Agua caliente**

Los experimentos con agua caliente se realizaron en un reactor de 0,5 L de acero inoxidable, con 0,3 L de volumen efectivo. El reactor fue cargado con 10 gramos de biomasa y 200 mL de agua destilada. El calentamiento se realizó por medio de un baño de aceite a temperatura controlada; una vez alcanzada la temperatura y presión de saturación, se inició el conteo del tiempo de tratamiento. Al terminar el ensayo, se enfrió rápidamente el reactor por inmersión en agua a 0°C. El contenido se filtró con el fin de separar las fracciones para su caracterización.

- **Explosión con vapor**

El pretratamiento de explosión con vapor se llevó a cabo en una unidad piloto basada en la tecnología Masonite y equipada con un reactor de 10 L, ubicado en la Unidad de biomasa del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas CIEMAT (Madrid-España). El reactor fue cargado con 100 gramos de material vegetal (base seca) por cada ensayo, el cual fue impregnado con agua durante 12 horas hasta una humedad del 70%. Se generó vapor saturado en la caldera a 240°C el cual se inyectó al reactor hasta alcanzar temperaturas de 200, 220 y 240°C. La temperatura se mantuvo por cinco minutos, posteriormente se realizó la descompresión súbita hasta presión atmosférica (13,6 psi). El material (sólido tratado y líquido de pretratamiento), fue recolectado del tanque de expansión, se filtró para separar las fracciones para su caracterización.

El análisis de las muestras sólidas y líquidas se realizó de acuerdo a los protocolos del CIEMAT, descritos previamente (Cara et al., 2008). En la fracción sólida resultante de los pretratamientos se

determinó el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina y en la fracción líquida el contenido de compuestos inhibitorios de la fermentación etanólica y de azúcares monoméricos, previa hidrólisis ácida (3%, v/v, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 120° y 30 min).

### 4.2.3 Diseño experimental

Para el desarrollo experimental del tratamiento con agua caliente, se utilizó la metodología de superficie de respuesta en un diseño central compuesto ampliado, factorial 2<sup>2</sup> con tres repeticiones en el punto central. Las variables de proceso fueron temperatura (180-220°C) y tiempo de tratamiento (30-60 min), cuyos valores codificados se presentan en la Tabla 4-3. Relacionado con las variables de respuesta, además de la composición de los materiales, se tuvieron en cuenta las siguientes:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{material pretratado (g)}}{\text{material inicial (g)}} \times 100\% \quad (4.1)$$

$$\% \text{ Eficiencia hidrólisis enzimática (\% HE)} = \frac{\text{glucosa producida por HE(g)}}{\text{glucosa potencial en el material pretratado}} \times 100\% \quad (4.2)$$

$$\text{Hidrólisis enzimática llevada a la materia prima (HE AR MP)} = \frac{\text{azúcares reductores producidos por HE(g)}}{\text{g material inicial}} \times 100\% \quad (4.3)$$

$$\text{Rendimiento global de glucosa (\%)} = \frac{(\text{glucosa producida por HE (g)} + \text{glucosa solubilizada en pretratamiento})}{(\text{material inicial (g)})} \times 100\% \quad (4.4)$$

$$\text{Rendimiento global de xilosa (\%)} = \frac{\text{xilosa producida por HE (g)} + \text{xilosa solubilizada en pretratamiento}}{\text{material inicial (g)}} \times 100\% \quad (4.5)$$

$$\text{Generación de inhibidores} = \frac{\text{masa de compuesto inhibidor (mg)}}{\text{material inicial (g)}} \times 100\% \quad (4.6)$$

$$\text{Recuperación de azúcares hemicelulósicos líquido de tratamiento (\%)} = \frac{\text{xilosa solubilizada en pretratamiento (g)}}{\text{xilosa en el material inicial (g)}} \times 100\% \quad (4.7)$$

Se realizó análisis de varianza, análisis de correlación y optimización del diseño experimental utilizando el software Design-Expert 8.0.6 (Stat-ease, 2010).

Relacionado con el pretratamiento de explosión con vapor, las condiciones evaluadas se presentan en la Tabla 4-1. Las variables de respuesta fueron las mismas que con agua caliente.

**Tabla 4-1** Condiciones experimentales temperatura, tiempo de tratamiento de explosión con vapor, experimentos de explosión con vapor

Material		
Original	Pretratado lacasa-ABTS	Pretratado <i>Pleurotus ostreatus</i>
200°C, 5 min	200 °C, 5 min	200 °C, 5 min
220°C, 5 min	220 °C, 5 min	220 °C, 5 min
240°C, 5 min		

#### 4.2.4 Hidrólisis enzimática (HE)

Los sólidos sin tratar y tratados (biológicamente y/o hidrotérmicamente) fueron hidrolizados enzimáticamente utilizando un complejo enzimático compuesto por celulasas (Celluclast 1.5L - 15 FPU/g sustrato) y  $\beta$ -glucosidasa (NS50010 – 12,6 UI/g sustrato) (Novozymes). La hidrólisis se realizó en buffer de citratos 0,1 M, pH 4,8, a 50°C, en agitación orbital a 150 rpm por 72 horas con una carga de sólidos del 5% (p/v). La hidrólisis se realizó por triplicado y los resultados presentados son el promedio de los resultados. La cuantificación de azúcares reductores, se realizó mediante la reacción de los azúcares con el ácido 5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), utilizando glucosa (Sigma-Aldrich®) como patrón, leyendo la absorbancia a 540 nm. Se determinó la concentración de glucosa en el hidrolizado mediante el kit enzimático (glucose assay kit Sigma GAHK-20).

#### 4.2.5 Determinación de compuestos inhibidores de la fermentación etanólica

Los compuestos fenólicos (ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehído, ácido vainillínico, ácido siríngico, vainillina, siringaldehído, ácido p-cumárico y ácido ferúlico) y derivados del furano (5-hidroximetilfurfural y furfural) se determinaron por cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, utilizando patrones reactivos grado analítico marca Sigma-Aldrich. Se utilizó una columna Chromolith C18 (Merck), temperatura de la columna 30° C, fase móvil compuesta por metanol (40%), ácido acético (1%) y agua (59%) a un flujo de 2 mL/min, gradiente de t=0 min 100% fase móvil, t=9 min 40% metanol y 60% fase móvil, t=10 min 40% metanol y 60% fase móvil y t=12 min 100% fase móvil, detector de UV a una longitud de onda de 270 nm. El ácido acético se determinó utilizando la columna HPX 87H (Biorad), con un flujo de 0,6 mL/min de solución 0,05M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y detector de índice de refracción. Los datos se procesaron en el software Galaxy.

#### 4.2.6 Pruebas de hidrólisis y fermentación simultánea (SSF)

Se realizó prueba de SSF, con los materiales obtenidos bajo las condiciones óptimas del tratamiento con agua caliente en los materiales original, y tratados biológicamente (*Pleurotus ostreatus* y lacasa-ABTS). Se realizó hidrólisis enzimática por 8 horas y fermentación por 64 horas, suplementando el buffer con (g/L): Extracto de levadura 2,5; NH<sub>4</sub>Cl 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,3. Las condiciones de la hidrólisis fueron las mismas y la fermentación se realizó a 32°C, a 100 rpm. Se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* comercial. La cuantificación de etanol se realizó por cromatografía de gases, detector FID, columna BP 20, temperatura del inyector y el detector de 175°C.

#### 4.2.7 Análisis FTIR

A los sólidos tratados se les realizó análisis de espectroscopía de reflectancia difusa, en espectrofotómetro FTIR Shimadzu Prestige – 21, detector DLATGS, resolución de 4 cm<sup>-1</sup> y 100 scan, rango 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>. Las muestras fueron diluidas a 1% en KBr grado espectroscópico. Las muestras se secaron a 50 ° C durante 48 h antes del análisis.

#### 4.2.8 Fotografías SEM

Se realizaron fotografías por microscopía electrónica de barrido en un equipo FEI QUANTA 200, de las muestras metalizadas (sputter SDC-050 Balzers prevacío (<10<sup>-1</sup> torr), argón como gas de ataque (plasma) sobre una placa (cátodo) de oro-paladio (8:2).

### 4.3 Resultados y discusión

#### 4.3.1 Composición de los materiales base

En la Tabla 4-2, se presentan los resultados experimentales de la composición de los materiales antes de someterlos a tratamientos hidrotérmicos. La principal diferencia es la concentración de celulosa, la cual es mayor en el material pretratado con PL, debido al consumo de la lignina por parte del hongo durante el tratamiento biológico. Otro aspecto importante es el contenido de extraíbles, el cual ha disminuido de forma notable en el material pretratado con lacasa-ABTS. No hay diferencias significativas entre el contenido de lignina ni hemicelulosa.



**Tabla 4-2** Caracterización de materiales base

		MATERIAL					
		ORIGINAL		PRET. <i>Pleurotus ostreatus</i>		PRET. Lacasa-ABTS	
COMPUESTO (%)		Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
Extraíbles		7,92		9,88		5,93	
Cenizas		2,94	0,00	2,88	0,02	1,73	0,07
Grupos acetilo		6,62	0,43	5,93	0,30	7,17	0,22
Lignina total		22,10		21,81	0,17	22,63	0,31
	Lign insoluble	20,17	0,38	19,76	0,11	20,48	0,29
	Lign soluble ácido	1,93	0,21	2,05	0,06	2,15	0,03
Hemicelulosa		26,24	0,60	26,04	1,16	24,94	0,42
	% xilosa	22,23	0,39	21,54	1,09	22,26	0,11
Celulosa		37,95	0,06	40,25	2,31	36,63	0,43
	% glucosa	41,74	0,06	44,28	2,55	40,30	0,47
TOTAL		103,76	1,09	106,78	3,96	99,03	1,45

### 4.3.2 Combinación de tratamientos biológicos con agua caliente

- **Recuperación y composición de los materiales sólidos**

En la Tabla 4-3 se presenta la composición de los materiales pretratados, y los valores de recuperación de sólidos después del tratamiento. Los datos recuperación de los sólidos con todos los materiales, se ajustan a modelos lineales ( $p < 0,05$ , lack of fit  $> 0,05$ ) y es afectada de forma significativa únicamente por la temperatura ( $p < 0,05$ ). Se observa disminución en la recuperación de los sólidos con un aumento en la temperatura de tratamiento, debido a la mayor solubilización del material. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Sabiha.Hanim et al. (2010) tratando follaje de palma de aceite y por Perez et al (2008) en paja de trigo.

Con respecto a la composición de los sólidos, presentada en la Tabla 4-3 se observa una mayor concentración de las fracciones de lignina y celulosa, debido principalmente a la solubilización de la fracción de hemicelulosa, lo cual se ha reportado en residuos de olivo (Ballesteros et al., 2002).

La lignina pasa de valores de 22% aproximadamente a valores comprendidos entre 36-40%. Esta variable se comporta linealmente (modelo lineal  $p < 0,05$ , lack of fit  $> 0,05$ ) y se ve afectada de forma significativa únicamente por la temperatura ( $p < 0,05$ ). Aunque el contenido de lignina es similar en los materiales sin tratar (Tabla 4-2), en materiales pretratados con PL y lacasa-ABTS y sometidos a tratamiento con agua caliente, el contenido de lignina es ligeramente inferior debido a la diferente configuración de la lignina del material pretratado biológicamente. Relacionado con la hemicelulosa se encontró que a las menores temperaturas de proceso se conserva un mayor porcentaje de hemicelulosa en los sólidos, especialmente en los pretratados con PL, lo que puede deberse a las diferencias

---

estructurales de la misma por el tratamiento biológico; al parecer la hemicelulosa presente en el material pretratado con PL puede tener una fracción más resistente a la temperatura, debido al consumo de los polisacáridos más simples por parte del hongo. Sabiha-Hanim et al. (2010) reportaron que sobre hojas de palma de aceite, la autodrólisis a condiciones leves (121°C, 20-80 min) produce materiales sólidos con porcentajes entre 51,6-62,3%. Similares resultados reportaron Nabarlatz et al. (2007) quienes trataron tusas de maíz, cáscaras de almendras y residuos de olivo a condiciones de mayor severidad (179° C, 23 min) conservando contenidos de hemicelulosa entre 33-35%. A temperatura similar (180°C), los residuos de palma de aceite conservaron porcentajes de hemicelulosa comprendidos entre 5,9 y 14,8%. A temperaturas de 220°C, los niveles de hemicelulosa son muy bajos o no detectables en todos los materiales. Wan y Li (2011) estudiaron el tratamiento combinado agua caliente-tratamiento biológico con *Ceriporiopsis subvermispota*, sobre tallos de maíz con lo cual se logró un 13% más de la degradación de lignina y un 20% más de la hemicelulosa, comparado con el tratamiento biológico únicamente. En residuos de soya la degradación de la lignina alcanzó un 36,7% y un 41,42% de hemicelulosa, mientras que los tratamientos aplicados de forma individual no afectaron el material de forma significativa. Sin embargo estos valores no se pueden comparar ya que en este trabajo se evaluó el tratamiento combinado inverso.

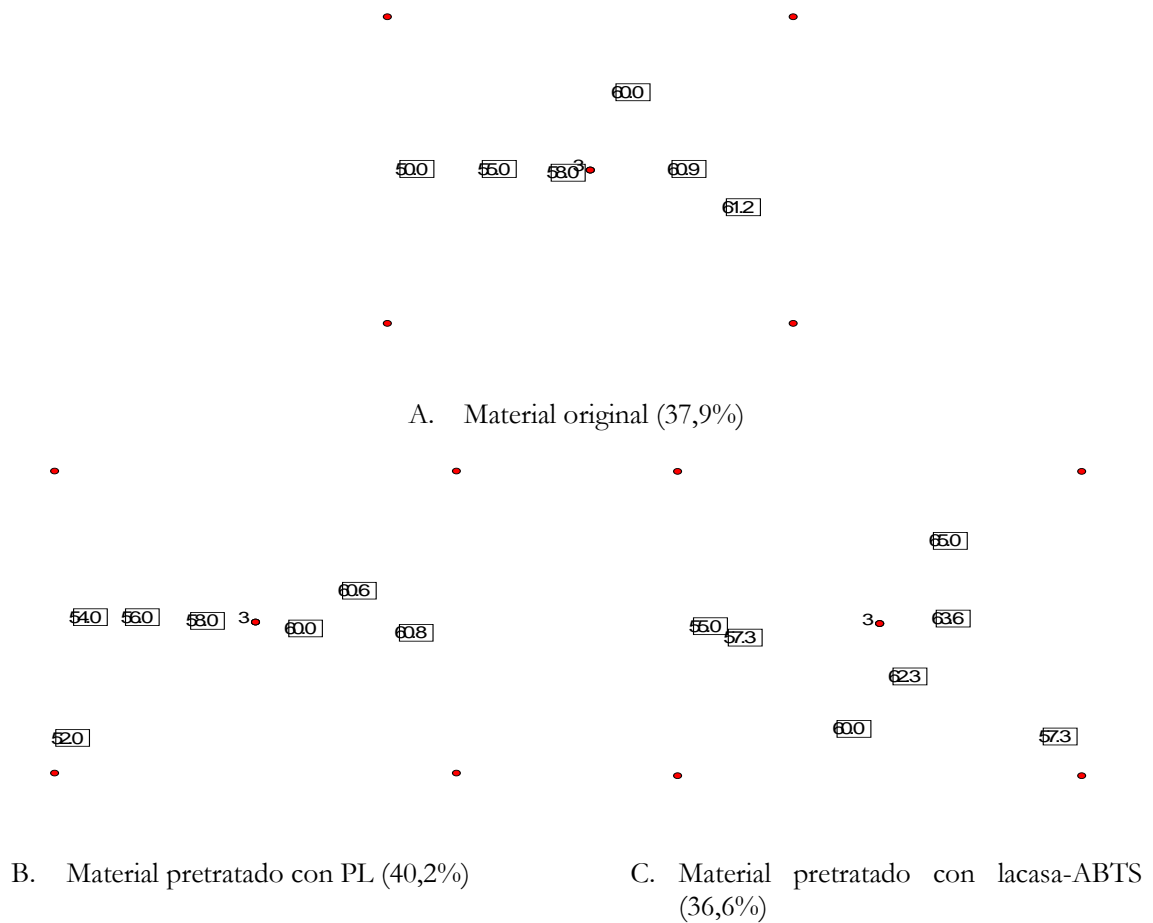
Una de las diferencias más importantes observadas en la composición de los materiales de palma de aceite es el % de celulosa. Los valores experimentales obtenidos de este componente con todos los materiales se ajustan a modelos cuadráticos ( $p < 0,05$ , lack of fit  $> 0,05$ ). En la Figura 4-1 se presentan los contornos de las superficies obtenidas, en los cuales se puede observar que a bajas temperaturas (180°C) se encuentran mayores contenidos en los materiales tratados biológicamente que en el material original. Se encontró que el porcentaje de celulosa en el material pretratado biológicamente con PL y lacasa-ABTS es 14,61% y 19,11% más comparado con el material original. Esto indica que el tratamiento biológico en combinación con agua caliente favorece la obtención de materiales enriquecidos en celulosa a bajas temperaturas. A temperatura de 220°C, no hay diferencias entre los materiales y a temperaturas superiores se inicia la degradación de la celulosa.



