

**OBTENCIÓN DE ETANOL COMBUSTIBLE A PARTIR DEL PARÉNQUIMA
DE LA HOJA DE LA PALMA AFRICANA POR HIDRÓLISIS OXIDATIVA Y
FERMETACIÓN CON *Zymomonas mobilis***

**LILIANA ALEXIS ESPITALETA CASAS
ANDREA DEL PÍLAR RODRÍGUEZ SILVESTRE**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2004

**OBTENCIÓN DE ETANOL COMBUSTIBLE A PARTIR DEL PARÉNQUIMA
DE LA HOJA DE LA PALMA AFRICANA POR HIDRÓLISIS OXIDATIVA Y
FERMETACIÓN CON *Zymomonas mobilis***

**DIRECTOR: GUILLERMO GONZALEZ SIERRA
ESCUELA DE QUÍMICA**

**CO-DIRECTOR: CLEMENTE RETAMOSO
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**CO-DIRECTOR: MARIELA CARREÑO DE ARANGO
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2004

A Dios por su fidelidad durante toda mi carrera universitaria.
A mis padres, mi hermana Mónica y mis tíos
Marcos y Nubia por su apoyo incondicional.

Liliana Espitaleta Casas

A Dios por darme fortaleza durante esta etapa en mi vida.
A mi hija quién me motiva a ser cada día mejor.
A mis padres y mi familia por su apoyo constante e incondicional.
A mis amigos por los momentos compartidos,
y a todas aquellas personas que de alguna forma me colaboraron en alcanzar este objetivo.

Andrea Rodríguez

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
FUNDAMENTO TEÓRICO	4
1.1 Palma africana	4
1.1.1 Generalidades	4
1.1.2 Área sembrada de palma africana	5
1.1.3 Proyección	7
1.2 Composición del material de partida	8
1.2.1 Celulosa	8
1.2.2 Hemicelulosas	9
1.2.3 Lignina	10
1.2.4 Extraíbles	10
1.3 Métodos de pretratamiento del material	11
1.3.1 Pretratamientos físicos	11
1.3.1.1 Molienda	11
1.3.1.2 Radiación de alta energía	12
1.3.2 Pretratamientos químicos	12
1.3.2.1 Reactivos removedores de lignina y/o hemicelulosa	12
1.3.2.2 Reactivos disolventes de celulosa	12
1.3.3 Pretratamientos fisico-químicos	13
1.3.3.1 Tratamiento hidrotérmico	13
1.3.3.2 Pretratamiento con vapor y adición de agentes químicos	13

1.3.3.3 Explosión por congelamiento	13
1.3.3.4 Procesos de oxidación húmeda	13
1.3.4 Petratamientos biológicos	14
1.4 Hidrólisis	14
1.4.1Hidrólisis ácida	14
1.4.2 Hidrólisis enzimática	14
1.4.3Hidrólisis oxidativa	14
1.5 Azucares reductores	15
1.6 Fermentación	16
1.6.1 Fermentación con <i>Zymomonas mobilis</i>	16
1.7 Conservación de cepas microbianas	18
1.7.1 Métodos de elección o de conservación a largo plazo	19
1.7.1.1 Conservación por congelación	19
1.8 Curva de crecimiento	21
1.8.1 Cinética de crecimiento de las cepas de <i>Zymomonas mobilis</i>	22
1.9 Determinación del crecimiento microbiano	22
1.9.1 Efecto de los factores ambientales sobre el crecimiento	23
1.9.1.1 Temperatura	23
1.9.1.2 pH	24
1.9.1.3 Agua	24
1.9.1.4 Oxígeno	25
1.10 Procesos industriales	25
1.11 Ventajas del uso del bioetanol	27
2. PARTE EXPERIMENTAL	31
2.1 Recolección del material y obtención del parénquima	31
2.1.1 Caracterización del parénquima	31
2.1.1.1 Análisis proximal	32
2.1.1.2 Análisis químico	33
2.2 Hidrólisis oxidativa	34

2.2.1 Comparación con hidrólisis ácida	36
2.3 Curva de crecimiento	36
2.3.1 Recuperación de la cepa de <i>Zymomonas mobilis</i>	37
2.3.2 Preparación de la escala de Mc Farland	39
2.3.3 Determinación de la curva de crecimiento	40
2.3.4 Azúcares reductores	41
2.4 Fermentación	41
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
3.1 Caracterización del parénquima	47
3.1.1 Análisis químico	47
3.1.2 Análisis proximal	48
3.2 Hidrólisis oxidativa	49
3.3 Hidrólisis ácida	53
3.4 Curva patrón de escala de Mc Farland	54
3.5 Curva de crecimiento	55
3.6 Fermentación	60
4. CONCLUSIONES	67
5. RECOMENDACIONES	69
6. BIBLIOGRAFÍA	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Regiones del país con Cultivo de palma	5
Figura 2. Visión del área sembrada en palma de aceite en Colombia	8
Figura 3. Metodología	30
Figura 4.Reactor	35
Figura 5. Características microscópicas de la bacteria <i>Zymomonas mobilis</i>	36
Figura 6. Características macroscópicas de la colonia de <i>Zymomonas mobilis</i>	37
Figura 7. Curva patrón escala Mc Farland	39
Figura 8. fermentador de 1 litro	41
Figura 9. Fermentador de 4 litros	44
Figura 10. Comportamiento del rendimiento de azúcares con la temperatura	49
Figura 11. Comportamiento de los azúcares con el tiempo	51
Figura 12. Curva de crecimiento para diferentes porcentajes de inóculo	54
Figura 13. Curva de crecimiento en el medio con y sin agitación	55
Figura 14. Curva de crecimiento en el licor 1	56
Figura 15. Curva de crecimiento en el licor 2	57
Figura 16. Comparación curva de crecimiento en el hidrolizado del parénquima	58
figura 17. Curvas de crecimiento en el medio con y sin xilosa	59
Figura 18. Curva de concentración de etanol Vs índice de refracción	60
Figura 19. Curva de concentración de etanol Vs. Tiempo	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Hectáreas cultivada de palma africana en el país	6
Tabla 2. Departamento con cultivos de palma de aceite 1.999	6
Tabla 3. Normas empleadas en el análisis proximal	32
Tabla 4. Normas empleadas en el análisis químico	33
Tabla 5. Preparación de la escala de Mc Farland	38
Tabla 6. Concentración- índice de refracción	42
Tabla 7. Caracterización química del parénquima	46
Tabla 8. Análisis proximal del parénquima	47
Tabla 9. Hidrólisis a diferentes temperaturas	49
Tabla 10. Hidrólisis con diferente tiempo de reacción	50
Tabla 11. Hidrólisis a diferentes presiones	52
Tabla 12. Hidrólisis ácida	53
Tabla 13. Resultados obtenidos para diferentes pH	62
Tabla 14. Resultados obtenidos para diferentes temperaturas	63
Tabla 15. Resultados obtenidos para diferentes concentraciones de Azúcares	63
Tabla 16. Resultados obtenidos para fermentaciones de 4 litros	64
Tabla 17. Resultados obtenidos para la hidrólisis ácida	64
Tabla 18. Resultados obtenidos para azúcares después de la Fermentación	65

INTRODUCCIÓN

Las crecientes demandas de energía en todos los países aparejadas con la disminución de las reservas disponibles de combustibles fósiles, aconsejan incrementar el aprovechamiento de otros recursos energéticos, que por otro lado contribuyan favorablemente a la economía y sostenibilidad ambiental de los países de América Latina. En la actualidad no hay controles para reducir el índice de contaminación ambiental generados por los combustibles; en otros países se ha adicionado el etanol a la gasolina disminuyendo así el índice de contaminación.

Colombia posee una gran diversidad de recursos biomásicos de manera que desde el punto de vista de disponibilidad de materia prima se encuentra en una posición favorable. Uno de estos recursos biomásicos es la palma africana; para la extracción de aceite a partir de su fruto, es necesario podar las hojas como parte de las labores de mantenimiento del cultivo. En la zona oriental, que involucra los departamentos de Santander y Cesar, las hectáreas plantadas son 52.000 (en producción); cada hectárea cuenta con 140 palmas, las cuales se podan dos veces por año produciendo en promedio 20 hojas cada palma por año y el peso promedio de cada hoja es de 10 Kg., por lo tanto, el peso de las hojas disponibles por año en la zona oriental es de 1.456.000 toneladas, de las cuales el parénquima corresponde a 291.210 toneladas por año.

El presente proyecto propone utilizar el parénquima o médula de la hoja de la palma africana como materia prima para la producción de etanol. Dentro del plan de estudio de este material se realizó el análisis del parénquima, el cual mostró un alto contenido de carbohidratos. La materia del parénquima está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosas y lignina. Los dos primeros compuestos son polisacáridos que generan por hidrólisis azúcares

fermentables, los cuales pueden ser aprovechados con fines energéticos. Se realizó la hidrólisis de estos residuos vegetales para la producción de monosacáridos que puedan utilizarse como fuente de energía para el cultivo de microorganismos. Este proceso de hidrólisis oxidativa es una forma de eliminar residuos vegetales que pueden entrar a contaminar el medio ambiente. La hidrólisis oxidativa implica un tratamiento de la biomasa con una solución de ácidos orgánicos presentes de residuos vegetales, con aire, a altas temperaturas y presiones.

Los estudios se han centrado en la fermentación del contenido real o potencial de azúcares de la biomasa bien para la producción de alcohol u otros compuestos volátiles que reemplacen a los combustibles convencionales de los automóviles. Se empleó como organismo fermentador la *Zymomonas mobilis* que se reconoce por su habilidad para convertir glucosa rápidamente a etanol con un alto rendimiento, teniendo en cuenta durante esta etapa las condiciones requeridas de temperatura, pH y concentración.

En Colombia; fue aprobada por el congreso la ley 693 del 2001 del día 19 de septiembre, donde se dictan normas para que en el 2005 los vehículos de Bogotá, Barranquilla, Cali y Medellín consuman gasolina mezclada, para reducir los niveles de contaminación. El porcentaje de etanol anhidro en volumen a 60 °F a utilizar en la mezcla con gasolina básica es de 10 ± 0.5 para lo cual se cuenta con cuatro (4) años a partir del establecimiento de la ley; en el 2006 deben haber entrado a utilizar la mezcla Bucaramanga, Pereira, Cúcuta y Cartagena.

El gobierno confía en que el etanol reducirá la emisión de gases contaminantes de por lo menos dos millones de vehículos que circulan en

las ocho principales ciudades del país, evitara el agotamiento de pozos petroleros, reducirá la importación de gasolina e impulsará la agroindustria.

Con este estudio logramos dar como alternativa viable la utilización de la hoja de la palma africana, para la obtención de etanol, debido a su contenido de polisacáridos hidrolizables y al gran número de hectáreas cultivadas en esta región.

1. FUNDAMENTO TEORICO

1.1 PALMA AFRICANA

1.1.1 GENERALIDADES

La palma africana es originaria del Golfo de Guinea (África occidental) y se extiende hasta 15° de latitud norte y sur. Es un cultivo que tarda entre 2 y 3 años para empezar a producir frutos y puede hacerlo durante más de 25 años. Dentro de los cultivos de semillas oleaginosas es el que produce mayor cantidad de aceite por hectárea. Con un contenido del 50% en el fruto, puede rendir de 3.000 a 5.000 Kg de aceite de pulpa por hectárea, mas 600 a 1.000 Kg de aceite de palmiste¹.

La palma africana fue introducida a Colombia en 1932 pero el desarrollo comercial del cultivo se inició a finales de los años cincuenta. A mediados de la década del sesenta ya existían 18.000 hectáreas en producción en los departamentos del César, Magdalena, Santander y Norte de Santander. Los cultivos se expandieron a otros departamentos y según datos publicados en 1995 por Fedepalma, en ese año ya sumaban alrededor de 130.000 hectáreas, siendo el principal cultivo de oleaginosas del país, fundamentalmente en las zonas norte, central y oriental².

La palma de aceite es una oleaginosa perenne, con inicio de producción a los 18 meses después de la siembra, alcanzando su potencial máximo progresivamente dentro de los 3 a 5 años siguientes, según las condiciones ecológicas de la región.

Bajo condiciones normales, el tronco sostiene entre cuarenta y cincuenta y seis hojas. Si éstas no son podadas o cortadas durante la cosecha y actividades de mantenimiento, este número sobrepasa las sesenta hojas (produce entre 20 a 30 hojas por año). Usualmente se obtiene una

proporción de 3 hojas por cada racimo producido; para una densidad de 143 palmas por hectárea, que es lo que normalmente se maneja, se producen 24 toneladas de racimos al año, es decir, que una palma aproximadamente produce 168 Kg. de racimos y cada uno de estos racimos tiene un peso promedio de 18 Kg.

La mayoría de las palmas adultas producen un promedio entre dos y tres hojas nuevas cada mes. Las hojas son de color verde, tienen un largo de 6 a 8 m y están arregladas en espirales sobre el tronco¹.