**Tabla 4-3** Composición de los materiales pretratados (ND No detectable)

Valores codificados		Variables de proceso		Recuperación de sólidos (base seca) (%)			Lignina (%)			Celulosa (%) <sup>a</sup>			Hemicelulosa (%) <sup>b</sup>		
X1	X2	T (°C)	t (min)	Original	PL	Lac	Original	PL	Lac	Original	PL	Lac	Original	PL	Lac
-1,4	0	172	45	86,5	82,2	85,0	27,1	26,1	25,1	40,8	47,3	49,6	9,9	8,1	12,0
-1	-1	180	30	79,5	86,3	76,4	30,1	24,3	28,6	44,5	51,0	53,0	9,1	14,5	9,3
-1	1	180	60	74,8	81,0	68,4	31,0	28,2	31,5	49,7	54,5	51,3	5,9	12,4	14,8
0	-1,4	200	24	66,9	63,6	60,0	31,5	29,5	30,0	56,4	58,4	61,9	2,5	9,3	0,0
0	0	200	45	67,4	69,3	60,3	31,6	30,4	29,4	59,3	59,3	61,3	2,0	11,4	1,6
0	0	200	45	68,4	68,0	66,6	33,2	30,0	33,4	60,1	60,1	60,8	1,7	10,2	2,0
0	0	200	45	62,5	66,0	63,4	32,5	31,1	31,4	57,1	58,1	61,0	1,2	9,9	1,8
0	1,4	200	66	66,4	67,2	59,4	34,4	31,8	32,6	58,7	58,7	61,6	1,3	9,0	1,5
1	-1	220	30	60,6	58,7	55,1	36,8	34,2	34,0	59,5	59,1	61,9	1,3	ND	1,3
1	1	220	60	55,2	57,8	53,9	37,5	38,6	38,0	57,6	59,6	60,7	0,3	ND	0,8
1,4	0	228	45	53,9	49,9	49,1	39,6	37,1	37,9	60,6	61,2	62,6	ND	ND	ND
		Control					22,1	21,8	22,6	37,9	40,2	36,6	26,2	26,0	24,9

**Figura 4-1** Contornos de la superficie de respuesta para % de celulosa en materiales pretratados con agua caliente. En paréntesis se muestra el % de celulosa del material de partida



- **Componentes de los líquidos de tratamiento**

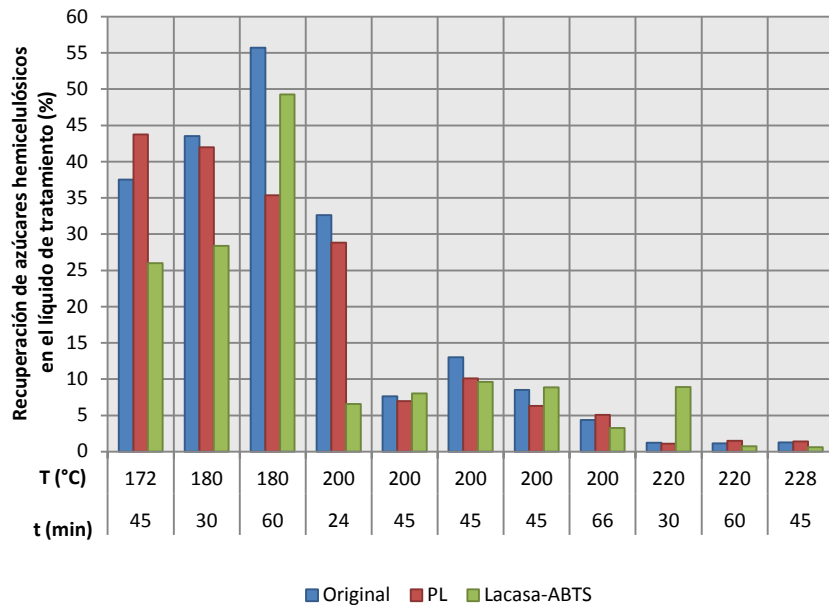
En las Figuras 4-2 y 4-3 se encuentra la recuperación de azúcares hemicelulósicos y la generación de compuestos inhibidores de la fermentación etanólica en el líquido de tratamiento, respectivamente. Se observa que los mayores valores de recuperación de la hemicelulosa se presentan con material original (56%) y pretratado con lacasa-ABTS (48%), a las condiciones de 180°C y 60 min; a temperaturas superiores, la recuperación se reduce, debido principalmente a la degradación de la hemicelulosa compuesta mayoritariamente por xilosa. Rogalisnki et al (2008) reportó que a largos tiempos de reacción, la biomasa puede ser solubilizada y los polisacáridos pueden degradarse para formar componentes de menor peso molecular, lo que pudo suceder en este trabajo con temperaturas superiores a los 200°C en el material original y en el pretratado con lacasa-ABTS. En materiales pretratados con PL, la máxima recuperación (44%) se logra a 172°C y 45 minutos, es decir bajo la condición de menor severidad, a temperaturas superiores la hemicelulosa se degrada. Esta diferencia

puede ser ocasionada por los cambios ocurridos en el material durante el pretratamiento con el hongo PL y hacen que la hemicelulosa recuperada inicie su degradación a menores severidades de tratamiento con agua caliente.

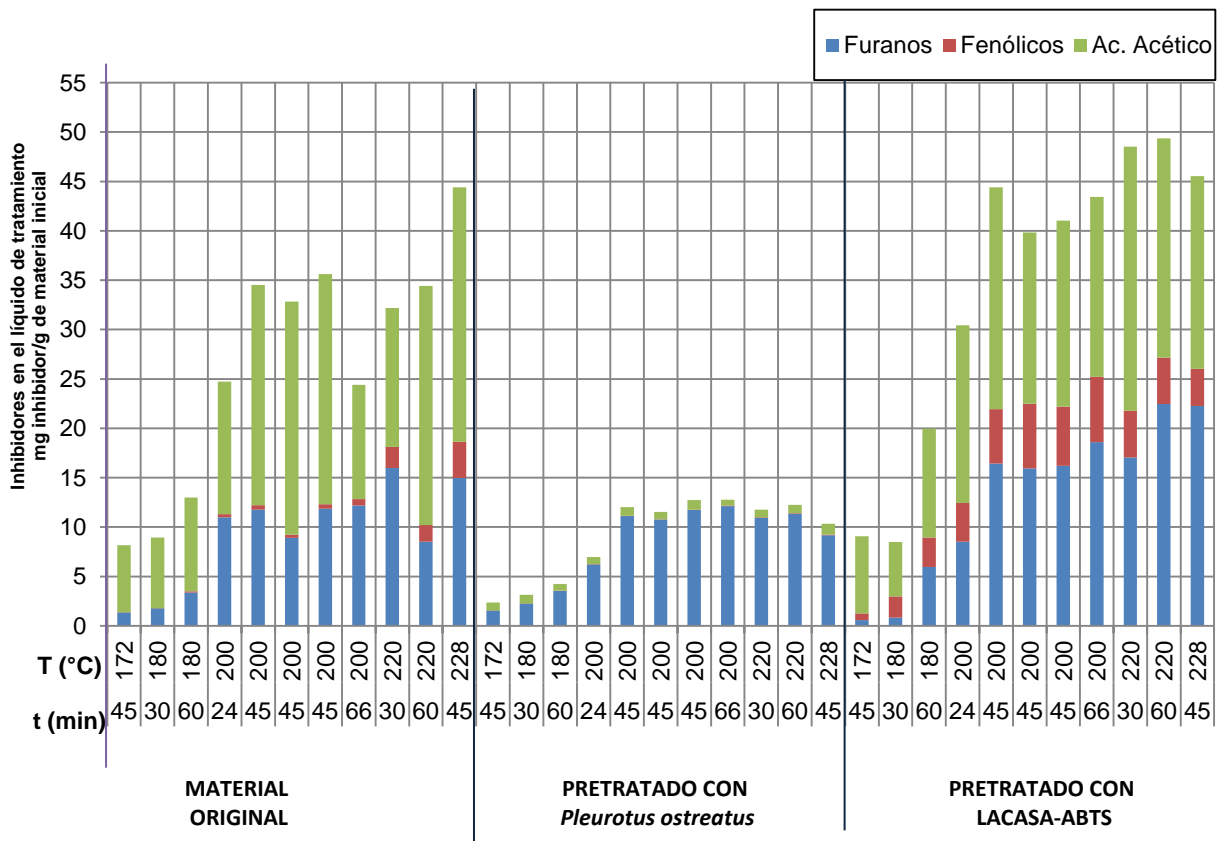
Relacionado con la generación de compuestos inhibidores, se realizó la clasificación en productos de la degradación de los azúcares (derivados del furano) de la lignina (compuestos fenólicos) y ácido acético. En la Figura 4-3 se observa que los menores niveles de compuestos inhibidores tanto de ácido acético como de compuestos fenólicos se encontraron con material pretratado con PL, debido a la diferente configuración de sus componentes, especialmente de lignina y polisacáridos luego del tratamiento biológico. En el Capítulo 2, se discutió acerca del consumo de grupos acetilos por parte de los hongos de la podredumbre blanca, lo que ocasionó que se redujera la generación de ácido acético. Esto influyó en la menor producción de derivados del furano. Se puede observar que en los tratamientos en los cuales se produjo mayor cantidad de ácido acético también se produjo mayor cantidad de furfural e hidroximetil furfural, lo cual está de acuerdo con lo reportado previamente por Roberto et al. (2003), quienes concluyeron que la concentración de furfural se incrementa con el aumento del tiempo de reacción y la concentración de ácido acético.

En cuanto a los compuestos fenólicos se encontró la máxima producción en material pretratado con lacasa-ABTS, debido a la posible depolimerización de los polímeros de longitud corta formados durante el tratamiento enzimático y que se discutió en el Capítulo 2.

**Figura 4-2** Recuperación de hemicelulosa en el líquido de tratamiento, expresada como un porcentaje de la hemicelulosa presente en el material inicial



**Figura 4-3** Generación de compuestos inhibidores, expresados como mg de inhibidor por gramo de material de entrada al tratamiento con agua caliente



Previamente ha sido reportado que el tratamiento con agua caliente permite la recuperación de los xilanos sin causar altos niveles de inhibición (Laser et al., 2002). Debe considerarse que se pudo generar otros productos derivados de la degradación de la hemicelulosa, ya que se produce furfural y luego por degradación se pueden formar otros compuestos como el furano, ácido levulínico, ácido furónico, entre otros (Ramos, 2003).

- **Hidrólisis enzimática**

En la Tabla 4-4, se presentan los datos de %HE, la cual indica la eficiencia de la hidrólisis enzimática para la producción de glucosa, es decir la cantidad de glucosa generada por HE a partir de la glucosa potencial presente en la celulosa. A temperaturas bajas de tratamiento los mayores valores se obtuvieron en el material pretratado con PL, lo que indica que la combinación con agua caliente a bajas condiciones de severidad aumenta de forma significativa la digestibilidad enzimática del material, lo que favorece la economía del proceso. Sin embargo a temperaturas de 220°C, los %HE son similares. Se encontró de forma general que el %HE aumenta con la severidad el tratamiento como previamente se ha reportado (Ballesteros et al., 2002; Pérez et al., 2008; van Walsum et al., 1996). Además se considera que la mayor remoción de hemicelulosa a mayores temperaturas, mejora la accesibilidad de las enzimas al (Goh et al., 2010).

Por otro lado se observó, que aunque se logró un mayor porcentaje de celulosa en el material pretratado con lacasa-ABTS comparado con el material original, la eficiencia de la hidrólisis es menor.

Algunos estudios reportan que durante los tratamientos hidrotérmicos la lignina fragmentada reacciona entre sí o con los oligosacáridos para formar moléculas de mayor tamaño que precipitan como un residuo sólido (Liu & Wyman, 2005), lo que podría causar una disminución en la eficiencia de la hidrólisis enzimática como lo reportado por Wan y Li (2011), quienes encontraron que el rendimiento de glucosa disminuyó con el pretratamiento combinado (agua caliente-degradación por hongos) de tallos de maíz, pasando de 56% en el tratamiento biológico al 52% con el tratamiento combinado. Esto sugiere que el arreglo de la estructura de la lignina ocurrida durante el tratamiento con agua caliente hace que los polisacáridos sean más susceptibles a la hidrólisis enzimática, pero con material pretratado previamente con lacasa-ABTS, la nueva configuración hace que ésta disminuya.

Otro factor que pudo afectar el %HE puede ser el efecto de adsorción de las enzimas sobre la superficie del material pretratado. Se ha reportado que materiales con alto contenido de lignina



adsorben las celulasas (Chang & Holtzaple, 2000), lo que hace que la cantidad de enzima que accede al sustrato sea significativamente menor.

**Tabla 4-4** Recuperación de los azúcares por combinación de pretratamientos biológicos con agua caliente

Variables de proceso		%Hidrólisis enzimática de la celulosa		
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Original	PL	Lac
172	45	22,14	48,19	20,05
180	30	28,11	55,54	23,70
180	60	32,94	52,90	32,00
200	24	55,32	59,21	43,50
200	45	53,26	61,90	48,92
200	45	50,32	57,91	48,40
200	45	53,74	57,26	48,88
200	66	58,27	56,25	46,15
220	30	68,59	70,59	53,89
220	60	72,53	66,67	54,67
228	45	66,05	70,19	49,98
Control		2,79	4,32	2,61

Wan y Li (2011) estudiaron el tratamiento con agua caliente (170°C, 3 min) en combinación con tratamiento biológico con *Ceriporiopsis subvermispora* durante 15 días aumentó la degradación de residuos de soya, con lo cual se removió el 36,7% y se logró un %HE del 64,25%, mientras que en tallos de maíz no se encontró efectividad en la combinación mientras el rendimiento de glucosa fue de 56% y en combinación del 52%.

Por otro lado es importante comparar la producción de azúcares fermentables en relación a la materia prima, para lo cual se realizó la comparación de la producción de azúcares reductores por hidrólisis enzimática con respecto al material de partida (HEARMP), considerando la recuperación de los sólidos en el pretratamiento biológico y en el tratamiento con agua caliente. En la Figura 4-4, se encuentran las superficies de respuesta y contornos para éste parámetro.

Los valores experimentales se ajustan a valores modelos cuadráticos, los cuales presentaron valores significativos ( $p < 0,05$ ) y valores de lack of fit no significativos, con valores de  $r^2$  superiores a 0,95, lo

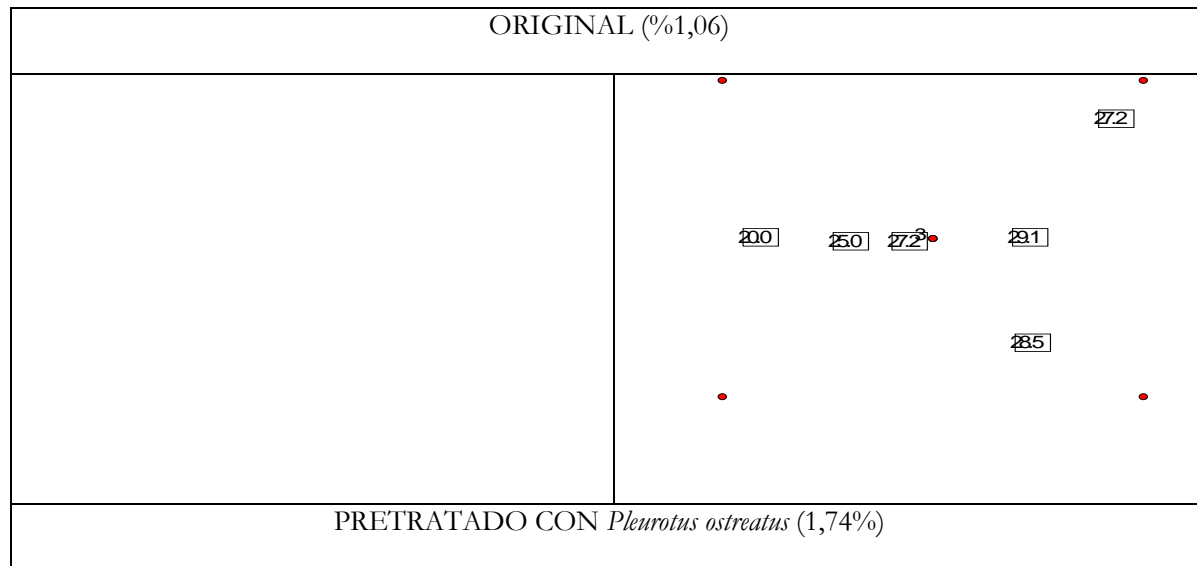
que indica un adecuado ajuste de los datos. Los resultados del análisis de varianza y coeficientes del modelo se presentan en la Tabla 4-5.