1.1.2 AREA SEMBRADA DE PALMA AFRICANA



(FEDEPALMA,2002)

Figura 1. Regiones del país con Cultivo de palma

Tabla 1. Hectáreas cultivadas de palma africana en el país

AÑO	AREA	CENTRAL		NORTE		OCCIDENTAL		ORIENTAL		TOTALES
		Ha	P (%)	Ha	P(%)	Ha	P(%)	Ha	P (%)	Ha
2000	Sembrada	39,126	24.9	42,817	27.2	21,602	13.7	53,783	34.2	157,327
	En producción	30,498	22.6	35,700	26.5	18,249	13.5	50,325	37.3	134,772
	En desarrollo	8,628	38.3	7,117	31.6	3,353	14.9	3,458	15.3	22,555
2001	Sembrada	43.773	26.0	46.843	27.8	22.794	13.5	55.030	32.7	168.440
	En producción	32.172	23.2	37.117	26.8	18.381	13.3	50.787	36.7	138.457
	En desarrollo	11.601	38.7	9.726	32.4	4.413	14.7	4.243	14.2	29.983
2002 e	Sembrada	48.825	26.4	54.259	29.3	25.056	13.5	57.025	30.8	185.165
	En producción	33.698	23.2	38.878	26.8	19.253	13.3	53.197	36.7	145.027
	En desarrollo	15.127	37.7	15.381	38.3	5.803	14.5	3.828	9.5	40.138

P: Participación
e: estimado

(FEDEPALMA 2000)

Tabla 2. Departamentos con cultivos de palma de aceite 1999

DEPARTAMENTO	HA	(%)
Atlántico	279	0,2
Caquetá	435	0,3
Casanare*	8.800	5,9
Cauca	95	0,1
Cesar*	27.319	18,2
Cundinamarca*	1.826	1,2
La Guajira	73	0,0
Magdalena*	24.754	16,5
Meta*	41.237	27,5
Nariño*	20.996	14,0
Norte Santander	289	0,2
Santander*	23.818	15,9
Valle del Cauca	132	0,1
Total Nacional	150.053	100,0

(FEDEPALMA,2002)

En las tablas 1 y 2 se pueden observar los datos publicados por FEDEPALMA (Federación nacional de cultivadores de palma africana) con referencia a la cantidad de hectáreas sembradas en el país en el 1999, 2000 y 2001.

1.1.3 PROYECCION

El sector de la palmicultura colombiano durante 1999 y 2000 definió su Visión de futuro 2020; para lograrlo se establecieron las siguientes metas:

- Multiplicar en siete veces la producción, pasando de 500.000 toneladas en 1999 a cerca de 3,5 millones en el 2020.
- Incrementar la productividad por hectárea de 3,9 toneladas de aceite en 1999 a 5,5 toneladas en el 2020.
- Crecer el área sembrada de 170.000 hectáreas en el año 2000 a 743.000 en el 2020, con una tasa de crecimiento del 8% anual, teniendo en cuenta que en Colombia hay 3,5 millones de hectáreas de tierras aptas para el cultivo de la palma de aceite.
- Crecer en exportaciones de aceite de palma, pasando del 24% de la producción nacional en 2001 al 78% en el 2020.

Visión 2020 del área sembrada en palma de aceite en Colombia

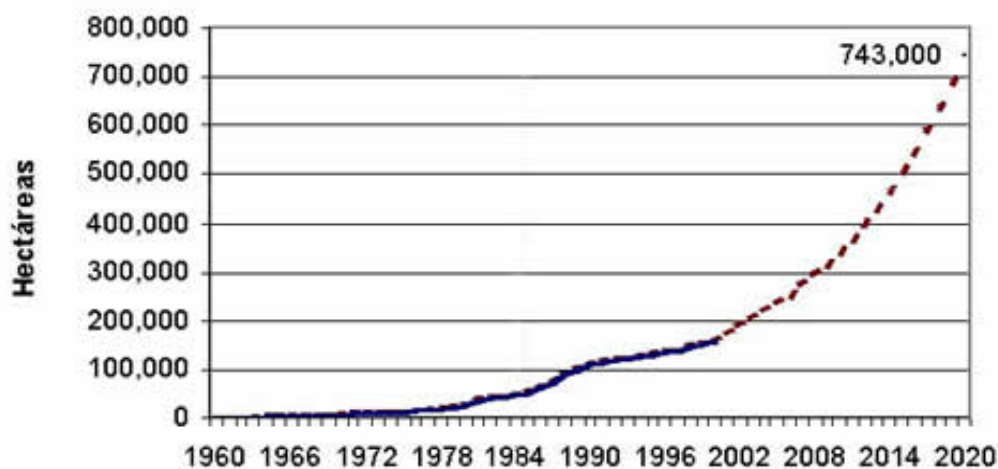


Figura 2. Visión del área sembrada en palma de aceite en Colombia

1.2 COMPOSICIÓN DEL MATERIAL DE PARTIDA

Dado que la estructura del material de partida condiciona de manera tan notable el proceso en general se tratarán en primer lugar las características generales de los materiales lignocelulósicos, los cuales comprenden fundamentalmente las paredes celulares vegetales de diverso origen, que están compuestas por tres fracciones diferentes:

1.2.1 Celulosa

Polímero homogéneo de glucosas unidas por enlace glucosídico β -1,4. A pesar de su sencilla estructura las cadenas de glucosas en la celulosa establecen puentes de H inter- e intramoleculares de manera que se forman microfibrillas y fibras lineales e interconectadas entre sí que confieren gran resistencia tensil al polímero y lo hacen difícil de desorganizar por tratamientos físicos, químicos y enzimáticos. Esta estructura tridimensional

se considera cristalina, y es la principal responsable de la resistencia de las paredes celulares vegetales a los ataques fisicoquímicos y biológicos. Los pretratamientos necesarios para obtener los monómeros incluyen: *steam explosion* (cocción a elevada presión y posterior liberación de la presión para desorganizar las fibras, que permanecen libres aunque insolubles); molido mecánico mediante molinos de bolas que pulverizan el material y lo hacen más accesible al ataque enzimático posterior. La hidrólisis ácida con ácidos clorhídrico o sulfúrico es muy efectiva para romper los enlaces glucosídicos entre los monómeros, pero plantea el problema de la eliminación posterior del ácido para llevar a cabo la fermentación. En cualquier caso, la celulosa se presenta asociada a los otros componentes de la lignocelulosa, de los que debe ser separada (sobre todo de la lignina). La despolimerización de las cadenas de glucosa se puede llevar a cabo mediante complejas mezclas enzimáticas que contengan al menos tres tipos de actores: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas.

1.2.2 Hemicelulosas

Las hemicelulosas son polímeros heterogéneos amorfos, formados por un esqueleto fundamental de pentosas (xilosa y arabinosa) y/o hexosas (glucosa, galactosa, manosa, ramnosa, fucosa, ácidos urónicos) al que se unen diversos sustituyentes (grupos metilo, acetilo, etc). Así se habla de glucomananos, galactoglucomananos, arabinoglucuronoxilanos, arabinoxilanos, etc. También existen grandes variaciones dependiendo del origen: maderas duras, maderas blandas, herbáceas, etc. Las cadenas son más cortas que en la celulosa y no adoptan estructura cristalina sino que forman una matriz amorfa que envuelve a la celulosa, en general sin establecer enlaces covalentes con ella. Además, las hemicelulosas son las que se unen física y covalentemente al otro componente de las paredes, la lignina. Dada su heterogeneidad, presentan muchas fracciones de diferente grado de solubilidad en ácidos o álcalis, y requieren para su hidrólisis

enzimática total mezclas todavía más complejas de enzimas, ausentes de las levaduras de fermentación, por lo que deben ser añadidas antes de la fermentación para conseguir una hidrólisis completa hasta los monómeros. También se pueden hidrolizar mediante tratamiento con ácidos.

1.2.3 Lignina

Es el componente más complejo de las paredes vegetales, abundante sobre todo en los tejidos vasculares. Es particularmente abundante en las maderas, a las que confiere enorme resistencia mecánica. Los monómeros esenciales de la lignina son los alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico (conocidos en general como monolignoles). Estos compuestos elementales se polimerizan entre sí estableciendo múltiples enlaces de diversos tipos, mediante reacciones complejas que determinan la formación de una malla o red tridimensional para la que no se conoce una estructura definida sino modelos más o menos aproximados. Esa compleja red se une en algunos puntos a las moléculas de hemicelulosas, no a las de celulosa. Los pretratamientos dados a los materiales lignocelulósicos en conjunto pueden separar la lignina en bloque o unida a hemicelulosas, pero no suelen emplearse enzimas ligninolíticas que, aunque existen, generan radicales muy reactivos de forma incontrolada y muchos de ellos permanecerían en los hidrolizados como compuestos tóxicos para la levadura fermentadora.

Uno de los factores limitantes principales para el aprovechamiento completo de los materiales lignocelulósicos es la efectiva despolimerización de la celulosa y las hemicelulosas.

1.2.4. Extraíbles

Además de la holocelulosa y la lignina, existen otras sustancias en las plantas que varían de manera notable entre las diferentes especies, así como por su ubicación geográfica, la mayoría de estos compuestos son solubles en agua o solventes orgánicos, se denominan extraíbles y por lo

general solo representan una pequeña fracción de la planta; se puede afirmar que el color, olor y flamabilidad de algunas maderas son atribuibles a sus extractos. Entre los principales solventes se encuentran: el etanol, la acetona, el diclorometano y el éter. En general los extraíbles pueden dividirse en tres grupos:

- Terpenos y terpenoides
- Compuestos alifáticos (grasas y ceras)
- Compuestos fenólicos

1.3 MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DEL MATERIAL

El objetivo de los pretratamientos es aumentar la susceptibilidad del material al ataque de carácter microbiológico y enzimático en el contexto de la utilización o procesamiento bioquímico de los mismos.

Se consigue también remover total o parcialmente la lignina y la hemicelulosa, disminuir la cristalinidad de la célula y reducir el tamaño de las partículas del material.

Estos se dividen en físicos, químicos, biológicos y fisicoquímicos.

1.3.1 PRETRATAMIENTOS FÍSICOS

Estos se dividen en mecánicos, térmicos y radiactivos.

1.3.1.1 Molienda

El uso de molinos se basa en la fuerza de compresión y de corte producen una reducción del grado de cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa y una disminución de la densidad aparente como resultado de la disminución del tamaño de partículas.

Los tipos de molinos ensayados para pretratamientos mecánicos son:

Molinos de bolas, de discos, de martillo, coloidal.

1.3.1.2 Radiación de alta energía

La irradiación por rayos gamma produce una despolimerización y descomposición de la celulosa a valores de la radiación ionizante de 10^6 a 10^8 rads. El material resultante posee un menor grado de cristalinidad. A dosis mayores de radiación el carbohidrato es destruido.

1.3.2 PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS

1.3.2.1 Reactivos removedores de lignina y/o hemicelulosa

Estos son agentes cuyo objetivo es remover o sacar lignina y/o hemicelulosas sin afectar significativamente la celulosa. Esto puede incluir técnicas de pulpaje convencional como tratamiento con álcali diluido, ozono o dioxano y expone la celulosa por extracción de la barrera de lignina.

1.3.2.2 Reactivos disolventes de celulosa

Este método da como resultado la disolución de la celulosa y hemicelulosas.

Los solventes celulósicos aptos para este fin pueden ser catalogados en cuatro grupos:

- a. ácidos minerales fuertes (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄)
- b. Solventes a base de amonio (diamina de etilo, etilamina, NH₃ líquido, hidracina, bases de amonio cuaternario).
- c. Solventes apróticos (DMSO, Dimetilformamida, M₂O₄, Metilmorfolina).
- d. Complejos metálicos (caxoden, óxido de cadmio en diamina de etilo acuosa y otros).

1.3.3 PRETRATAMIENTOS FISICO-QUÍMICOS

Todos los pretratamientos de esta categoría consideran el uso de vapor para modificar la estructura lignocelulósica. Se utiliza vapor solo o en presencia de agentes químicos como SO_2 , CO_2 y NaOH .

1.3.3.1 Tratamiento hidrotérmico

El sustrato molido es puesto en contacto con vapor a presiones mayores que la atmosférica (15 a 45 atm) y a altas temperaturas (185 – 260 °C) con un tiempo de contacto de 1 a 10 minutos.

1.3.3.2 Pretratamiento con vapor y adición de agentes químicos

El efecto del tratamiento hidrotérmico se puede realizar añadiendo reactivos químicos antes o después del proceso térmico. Estas sustancias incluyen el SO_2 , CO_2 y NaOH .

1.3.3.3 Explosión por congelamiento

Se trata el material con amoníaco líquido a presión seguido de una liberación de presión para evaporar el amoníaco líquido el cual reduce la temperatura, congelando por lo tanto, la parte exterior de la fibra. El amoníaco líquido hincha y descristaliza la celulosa, haciéndola altamente digerible a las enzimas.

1.3.3.4 Procesos de oxidación húmeda

Se calienta el material a 120°C en presencia de agua y aire u oxígeno a alta presión. Los ácidos formados a partir de la celulosa y la lignina, así como los que se forman por desesterificación de los grupos acetato en las hemicelulosas, producen un residuo que es altamente accesible a la hidrólisis ácida y enzimática.

1.3.4 PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

Estos pretratamientos usan microorganismos degradadores de madera que atacan a la lignina. Estos incluyen bacterias, hongos de pudrición blanca y café.

1.4 HIDRÓLISIS

1.4.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA

La hidrólisis ácida se puede realizar con ácidos concentrados o diluidos, se utilizan ácido sulfúrico o ácido clorhídrico; también depende de la temperatura a la que se realice el proceso, puede llevarse a cabo a altas o bajas temperaturas dependiendo de la concentración utilizada y del tiempo de residencia.

1.4.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Consiste en realizar la hidrólisis con microorganismos que consumen la lignina, liberando la celulosa y hemicelulosa. Se realiza en varias etapas y su velocidad depende del tamaño de partículas, de la materia prima, la calidad y composición del complejo enzimático, los grados de polimerización y cristalinidad originales del sustrato lignocelulósico, su productividad disminuye a medida que transcurre el tiempo.

1.4.3 HIDRÓLISIS OXIDATIVA

Es un proceso de aprovechamiento de carbohidratos que persigue desdoblar los polisacáridos hasta glucosa.

El objetivo de esta hidrólisis de residuos vegetales es la producción de monosacáridos que puedan utilizarse como fuente de energía para el cultivo de microorganismos. Se obtienen además ácidos orgánicos y un residuo rico en lignina. Este proceso de hidrólisis oxidativa es una forma de eliminar

residuos vegetales que pueden entrar a contaminar el medio ambiente sin introducir ácidos fuertes en el medio.

La hidrólisis oxidativa implica un tratamiento de los residuos vegetales con una solución de ácidos orgánicos presentes en dichos residuos a altas temperaturas y presiones⁴.

1.5 AZUCARES REDUCTORES

El método más utilizado para la determinación del contenido de azúcares reductores en soluciones es una modificación del método de Lane y Eynon que data del año 1923. El principio de la técnica consiste en reducir la solución de Fehling modificada, titulándola a punto de ebullición, con una solución de los azúcares reductores de la solución; utilizando como indicador interno una solución de azul de metileno.

Para llegar a la obtención del resultado que indique, la concentración de los azúcares reductores se deben realizar 3 titulaciones, la primera se denomina valoración preliminar y con esta se obtiene el volumen aproximado del azúcar invertido necesario para reducir el reactivo. La segunda valoración se denomina valoración definitiva. En este paso se agrega en volumen gastado en la valoración preliminar menos 1 ml, en frío y se calienta hasta ebullición, la que se debe mantener por 2 minutos y luego de agregar el indicador se titula nuevamente en menos de un minuto. Por último se determinan los azúcares reductores totales, en esta oportunidad la bureta se carga con la solución (muestra) y se procede igual que para las soluciones de azúcar invertido en las titulaciones preliminar y definitiva. Los resultados se deben expresar como azúcar reductor en % de muestra⁵.

1.6 FERMENTACIÓN

Una vez hidrolizado el material de partida a glúcidos de bajo peso molecular estos deben ser empleados por el organismo productor para obtener etanol.

1.6.1 FERMENTACIÓN CON *Zymomonas mobilis*

La fermentación con *S. cerevisiae* es de momento la opción preferida, pero se están probando otras alternativas. Una de ellas es la bacteria Gram (-) *Zymomonas mobilis*.

Esta bacteria fue encontrada en los caldos de fermentación de sidra, pulque, caña de azúcar y vinos de palma. Es una bacteria anaerobia y flagelada, que no produce cápsulas ni esporas. *Zymomonas* se presenta en forma de bastoncillos de 2 a 6 μm de longitud por de 1 a 1.4 μm de ancho, generalmente en pares. Las colonias obtenidas en medio estándar son brillantes, blancas o crema y miden alrededor de 2 mm de diámetro tras dos días de incubación a 30 °C.

En principio es capaz de producir etanol 3-4 veces más rápidamente que *S. cerevisiae* y con rendimientos que pueden llegar al 97% del teórico máximo. No sólo es anaerobia, sino que no depende en absoluto del O_2 para su crecimiento y es capaz de crecer en medios más sencillos que la levadura, sin adición de factores de crecimiento. Es además más termotolerante (óptimo a 38-40° C). Es osmotolerante (hasta 40% en peso de glucosa en el medio) pero no halotolerante (sensible a la elevada concentración salina). A pesar de estas características favorables, sigue sin desplazar a *S. cerevisiae* en los procesos de producción de etanol.

Z. mobilis solo puede emplear tres azúcares para su crecimiento: sacarosa, glucosa y fructosa. Además no emplea la ruta de EMP sino la ruta de Entner-Doudoroff.¹³ Esta ruta es energéticamente menos favorable que la EMP, pues produce 1 ATP por cada molécula de glucosa, lo que explica en cierta

medida el menor rendimiento en biomasa de la bacteria frente a la levadura. Sin embargo, las enzimas encargadas de la producción del etanol a partir del piruvato (el piruvato descarboxilasa y el alcohol deshidrogenasa) son muy abundantes lo que hace que el flujo metabólico de glucosa -> piruvato -> etanol sea muy rápido y activo. El piruvato descarboxilasa y el alcohol deshidrogenasa pueden representar hasta un 50% de las proteínas citoplasmáticas.

La utilización de glucosa genera mucho etanol y pocos compuestos minoritarios, pero no ocurre lo mismo cuando el crecimiento es en fructosa o sacarosa. En fructosa el rendimiento de etanol baja al 90% pero no existe más crecimiento celular sino que se generan productos secundarios. La ruta de ED se desequilibra y se reduce la producción de etanol, incrementándose la de manitol (que no puede ser metabolizado posteriormente), la de acetaldehído, dihidroxiacetona, glicerol, lactato y acetoína. Además el acetaldehído y la dihidroxiacetona inhiben el crecimiento. En sacarosa, se producen otros metabolitos derivados de una actividad transglicosilante de la levansucrasa (que hidroliza la sacarosa a glucosa y fructosa) para dar levanos y fructooligosacáridos (productos de polimerización más que de hidrólisis). Además, la fructosa y glucosa formadas pueden derivar hacia la formación de sorbitol que se acumula en el medio sin poder ser utilizado. En presencia de altas concentraciones de glucosa y fructosa hasta el 11% de la fuente de carbono se deriva hacia sorbitol, con la consiguiente pérdida general de eficiencia.

Z. mobilis es bastante tolerante al etanol (hasta 13% en volumen) debido a que sus membranas poseen más ácidos grasos de cadena más larga e insaturaciones que otras bacterias Gram(-). Además poseen otro grupo de compuestos protectores, parecidos al colesterol y al ergosterol, los hopanoides. En conjunto, estas modificaciones compensan la inestabilidad de la membrana causada por la creciente concentración de etanol a lo largo del cultivo.

A pesar de su elevado rendimiento partiendo de glucosa, la diversidad de productos laterales generados a partir de sacarosa y fructosa-glucosa impiden de momento que *Z. mobilis* pueda reemplazar a la levadura en las fermentaciones productoras de etanol. Quizás la ingeniería genética y metabólica puedan ayudar a mejorar el sistema.

Zymomonas interviene en la fermentación del vino de palma, de la cerveza chica, así como en la fabricación del vino. Otra posibilidad de utilización es la producción a gran escala de etanol, debido a sus características: un rendimiento de conversión en etanol superior al de la levadura, que resulta de una vía metabólica de utilización de los azúcares diferente de las levaduras. *Z mobilis* en consecuencia produce menos biomasa. Además es capaz de producir etanol a una velocidad significativamente más elevada.

1.7 CONSERVACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables. Los dos primeros objetivos no son muy difíciles de conseguir cuando se conoce bien la técnica microbiológica, pero el tercero puede presentar dificultades, y este es el motivo por el cual existen varios métodos de conservación para los microorganismos, y ninguno de ellos es de utilización general. Vamos a resumir estos métodos agrupándolos en tres apartados, que son: Métodos de elección o de conservación a largo plazo, métodos alternativos y métodos restringidos.

1.7.1 Métodos de elección o de conservación a largo plazo

Son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Aún así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en si mismo. Los métodos de conservación pertenecientes a este grupo son dos: Congelación y liofilización.

1.7.1.1 Conservación por congelación

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura. Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, y además existe el peligro de que alguna falla del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento. También resulta ser el método más molesto para realizar el envío de las cepas. Los cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

- 1º.- Edad de las células: En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. Esto sucede en el caso de microorganismos que esporulan, en algunos pleomórficos e incluso en algunos más sencillos.

2°.- Velocidad en la congelación y descongelación: Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37°C.

3°.- Temperatura de almacenamiento: Debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195°C , o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140°C .

En el mercado existen variados tipos de armarios congeladores, de los cuales los más aconsejables son los que alcanzan temperaturas por debajo de -70°C . Aquellos que sólo alcanzan temperaturas entre -20°C y -40°C , como ocurre con la mayoría, no son aconsejables, entre otras cosas porque debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja. El daño que se produce en las células es debido a que a estas temperaturas hay frecuentes congelaciones y descongelaciones. Si se añade un crioprotector no iónico, como por ejemplo el glicerol, se reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica.

Para la conservación en armarios congeladores, las células se almacenan en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión. De esta manera se evita que las cepas se congelen y se descongelen varias veces. Esto también se puede evitar empleando tubos con criobolas (bolas de

tipo abalorio que se impregnan con la solución celular a congelar), ya que para tomar una muestra basta con emplear una o varias bolitas sin necesidad de descongelar el resto. Este método no se debe emplear para la conservación de microorganismos anaerobios, como por ejemplo el género bacteriano *Clostridium*, ya que al estar las células en una superficie hay un mayor contacto con el oxígeno y puede afectarse la viabilidad.

4°.- Empleo de agentes crioprotectores: Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se pueden utilizar el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar⁷.

1.8 CURVA DE CRECIMIENTO

Es la representación gráfica del logaritmo del número de células frente al tiempo. La curva teórica sería una recta pues los microorganismos estarían creciendo constantemente pero en la práctica la curva presenta distintas fases:

- **Fase de latencia:** período de adaptación de un microorganismo a un nuevo medio de cultivo.
- **Fase exponencial o logarítmica:** aumento regular de la población que se duplica a intervalos regulares de tiempo (g).
- **Fase estacionaria:** cese del crecimiento por agotamiento de nutrientes, por acumulación de productos tóxicos, etc.

- **Fase de declinación o muerte:** el número de células que mueren es mayor que el número de células que se dividen.

Las propiedades de un microorganismo dependerán de la fase de la curva en que se encuentren (Ej: la producción de antibióticos se lleva a cabo en la fase estacionaria, es un producto del metabolismo secundario)⁶.

1.8.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA DE *Zymomonas mobilis*

Los datos de la cinética de crecimiento de la cepa de *Zymomonas mobilis* fueron ajustados a un modelo de máxima similitud (**Pedroza, A.M., et al, 1997**) definido por la fórmula $(Abs_{max} / (1 + e^{(Abs_{media} * (T_{medio} - T_{real\ de\ fermentación})}))$), Donde: Abs_{max} = Abs máxima alcanzada por el microorganismo; Abs_{media} = 1/2 Abs máxima alcanzada por el microorganismo; T_{medio} = tiempo que demora el microorganismo en alcanzar la Abs_{media} ; $T_{real\ de\ fermentación}$ = horas de muestreo en la fermentación.

1.9 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

El cálculo del número de células que existen en una suspensión se puede llevar a cabo mediante el recuento celular (microscopía, número de colonias), masa celular (peso seco, medida del nitrógeno celular, turbidimetría) o actividad celular (grado de actividad bioquímica en relación al tamaño de la población). Todos estos métodos se clasifican en dos métodos: directos e indirectos⁶.

- **Métodos directos:**
 - Recuento del número de células en una cámara Thoma o Neubauer
 - Peso seco celular
 - Determinación de nitrógeno o de proteínas totales
 - Determinación de DNA

- **Métodos indirectos:**
 - Recuento de colonias en placa
 - Recuento sobre filtro de membrana
 - Consumo de oxígeno
 - Liberación de dióxido de carbono
 - Concentración de una enzima constitutiva
 - Decoloración de un colorante
 - Incorporación de precursores radiactivos
 - Medida de la turbidez

1.9.1 EFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO

No todos los microorganismos responden de la misma manera a los factores ambientales, lo que para unos puede ser beneficioso para otros es perjudicial⁶.

1.9.1.1 Temperatura

Es de los factores ambientales que más influye en el crecimiento de los microorganismos. Al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de las reacciones enzimáticas hasta una cierta temperatura a la cual las proteínas, DNA y otras macromoléculas son sensibles y se desnaturalizan. Cada microorganismo tiene una temperatura mínima, óptima y máxima de crecimiento. La temperatura óptima siempre está más cerca de la temperatura máxima que de la mínima.