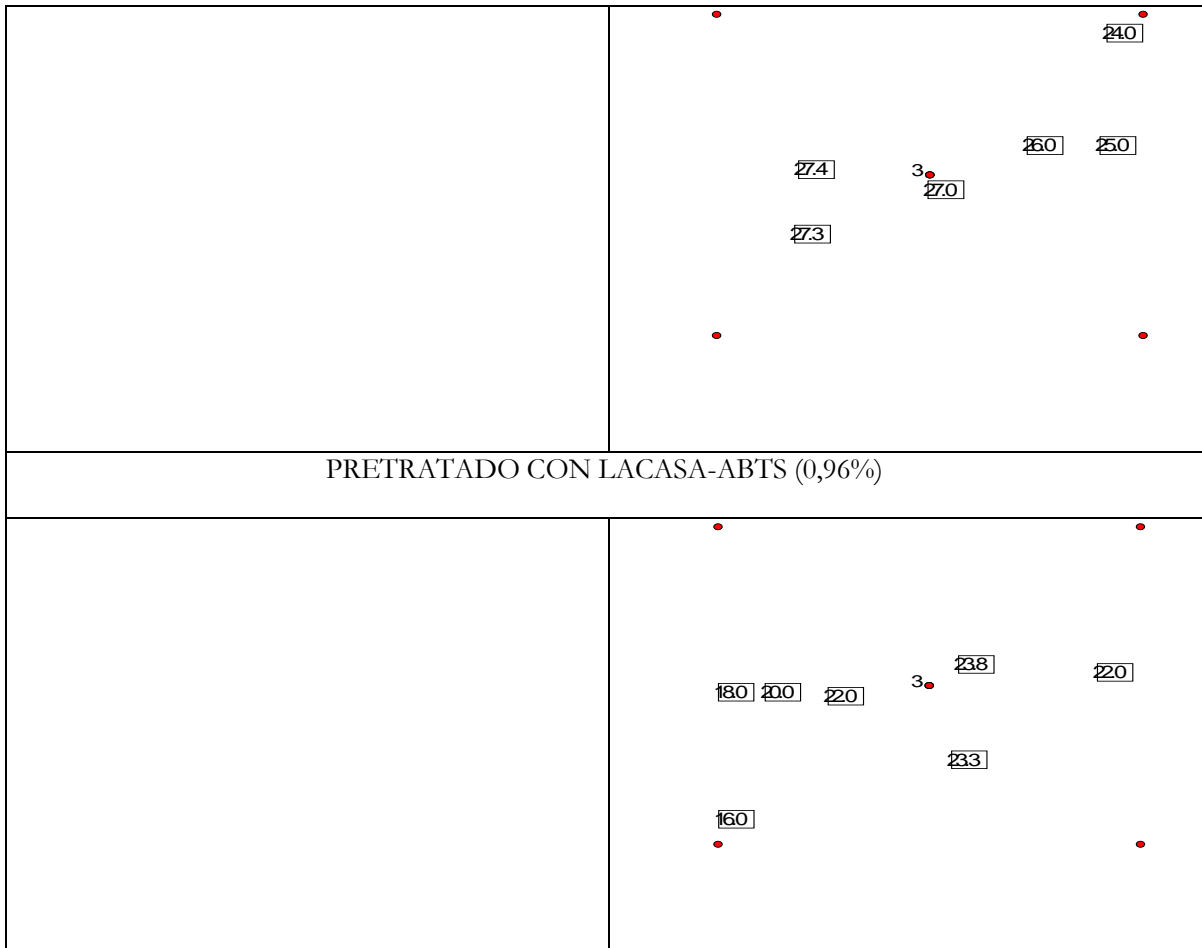
**Tabla 4-5** Resultados del análisis de varianza (ANOVA) (Valores p) y coeficientes de modelo cuadrático

	Original	PL	Lacasa-ABTS
	p-value		
Modelo	< 0,0001	0,0498	0,0015
Lack of Fit	0,0517	0,2882	0,5930
R-Squared	0,794	0,835	0,962
Coeficientes del modelo			
	27,909	27,072	23,579
A-Temperatura	5,132 <sup>a</sup>	-1,228 <sup>a</sup>	2,020 <sup>a</sup>
B-tiempo	0,540	-0,249	0,386
AB	-1,260	-0,424	-0,750
A <sup>2</sup>	-5,437 <sup>a</sup>	-1,156 <sup>a</sup>	-4,321 <sup>a</sup>
B <sup>2</sup>	-1,304 <sup>a</sup>	-0,670	-1,441 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95%

**Figura 4-4** Hidrólisis enzimática llevada a la materia prima (HEARMP)



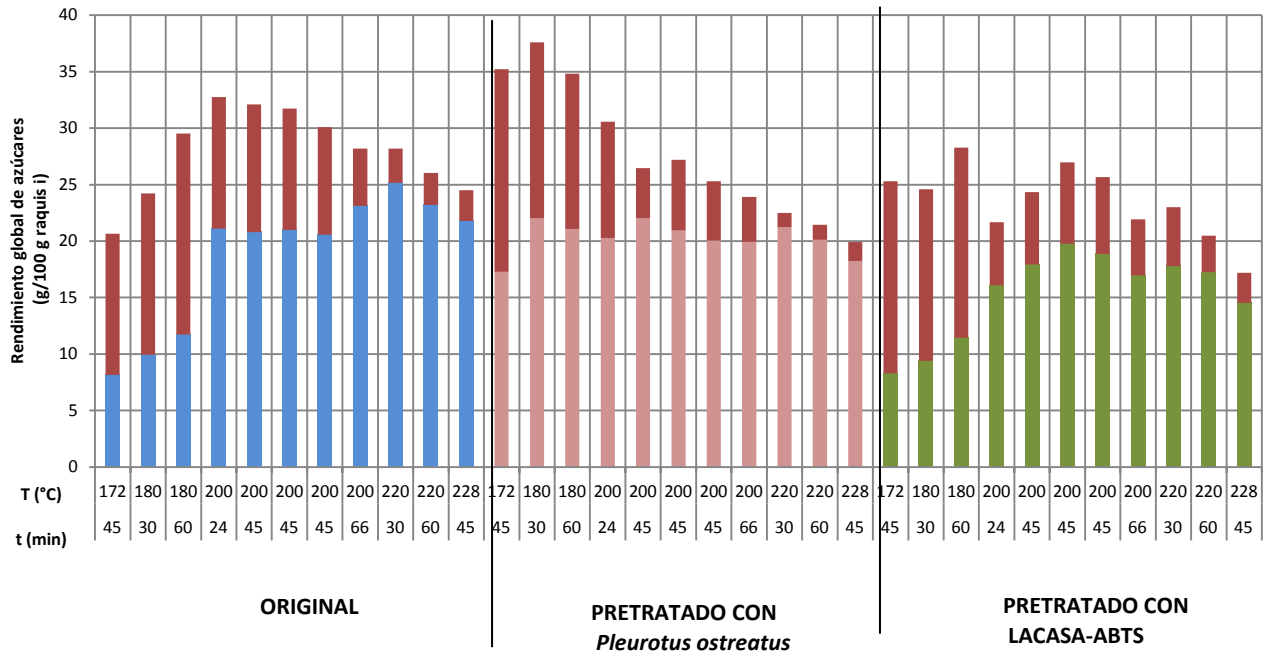


El mayor valor %HE AR MP obtenido se logró con material original ( $T^{\circ}$  210°C), el cual es 6,2% y 18% mayor que los obtenidos en materiales pretratados con PL y lacasa-ABTS respectivamente. En material PL, a pesar de lograr los mayores %HE, la pérdida de masa durante el tratamiento biológico, afecta los rendimientos sobre la materia prima de partida. Se hace referencia sólo a la temperatura considerando que esta variable fue estadísticamente significativa en todos los casos ( $p < 0,05$ ).

Relacionado con los rendimientos globales de azúcares (glucosa + xilosa) (Figura 4-5) , que incluye no solamente los azúcares producidos por hidrólisis enzimática sino los obtenidos en el líquido de tratamiento, el máximo valor se obtiene con los materiales pretratados con PL, seguido del material original y por último el tratado con lacasa-ABTS. El máximo valor obtenido fue de 37%, equivalente al 60% de la recuperación de los azúcares presentes en el material sin tratar. Este valor es un 14% más que en material original sin considerar las ventajas por el consumo de energía, ya que la condición es 180°C. En esta misma gráfica se muestra la recuperación de xilosa, dada en su mayoría por solubilización durante el tratamiento, la cual se mostró en la Figura 4-2. Goh et al (2010) estudió el

tratamiento de agua caliente en hojas de palma encontrando una recuperación de glucosa entre 21,36-88,97%, requiriendo un tiempo corto y alta temperatura para recuperar la glucosa.

**Figura 4-5** Rendimiento global de azúcares obtenidos en el tratamiento con agua caiente (barras superiores corresponden a xilosa mientras las inferiores son las de glucosa)

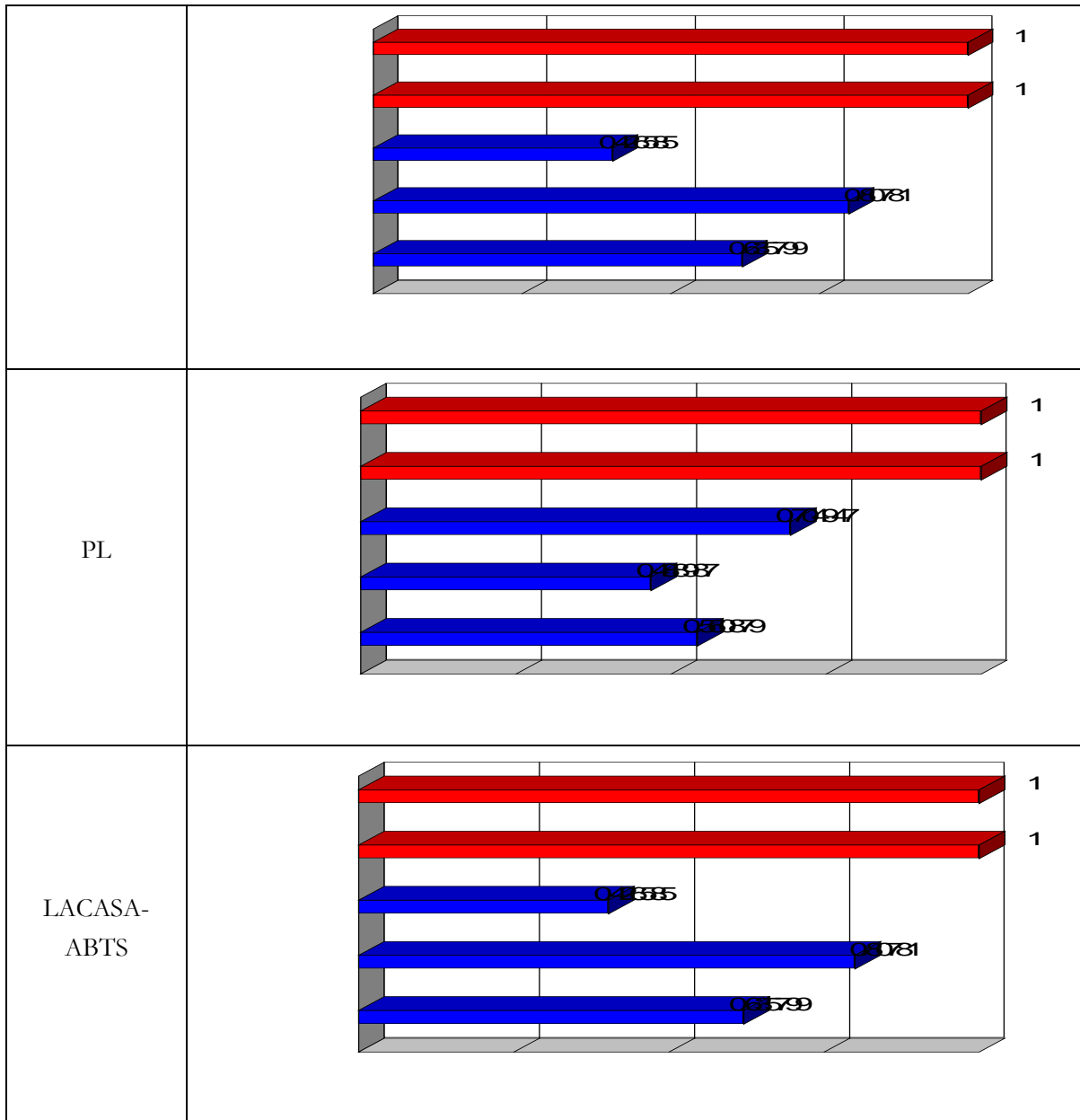


- **Optimización de múltiples respuestas por la función deseabilidad**

Considerando que la producción de azúcares fermentables a partir de materiales lignocelulósicos, está relacionada con varias variables, se realizó el proceso de optimización mediante el uso de optimización de múltiples respuestas, para lo cual se consideró maximizar las siguientes variables: rendimiento hidrólisis enzimática llevada a la materia prima (peso 5) y recuperación de azúcares hemicelulósicos en el líquido de tratamiento (peso 2). Los resultados se muestran en la Figura 4-6.

**Figura 4-6** Diagramas de barras resultado de la optimización de la función deseabilidad, múltiples respuestas

ORIGINAL	
----------	--



Las condiciones experimentales y variables de respuesta obtenidas en los puntos óptimos se presentan en la Tabla 4-6.

**Tabla 4-6** Condiciones experimentales y resultados obtenidos en los puntos óptimos

	ORIGINAL	PL	LACASAS
Temperatura (°C)	196,2	180	193,4
Tiempo (min)	40,2	41,4	49,65

% Celulosa	57,04	52,1	61,8
% Lignina	32,24	26,2	31,1
%HE	45,68	47,7	35,2
Rendimiento global de azúcares	29,72	33,3	26,4

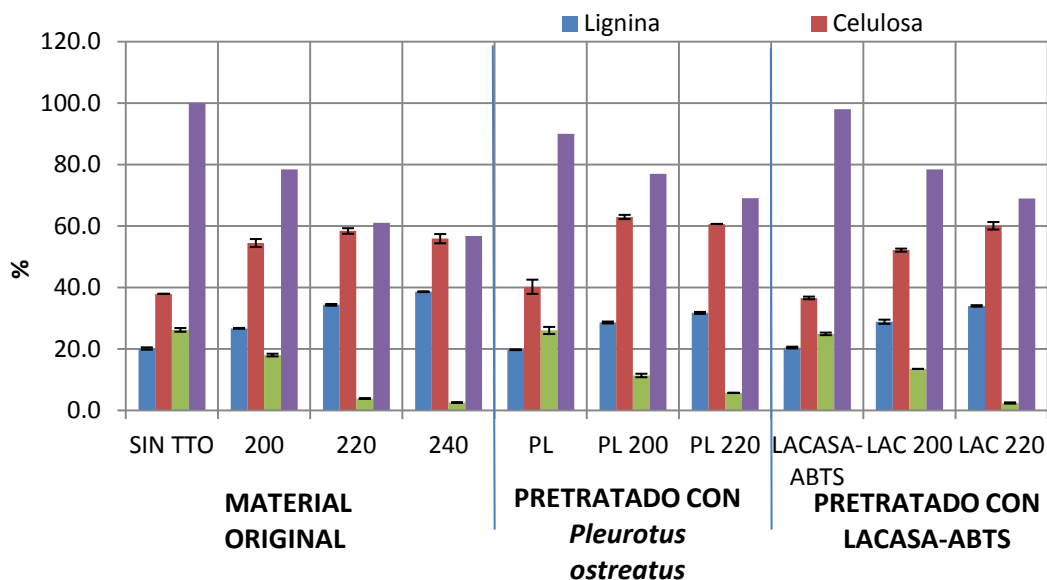
### 4.3.3 Combinación de tratamientos biológicos con explosión con vapor

- **Recuperación y composición de los materiales sólidos**

En la Figura 4-7, se presentan los resultados de caracterización de los materiales pretratados con explosión con vapor, en la cual se observa un aumento en la concentración de celulosa, especialmente en los materiales pretratados con PL y lacasas-ABTS. En el material original se alcanza un máximo de concentración de celulosa de 58,4% a la condición de 220°C, valor inferior al obtenido bajo esa misma condición con lacasa-ABTS del 60,1% y con PL a 200°C, que fue de 63%.