Psicrófilos: temperatura óptima baja (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*)

Mesófilos: temperatura óptima normal (la mayor parte de los organismos)

Termófilos: temperatura óptima alta (microorganismos aislados de áreas volcánicas)

Termófilos extremos: temperatura óptima muy alta (*Thermococcus celer* 103° C)

1.9.1.2 pH

Debido a que los microorganismos cambian el pH del medio cuando crecen se debe añadir un tampón al medio para mantener el pH constante. Estos tampones funcionan en un rango de pH por lo que se deben utilizar diferentes tampones dependiendo del pH que se quiera en el medio. Para pHs neutros se utiliza el tampón fosfato. Los ambientes naturales tienen un rango de pH que oscila entre 5 y 9. Los microorganismos que crecen a pH inferiores a 5 se denominan **acidófilos** (*Thiobacillus* pH: 0,5). Los microorganismos que crecen a pH superiores a 9 se denominan **alcalófilos** (*Bacillus* pH: 11).

1.9.1.3 Agua

Todos los organismos requieren agua para vivir. Las sustancias absorben en mayor o menor medida moléculas de agua que no están disponibles para los organismos. Esta disponibilidad del agua es lo que se llama **potencial de agua (aw)** cuyos valores van de 0 a 1. El aw del agua pura es 1; el aw de los frutos secos es 0,7; el aw de los campos de cultivo se sitúa entre 0,9 y 1,0.

Según la tolerancia a las soluciones, los microorganismos se clasifican en:

Halófilos: microorganismos que viven en altas concentraciones de sales.

Osmófilos: microorganismos que viven en altas concentraciones de azúcares.

Xerófilos: microorganismos que viven en ambientes secos.

1.9.1.4 Según la relación de los microorganismos con el oxígeno para su desarrollo, estos se clasifican en:

- **Aerobios**
 - **Obligados** Requieren O_2 para crecer (21 %)
 - **Facultativos** No requieren pero crecen mejor en presencia de O_2
- **Micraerófilos** Requieren pero a niveles más bajos que los atmosféricos (1 - 15 %)
- **Anaerobios**
 - **Aerotolerantes** No requieren y crecen peor cuando el O_2 está presente
 - **Obligados** La presencia de O_2 es letal

1.10 PROCESOS INDUSTRIALES

En general, un proceso completo de aprovechamiento de materiales vegetales de diferente origen para la obtención de etanol requiere tres etapas fundamentales:

1. Pretratamiento de los materiales de partida para dejar los polímeros en condiciones de fermentación. Estos pretratamientos pueden ser físicos y químicos (presión, vapor, ácidos diluidos) y despolimerización enzimática mediante mezclas de enzimas despolimerizantes especializadas según el tipo de material.

2. Fermentación de los azúcares sencillos producidos en la etapa anterior y generación de etanol.

3. Recuperación del etanol producido y su purificación adecuada al uso final del mismo.

En general, el factor condicionante de todo el proceso es la etapa de pretratamiento, que suele consumir mucha energía y generar un sustrato no completamente homogéneo debido a la propia heterogeneidad de los materiales de partida. También el proceso de purificación del etanol producido es caro. La biomasa generada (células de levadura en la mayoría de los casos) suele emplearse como alimento para animales.

Para sacar ventajas de las técnicas de fermentación el sustrato líquido debería poseer las siguientes condiciones:

Las concentraciones de azúcares fermentables deberían estar correctamente ajustadas para poderlas usar en un método particular de fermentación y para asegurar que los azúcares residuales después de la fermentación sean mantenidos en un nivel mínimo.

El sustrato deberá clarificarse, a un pH y a una temperatura óptimos y deberá contener los nutrientes adecuados para los microorganismos.

Los microorganismos diferentes de los del inóculo principal se deben eliminar por pasteurización, tratamiento con antibióticos o antisépticos, o esterilización; el grado y método de eliminación dependería del sistema de fermentación empleado.

Las sustancias tóxicas para los microorganismos encargados de llevar a cabo la fermentación deberían eliminarse o ser reducidas hasta un nivel aceptable².

Al menos son importantes dos objetivos en la producción de etanol a gran escala: un porcentaje de conversión del azúcar, lo más próximo posible al

porcentaje teórico, y el mantenimiento de valores de productividad elevados a concentraciones importantes de etanol.

La obtención de productividad elevada pasa por el aumento de la concentración celular de los microorganismos en los reactores de producción. Se han aprovechado los avances en el campo del diseño y de la ingeniería de fermentación:

- Empleando procedimientos de fermentación como la fermentación extractiva, la fermentación multiescalonada, los fermentadores air lift y los fermentadores de lecho fluidificado;
- Utilizando las principales técnicas para confinar los microorganismos fermentadores: la adherencia a la superficie de un soporte, la colocación en una matriz polimerizada, la retención por membrana y la floculación.

1.11 VENTAJAS DEL USO DEL BIOETANOL

La utilización del bioetanol reduce las emisiones tóxicas por evaporación del combustible, las cuales favorecen la formación de neblinas contaminantes. En cuanto a los aditivos como etilterbutileter (ETBE), los estudios sobre su ciclo de vida señalan que contribuye al efecto invernadero de un 15-20 % menos que el aditivo oxigenado de elevado índice de octano del tipo metiliterbutileter (MTBE). La razón cabe buscarla en la proporción más grande entre la fracción renovable y la fósil.

La utilización de los biocarburantes reporta otras ventajas ambientales. El hecho de que provengan de cultivos energéticos o de aceites reciclados elimina el riesgo inherente de las fuentes energéticas convencionales, especialmente ante la manipulación inadecuada, las fugas accidentales, etc.

Dada la biodegradabilidad de estos compuestos, se elimina la posibilidad de causar impactos importantes en el caso de vertidos accidentales

La labor de los cultivos energéticos como materia prima para la producción de biocarburantes evita la erosión o degradación de suelos que, de otra forma, podrían ser abandonados por falta de rentabilidad. Además, la utilización menos intensiva de fertilizantes disminuye el riesgo de contaminación por exceso de fertilizantes.

Es importante destacar también el aspecto ambiental de la biomasa. Su aprovechamiento energético no contribuye a aumentar el efecto invernadero ya que el balance de emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera es neutro. En efecto, el dióxido de carbono generado en la combustión de la biomasa es reabsorbido mediante la fotosíntesis en el crecimiento de las plantas necesarias para su producción y, por tanto, no incrementa la cantidad de CO₂ presente en la atmósfera. Por el contrario, en el caso de los combustibles fósiles, el carbono que se libera a la atmósfera es el que se ha fijado en la tierra durante miles de años.

Los recursos energéticos de la biomasa son enormes y variados. La materia prima incluye los productos forestales, las plantas herbáceas, los cultivos agrícolas y sus residuos, los desechos municipales sólidos, los desechos animales y humanos, los desperdicios del procesamiento de alimentos, y las plantas acuáticas. Algunas de las plantas usadas en la producción de energía se cultivan específicamente con este propósito. Pero, la mayoría de la biomasa utilizada con fines energéticos consiste de residuos que de otra forma se pudrirían, se quemarían en el bosque o se convertirían en un relleno sanitario. Los residuos representan un enorme potencial de energía fácilmente disponible que en la actualidad se encuentra sub-utilizado.

Además, el uso de los combustibles líquidos de biomasa, en particular del etanol, es mucho más benigno para el medio ambiente que la gasolina, porque:

- Las emisiones de monóxido de carbono son menores.
- No contiene aditivos de plomo.
- Sus más bajas temperaturas de combustión provocan menores emisiones de óxidos de nitrógeno.
- Se reduce el smog y el ozono fotoquímico debido a la ausencia de emisiones aromáticas.
- Las mezclas de alcohol/gasolina producen menos contaminantes que la gasolina pura.
- Un derrame de etanol es biodegradado más rápida y fácilmente.

La producción de alcohol para fines energéticos ayuda a revitalizar las comunidades rurales creando un gran número de fuentes de trabajo dentro de muchos sectores, que van desde las plantaciones hasta las instalaciones de conversión.

Desventajas

Sin embargo, el uso del etanol como combustible presenta algunas desventajas:

- Las emisiones de aldehídos son más altas que las de la gasolina. Estas pueden constituir un serio problema pues se conoce que los aldehídos son reactivos.
- A pesar de que los costos de producción han disminuido en los últimos 15 años, los costos energéticos son todavía altos y la reducción potencial de los precios es baja.³⁶

Obtención de etanol combustible a partir del parénquima de la hoja de la palma africana por hidrólisis oxidativa y fermentación con *Zymomonas mobilis*

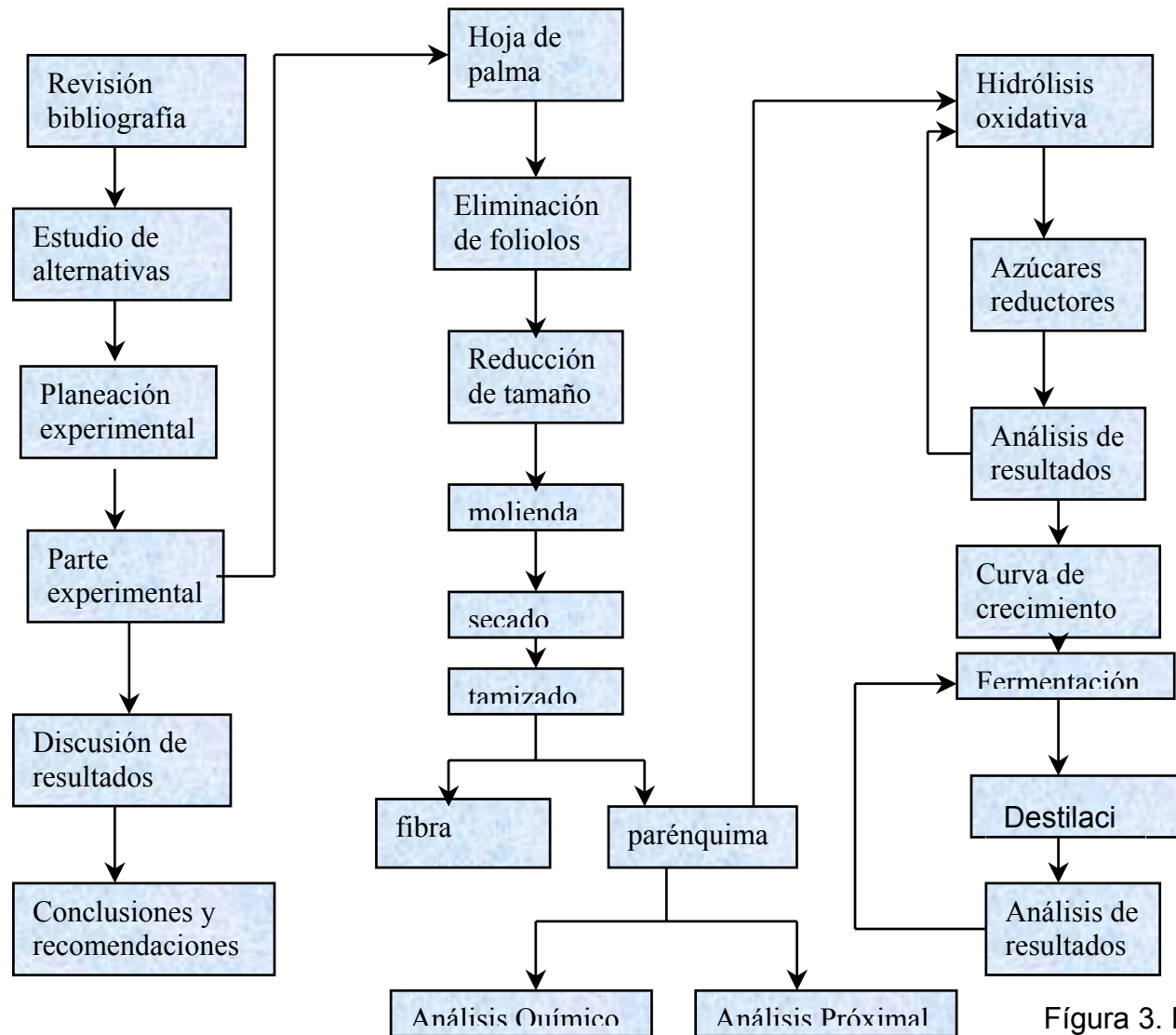


Figura 3. METODOLOGÍA

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL Y OBTENCIÓN DEL PARENQUIMA

La materia prima fue suministrada por la empresa Palmas del Cesar (San Alberto). Las hojas fueron cortadas en el momento de retirar el fruto de la planta y con un machete le fueron quitados los folíolos.

A partir de 2400 Kg de raquis, los cuales luego de clasificarlos por tamaño se picaron y molieron en el molino de cuchillas y martillos; marca Cremasco con motor de 16 HP, obteniéndose una muestra cortada con un tamaño que permitió pasarla nuevamente por el molino con una criba de perforaciones de 1 cm. de diámetro de tal forma que el sistema martillo del molino fracture los haces fibrosos, lo cual permite una separación y selección de fibra y parénquima.

La muestra obtenida fue secada al sol, se tamizó inicialmente en malla 4 mesh donde se separa la fibra, luego la que pasa por la malla 4 se sigue clasificando en malla 8 mesh donde se separa fibra más corta y un pequeño porcentaje de parénquima. Lo que pasa por esta malla se clasifica en malla 15 mesh obteniéndose dos productos; parénquima y algún porcentaje de fibra muy corta, y lo que pasa a través de el que será parénquima casi en su totalidad.

El material fue empacado en bolsas de poliestireno para conservar la humedad constante.

2.1.1 CARACTERIZACIÓN DEL PARÉNQUIMA

A esta muestra se le realizó el análisis proximal y químico, mediante las normas TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry).

2.1.1.1 ANALISIS PROXIMAL

Tabla 3. Normas empleadas en el análisis proximal

ANÁLISIS PROXIMAL	MÉTODO
Lignina	T13m-54 Klason
Holocelulosa	T9m-54
Pentosanos	T19m-50
Cenizas	T15m-58
Humedad	T18m-59

Determinación de lignina

Se eliminan todos los componentes celulósicos y hemicelulósicos con ácido sulfúrico al 72% . El resultado es el promedio de mínimo dos determinaciones y se expresan como porcentaje de lignina.

Determinación de holocelulosa

Se retira la lignina con clorito de sodio al 1.5% y ácido acético concentrado, recuperando el material fibroso y dejando intactos la totalidad de la celulosa, los pentosanos y hexosanos. El resultado se expresa como porcentaje de holocelulosa en base seca, libre de extraíbles, promedio de tres determinaciones.

Determinación de pentosanos

La muestra se trata con ácido clorhídrico al 12% en caliente para convertirlo a furfural; el furfural formado es destilado y este a su vez es tratado con una solución de floroglucinol . El peso de pentosanos corresponde al peso de fluroglucide furfural precipitado y se expresa como un porcentaje promedio de tres determinaciones.

Determinación del contenido de cenizas

Esta determinación se define como el residuo remanente después de la ignición del material a $575 \pm 25^\circ\text{C}$ durante tres horas y se expresa como porcentaje promedio de dos determinaciones.

Determinación de humedad

La muestra tiene un contenido de humedad que es necesario conocer para así poder expresar los resultados en porcentaje base de material seco. El peso seco se obtiene al calentar una porción del material a 105°C en una estufa hasta peso constante. Los resultados se expresan como porcentaje de humedad producto de tres determinaciones.

2.1.1.2 ANÁLISIS QUÍMICO

El análisis químico se llevó a cabo tomando 100 g del material cribado y empacado y moliéndolo en un molino de cuchillas y martillos; de 12.5HP, 3510 r.p.m. y criba de 0.3 cm. El material resultante fue pasado por tamices # 20,40,60,80 y 100. Se tomó lo obtenido entre mallas 40 y 60 para el análisis químico.

Tabla 4. Normas empleadas en el análisis químico

ANÁLISIS QUÍMICO	MÉTODO
Solubles en soda 1%	T4m-59
Solubles en agua caliente	T1m-59
Solubles en agua fría	T1m-59
Alcohol	T12m-59
Alcohol- benceno	T6m-59

Fuente TAPPI

Determinación de solubles en NaOH 1%

Se indica la cantidad de material de bajo peso molecular presente en la materia prima. Los resultados se expresan como % de solubles en NaOH producto de tres determinaciones.

Determinación de solubles en agua caliente y fría

Este % indica la cantidad de taninos, gomas, mucílagos, sales y carbohidratos solubles presentes en la materia prima. Los resultados se expresan como porcentaje del material soluble en agua caliente producto de tres determinaciones.

Determinación de solubles en alcohol-benceno

Los solubles en alcohol-benceno determinan la cantidad de grasas, resinas, gomas y compuestos insolubles en agua. El resultado se expresa como % de solubles en alcohol-benceno del material producto de tres determinaciones.

2.2 HIDRÓLISIS OXIDATIVA

El proceso de hidrólisis oxidativa se hizo en un reactor marca PARR con capacidad de 2 litros, con una presión máxima de 2000 lb/pulg², una temperatura máxima de 200 °C y agitación de 1.725 r.p.m.

Se programó una serie de hidrólisis oxidativas variando el tiempo de humectación, el tiempo de reacción, la temperatura, la presión y la relación de humectación, buscando obtener el licor con mayor cantidad de azúcares reductores totales.

Las hidrólisis se llevaron a cabo humectando previamente el parénquima con agua del proceso y se determinó el valor de pH inicial.



Figura 4. Reactor

La prehidratación se hizo con el fin de facilitar la circulación del licor de cocción lo mas rápidamente entre los conductos capilares del parénquima, por hinchamiento de este con el agua.

Terminado el proceso de mezcla entre el licor de cocción y el parénquima se llevó la mezcla al reactor, se agitó cada 30 minutos, se determinó la temperatura y la presión.

Una vez transcurrido el tiempo de la hidrólisis se suspendió el calentamiento y se extrajo el licor de cocción rico en carbohidratos.

A estos licores se les determinó el pH, la densidad, y la cantidad de azúcares reductores presentes valorándolos por medio del método Lane J. y L. Eynon.

2.2.1 COMPARACIÓN CON HIDRÓLISIS ÁCIDA

Se programaron tres hidrólisis ácidas en el reactor utilizado para la hidrólisis oxidativa, se utilizó ácido sulfúrico concentrado. El porcentaje de ácido respecto al parénquima fue de 1:11.

2.3 CURVA DE CRECIMIENTO

La cepa de *Zymomonas mobilis* fue donada al proyecto por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN), del cepario de Biotecnología sede Bogotá.

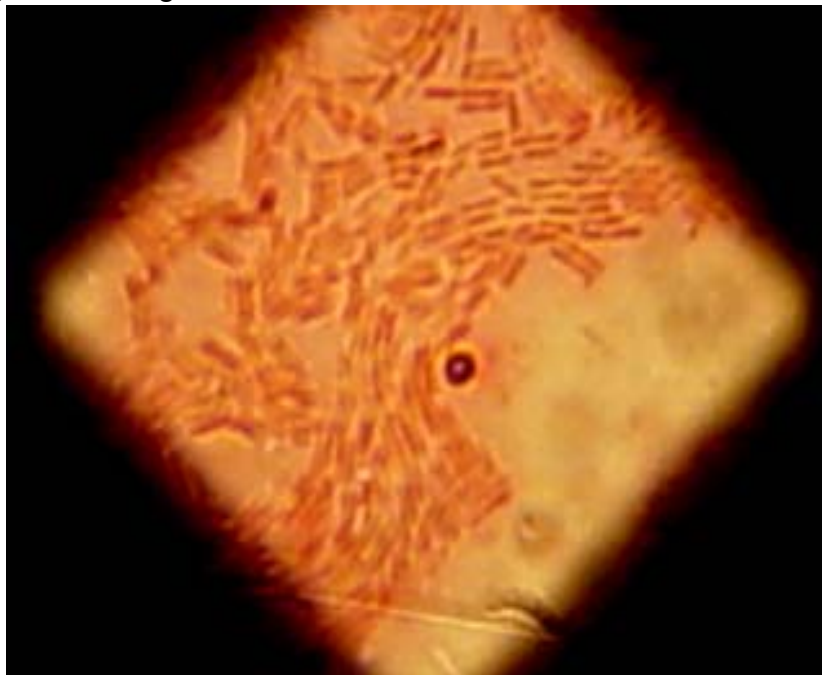


Figura 5. Características microscópicas de la bacteria *Zymomonas mobilis*

2.3.1 RECUPERACIÓN DE LA CEPA DE *Zymomonas mobilis*

La recuperación de la *Zymomonas mobilis* se realizó en el Centro de Investigación Biotecnológica Industrial y Biología Molecular (CINBIN) de la Universidad Industrial de Santander, de la siguiente manera:

Se preparó el medio de cultivo con 30 g de glucosa, 20 g de xilosa, 10 g de extracto de levadura, 2 g de K_2HPO_4 , 0.02 g de tetraciclina; para un volumen de 1 litro.



Figura 6. Características macroscópicas de la colonia de *Zymomonas mobilis*

Al tubo de ensayo que contenía la cepa donada; se le adiciono 1 ml de medio para homogenizarla, se agrego 2.5 ml de medio, se llevó a centrifugar por 10 minutos a 3000 r.p.m.; descartando el sobrenadante. Se repitió esta operación por 3 veces para retirar el glicerol de la conservación de la cepa.

Para la siembra de la *Zymomonas mobilis* se colocaron en cinco frascos estériles cada uno de ellos con 15 ml de medio de cultivo. La bacteria se diluyó en el medio suministrándole 3 ml como inóculo a cada frasco para un volumen total de 18 ml. Luego se incubó en un ambiente microaerófilico a 34°C.

Para determinar la curva de crecimiento primero se hizo una curva patrón con la escala de Mc Farland leyendo las absorbancias en un equipo Spectronic 20, marca MILTON ROY COMPANY, rango visible colorímetro a una longitud de onda de 600 nm .

2.3.2 PREPARACIÓN DE LA ESCALA DE MC FARLAND

Escala de Mc Farland

Se trata de una serie de patrones de turbidez previamente calibrados. Consiste en varios tubos de vidrio herméticamente cerrados que contienen {1% de BaCl₂ + cantidades crecientes de H₂SO₄ al 1%}.

Materiales

11 tubos tapa rosca

Solución de Cloruro de Bario al 1%

Solución de ácido sulfúrico al 1%

Tabla 5. Preparación de la escala de Mc Farland

TUBO	BACL ₂ (ML)	H ₂ SO ₄ (ML)	CONCENTRACIÓN BACTERIANA / ML (X10 ⁸)
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
20	1.0	9.0	30

Para cada solución preparada se leyó la absorbancia y se realizó una grafica de concentración vs absorbancia.

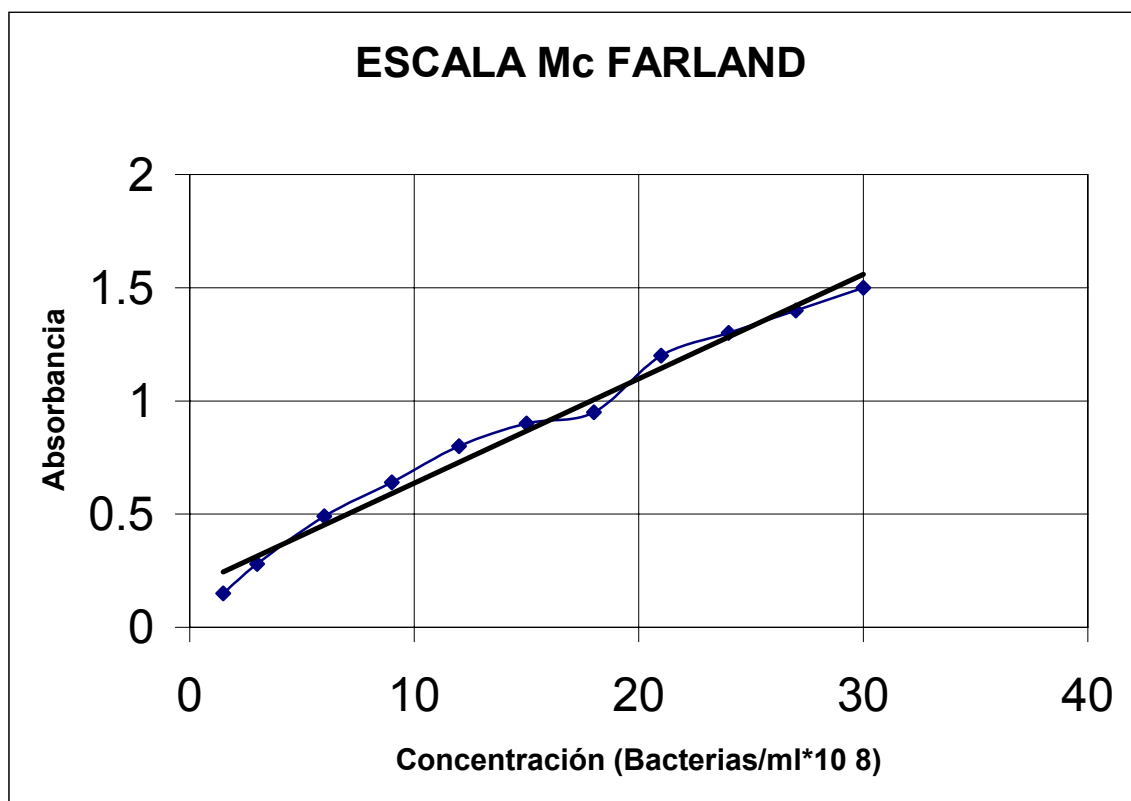


Figura 7. Curva patrón escala Mc Farland

Se realizó una correlación para esta grafica mediante mínimos cuadrados; de esta correlación por medio de la absorbancia leída se hallaron los datos de concentración para la *Zymomonas mobilis*.

$$\text{Ecuación} \quad A = 0.0461 \cdot C + 0.1751$$

2.3.3 DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

1. Se determinó el tiempo de crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo, tomando mediciones de absorbancia cada 2 horas durante 24 horas, con estos valores de absorbancia se leyeron los datos concentración (Se realizaron curvas con agitación y sin agitación).