La recuperación de los sólidos se comportó de forma similar a la obtenida en el tratamiento con agua caliente en todos los materiales y disminuyó con la severidad del tratamiento como lo han reportado otros investigadores (Ruiz et al., 2008; Viola et al., 2008a). Los valores obtenidos de rendimiento son similares a los reportados (Wang et al., 2012), aplicando el tratamiento de explosión con vapor sobre racimos de palma impregnados con una solución alcalina, con el fin de producir pulpa para papel.

**Figura 4-7** Caracterización de los materiales antes y después del tratamiento con explosión con vapor



El tratamiento de explosión con vapor se combinó con tratamiento biológico con el fin de deslignificar paja de trigo. Inicialmente Zhang et al. (2008) realizaron tratamiento de explosión con vapor (0,8 MPa) con una pérdida de lignina del 19,94%. Posteriormente realizaron tratamiento con *Trametes versicolor* durante 30 días, alcanzando un 55,40% de deslignificación, para un total de 75,34% de deslignificación con el tratamiento combinado, valor bastante superior al 31,23% obtenido sólo con tratamiento biológico. En el caso de racimos vacíos de palma de aceite no se encontró que el tratamiento con explosión con vapor afecte la lignina, por lo que el proceso de delignificación fue realizado únicamente por el *Pleurotus ostreatus*. Sin embargo se ha reportado delignificación de los racimos vacíos de palma de aceite sólo con tratamiento con vapor a 140°C (Simarani et al., 2009).

- **Composición de los líquidos de tratamiento**

Se puede observar que la generación de compuestos derivados de los azúcares, fenólicos y ácidos va aumentando de forma significativa con la temperatura Tabla 4-7. En general se observa menor producción de compuestos inhibidores en material pretratado con lacasas, seguido por el material original y finalmente el tratado con PL, material con el cual se obtuvo la mayor cantidad de compuestos potencialmente inhibidores de la fermentación. Este comportamiento fue contrario a lo obtenido con agua caliente PL<original<lacasa-ABTS. Esto indica que durante el tratamiento con agua caliente se logra una mayor solubilización de la lignina que con explosión con vapor debido al mayor contacto y tiempo de tratamiento.

Relacionado con la recuperación de azúcares hemicelulósicos en el líquido se observa una disminución de la misma con la temperatura, como previamente ha sido reportado (Cara et al., 2008). Sin embargo los valores son muy superiores a los obtenidos con agua caliente, debido probablemente a las condiciones de mayor tiempo de contacto del material con el agua, permite la solubilización y pérdida de éstos azúcares. Asada et al. (2011a) realizó pretratamiento con explosión con vapor (183°C, 214°C y 235°C) a residuos de cultivo de hongos comestibles (shiitake por 4 meses) encontrando que se solubilizó de un 22 a 33% del material de partida, con una buena proporción de hemicelulosa solubilizada. Como se observa en la Tabla 4-7 la recuperación de hemicelulosa es mucho mayor en los materiales pretatados biológicamente comparados con el material tratado únicamente con explosión con vapor, lo que indica que los tratamientos biológicos evaluados modifican la estructura de tal forma que se pueda recuperar principalmente los azúcares de la hemicelulosa, también considerado hoy día importante como materia prima.

**Tabla 4-7** Generación de compuestos inhibidores y recuperación de azúcares hemicelulósicos durante el tratamiento de explosión con vapor

	200°C	220°C	240°C
--	-------	-------	-------

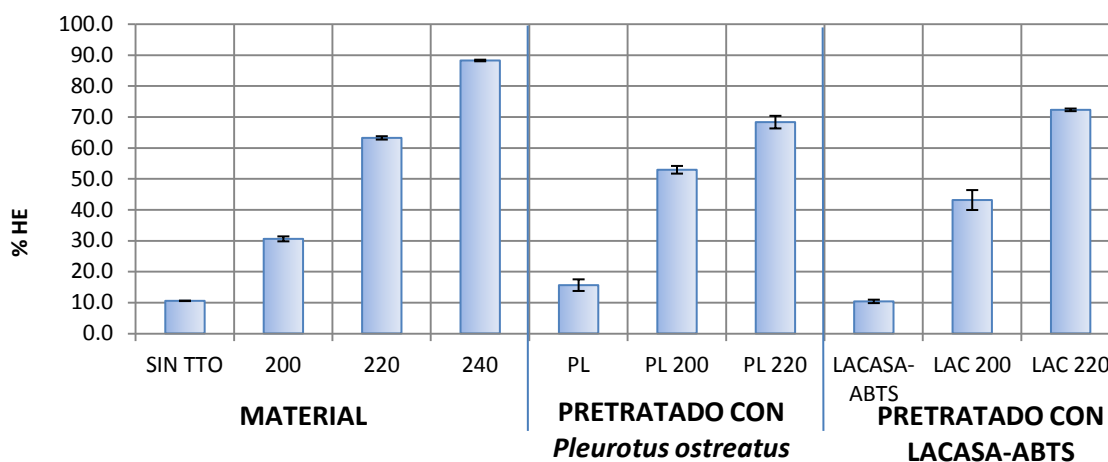
Inhibidores (mg/g material inicial)	Original	PL	Lac	Original	PL	Lac	Original
Furanos	0,41	0,82	1,36	8,28	11,52	10,67	10,73
Fenólicos	2,62	3,16	1,63	7,29	7,95	5,32	6,77
Acido acético	13,85	10,18	6,47	34,79	43,78	25,43	44,72
Acido fórmico	1,08	1,37	0,41	9,94	10,94	7,27	18,76
Recuperación de azúcares hemicelulósicos en el líquido de tratamiento (%)	38,61	73,28	76,59	35,18	50,44	62,43	5,15

- **Hidrólisis enzimática**

En la Figura 4-8, se presentan los resultados de la eficiencia de la hidrólisis enzimática, encontrando valores muy superiores a los obtenidos en el tratamiento con agua caliente. Esto puede ser debido a la estructura altamente compleja de los racimos de palma de aceite, que impiden la solubilización del material en agua caliente, por lo que el rompimiento físico de las fibras en la explosión favorece el acceso de las enzimas al sustrato. Hasibuan and Daud (2009) reportaron que al realizar tratamiento con vapor sobrecalentado a temperaturas superiores a los 200°C, se logra la remoción del 88% de las partículas de sílica presentes en la superficie de los racimos vacíos de palma de aceite, lo que pudo ocasionar un aumento en la hidrólisis enzimática de estos materiales. Simarani et al. (2009) reportó un aumento en 44,55% en la hidrólisis enzimática de residuos tratados con vapor a 140°C comparado con material sin tratar. En este trabajo a temperaturas de 200°C, en material original se logró 3 veces, en material pretratado con PL, 5,4 veces y con lacasa-ABTS 4,3 veces. En general los resultados muestran que a temperaturas de 200°C y 220°C, los valores son superiores en los materiales pretratados biológicamente especialmente en el tratamiento con PL. Con el tratamiento combinado se alcanza un 54% de eficiencia de la HE, valor muy superior al obtenido de 30% con el tratamiento térmico y 16% con tratamiento biológico de forma independiente. Con lacasas se alcanza un %HE a 200°C de 44% valor superior al 10% logrado sólo con tratamiento enzimático con ABTS lacasas.

**Figura 4-8** Eficiencia de la hidrólisis enzimática de materiales pretratados con explosión con vapor



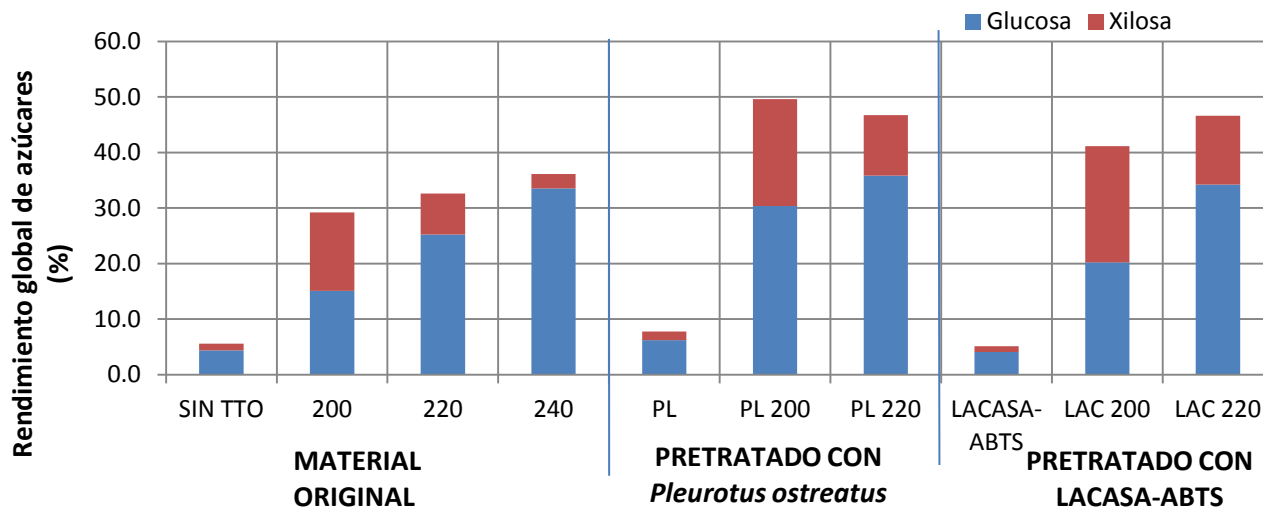


Los antecedentes del uso de tratamientos combinados biológicos-explosión con vapor son escasos. Se encontraron reportes de Taniguchi et al. (2010) quienes estudiaron la combinación explosión con vapor (1,5 atm, 1 min) con tratamiento con *Pleurotus ostreatus* con el fin de disminuir el tiempo de tratamiento biológico para la producción de azúcares a partir de residuos de trigo reduciendo de 60 días a 36 días el tratamiento biológico. Relacionado con la combinación con lacasa-mediadores se encontró tratamiento combinado explosión con vapor y tratamiento enzimático con lacasa-NHA (N-hidroxi-N-fenilacetamida) con lo cual se logró un aumento del 21% en el %HE reportado por Palonen y Viikary (2004). Sin embargo los resultados no se pueden comparar considerando que los tratamientos no se realizaron en la misma secuencia.

Se encuentran algunos estudios de tratamientos combinados biológicos-tratamiento alcalino: Yu et al. (2010) estudiaron la combinación de tratamiento biológico con el hongo *Irpex lacteus* durante 15 días con tratamiento alcalino con lo cual se logró aumentar en un 14% la digestibilidad enzimática de tallos de maíz comparado con sólo tratamiento alcalino. También Salvachúa et al. (2011) evaluó la combinación de tratamientos biológicos (21 hongos durante 21 días) con tratamiento alcalino 1% NaOH (5% p/v), a 50 °C y 165 rpm por 1 h, en paja de trigo. Los mayores rendimientos de glucosa se obtuvieron con *Poria subvermispora* e *Irpex lacteus* alcanzando eficiencia de la hidrólisis enzimática del 69% y 66% respectivamente. Otro estudio reportado de esta combinación, lo realizó Zhong et al. (2011) sobre tallos de maíz quienes evaluaron el tratamiento con los hongos *E. taxodii* e *Irpex lacteus* en combinación con tratamiento alcalino (NaOH 0,25 M, 30°C, 30 min). Los mejores resultados se obtuvieron con *Irpex lacteus* durante 15 días, con lo cual se alcanzó un %HE del 82%, mayor que el obtenido con tratamiento alcalino (61%). Los valores reportados en estos estudios con diversos materiales son comparables con el tratamiento biológico seguido de explosión con vapor de residuos de palma.

En la Figura 4-9 se puede observar que el rendimiento global de azúcares presentó un valor máximo con tratamiento combinado PL- explosión con vapor a 200°C con 49%, valor superior al obtenido con la combinación con agua caliente del 37% a 180°C y 30 min. La recuperación global de glucosa fue prácticamente por hidrólisis enzimática mientras que la de xilosa fue debido al tratamiento principalmente, de forma similar a lo obtenido en el tratamiento con agua caliente y que se reportado previamente (Ruiz et al., 2008; Viola et al., 2008a). El máximo valor de rendimiento global de glucosa fue del 35% y se obtuvo con materiales pretratados biológicamente a 220°C y es superior al obtenido en material original tratado a 240°, lo que indica que el tratamiento biológico puede disminuir el consumo energético del tratamiento de explosión con vapor. Simarani et al. (2009) reportó un rendimiento global de glucosa del 53,77% tratando residuos de palma a condiciones de esterilización, mientras que Shamsudin et al. (2011) lograron un 30% tratando los materiales a 140°C. En este trabajo los rendimientos obtenidos de glucosa fueron menores considerando las mayores temperaturas evaluadas.

**Figura 4-9** Rendimiento global de azúcares obtenidos en el tratamiento de explosión con vapor (barras superiores corresponden a xilosa mientras las inferiores son las de glucosa)



El valor máximo de rendimiento global de glucosa del 30% obtenido mediante la combinación PL- explosión con vapor son menores a los reportados del 55,3 en paja de trigo (Bauer et al., 2009), 49,6 en maderas suaves (Asada et al., 2011c), 52% en álamo (Asada et al., 2011b), lo que indica la alta complejidad de los materiales de palma usados en este trabajo.

#### 4.3.4 Prueba de fermentabilidad

En la Tabla 4-8 se encuentran los resultados de las pruebas de fermentabilidad de los hidrolizados enzimáticos obtenidos a partir de los sólidos. El conjunto sólido-líquido resultante de los

tratamientos fue hidrolizado enzimáticamente, pero la fermentación presentó inhibición, por lo que es necesario remover los compuestos inhibidores o detoxificar los líquidos de tratamiento. Estos resultados son similares a los reportados por Bellido et al. (2011) quienes encontraron inhibición total de la fermentación utilizando el líquido luego del tratamiento de explosión con vapor (T 210° C y 10 min) de residuos de trigo.

**Tabla 4-8** Resultados prueba de fermentabilidad

Prueba de fermentabilidad (g etanol g/100 g material de partida)						
Tratamiento	Original		PL		Lacasa-ABTS	
	Condición	Valor	Condición	Valor	Condición	Valor
Explosión vapor	200°C, 5 min	6,9	200°C, 5 min	13,6	200°C, 5 min	7,1
Agua caliente	195°C, 44 min	8,2	180°C, 40 min	8,6	195°C, 44min	7,4

Como se puede observar en la Tabla 4-8, se logró la producción de azúcares fermentable mediante la combinación de tratamientos biológicos con hidrotérmicos, obteniendo el mejor rendimiento etanol/glucosa en material pretratado de forma combinada tratamiento biológico con *Pleurotus ostreatus* por 3 semanas y explosión con vapor a 200°C por 5 minutos, condiciones bajo las cuales se logra producir un 97% más comparado con sólo tratamiento de explosión con vapor.

### 4.3.5 Análisis FTIR

En la Figura 4-10 a) se amplía la zona de la huella digital de los espectros FTIR y se comparan los materiales originales y pretratados con agua caliente (220°C, 30 min); se observa la desaparición del pico a 1740 cm<sup>-1</sup> (C=O) lo que indica la ruptura de los grupos acetilo en alto grado durante el tratamiento (Tjeerdsma & Militz, 2005), lo que conlleva a la formación de ácido acético en el líquido de tratamiento (Figura 4-3). Por otro lado, los tres fuertes picos de absorción en 1602, 1515 y 1462 cm<sup>-1</sup> corresponden a las típicas vibraciones del esqueleto del anillo aromático fenilpropano (Ibrahim et al., 2010), picos de mayor intensidad en el material pretratado, debido al aumento en la concentración de lignina.

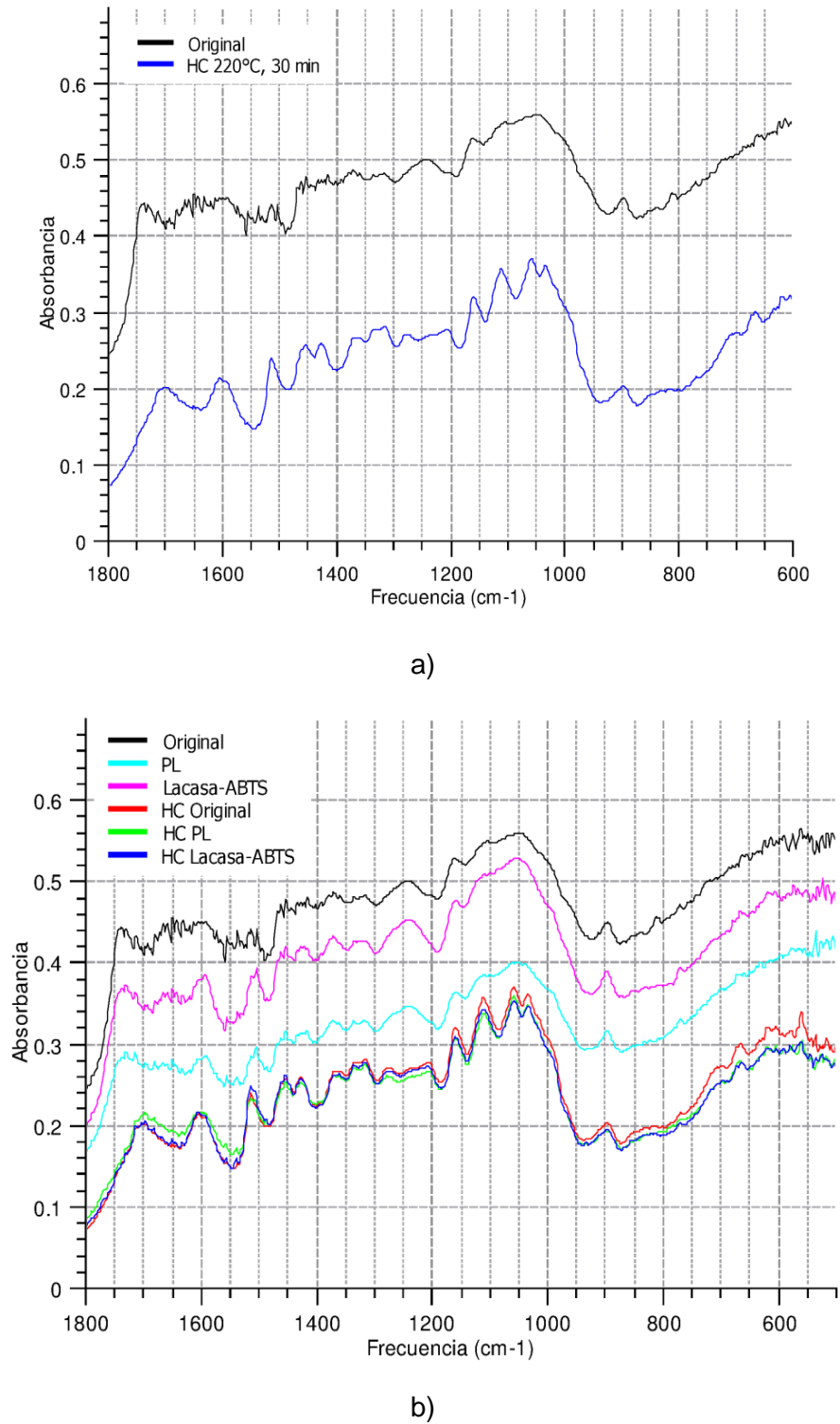
Los picos observados entre 1000 y 1200 corresponden a las vibraciones de los grupos C-OH, C-O-C, y C-C de la celulosa (1160, 1110, 1060 cm<sup>-1</sup>) (Yan et al., 2009), los cuales aumentan en su intensidad, debido a la mayor concentración de celulosa en el material pretratado. Además, los picos presentan

una mejor resolución, ya que durante el tratamiento se han retirado extraíbles, hemicelulosa y otros que mejoran la calidad del espectro. El pico a  $1240\text{ cm}^{-1}$  evidencia la disminución de la hemicelulosa, ya que desaparece en el material pretratado. Este corresponde a la vibración del grupo C-C-O presente en la hemicelulosa (Yan et al., 2009). También desaparece el pico a  $1630\text{ cm}^{-1}$  que está asociado principalmente a la vibración del grupo C=O de aniones carboxílicos de ácidos urónicos y hemicelulosa (Stewart et al., 1995). Además se presenta disminución del pico a  $811$  debido al rompimiento de arabinoglucaronoxilanos y galactoglucomanos los cuales son componentes de la hemicelulosa (Kauráková et al., 2000).

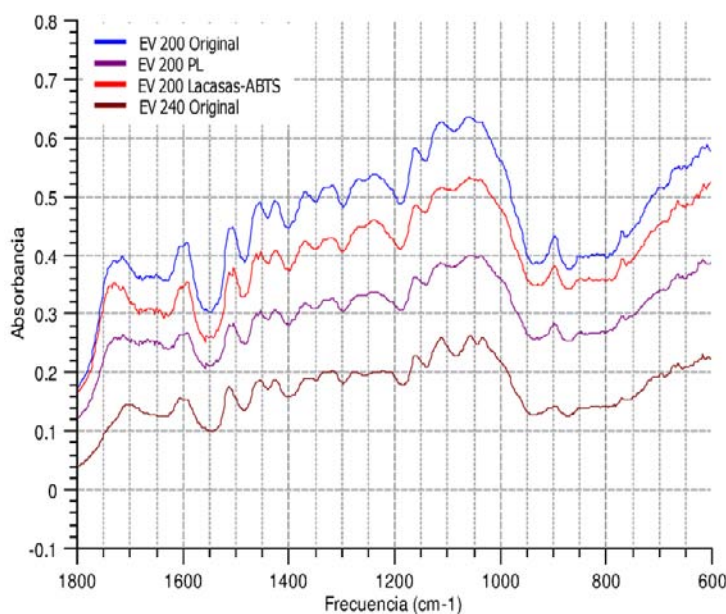
En la Figura 4-10 b) se comparan los espectros FTIR en la zona de huella digital de los materiales pretratados biológicamente y en combinación con tratamientos con agua caliente a  $220^{\circ}\text{C}$  y 30 minutos, donde se evidencia que los espectros son muy similares a pesar de haber sido tratados biológicamente de forma previa. Sin embargo se observa la menor intensidad de los picos a  $1604\text{ cm}^{-1}$  y  $1515\text{ cm}^{-1}$ , en materiales pretratados con PL, debido al consumo previo de la lignina dado por el hongo.

En cuanto a los materiales pretratados con explosión con vapor en la Figura 4-11 se encuentran los correspondientes a las muestras de  $200^{\circ}\text{C}$ , 5 min. Se observan comportamientos similares al tratamiento con agua caliente, desaparición de los picos entre  $1720\text{-}1760$  ( $1740\text{ cm}^{-1}$  (C=O)) lo que indica la ruptura de los grupos acetilo en alto grado durante el tratamiento (Tjeerdsma & Militz, 2005), especialmente a  $240^{\circ}\text{C}$ , condición bajo la cual se logra la mayor generación de ácido acético durante el tratamiento, como se observa en la Tabla 4-7. A temperaturas menores la pérdida de C=O en cetonas, carboxilo o grupos éster es menor en todos los materiales, como se observa en la Figura 4-11. A  $240^{\circ}\text{C}$ , ocurre la mayor pérdida de hemicelulosa, considerando la pérdida de la banda a  $1240\text{ cm}^{-1}$  que aún aparece en materiales tratados a  $200^{\circ}\text{C}$ . Los picos de absorción en  $1602$ ,  $1515$  y  $1462\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las típicas vibraciones del esqueleto del anillo aromático fenilpropano (Ibrahim et al., 2010), de mayor intensidad en todos los materiales pretratados, debido al aumento en la concentración de lignina.

**Figura 4-10** Espectro FITR ampliación del espectro a) material original y material original tratado con agua caliente b) material original, pretratado con PL y con lacasa-ABTS tratados con agua caliente



**Figura 4-11** Espectro FTIR materiales pretratados con explosión con vapor a 200° C (zona de huella digital)

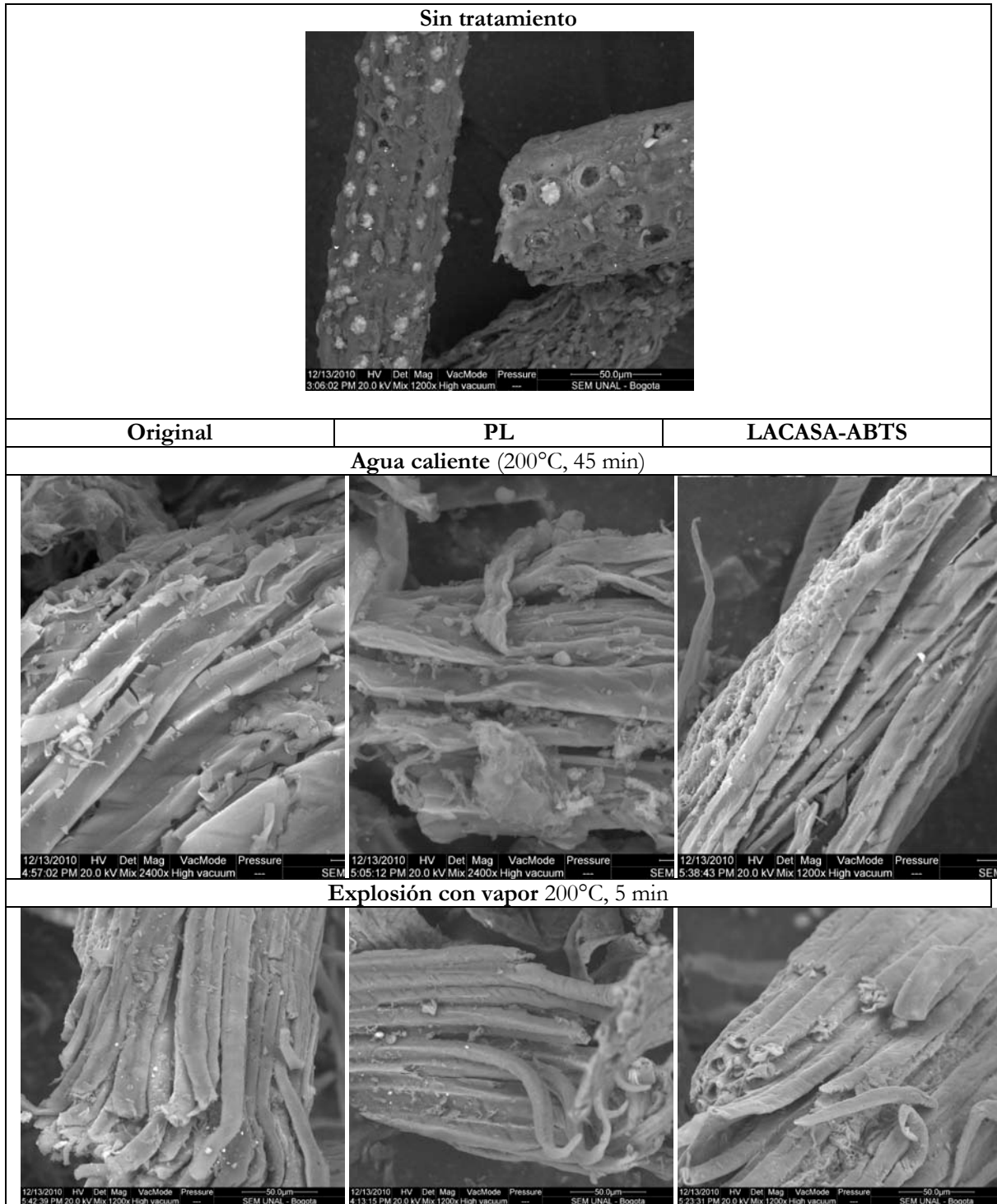


Los picos observados entre 1000 y 1200 corresponden a las vibraciones de los grupos C-OH, C-O-C, y CC de la celulosa (1160, 1110, 1060  $\text{cm}^{-1}$ ) (Yan et al., 2009), los cuales aumentan en su intensidad, debido a la mayor concentración de celulosa en el material pretratado. Además, los picos presentan una mejor resolución, ya que durante el tratamiento se han retirado extraíbles, hemicelulosa y otros que mejoran la calidad del espectro.

#### 4.3.6 Análisis SEM

En la Figura 4-12, se encuentran las fotografías de microscopía electrónica de barrido de las muestras pretratadas con agua caliente (200°C, 45 min) y las tratadas con explosión con vapor (200°C, 5 min). En el material sin tratar se observa una capa superficial que recubre el material compuesta por grasas o ceras, de acuerdo a lo reportado con otros materiales lignocelulósicos (Reddy & Yang, 2007). Esto está de acuerdo a lo encontrado en el espectro FTIR, y los picos a 2920 y 2850  $\text{cm}^{-1}$ . En material sin pretratar se observa la presencia de partículas de sílice sobre la superficie, encontradas de forma común en los materiales de palma de aceite (Hong et al., 2010). Después del tratamiento con agua caliente, los componentes de sílice desaparecieron dejando poros y además se expusieron la células de parénquima y el xilema. Se observa la exposición de microfibras de celulosa (10  $\mu\text{m}$  de ancho aprox.), debido a la extracción de la hemicelulosa como agente de unión entre la lignina y la hemicelulosa, ocurrida durante el tratamiento. Sin embargo en la Figura 4-16 se observa una mayor exposición en materiales pretratados con explosión, lo que mejora el proceso de hidrólisis enzimática.

**Figura 4-12** Microfotografías de materiales sin tratar y tratados mediante tratamientos biológicos combinados con tratamietnos hidrotérmicos



La morfología de las fibras de los materiales sin tratamiento presentan rigidez y fibrillas altamente ordenadas, mientras que con los tratamientos hidrotérmicos ocurren cambios, ya que la estructura inicialmente conectada, se pierde luego del tratamiento y por lo tanto se las fibras se separan y exponen similar a lo reportado previamente (Shahriarinnour et al., 2011), debido a la extracción de lignina y hemicelulosa durante el tratamiento. Además la superficie de las fibras se observa limpia y menos rugosa después de los tratamientos, sobre todo en los tratados con explosión con vapor. Además se observan grietas en la superficie del material tratado, lo que ocasiona mayor área y porosidad en el material, lo que mejora el %HE. Zeng et al. (2007) reportaron que los tratamientos hidrotérmico causan cambios ultraestructurales y formación de microporos que aumentan la accesibilidad y susceptibilidad del área superficial y hacen que la celulosa sea más accesible.

Se confirma mediante microfotografías, la alteración de la morfología y la estructura de los residuos celulósicos ocurridos durante el tratamiento hidrotérmico, el cual puede ocasionar cambio en la estructura de los poros, en el tamaño de partícula, en la asociación de la hemicelulosa y la lignina, cristalinidad y grado de polimerización.

## 4.4 Conclusiones

La combinación de tratamientos biológicos con agua caliente lograron producir materiales enriquecidos en celulosa 14,61% y 19,11% más en materiales pretratados biológicamente con *Pleurotus ostreatus* y lacasa-ABTS respectivamente. En cuanto la recuperación de azúcares hemicelulósicos ésta se realizó principalmente a bajas temperaturas y alcanzó valores comprendidos entre 44 y 56%.

En cuanto al proceso de hidrólisis enzimática, aunque la mayor eficiencia se logró en material pretratado con PL, la pérdida de masa ocurrida durante el proceso biológico hace que la producción de azúcares reductores con base en la materia prima disminuya. La hidrólisis enzimática en material pretratado con lacasa-ABTS y agua caliente presentó bajas eficiencias, a pesar de haber obtenido el material con mayor porcentaje de celulosa; esto pudo ocasionarse por la condensación de la lignina y/o adsorción de las celulasas.

Relacionado con los rendimientos globales de azúcares (glucosa + xilosa), el máximo valor se obtuvo con los materiales pretratados con PL combinado con agua caliente a 180°C, alcanzando un 37%, valor un 14% más que en material original sin considerar las ventajas por el consumo de energía. La temperatura fue la variable significativa en el tratamiento hidrotérmico.



En cuanto a la combinación de tratamientos biológicos con explosión con vapor se logró aumentar también la concentración de celulosa en los materiales, con una mayor recuperación de la hemicelulosa en el líquido de tratamiento que con tratamiento con agua caliente. La eficiencia de hidrólisis enzimática con el tratamiento combinado alcanzó un 54%, valor muy superior al obtenido de 30% con el tratamiento térmico (200°C, 5 min) y 16% con tratamiento biológico (PL por 3 semanas). Con lacasas se alcanza un %HE a 200°C de 44% valor superior al 10% logrado sólo con tratamiento enzimático con ABTS lacasas.