2. Se realizarón las curvas de crecimiento en el hidrolizado del parénquima de la palma africana, para determinar el comportamiento de la *Zymomonas mobilis* en este medio.

Se tomaron las mismas condiciones que para las curvas de crecimiento en el medio de cultivo para diferentes hidrolizados.

3. Se realizó también una curva de crecimiento en otro medio de cultivo cuya composición fue en g/l, 100 de glucosa, 10 de extracto de levadura, 2 de fosfato monobásico de potasio, 1 de sulfato de amonio y 0.5 de sulfato de magnesio hepta-hidratado para mirar si el crecimiento del microorganismo es el mismo.

2.3.4 AZUCARES REDUCTORES

Se toman 25 ml de fehling para determinar el contenido de azúcares presentes en la muestra mas 40 ml de agua destilada los cuales se ponen a hervir durante 55 segundos agregándole como indicador azul de metileno. Se titula hasta que cambie a color rojizo.

Se da el resultado como porcentaje de azúcares reductores del promedio de tres valoraciones.

2.4 FERMENTACIÓN

Se realizaron los primeros ensayos en un fermentador con capacidad de 4 litros, se tomaron muestras cada 2 horas para determinar si el microorganismo estaba produciendo etanol, y si el tiempo determinado para la fermentación era el adecuado.



Figura 8. Fermentador de 1 litro

El fermentador donde se realizaron los ensayos preliminares, tiene una capacidad de 1 litro construido en vidrio con tapa esmerilada con cuatro accesos; dos para la entrada y salida de gases, uno para monitoreo de muestras y otro para control de temperatura. (Figura 4)

Las variables objeto de estudio fueron: Concentración del producto (azúcares reductores presentes en el hidrolizado), pH, temperatura y tasa de dilución para determinar las condiciones donde se obtuviera un mayor rendimiento de etanol producido.

Para determinar la cantidad de etanol en cada muestra se hizo una curva de calibración; se tomaron datos de concentraciones diferentes de alcohol y se leyó su índice de refracción.

Las soluciones etanol – agua se prepararon de la siguiente manera:
Se utilizó etanol absoluto tomando los volúmenes necesarios para preparar las diferentes concentraciones de etanol aforando a 50 ml con agua.

Tabla 6. concentración- índice de refracción

CONCENTRACIÓN	INDICE DE REFRACCIÓN
0	1.332
5	1.334
10	1.337
15	1.339
20	1.342
25	1.345
30	1.347
35	1.350
40	1.352
45	1.354
50	1.356
55	1.357
60	1.359
65	1.359
70	1.360
75	1.361
80	1.361
85	1.362

1. Se varió el pH del licor desde 4 hasta 5.7; se realizaron dos fermentaciones para cada pH, donde se halló el rendimiento de etanol en base al volumen recuperado de la destilación. Se escogió el pH para el cual el rendimiento de etanol fue el mayor; este pH se tomó constante para las siguientes pruebas.

2. Se instaló un sistema electrónico que se usó para el control de temperatura durante esta etapa; este consiste en un sistema de lazo cerrado que permite automatizar el ajuste de temperatura en el licor y garantizar que esta se mantenga constante en una temperatura programada. Este sistema se implementó mediante un microcontrolador a 8 bits de motorola (GP32). Para sensar la temperatura se usó una termocupla tipo K la cual se compensó por medio de un sensor de temperatura que garantiza una medida adecuada de la temperatura ambiente, la señal proveniente de la termocupla se digitalizó con un conversor a 8 bits incluido en el microcontrolador. Este sistema se puede operar en un intervalo de operación de 28 a 38°C con $\pm 1^\circ\text{C}$ de error.

La temperatura presente en el fermentador es presentada por el sistema de control en indicadores visuales (display a 7 segmentos) que permite leer la temperatura instantánea del licor.

Este sistema realiza el control de temperatura en el fermentador en el siguiente orden: la temperatura medida es presentada en los tableros y comparada con la temperatura a la cual se desea estabilizar el licor. Si la temperatura en el licor es mayor que la temperatura dada, el control desactiva la resistencia eléctrica (plancha de calentamiento); si la temperatura es menor o igual a la temperatura programada, el control mantendrá la resistencia encendida. Con esto se garantiza una temperatura constante durante las 12 horas de fermentación.



Figura 9. Fermentador de 4 litros.

Se realizaron dos fermentaciones para cada temperatura y se tomó la que dió un mayor rendimiento de etanol. El resultado es un promedio de dos pruebas realizadas por temperatura. Esta temperatura se tomó constante para las siguientes fermentaciones.

3. Se realizaron diluciones del 25, 50 y 75% del hidrolizado; para determinar si el microorganismo a concentraciones menores produce un mejor o igual rendimiento de etanol.

4. Se realizaron pruebas de azúcares reductores para determinar que porcentaje de azúcares queda después de la fermentación.

El volumen total del medio fue de 1000 ml, se le inyectó argón para desalojar el oxígeno presente en el fermentador cumpliendo así con las condiciones facultativas (o microaerofílicas) durante todo el proceso.

Con los pasos anteriores se determinaron los valores de las variables tales como pH, temperatura y concentración del sustrato para determinar las condiciones donde se obtuviera un mayor rendimiento de etanol producido.

Después de determinar las mejores condiciones para la fermentación se trabajó en un volumen de 4 litros, estableciendo si las *Zymomonas mobilis* a volúmenes mayores nos reporta mejores rendimientos de etanol.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las hojas sin folíolos, fueron astilladas, obteniendo un tamaño adecuado que permitiera la entrada por la abertura del molino. El material fue molido y cribado. Se obtuvo un rendimiento en este proceso de 1ton/ hora, utilizando una criba de 1 cm. El material se tamizó en zarandas, lográndose una excelente separación de fibra-parénquima, con mallas de 0.67; 0.42 y 0.17 cm respectivamente. Se obtuvo un 75-80 % de material fibroso retenido en los tamices y un 20 a 25% de parénquima extraído correspondiente a finos.

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL PARÉNQUIMA

3.1.1 ANÁLISIS QUÍMICO

Tabla 7 Caracterización química del parénquima

SOLUBILIDADES	% (BASE SECA)
Hidróxido de sodio al 1%	44.5
Agua caliente	12.8
Agua fría	11.44
Alcohol – benceno	3.12
Alcohol	2.32

3.1.2 ANÁLISIS PROXIMAL

Tabla 8 Análisis proximal del parénquima

FRACCIÓN	% (BASE SECA)
Lignina	36.96
Holocelulosa	55.29
Pentosas	25.41
Cenizas	7.76
Humedad	15.39

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos del análisis químico del material utilizado para todos los procesos de hidrólisis luego del proceso de tamizado para la eliminación de la fibra.

Se llevó a cabo el análisis químico del material utilizando las normas mostradas en las tablas 3 y 4, y el proceso del numeral 2.1.1.1 y 2.1.1.2 de la parte experimental.

Observando los resultados obtenidos para el análisis químico, se puede decir que:

El material presenta un alto contenido de solubles en soda 1%, correspondiente a sustancias susceptibles a ser degradadas por ataque de hongos y microorganismos. Estos solubles corresponden a productos de degradación de gomas, holocelulosa (pentosanos y hexosanos), lignina, resinas y productos de degradación de la celulosa. Este alto contenido de

material degradable da una idea del rendimiento que se logra en un proceso de fermentación como el llevado a cabo en la presente investigación.

El alto contenido de cenizas presente en el material, indica un alto contenido de minerales que es debido a procedencia de la materia prima. Las cenizas indican que el parénquima puede ser perjudicial por el efecto abrasivo de los minerales en los equipos de molido y picado.

3.2 HIDRÓLISIS OXIDATIVA

El material fue sometido a varias hidrólisis oxidativas; para cada prueba se pesaron 160 gramos de parénquima húmedo, trabajando con la capacidad máxima del reactor. Los datos reportados para todas las hidrólisis son el resultado de tres pruebas por cada variable manipulada.

El pH inicial del parénquima hidratado fué de 6,2; al final del proceso el licor obtenido tuvo un pH de 3,7; esto se debe a la formación de ácidos producidos a partir de la celulosa y la lignina, que se encargan de desdoblar los polisacáridos en monosacáridos.

Se realizaron hidrólisis variando la relación de parénquima - agua de 1:10 y 1:11, obteniéndose la misma cantidad de azúcares, se escogió la relación 1:11 ya que esta proporciona un mayor volumen de licor, necesario para las posteriores fermentaciones.

Se varió la temperatura de reacción, entre 140 y 180 °C; el tiempo de reacción fué de 5 horas.

Tabla 9. Hidrólisis a diferentes temperaturas

TEMPERATURA (°C)	DENSIDAD DEL LICOR (Kg/m ³)	MASA DEL RESIDUO BASE SECA (g)	% DE AZUCARES FERMENTABLES (mg DE AZÚCAR INVERTIDO POR 100 mL)
140	1,07	113,67	4,12
150	1,07	113,14	4,47
160	1,05	107,73	5,83
170	1,06	106,25	4,69
180	1,06	105,97	4,31

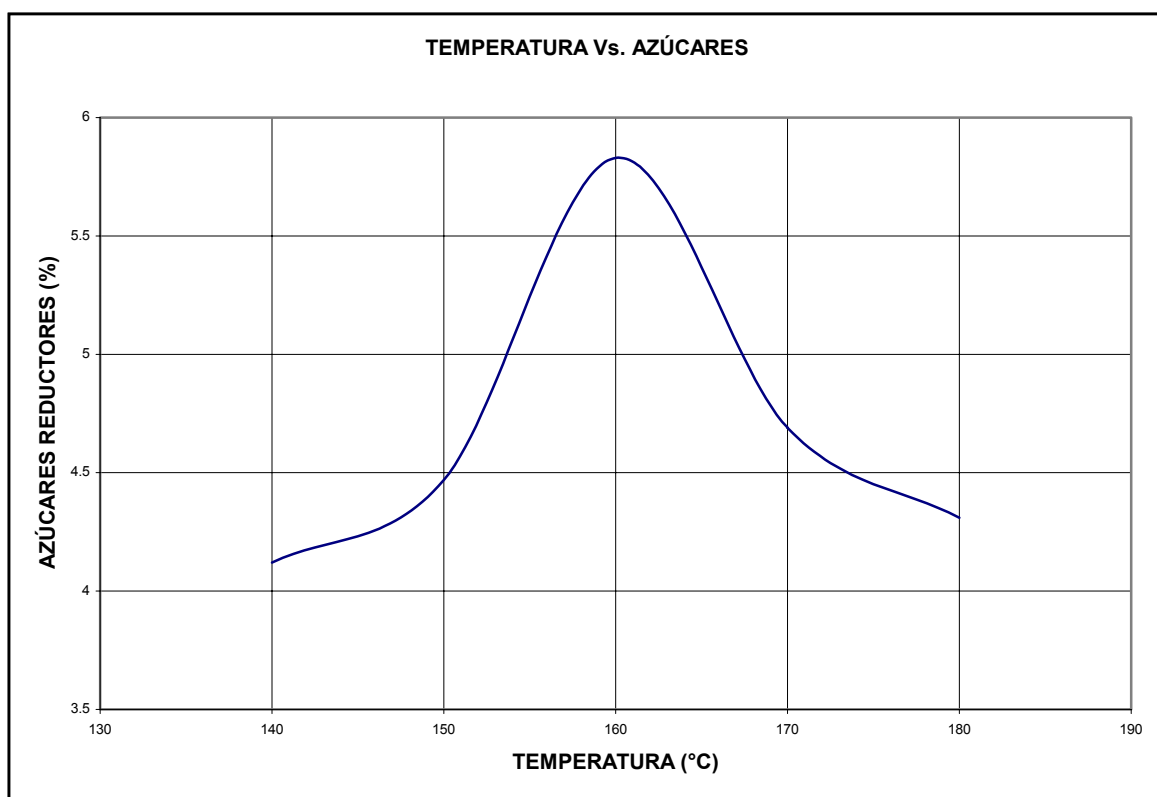


Figura 10. Comportamiento del rendimiento de azúcares con la temperatura

Con base en la figura 10, se observa que a 160°C se obtuvo mayor cantidad de azúcares fermentables.