Los sólidos recuperados en los tratamientos combinados en los cuales se produjo la máxima recuperación global de azúcares fueron hidrolizados y llevados fermentación de forma favorable. Sin embargo en presencia de los líquidos de tratamiento la fermentación presentó inhibición por lo que es necesario establecer procesos de detoxificación de los mismos.

Se demostró que la combinación de tratamientos biológicos (*Pleurotus ostreatus* y lacasa-ABTS) con tratamientos hidrotérmicos evaluados (agua caliente y explosión con vapor), logra mejorar el rendimiento global de azúcares, siendo más efectiva la combinación PL-explosión con vapor.



## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

Se estudió la biodegradación de los racimos vacíos de palma de aceite utilizando los hongos de podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus*, con los cuales se lograron diferentes grados de delignificación (39,07 – 51,91%) siendo más eficiente en este proceso el *Pleurotus ostreatus*, con una baja pérdida de masa (12,29%).

El valor máximo de obtención de azúcares por hidrólisis enzimática se obtuvo en material pretratado con *Pleurotus ostreatus*, suplemento Mandels durante tres semanas, condición bajo la cual se logró la menor degradación de celulosa. El valor obtenido fue de 6,4 gramos de azúcares reductores/100 gramos de material inicial, 4,4 veces el obtenido en material sin pretratamiento, lo que indica que efectivamente el pretratamiento biológico es una alternativa para mejorar el acceso de las enzimas al sustrato. Aunque se utilizaron suplementos (medios Mandels y Kirk) en el tratamiento biológico, éstos no fueron significativos sobre la producción de azúcares.

Aunque los suplementos contenían 5 g/L de glucosa, esta concentración no fue suficiente para evitar el consumo de celulosa, especialmente con *Phanerochaete chrysosporium* con el cual se consumió el 31% en promedio.

Aunque se logró mejorar la producción de azúcares por hidrólisis enzimática, todavía el pretratamiento biológico presenta una baja eficiencia, se pierden carbohidratos por el precultivo y los tratamientos son extensos en el tiempo. Por lo tanto se deben plantear nuevas estrategias para superar los inconvenientes.

El seguimiento del tratamiento biológico se realizó durante cuatro semanas, y los datos experimentales de biodegradación de lignina, celulosa y hemicelulosa, correlacionaron con el modelo cinético de Weibull, con coeficientes superiores a 0,97 para la lignina, por lo que este modelo es apropiado para la biodegradación de lignocelulósicos por hongos basiomycetos de la podredumbre blanca.

En cuanto al tratamiento enzimático con lacasas, éste logró aumentar la eficiencia de la hidrólisis enzimática en un 21,41% y en presencia del mediador ABTS aumentó en un 49,6%, siendo la concentración y el tiempo de tratamiento las variables significativas. Se encontró

En los dos tratamientos evaluados (lacasa y lacasa-ABTS) se presentó repolimerización de los derivados de bajo peso molecular, debido a la presencia de lacasas. En presencia del mediador, el tratamiento enzimático afectó principalmente las unidades G no condensadas y posteriormente fueron oxidadas hasta ácido vainillínico, lo que pudo favorecer una mejor configuración del material para la hidrólisis enzimática.

En cuanto a la combinación de tratamientos biológicos (*Pleurotus ostreatus* y lacasa-ABTS) con tratamientos hidrotérmicos evaluados (agua caliente y explosión con vapor) fue efectiva para la producción de azúcares, ya que en todos los casos se lograron aumentos significativos.

En la combinación de tratamientos biológicos con agua caliente se logró producir materiales enriquecidos en celulosa comparados con el tratamiento con agua caliente únicamente. En cuanto al proceso de hidrólisis enzimática, aunque la mayor eficiencia se logró en material pretratado con PL, la pérdida de masa ocurrida durante el proceso biológico hace que la producción de azúcares reductores con base en la materia prima disminuya. En el material pretratado con lacasa-ABTS la hidrólisis enzimática presentó bajas eficiencias, a pesar de haber obtenido el material con mayor porcentaje de celulosa; esto pudo ocasionarse por la condensación de la lignina y/o adsorción de las celulasas.

Relacionado con los rendimientos globales de azúcares (glucosa + xilosa), el máximo valor se obtuvo con los materiales pretratados con PL combinado con agua caliente a 180°C, alcanzando un 37%, valor un 14% más que en material original sin considerar las ventajas por el consumo de energía mientras que este mismo tratamiento biológico en combinación con explosión con vapor logró un 54%, valor muy superior al obtenido de 30% con el tratamiento térmico (200°C, 5 min) y 16% con tratamiento biológico (PL por 3 semanas).

En cuanto a la fermentabilidad, se logró demostrar la producción de azúcares fermentables únicamente a partir de los sólidos tratados, ya que en presencia de los líquidos de tratamiento la fermentación presentó inhibición por lo que es necesario establecer procesos de detoxificación de los mismos.

Se demostró que la combinación de tratamientos biológicos (*Pleurotus ostreatus* y lacasa-ABTS) con tratamientos hidrotérmicos evaluados (agua caliente y explosión con vapor), logra mejorar el rendimiento global de azúcares, siendo más efectiva la combinación PL-explosión con vapor.

Mediante microscopía electrónica de barrido, se comprobó el rompimiento de la estructura lignocelulósica especialmente en materiales pretratados con explosión con vapor.

## 5.2 Recomendaciones

Sería conveniente estudiar el pretatamiento con otros hongos reportados como promisorios dentro de lo que se encuentran *Irpex lacteus* y *Ceriporiopsis subermispora*, haciendo seguimiento de las actividades enzimáticas. De igual forma se sugiere combinar estos tratamientos con otros de bajo consumo energético como tratamientos alcalinos a temperatura ambiente o tratamientos mecánicos que remuevan las partículas de sílica o rompan la estructura compleja de los racimos vacíos de palma de aceite.

Optimización de tratamientos enzimáticos con ligninasas (lacasas, manganeso peroxidasas) en conjunto con la hidrólisis enzimática y el uso de xilanasas, con el fin de mejorar la producción de los azúcares.

Estudiar otros mediadores de la actividad lacasa, de bajo costo como los derivados de la lignina y utilizar otras lacasas con alto potencial redox.

Evaluar el tratamiento enzimático o biológico posterior a tratamientos hidrotérmicos o químicos con los cuales también se han reportado aumentos en los rendimientos globales de azúcares.

Se recomienda la combinación de tratamientos biológicos con tratamientos alcalinos posteriores, ya que a valores altos de pH la lignina es soluble.

Estudiar el proceso de oxidación de la lignina en presencia de lacasas, realizando la determinación de compuestos derivados de la lignina con diferentes pesos moleculares.

Evaluar el uso de complejo enzimáticos crudos, con diferentes mediadores de las actividades lacasas, MnP y LiP, concentradas.

Estudiar la fermentación de azúcares hemicelulósicos que se generan durante los tratamientos propuestos mediante la combinación realizada en este trabajo, así como estrategias para la detoxificar los líquidos de tratamiento.



## Bibliografía

- Abdul, A., Husin, M., Mokhtar, A. 2002. Preparation of cellulose from oil palm empty fruit bunches via ethanol digestion: effect of acid and alkali catalyts. *J Oil Palm REs*, **14**, 9-14.
- Adler, E. 1977. Lignin chemistry—past, present and future. *Wood Science and Technology*, **11**(3), 169-218.
- Agarwal, U.P., Weinstock, I., Atalla, R.H. 2003. FT-Raman spectroscopy for direct measurement of lignin concentrations in kraft pulps. *Tappi Journal*, **2**(1), 22-26.
- Agosin, E., Daudin, J.J., Odier, E. 1985. Screening of white-rot fungi on (14 C) lignin-labelled and (14 C) whole-labelled wheat straw. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **22**(2), 132-138.
- Akin, D., Rigsby, L., Sethuraman, A., Morrison 3rd, W., Gamble, G., Eriksson, K. 1995. Alterations in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Applied and environmental microbiology*, **61**(4), 1591.
- Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., Hahn-Hagerdal, B., Lidén, G., Gorwa-Grauslund, M.F. 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **82**(4), 340-349.
- Ancín Viguiristi, J. 2008. Biocombustibles de segunda generación. *Física y sociedad*(19), 30-33.
- Andric, P., Meyer, A.S., Jensen, P.A., Dam-Johansen, K. 2010. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology advances*, **28**(3), 308-324.
- Arora, D.S., Chander, M., Gill, P.K. 2002. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **50**(2), 115-120.

- Asada, C., Asakawa, A., Sasaki, C., Nakamura, Y. 2011a. Characterization of the steam-exploded spent Shiitake mushroom medium and its efficient conversion to ethanol. *Bioresource technology*.
- Asada, C., Kita, A., Sasaki, C., Nakamura, Y. 2011b. Ethanol production from disposable aspen chopsticks using delignification pretreatments. *Carbohydrate polymers*.
- Asada, C., Sasaki, C., Uto, Y., Sakafuji, J., Nakamura, Y. 2011c. Effect of steam explosion pretreatment with ultra-high temperature and pressure on effective utilization of softwood biomass. *Biochemical Engineering Journal*.
- Asgher, M., Asad, M., Legge, R. 2006. Enhanced lignin peroxidase synthesis by *Phanerochaete chrysosporium* in solid state bioprocessing of a lignocellulosic substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**(5), 449-453.
- Asther, M., Corrieu, G., Drapron, R., Odier, E. 1987. Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme and Microbial Technology*, **9**(4), 245-249.
- Aziz, A.A., Husin, M., Mokhtar, A. 2002. Preparation of cellulose from oil palm empty fruit bunches via ethanol digestion: effect of acid and alkali catalysts. *Journal of Oil Palm Research*, **14**, 9-14.
- Bak, J.S., Ko, J.K., Choi, I.-G., Park, Y.-C., Seo, J.-H., Kim, K.H. 2009. Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw. *Biotechnology and Bioengineering*, **104**(3), 471-482.
- Ballesteros, I., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M. 2002. Ethanol production from olive oil extraction residue pretreated with hot water. *Applied biochemistry and biotechnology*, **98**(1), 717-732.
- Ballesteros, I., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M. 2001. Ethanol production from lignocellulosic byproducts of olive oil extraction. *Applied biochemistry and biotechnology*, **91**(1), 237-252.
- Barrasa, J., Camarero, S., Martinez, A., Ruel, K. 1995. Ultrastructural aspects of wheat straw degradation by *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Applied microbiology and biotechnology*, **43**(4), 766-770.



- Bates, D.M., Watts, D.G. 2008. Practical Considerations in Nonlinear Regression. in: *Nonlinear Regression Analysis and Its Applications*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 67-133.
- Bauer, A., Bösch, P., Friedl, A., Amon, T. 2009. Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production. *Journal of biotechnology*, **142**(1), 50-55.
- Behbood, M. 2005. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of white-rot decayed beech wood. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **55**(4), 247-251.
- Bellido, C., Bolado, S., González-Benito, G., García-Cubero, M.T. 2011. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource technology*.
- Berg, C., Licht, F.O. 2004. World Fuel Ethanol. *Analysis and Outlook, report for FO Licht*.
- Bic-Biocentrum-DTU. 2006. Ethanol potential for empty fruit bunches pre-treated by wet-explosion. Denmark's Technical University.
- Bichsel, S., Sandre, A. 1982. Application of membrane technology to juice concentration. *International Sugar Journal*, **84**, 266-8.
- Bjerre, A.B., Schmidt, A.S., Risø, F. 1997. *Development of chemical and biological processes for production of bioethanol: Optimization of the wet oxidation process and characterization of products*. Risø National Laboratory.
- Bobleter, O. 1994. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in polymer science*, **19**(5), 797-841.
- Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M.G. 1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1379**(3), 381-390.
- Bourbonnais, R., Paice, M., Freiermuth, B., Bodie, E., Borneman, S. 1997. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and environmental microbiology*, **63**(12), 4627.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *Febs Letters*, **267**(1), 99-102.

- Bujanovic, B., Reiner, R.S., Ralph, S.A., Agarwal, U.P., Atalla, R.H. 2005. Structural changes of residual lignin of softwood and hardwood kraft pulp upon oxidative treatment with polyoxometalates. pp. 89–92.
- Call, H., Mucke, I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology*, **53**(2-3), 163-202.
- Camarero, S., Galletti, G.C., Martinez, A.T. 1994. Preferential degradation of phenolic lignin units by two white rot fungi. *Applied and environmental microbiology*, **60**(12), 4509.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M.J., Castro, E. 2008. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel*, **87**(6), 692-700.
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M. 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **67**, 849-864.
- Castro, E., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., Cara, C., Ruiz, E., Domínguez, H. 2008. Antioxidant activity of liquors from steam explosion of *Olea europea* wood. *Wood Science and Technology*, **42**(7), 579-592.
- Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E., Domínguez, H. 2009. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*, **114**(3), 806-812.
- Cordoba, A., Piñeros, Y. 2006. Aprovechamiento de residuos de palma EFB( Raquis) para la producción de hongos comestibles del género *Pleurotus*. in: *XIV Seminario Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. La Habana, Cuba.
- Corzo, O., Bracho, N. 2008. Application of Weibull distribution model to describe the vacuum pulse osmotic dehydration of sardine sheets. *LWT - Food Science and Technology*, **41**(6), 1108-1115.
- Cunha, L.M., Oliveira, F.A.R., Oliveira, J.C. 1998. Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by the Weibull probability distribution function. *Journal of Food Engineering*, **37**(2), 175-191.
- Chandra, R., Bura, R., Mabee, W., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J. 2007. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocelluloses? *Biofuels*, 67-93.

- Chang, V.S., Holtzapfle, M.T. 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **84**(1), 5-37.
- Cheng, C.K., Hani, H.H., Ismail, K.S.K. 2007. Production of Bioethanol from oil palm empty fruit bunch.
- Da Silva, T.A., Mocchiutti, P., Zanuttini, M., Ramos, L.P. 2007. Chemical characterization of pulp components in unbleached softwood kraft fibers recycled with the assistance of a laccase/HBT system. *Bioresources*, **2**(4), 616-629.
- Daud, F., Chiang, C.P., Senafi, S., Kader, J., Omar, O. 2001. Suitability of Decomposed Oil Palm Empty Fruit Bunch (EFB) by *Aspergillus terreus* SUK-1 for Cultivation of Mushrooms. *Biotechnol Sustain Util Biol Resour Trop*, **15**, 46-49.
- del Ri'o, J., Gutiérrez, A. 2001. Py-GC/MS study of Eucalyptus globulus wood treated with different fungi. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **58**, 441-452.
- Dias, A.A., Freitas, G.S., Marques, G.S.M., Sampaio, A., Fraga, I.S., Rodrigues, M.A.M., Evtuguin, D.V., Bezerra, R.M.F. 2010. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresource technology*, **101**(15), 6045-6050.
- Dien, B., Li, X.L., Iten, L., Jordan, D., Nichols, N., O'Bryan, P., Cotta, M. 2006. Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. *Enzyme and microbial technology*, **39**(5), 1137-1144.
- DNP. 2007. Documento Conpes 3477. ESTRATEGIA PARA EL DESARROLLO COMPETITIVO DEL SECTOR PALMERO COLOMBIANO, Consejo Nacional de Política Económica y Social, República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación. Bogotá.
- Dornier, M., Decloux, M., Lebert, A., Trystram, G. 1994. Use of experimental design to establish optimal crossflow filtration conditions: application to raw cane sugar clarification. *Journal of food process engineering*, **17**(1), 73-92.
- Duyvesteyn, W.S., Shimoni, E., Labuza, T.P. 2001. Determination of the End of Shelf-life for Milk using Weibull Hazard Method. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **34**(3), 143-148.
- Ekman, R., Holmbom, B. 2000. The chemistry of wood resin. *Pitch Control, Wood Resin and Deresination*.

- 
- Eriksson, K.E.L. 1990. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood science and technology*, **24**(1), 79-101.
- Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P. 2002. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, **16**(5-6), 231-240.
- Faix, O., Mozuch, M.D., Kirk, T.K. 1985. Degradation of gymnosperm (guaiacyl) vs. angiosperm (syringyl/guaiacyl) lignins by *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, **39**(4), 203-208.
- Fedelpalma. 2008. Anuario estadístico 2008, Federación Nacional de Cultivadores de Palma Bogotá.
- Fengel, D., Wegener, G. 1989. Wood-chemistry, ultrastructure, reactions.
- Fengel, D., Wegener, G. 1984. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Ferraz, A., Baeza, J., Rodriguez, J., Freer, J. 2000. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresource technology*, **74**(3), 201-212.
- Fillingham, I.J., Kroon, P.A., Williamson, G., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P. 1999. A modular cinnamoyl ester hydrolase from the anaerobic fungus *Piromyces equi* acts synergistically with xylanase and is part of a multiprotein cellulose-binding cellulase-hemicellulase complex. *Biochemical Journal*, **343**(Pt 1), 215.
- Fujian, X., Hongzhang, C., Zuohu, L. 2001. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. *Bioresource technology*, **80**(2), 149-151.
- Galbe, M., Zacchi, G. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Biofuels*, 41-65.
- Galbe, M., Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**(6), 618-628.
- García, J.A., Pedraza, D. 1997. Informe final del diagnóstico. tecnológico de plantas extractoras de aceite de palma en Colombia, CENIPALMA.
- Garrote, G., Dominguez, H., Parajo, J. 1999a. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *European Journal of Wood and Wood Products*, **57**(3), 191-202.

- Garrote, G., Parajó, J. 2002. Non-isothermal autohydrolysis of Eucalyptus wood. *Wood Science and Technology*, **36**(2), 111-123.
- Ghosh, P., Singh, A. 1993. Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass. *Advances in applied microbiology*, **39**, 295-333.
- Goh, C.S., Lee, K.T., Bhatia, S. 2010. Hot compressed water pretreatment of oil palm fronds to enhance glucose recovery for production of second generation bio-ethanol. *Bioresource technology*, **101**(19), 7362-7367.
- Goh, C.S., Tan, H.T., Lee, K.T., Mohamed, A.R. 2010b. Optimizing ethanolic hot compressed water (EHCW) cooking as a pretreatment to glucose recovery for the production of fuel ethanol from oil palm frond (OPF). *Fuel Processing Technology*, **91**(9), 1146-1151.
- Gonçalves, A.R., Esposito, E., Benar, P. 1998. Evaluation of *Panus tigrinus* in the delignification of sugarcane bagasse by FTIR-PCA and pulp properties. *Journal of Biotechnology*, **66**(2-3), 177-185.
- Gooday, G.W. 1995. The dynamics of hyphal growth. *Mycological Research*, **99**(4), 385-394.
- Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. 1992. Substrate specificity and properties of the aryl alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*, **209**(2), 603-611.
- Guillén, F., Martínez, M.J., Muñoz, C., Martínez, A.T. 1997. Quinone Redox Cycling in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii* Leading to Extracellular Production of Superoxide Anion Radical\* 1. *Archives of biochemistry and biophysics*, **339**(1), 190-199.
- Gupta, R., Mehta, G., Khasa, Y., Kuhad, R. 2011. Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of cellulose. *Biodegradation*, **22**(4), 797-804.
- Gutiérrez, A., José, C., Ibarra, D., Rencoret, J., Romero, J., Speranza, M., Camarero, S., Martínez, M.J., Martínez, A.T. 2006. Enzymatic removal of free and conjugated sterols forming pitch deposits in environmentally sound bleaching of eucalypt paper pulp. *Environmental science & technology*, **40**(10), 3416-3422.
- Gutiérrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., José, C., Martínez, A.T. 2007. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-

- derived phenols as natural mediators. *Environmental science & technology*, **41**(11), 4124-4129.
- Hakulinen, N., Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., Rouvinen, J. 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural & Molecular Biology*, **9**(8), 601-605.
- Hamelinck, C.N., Hooijdonk, G., Faaij, A.P.C. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass and Bioenergy*, **28**(4), 384-410.
- Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G., Faaij, A.P.C. 2003. Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance as development progresses. *University Utrecht, November*.
- Hamisan, A., Abd-Aziz, S., Kamaruddin, K., Shah, U.K.M., Shahab, N., Hassan, M. 2009. Delignification of oil palm empty fruit bunch using chemical and microbial pretreatment methods. *International Journal of Agricultural Research*, **4**(8), 250-256.
- Hasibuan, R., Daud, W.R.W. 2009. Quality changes of superheated steam-dried fibers from oil palm empty fruit bunches. *Drying Technology*, **27**(2), 194-200.
- Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, **13**(2-3), 125-135.
- Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Bergbauer, M., Szewzyk, U., Martínez, A.T. 1998. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS letters*, **428**(3), 141-146.
- Hendriks, A., Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, **100**(1), 10-18.
- Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Science and Technology*, **24**(1), 23-63.
- Hinkova, A., Bohacenko, I., Bubnik, Z., Hrstkova, M., Jankovska, P. 2004. Mineral membrane filtration in refinement of starch hydrolysates. *Journal of Food Engineering*, **61**(4), 521-526.
- Hinkova, A., Bubnik, Z., Kadlec, P., Pridal, J. 2002. Potentials of separation membranes in the sugar industry. *Separation and purification technology*, **26**(1), 101-110.

- Hong, L., Ibrahim, D., Omar, I. 2010. Microscopic Studies Of Oil Palm Frond During Processing For Saccharification. *The Internet Journal of Bioengineering*, **4**(2).
- Huang, D., Zeng, G., Peng, Z., Zhang, P., Hu, S., Jiang, X., Feng, C., Chen, Y. 2008. Biotransformation of rice straw by *Phanerachaeete chrysosporium* and the related ligninolytic enzymes. *International Journal of Biotechnology*, **10**(1), 86-92.
- Hussain, A., Ani, F.N., Darus, A.N., Mokhtar, H., Azam, S., Mustafa, A. 2006. Thermochemical behaviour of empty fruit bunches and oil palm shell waste in a circulating fluidized-bed combustor (CFBC). *Journal of Oil Palm Research*, **18**, 210-218.
- Ibrahim, M., Ngah, W., Norliyana, M., Daud, W., Rafatullah, M., Sulaiman, O., Hashim, R. 2010. A novel agricultural waste adsorbent for the removal of lead (II) ions from aqueous solutions. *Journal of hazardous materials*, **182**(1-3), 377-385.
- Ibrahim, M.N.M., Rosli, W.D.W., Chuah, S. 2005. Monitoring quality of soda black liquor of oil palm empty fruit bunch fibers in terms of storage time and Temperature. *J. Teknologi*, **42**, 21-28.
- Ikehata, K., Buchanan, I.D., Smith, D.W. 2004. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science*, **3**(1), 1-19.
- Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., Watanabe, T. 2003. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of biotechnology*, **103**(3), 273-280.
- Jacob, S., Jaffrin, M. 2000. Purification of brown cane sugar solutions by ultrafiltration with ceramic membranes: investigation of membrane fouling. *Separation Science and Technology*, **35**(7), 989-1010.
- Jeffries, T.W. 1996. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Current opinion in Biotechnology*, **7**(3), 337-342.
- Jeffries, T.W. 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. in: *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer, Dordrecht, pp. 233-277.
- Jensen Jr, K.A., Bao, W., Kawai, S., Srebotnik, E., Hammel, K.E. 1996. Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermisporea* in the absence of lignin peroxidase. *Applied and environmental microbiology*, **62**(10), 3679.

- 
- Karode, S., Gupta, B., Courtois, T. 2000. Ultrafiltration of raw Indian sugar solution using polymeric and mineral membranes. *Separation Science and Technology*, **35**(15), 2473-2483.
- Karunanandaa, K., Varga, G. 1996. Colonization of crop residues by white-rot fungi: cell wall monosaccharides, phenolic acids, ruminal fermentation characteristics and digestibility of cell wall fiber components in vitro. *Animal feed science and technology*, **63**(1-4), 273-288.
- Karunanandaa, K., Varga, G., Akin, D., Rigsby, L., Royse, D. 1995. Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in chemical composition and structure. *Animal feed science and technology*, **55**(3-4), 179-199.
- Kauráková, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N., Ebringerova, A. 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate polymers*, **43**(2), 195-203.
- Kawai, S., Asukai, M., Ohya, N., Okita, K., Ito, T., Ohashi, H. 1999. Degradation of a non phenolic O 4 substructure and of polymeric lignin model compounds by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of 1 hydroxybenzotriazole. *FEMS microbiology letters*, **170**(1), 51-57.
- Kawai, S., Umezawa, T., Higuchi, T. 1988. Degradation mechanisms of phenolic [beta]-1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*\* 1. *Archives of biochemistry and biophysics*, **262**(1), 99-110.
- Kelly-Yong, T.L., Lee, K.T., Mohamed, A.R., Bhatia, S. 2007. Potential of hydrogen from oil palm biomass as a source of renewable energy worldwide. *Energy Policy*, **35**(11), 5692-5701.
- Kersten, P.J. 1990. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**(8), 2936.
- Khajavi, S.H., Kimura, Y., Oomori, T., Matsuno, R., Adachi, S. 2005. Degradation kinetics of monosaccharides in subcritical water. *Journal of Food Engineering*, **68**(3), 309-313.
- Kirk, T.K. 1985. The discovery and promise of lignin-degrading enzymes. pp. 27-42.
- Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E., Farrell, R.L. 1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology*, **8**(1), 27-32.



- Kirk, T.K., Farrell, R.L. 1987. Enzymatic" combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Reviews in Microbiology*, **41**(1), 465-501.
- Kirk, T.K., Koning Jr, J., Burgess, R., Akhtar, M., Blanchette, R., Cameron, D., Cullen, D., Kersten, P., Lightfoot, E., Myers, G. 1993. Biopulping: a glimpse of the future? *Research paper FPL (USA)*.
- Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W., Lorenz, L., Zeikus, J. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of microbiology*, **117**(3), 277-285.
- Korner, I., Faix, O., Wienhaus, O. 1992. Attempt to determine brown-rot breakdown of scots pine wood with the aid of FTIR spectroscopy. *Holz als Roh-und Werkstoff*, **50**(9), 363-367.
- Krokida, M.K., Marinos-Kouris, D. 2003. Rehydration kinetics of dehydrated products. *Journal of Food Engineering*, **57**(1), 1-7.
- Kuhad, R., Singh, A., Eriksson, K.E. 1997. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Biotechnology in the pulp and paper industry*, 45-125.
- Kumar, R., Mago, G., Balan, V., Wyman, C.E. 2009b. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresource technology*, **100**(17), 3948-3962.
- Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J. 2000. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied biochemistry and biotechnology*, **84**(1), 617-632.
- Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal, M.J., Lynd, L.R. 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource technology*, **81**(1), 33-44.
- Law, K.N., Daud, W.R.W., Ghazali, A. 2007. Morphological and chemical nature of fiber strands of oil palm empty-fruit bunch (OPEFB). *Bioresources*, **2**(3), 351-362.
- Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of biotechnology*, **56**(1), 1-24.

- Liu, C., Wyman, C.E. 2005. Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource technology*, **96**(18), 1978-1985.
- Loboguerrero, C. 2007. Exploración de la factibilidad del aprovechamiento de los residuos de la palma de aceite para convertirlos en azúcares fermentables. Proyecto de grado. Universidad de los Andes.
- Lopez, M.J., del Carmen Vargas-García, M., Suárez-Estrella, F., Moreno, J. 2006. Bidelignification and humification of horticultural plant residues by fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **57**(1), 24-30.
- Lu, C., Wang, H., Luo, Y., Guo, L. 2010. An efficient system for pre-delignification of gramineous biofuel feedstock in vitro: Application of a laccase from *Pycnoporus sanguineus* H275. *Process Biochemistry*, **45**(7), 1141-1147.
- Ma, F., Yang, N., Xu, C., Yu, H., Wu, J., Zhang, X. 2010. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. *Bioresource technology*, **101**(24), 9600-9604.
- Madaeni, S.S., Tahmasebi, K., Kerendi, S.H. 2004. Sugar syrup concentration using reverse osmosis membranes. *Engineering in life sciences*, **4**(2), 187-190.
- Malovík, V., Yaropolov, A., Varfolomeev, S. 1984. Oxidation of lignins and their components by oxygen in the presence of laccase from *Polyporus versicolor*. lignin detection by an enzyme electrode. *Collection of Czechoslovak chemical communications*, **49**(6), 1390-1394.
- Mandels, M., Weber, J. 1969a. The production of cellulases. American Chemical Society. pp. 391.
- Mandels, M., Weber, J. 1969b. The production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.*, **95**, 391-414.
- Manjarres, K., Piñeros, Y. 2007. Producción de celulasas mediante cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. sobre residuos de palma de aceite. in: *IX Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos*. Isla Margarita.
- Manjarrés, K., Piñeros, Y., Rodríguez-Sandoval, E. 2011. Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida sobre residuos de palma. *Bioagro*, **23**(1), 19-26.

- Mansfield, S.D., Mooney, C., Saddler, J.N. 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology progress*, **15**(5), 804-816.
- Mansor, H., Ahmad, A.R. 1991. Chemical composition of the oil palm trunk. pp. 335-342.
- Martin-Sampedro, R., Eugenio, M., Carbajo, J., Villar, J. 2011. Combination of steam explosion and laccase-mediator treatments prior to *Eucalyptus globulus* kraft pulping. *Bioresource technology*.
- Martin, C., Klinke, H.B., Thomsen, A.B. 2007. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**(3), 426-432.
- Martínez, A., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., Del Río, J.C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, **8**(3), 195-204.
- Matsushashi, S., Kume, T., Hashimoto, S., Awang, M.R. 1995. Effect of  $\gamma$ -irradiation on enzymatic digestion of oil palm empty fruit bunch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **69**(2).
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid (DNS) for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428.
- Moilanen, U., Kellok, M., Galkin, S., Viikari, L. 2011. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*.
- Moniruzzaman, M. 1996. Effect of steam explosion on the physicochemical properties and enzymatic saccharification of rice straw. *Applied biochemistry and biotechnology*, **59**(3), 283-297.
- Montane, D., Farriol, X., Salvado, J., Jollez, P., Chornet, E. 1998. Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor-phase alkaline pulping of wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, **14**(3), 261-276.
- Montenecourt, B.S., Eveleigh, D.E. 1979. Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. *Adv. Chem. Ser.*, **181**, 289-301.
- Moore, A., Owen, N. 2001. Infrared spectroscopic studies of solid wood. *Applied Spectroscopy Reviews*, **36**, 65-86.

- Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R. 2005a. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource technology*, **96**(18), 1986-1993.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. 2005b. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, **96**(6), 673-686.
- Mukhopadhyay, M., Kuila, A., Tuli, D., Banerjee, R. 2011. Enzymatic depolymerization of *Ricinus communis*, a potential lignocellulosic for improved saccharification. *Biomass & bioenergy*, **35**(8), 3584-3591.
- Nabarlatz, D., Ebringerova, A., Montane, D. 2007. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate polymers*, **69**(1), 20-28.
- Nunes, S.P., Wiley, J., Sons, I. 2001. *Membrane technology*. Wiley Online Library.
- Ojeda, K., Kafarov, V. 2009. Exergy analysis of enzymatic hydrolysis reactors for transformation of lignocellulosic biomass to bioethanol. *Chemical Engineering Journal*, **154**(1), 390-395.
- Ojeda, K., Sánchez, E., Kafarov, V. 2011. Sustainable ethanol production from lignocellulosic biomass—Application of exergy analysis. *Energy*, **36**(4), 2119-2128.
- Oliva, J.M. 2003. Efecto De Los Productos De Degradación Originados En La Explosión Por Vapor De Biomasa De Chopo Sobre *Kluyveromyces Marxianus*. Colección Documentos CIEMAT. ISBN 84-7834-457-8. 160 p.
- Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. 2009. Use of Weibull distribution for describing kinetics of antioxidant potential changes in fresh-cut watermelon. *Journal of Food Engineering*, **95**(1), 99-105.
- Oomori, T., Khajavi, S.H., Kimura, Y., Adachi, S., Matsuno, R. 2004. Hydrolysis of disaccharides containing glucose residue in subcritical water. *Biochemical Engineering Journal*, **18**(2), 143-147.
- Palmer, M.W. 2007. Biofuels and the environment. *Science*, **317**(5840), 897.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification *Bioresource technol*, **74**, 17-24.

- Palonen, H., Viikari, L. 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and Bioengineering*, **86**(5), 550-557.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*, **77**(1), 149-162.
- Pandey, K.K., Nagveni, H. 2007. Rapid characterisation of brown and white rot degraded chir pine and rubberwood by FTIR spectroscopy. *European Journal of Wood and Wood Products*, **65**(6), 477-481.
- Pandey, K.K., Pitman, A.J. 2003. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **52**(3), 151-160.
- Parisi, F. 1989. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzates. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, **38**, 53-87.
- Patrouilleau, R.D., Lacoste, C., Yapura, P., Casanovas, M. 2007. Perspectivas de los biocombustibles en la Argentina, con énfasis en el etanol de base celulósica. *Buenos Aires, INTA. Unidad de Coyuntura y Prospectiva. Disponible en: [www.inta.gov.ar/actual/info/perspectiva\\_%20biocombus.pdf](http://www.inta.gov.ar/actual/info/perspectiva_%20biocombus.pdf)*.
- Pauli, G. 1999. Forest Products for a Sustainable Economy. University of Tennessee, EERC.
- Peleg, M. 2000. Microbial survival curves -- the reality of flat "shoulders" and absolute thermal death times. *Food Research International*, **33**(7), 531-538.
- Pérez, J., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Sáez, F., Negro, M., Manzanares, P. 2008. Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel*, **87**(17-18), 3640-3647.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, T., Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, **5**(2), 53-63.
- Piarpuzan, D., Quintero, J.A., Cardona, C.A. 2011. Empty fruit bunches from oil palm as a potential raw material for fuel ethanol production. *Biomass and Bioenergy*.
- Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T. 2002. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(40), 37663.