Para temperaturas hasta 160°C se ve una tendencia al aumento en la producción de azúcares fermentables, pero a temperaturas mayores se disminuye debido a que parte del parénquima presenta una fuerte degradación térmica, toma una coloración oscura y el olor que presenta el hidrólizado es a materia orgánica que se ha quemado.

A 160°C, se llevaron a cabo varias hidrólisis a diferentes tiempos de reacción, los cuales se contabilizaron desde el momento en que el reactor alcanzó esta temperatura (160 °C). El tiempo que se demoró en llegar a 160 °C fué de aproximadamente 1 hora.

Tabla 10. Hidrólisis con diferente tiempo de reacción

TIEMPO DE REACCIÓN (h)	DENSIDAD DEL LICOR (Kg/m ³)	MASA DEL RESIDUO BASE SECA (g)	% DE AZÚCARES FERMENTABLES (mg DE AZÚCAR INVERTIDO POR 100 mL)
2	1,07	119,15	4,09
3	1,06	119,02	4,31
4	1,04	115,67	4,97
5	1,05	112,14	5,47
6	1,05	108,26	7,72
7	1,06	106,54	7,56
8	1,04	106,12	6,83

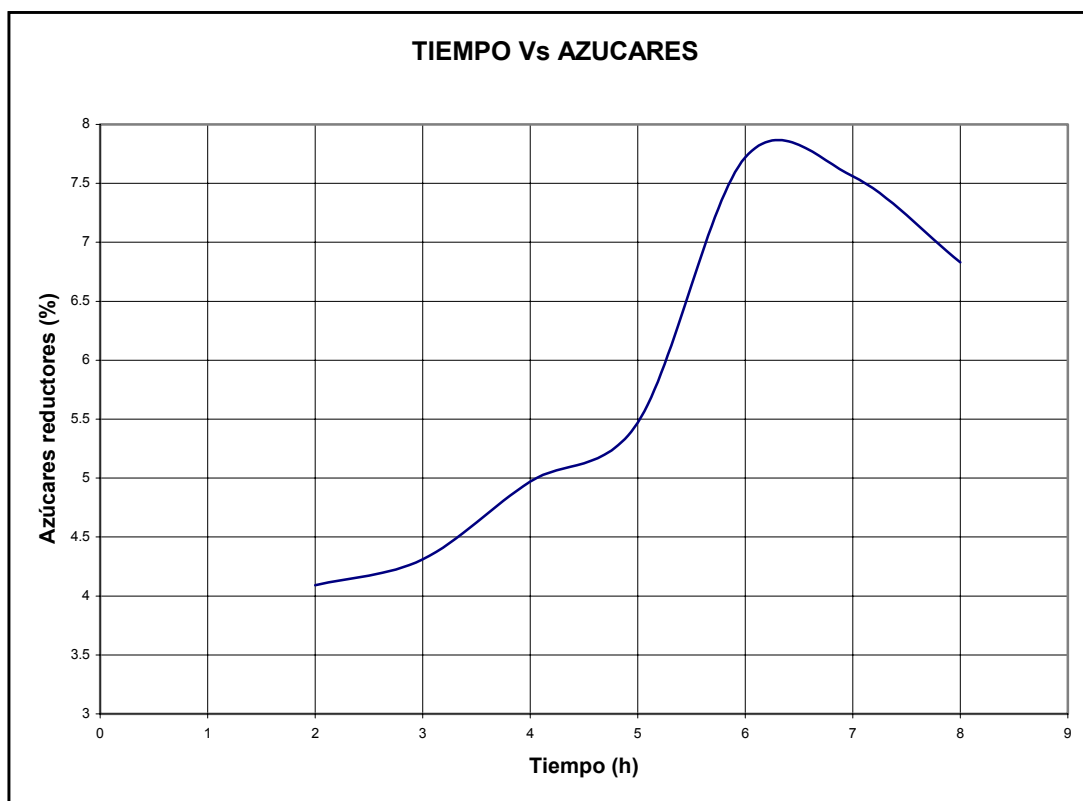


Figura 11. Comportamiento de los azúcares con el tiempo

Con base en la figura 11, se estableció que para obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables del hidrolizado; se deben realizar hidrólisis de 6 horas.

Se observó un aumento de azúcares a mayor tiempo de reacción, hasta llegar a 6 horas, de este tiempo de reacción en adelante el porcentaje de azúcares presenta tendencia a disminuir, esto es debido a la degradación térmica de los azúcares.

Una vez se estableció la temperatura y el tiempo de reacción, se varió la presión de los gases dentro del reactor de hidrólisis. Los resultados de la variación de la presión sobre la producción de azúcares se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Hidrólisis a diferentes presiones

PRESIÓN MÁXIMA (Psia)	MASA DEL RESIDUO BASE SECA (g)	% DE AZUCARES FERMENTABLES (mg DE AZÚCAR INVERTIDO POR 100 mL)
380*	113,34	7,29
340*	107,73	7,41
260*	106,52	7,59
220	105,79	7,63
180	105,75	7,72

*Para obtener estas presiones se inyectó aire al reactor

Como el aumento en la presión no influyó en una producción mayor de azúcares fermentables las siguientes hidrólisis se realizaron con la presión alcanzada a la temperatura establecida, sin inyección de aire.

Se estudió la influencia del tiempo de humectación del parénquima con el agua a temperatura ambiente.

Se determinó que al variar el tiempo de humectación del material de 30 minutos a 14 horas, no hubo cambio en la cantidad de azúcares fermentables recuperables del hidrolizado.

3.3 HIDRÓLISIS ACIDA

Se realizaron 3 hidrólisis ácidas para comparar la cantidad de azúcares reductores obtenidos en el licor con los realizados por medio de hidrólisis oxidativa. Se empleó ácido sulfúrico para las hidrólisis ácidas. La cantidad de ácido aplicada a 160 g de parénquima en una relación de 1:11 fue de 40 ml.

El pH del parénquima hidratado para estas hidrólisis ácidas fué de 1,5 y luego del proceso el pH del licor fue de 0,9.

Tabla 12. Hidrólisis ácida

TIEMPO DE REACCIÓN (min)	TEMPERATURA (°C)	% AZÚCARES REDUCTORES (mg DE AZÚCAR INVERTIDO POR 100 mL)
15	160	10,12
15	160	10,08

Los azúcares obtenidos son mayores que en el proceso por hidrólisis oxidativa, esto se debe a que el pH es menor y esto favorece el desdoblamiento de los polisacáridos.

3.4 CURVA PATRON DE ESCALA DE Mc Farland

Al mezclar las soluciones ocurre la siguiente reacción:



El sulfato de bario (BaSO_4) es un sólido insoluble en agua que al agitarse queda en suspensión y dispersa la radiación que proviene de la fuente del espectrofotómetro. La cantidad de luz dispersada es proporcional al número de partículas en suspensión. La dispersión causada por el sulfato de bario se considera equivalente a la producida por los microorganismos en suspensión.

3.5 CURVA DE CRECIMIENTO

La figura 12 presenta las curvas de crecimiento de la *Zymomonas mobilis* realizadas en el medio de cultivo, tomando mediciones de absorbancia cada dos horas para diferentes porcentajes de inóculo.

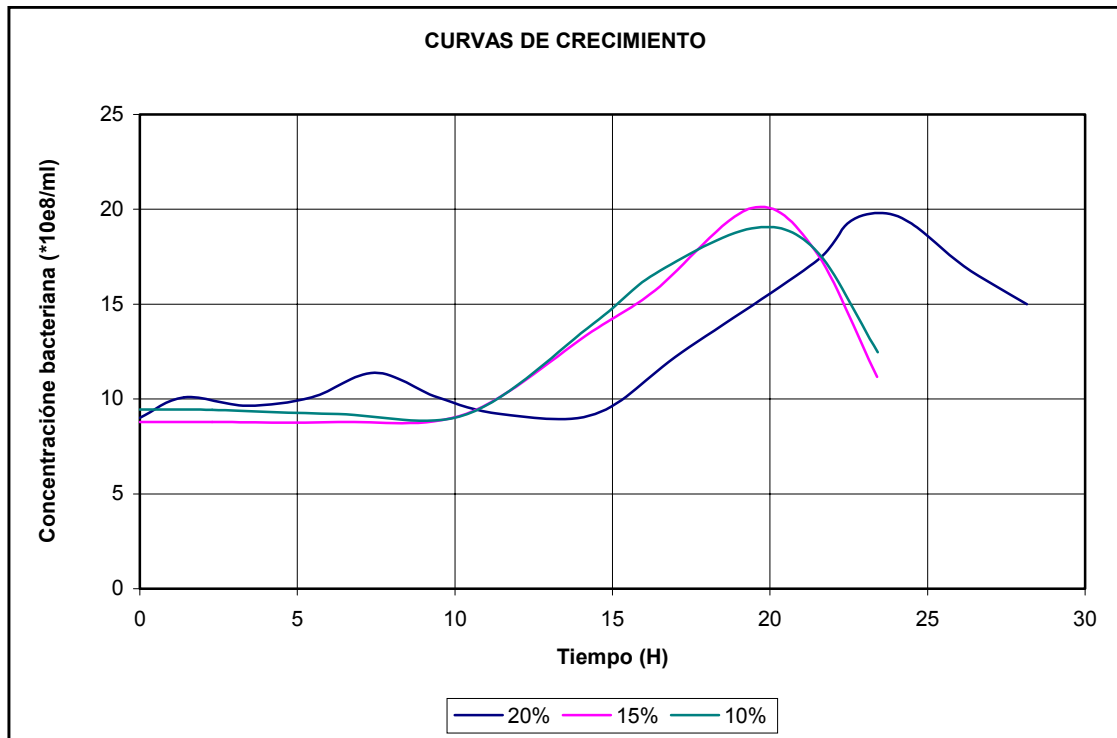


Figura 12. Curva de crecimiento para diferentes porcentajes de inóculo

La curva obtenida para un porcentaje del 10% de inóculo presenta un tiempo de adaptación de 10 horas, el tiempo de crecimiento también de 10 horas con una concentración bacteriana de $20 \times 10^8/\text{ml}$. Para un porcentaje del 15% de inóculo el tiempo de adaptación fue de 10 horas, el tiempo de crecimiento de 10 horas, con una concentración bacteriana de $21 \times 10^8/\text{ml}$. Con un 20% de inóculo el tiempo de adecuación es de 15 horas y el de crecimiento de 8 horas. Concluyendo así que el porcentaje de inóculo que ofrece una mayor concentración fue el del 15%.

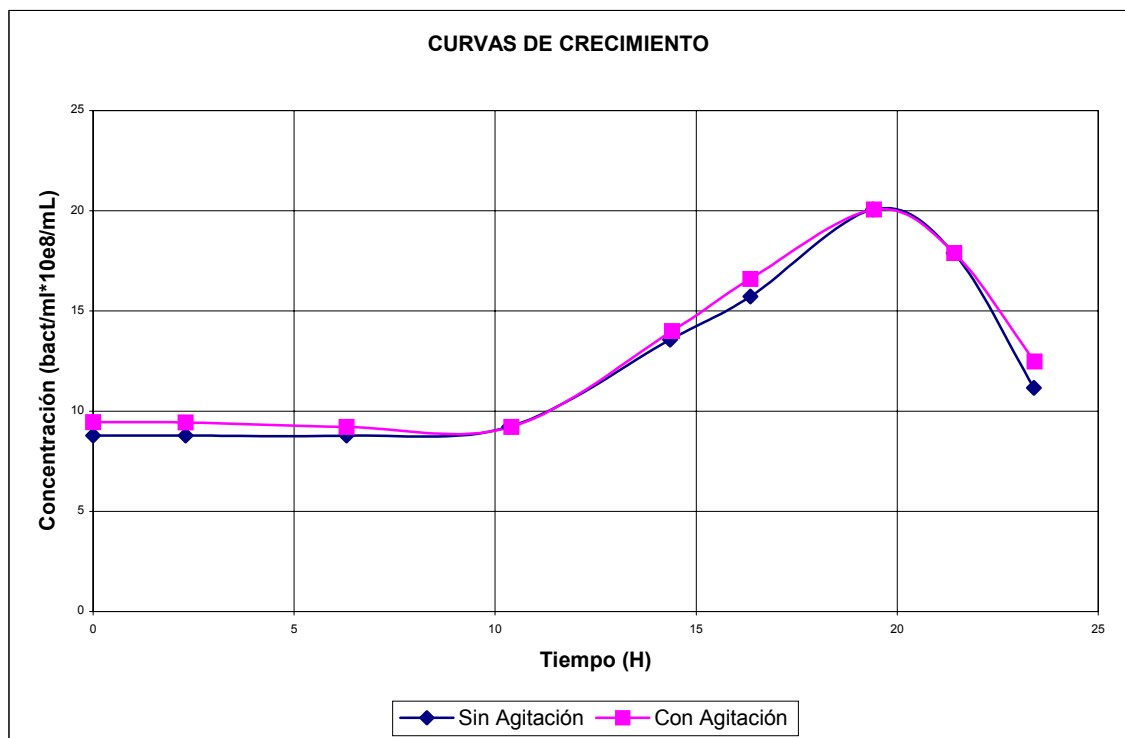


Figura 13. Curva de crecimiento en el medio con y sin agitación

Con base en la figura 13 se determinó que las *Zymomonas mobilis* se toman 10 horas para adaptarse al medio de cultivo; para luego comenzar la fase de crecimiento logarítmico (o exponencial) que demora alrededor de 10 horas. El tiempo y la concentración bacteriana son los mismos para las curvas con agitación y sin agitación.