- 
- Prasertsan, S., Prasertsan, P. 1996. Biomass residues from palm oil mills in Thailand: an overview on quantity and potential usage. *Biomass and Bioenergy*, **11**(5), 387-395.
- Puri, V.P. 1984. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**(10), 1219-1222.
- Quintana, G.C., Arroyave, M.S., Suárez, D.E. 2008. Obtención de pulpa a partir de los residuos de palma africana pretratados con steam explosion. . in: *Memorias V Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel*
- Rabinovich, M., Melnick, M., Bolobova, A. 2002. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Moscow)*, **67**(8), 850-871.
- Rahman, S.H.A., Choudhury, J.P., Ahmad, A.L. 2006. Production of xylose from oil palm empty fruit bunch fiber using sulfuric acid. *Biochemical Engineering Journal*, **30**(1), 97-103.
- Rahman, S.H.A., Choudhury, J.P., Ahmad, A.L., Kamaruddin, A.H. 2007. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. *Bioresource technology*, **98**(3), 554-559.
- Raimbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, **1**(3), 26-27.
- Ramos, L.P. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, **26**, 863-871.
- Reddy, N., Yang, Y. 2007. Structure and properties of natural cellulose fibers obtained from sorghum leaves and stems. *Journal of agricultural and food chemistry*, **55**(14), 5569-5574.
- Riva, S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology*, **24**(5), 219-226.
- Roberto, I.C., Mussatto, S.I., Rodrigues, R.C.L.B. 2003. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Industrial Crops and Products*, **17**(3), 171-176.
- Rodríguez Couto, S., Toca Herrera, J.L. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*, **24**(5), 500-513.
- Rodríguez, I., Píneros, Y. 2007. PRODUCTION OF ENZYMATIC COMPLEX IN SOLID STATE FERMENTATION BY *Trichoderma* sp. USING PALM OIL EMPTY FRUIT BUNCH (EFB) AS SUBSTRATE. *Vitae*, **14**(2), 35-42.

- Rogalinski, T., Ingram, T., Brunner, G. 2008. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *The Journal of Supercritical Fluids*, **47**(1), 54-63.
- Rolz, C., De Leon, R., De Arriola, M., De Cabrera, S. 1986. Biodelignification of lemon grass and citronella bagasse by white-rot fungi. *Applied and environmental microbiology*, **52**(4), 607.
- Rosen, M., Dincer, I. 2003. Exergy–cost–energy–mass analysis of thermal systems and processes. *Energy Conversion and Management*, **44**(10), 1633-1651.
- Rosen, M.A., Dincer, I. 2001. Exergy as the confluence of energy, environment and sustainable development. *Exergy, an International journal*, **1**(1), 3-13.
- Ruiz Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T. 1999. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular microbiology*, **31**(1), 223-235.
- Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., Castro, E. 2008. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*, **42**(2), 160-166.
- Saavedra, J.F., Vargas, O.R. 2000. Estimación del impacto ambiental del cultivo de caña de azúcar utilizando la metodología del análisis del ciclo de vida (Acv). *Revista de Ingeniería Universidad de los Andes*, **12**, 61-67.
- Sabiha-Hanim, S., Noor, M.A.M., Rosma, A. 2010. Effect of autohydrolysis and enzymatic treatment on oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) frond fibres for xylose and xylooligosaccharides production. *Bioresource technology*.
- Saha, N., Balakrishnan, M., Ulbricht, M. 2006. Polymeric membrane fouling in sugarcane juice ultrafiltration: role of juice polysaccharides. *Desalination*, **189**(1-3), 59-70.
- Saka, S. 2005. Whole efficient utilization of oil palm to value-added products.
- Saletes, S., Caliman, J.P., Raham, D. 2004. Study of mineral nutrient losses from oil palm empty fruit bunches during temporary storage. *Journal of Oil Palm Research*, **16**(1), 11-21.
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, Á.T., Martínez, M.J. 2011. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource technology*, **102**, 7500-7506.

- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, **27**(2), 185-194.
- Sánchez, O.J., Cardona, C.A. 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, **30**(11), 671-678.
- Sanhueza, E. 2009. Agroetanol:¿ un combustible ambientalmente amigable. *terciencia*, ISSN, 0378-1844.
- Santoyo, F., González, A.E., Terrón, M.C., Ramírez, L., Pisabarro, A.G. 2008. Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial technology*, **43**(2), 137-143.
- Schmidt, K., Bouma, J. 1992. Estimating Shelf-Life of Cottage Cheese Using Hazard Analysis. *Journal of Dairy Science*, **75**(11), 2922-2927.
- Shahriarinnour, M., Wahab, M.N.A., Ariff, A.B., Rosfarizan, M., Shuhaimi, M. 2011. Effect of various pretreatments of oil palm empty fruit bunch fibres for subsequent use as substrate on the performance of cellulase production by *Aspergillus terreus*. *Bioresources*, **6**(1), 291-307.
- Shamsudin, S., Md Shah, U.K., Zainudin, H., Abd-Aziz, S., Mustapa Kamal, S.M., Shirai, Y., Hassan, M.A. 2011. Effect of steam pretreatment on oil palm empty fruit bunch for the production of sugars. *Biomass and Bioenergy*.
- Shi, J. 2007. Microbial pretreatment of cotton stalks by *Phanerochaete chrysosporium* for bioethanol production.
- Shi, J., Chinn, M.S., Sharma-Shivappa, R.R. 2008. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource technology*, **99**(14), 6556-6564.
- Shi, J., Sharma-Shivappa, R.R., Chinn, M., Howell, N. 2009. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, **33**(1), 88-96.
- Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T., Gorton, L. 2006. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme and Microbial technology*, **39**(4), 841-847.



- Simarani, K., Hassan, M., Abd-Aziz, S., Wakisaka, M., Shirai, Y. 2009. Effect of Palm Oil Mill Sterilization Process on the Physicochemical Characteristics and Enzymatic Hydrolysis of Empty Fruit Bunch. *Asian Journal of Biotechnology*, **1**(2), 57-66.
- Singh Arora, D., Kumar Sharma, R. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, **160**(6), 1760-1788.
- Singh, D., Chen, S. 2008. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied microbiology and biotechnology*, **81**(3), 399-417.
- Singh, D., Zeng, J., Laskar, D.D., Deobald, L., Hiscox, W.C., Chen, S. 2011. Investigation of wheat straw biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biomass and Bioenergy*, **35**(3), 1030-1040.
- Singh, G., Leng, T., Kow, D. 1999. *Oil palm and the environment: a Malaysian perspective*. Malaysian Oil Palm Growers' Council.
- Singh, P., Suman, A., Tiwari, P., Arya, N., Gaur, A., Shrivastava, A. 2008. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**(5), 667-673.
- Sjöström, E. 1993. *Wood chemistry: fundamentals and applications*. Academic Pr.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. 2006. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *National Renewable Energy Laboratory*. <http://devafdc.nrel.gov/pdfs/9572.pdf> [www1.eere.energy.gov/biomass/analytical\\_procedures.html#LAP-002](http://www1.eere.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html#LAP-002).
- Stewart, D., McDougall, G.J., Baty, A. 1995. Fourier-transform infrared microspectroscopy of anatomically different cells of flax (*Linum usitatissimum*) stems during development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**(7), 1853-1858.
- Sun, R., Fang, J.M., Mott, L., Bolton, J. 1999. Fractional isolation and characterization of polysaccharides from oil palm trunk and empty fruit bunch fibres. *Holzforschung*, **53**(3), 253-260.
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review\* 1. *Bioresource technology*, **83**(1), 1-11.

- 
- Szklarz, G.D., Antibus, R.K., Sinsabaugh, R.L., Linkins, A.E. 1989. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*, 234-240.
- Tabi, M., Nafissa, A., Zakil, A., Fauzai, M., Fauzan, W.N., Ali, N., Hassan, O. 2008. The usage of empty fruit bunch (EFB) and palm pressed fibre (PPF) as substrates for the cultivation of pleurotus ostreatus. *Jurnal Teknologi*(49), 189-196.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, **9**(9), 1621-1651.
- Taherzadeh, M.J., Niklasson, C., Liden, G. 2000. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. *Biotechnology and bioengineering*, **69**(3).
- Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Tanaka, T. 2005. Evaluation of pretreatment with Pleurotus ostreatus for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**(6), 637-643.
- Taniguchi, M., Takahashi, D., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., Kouya, T., Tanaka, T. 2010. Effect of steam explosion pretreatment on treatment with Pleurotus ostreatus for the enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of bioscience and bioengineering*, **110**(4), 449-452.
- Telke, A.A., Kagalkar, A.N., Jagtap, U.B., Desai, N.S., Bapat, V.A., Govindwar, S.P. 2011. Biochemical characterization of laccase from hairy root culture of Brassica juncea L. and role of redox mediators to enhance its potential for the decolorization of textile dyes. *Planta*, 1-13.
- Tjeerdsma, B., Militz, H. 2005. Chemical changes in hydrothermal treated wood: FTIR analysis of combined hydrothermal and dry heat-treated wood. *European Journal of Wood and Wood Products*, **63**(2), 102-111.
- Tomati, U., Galli, E., Pasetti, L., Volterra, E. 1995. Bioremediation of olive-mill wastewaters by composting. *Waste management & research*, **13**(6), 509.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource technology*, **72**(2), 169-183.
- Umikalsom, M., Ariff, A., Zulkifli, H., Tong, C., Hassan, M., Karim, M. 1997. The treatment of oil palm empty fruit bunch fibre for subsequent use as substrate for cellulase production by Chaetomium globosum Kunze. *Bioresource technology*, **62**(1-2), 1-9.

- Umikalsom, M.S. 1997. Optimization of cellulase production by *Chaetomium globosum* using oil palm empty fruit bunch as substrate, PhD thesis, Universiti Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Malaysia.
- Umikalsom, M.S., Ariff, A.B., Hassan, M.A., Karim, M.I.A. 1998. Kinetics of cellulase production by *Chaetomium globosum* at different levels of dissolved oxygen tension using oil palm empty fruit bunch fibre as substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **14**(4), 491-498.
- Unluturk, S., AtIlgan, M.R., Baysal, A.H., Unluturk, M.S. 2010. Modeling inactivation kinetics of liquid egg white exposed to UV-C irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, **142**(3), 341-347.
- van Boekel, M.A.J.S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, **74**(1-2), 139-159.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Dept. of Animal, S., Cornell, U. 1985. *Analysis of forages and fibrous foods*. Cornell University USA.
- van Walsum, G.P., Allen, S.G., Spencer, M.J., Laser, M.S., Antal, M.J., Lynd, L.R. 1996. Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. *Applied biochemistry and biotechnology*, **57**(1), 157-170.
- Vares, T., Lundell, T.K., Hatakka, A.I. 1993. Production of multiple lignin peroxidases by the white-rot fungus *Phlebia ochraceofulva*. *Enzyme and microbial technology*, **15**(8), 664-669.
- Vidal, P.F., Molinier, J. 1988. Ozonolysis of lignin-improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass(London)*, **16**(1), 1-17.
- Viikari, L. 2002. Trends in pulp and paper biotechnology. *Progress in Biotechnology*, **21**, 1-5.
- Vikineswary, S., Abdullah, N., Renuvathani, M., Sekaran, M., Pandey, A., Jones, E. 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource technology*, **97**(1), 171-177.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gomez, S.J., Diaz-Godínez, G., Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, **13**(2-3), 157-167.

- Viola, E., Cardinale, M., Santarcangelo, R., Villone, A., Zimbardi, F. 2008a. Ethanol from eel grass via steam explosion and enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, **32**(7), 613-618.
- Viola, E., Zimbardi, F., Cardinale, M., Cardinale, G., Braccio, G., Gambacorta, E. 2008b. Processing cereal straws by steam explosion in a pilot plant to enhance digestibility in ruminants. *Bioresource technology*, **99**(4), 681-689.
- Wan, C., Li, Y. 2011. Effect of Hot Water Extraction and Liquid Hot Water Pretreatment on the Fungal Degradation of Biomass Feedstocks. *Bioresource technology*.
- Wan, C., Li, Y. 2010. Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresource technology*, **101**(16), 6398-6403.
- Wang, X., Hu, J., Zeng, J. 2012. STEAM EXPLOSION PULPING OF OIL PALM EMPTY FRUIT BUNCH FIBER. *BioResources*, **7**(1).
- Ward, O.P., Singh, A. 2002. Bioethanol technology: developments and perspectives. *Advances in applied microbiology*, **51**, 53-80.
- Watanabe, T., Kuwahara, M. 2002. Pre-treatment of Oil Palm Empty Fruit Bunch by White-rot Fungi for Enzymatic Saccharification.
- Wong, D.W.S. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology*, **157**(2), 174-209.
- Wormeyer, K., Ingram, T., Saake, B., Brunner, G., Smirnova, I. 2010. Comparison of different pretreatment methods for lignocellulosic materials. Part II: influence of pretreatment on the properties of rye straw lignin. *Bioresource technology*.
- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource technology*, **96**(18), 1959-1966.
- Yan, H., Hua, Z., Qian, G., Wang, M., Du, G., Chen, J. 2009. Analysis of the chemical composition of cotton seed coat by Fourier-transform infrared (FT-IR) microspectroscopy. *Cellulose*, **16**(6), 1099-1107.

- Yang, B., Wyman, C.E. 2004. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, **86**(1), 88-98.
- Yang, B., Wyman, C.E. 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, bioproducts and biorefining*, **2**(1), 26-40.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Liang, D.T., Zheng, C. 2006. Pyrolysis of palm oil wastes for enhanced production of hydrogen rich gases. *Fuel Processing Technology*, **87**(10), 935-942.
- Yu, H., Du, W., Zhang, J., Ma, F., Zhang, X., Zhong, W. 2010. Fungal treatment of cornstalks enhances the delignification and xylan loss during mild alkaline pretreatment and enzymatic digestibility of glucan. *Bioresource technology*, **101**(17), 6728-6734.
- Yu, J., Zhang, J., He, J., Liu, Z., Yu, Z. 2009. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresource technology*, **100**(2), 903-908.
- Yusoff, S. 2006. Renewable energy from palm oil-innovation on effective utilization of waste. *Journal of cleaner production*, **14**(1), 87-93.
- Zeng, M., Mosier, N.S., Huang, C.P., Sherman, D.M., Ladisch, M.R. 2007. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **97**(2), 265-278.
- Zhang, L., Li, D., Wang, L., Wang, T., Chen, X.D., Mao, Z. 2008. Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw. *Bioresource technology*, **99**(17), 8512-8515.
- Zhang, X., Xu, C., Wang, H. 2007a. Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **104**(2), 149-151.
- Zhang, X., Yu, H., Huang, H., Liu, Y. 2007b. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **60**(3), 159-164.
- Zheng, H., Lu, H. 2011. Use of kinetic, Weibull and PLSR models to predict the retention of ascorbic acid, total phenols and antioxidant activity during storage of pasteurized pineapple juice. *LWT - Food Science and Technology*, **44**(5), 1273-1281.

- Zhong, W., Yu, H., Song, L., Zhang, X. 2011. Combined pretreatment with white-rot fungus and alkali at near room-temperature for improving saccharification of corn stalks. *BioResources*, **6**(3).
- Zhu, S., Wu, Y., Chen, Q., Yu, Z., Wang, C., Jin, S., Ding, Y., Wu, G. 2006. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. *Green Chemistry*, **8**(4), 325-327.
- Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Vinzant, T., Schell, D.J., McMillan, J.D., Zhang, Y.H.P. 2009. Comparative study of corn stover pretreated by dilute acid and cellulose solvent based lignocellulose fractionation: Enzymatic hydrolysis, supramolecular structure, and substrate accessibility. *Biotechnology and Bioengineering*, **103**(4), 715-724.
- Zhuang, X., Yuan, Z., Ma, L., Wu, C., Xu, M., Xu, J., Zhu, S., Qi, W. 2009. Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water. *Biotechnology advances*, **27**(5), 578-582.