Luego se llevaron a cabo experimentos con diferentes hidrolizados para determinar las curvas de crecimiento en estos y para verificar la adaptación de la *Zymomonas mobilis* en este licor producto de la hidrólisis.

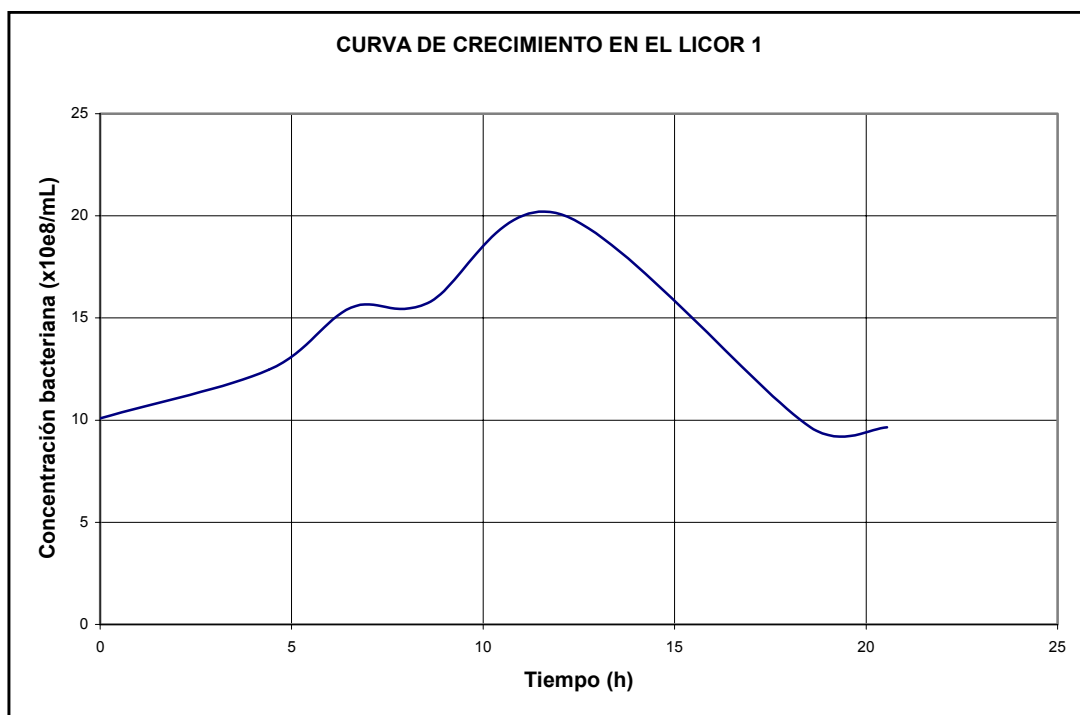


Figura 14. Curva de crecimiento en el licor 1

Licor 1 (tabla 11; presión 220 psia). Esta curva no presenta tiempo de adaptación, desde que se inócula la bacteria en este hidrolizado hay fase de crecimiento con una duración de 12 horas. Esta curva se realizó tomando mediciones de absorbancia cada 2 horas, la máxima concentración bacteriana fue de 20×10^8 /ml.

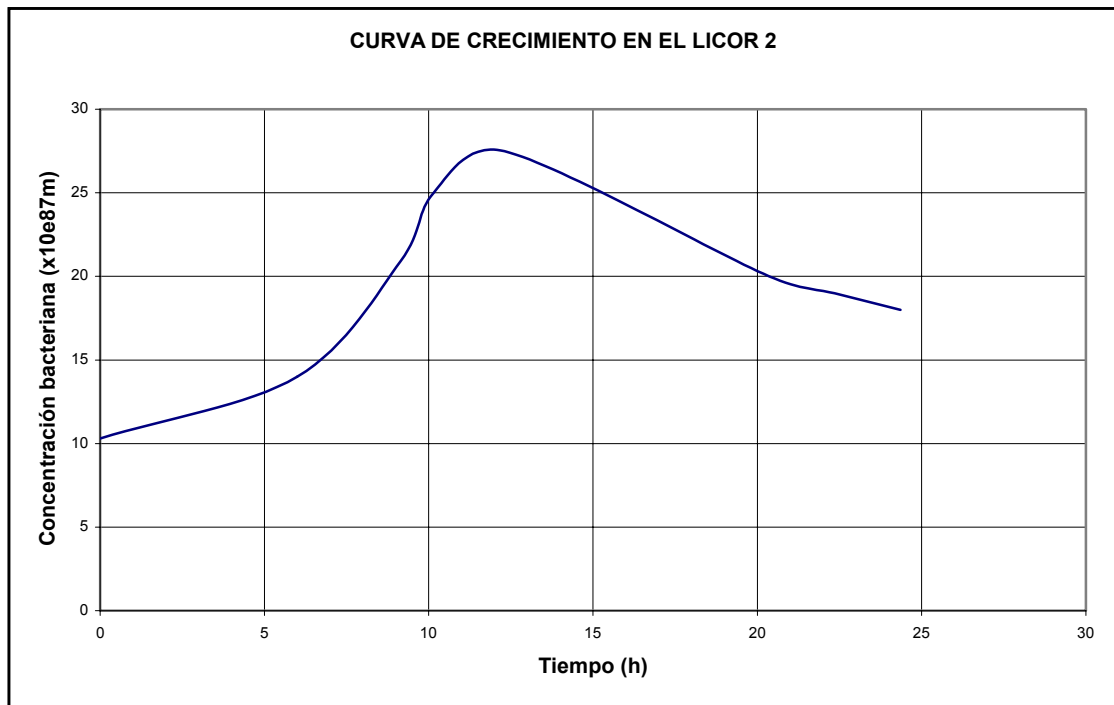


Figura 15. Curva de crecimiento en el licor 2

Licor 2 (tabla 11; presión 180 psia). En este ensayo con el licor 2 la curva de crecimiento tampoco mostró tiempo de adaptación, y el tiempo de crecimiento fué de 12 horas pero con una mayor concentración bacteriana (28×10^8 /ml.)

En el hidrolizado el tiempo de crecimiento es de 12 horas con un tiempo de adaptación mínimo (± 1 hora).

Las gráficas obtenidas a partir de diferentes hidrolizados son:

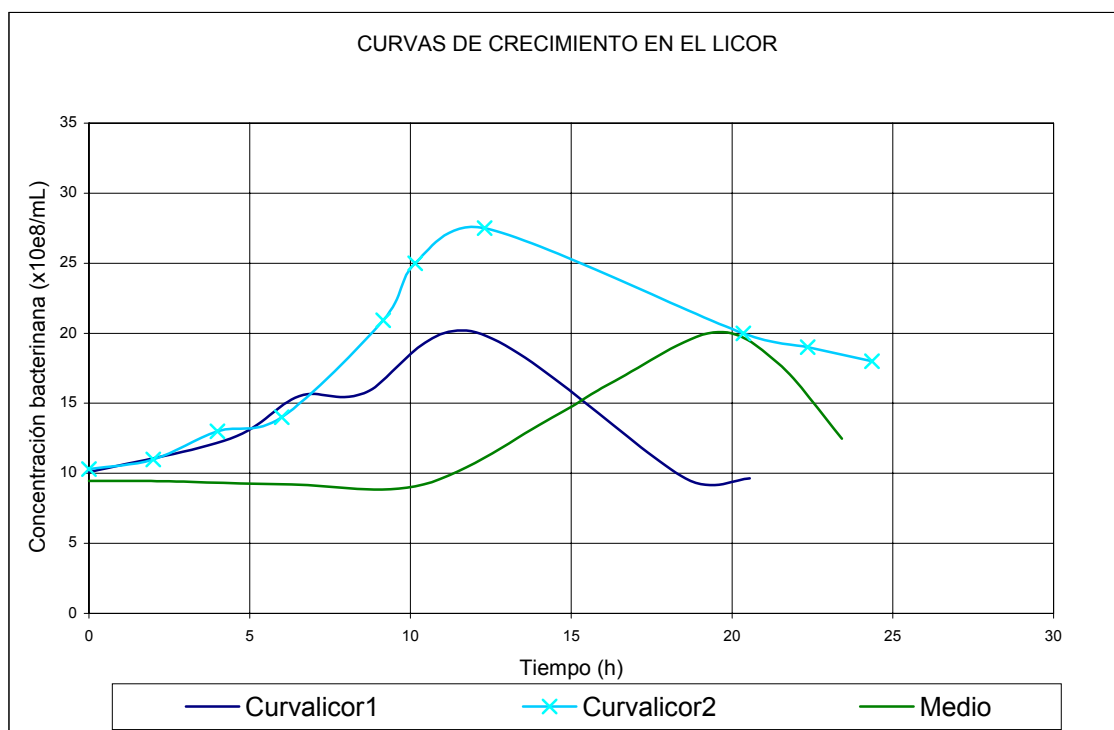


Figura 16. Comparación curvas de crecimiento en el hidrolizado del parénquima

A continuación se presenta la figura 17 en la cual se compara el crecimiento bacteriano en dos medios con y sin adición de xilosa.

Grafica de comparación de los medios con y sin xilosa

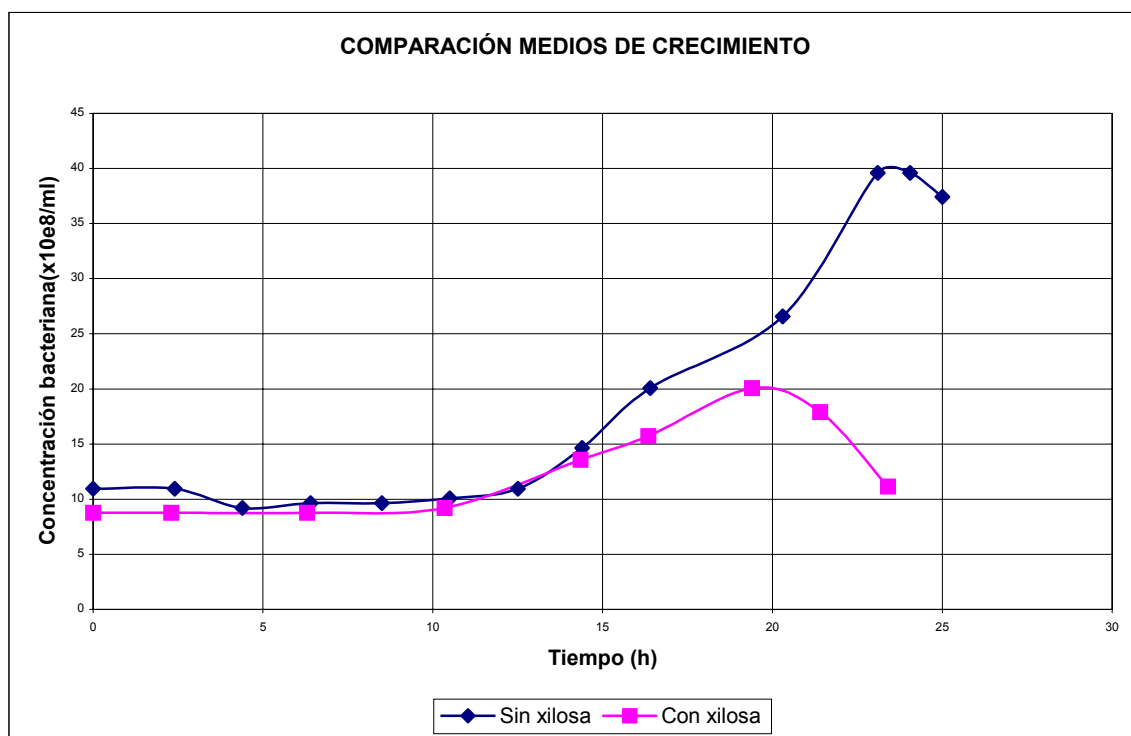


Figura 17. Curvas de crecimiento en el medio con y sin xilosa

Al comparar la curva de crecimiento del medio con y sin xilosa, se concluye que el medio sin xilosa presentó un mayor tiempo de crecimiento, con una mayor concentración bacteriana: 40×10^8 /ml; manteniendo el pH igual que en el medio con xilosa. Como no se observó influencia de la xilosa, en el crecimiento bacteriano; se siguió realizando la multiplicación del microorganismo en el medio de cultivo, sin presencia de xilosa.

3.6 FERMENTACION

1. Curva de calibración. Se realizó una curva de calibración del índice de refracción Vs. Concentración de etanol. Los resultados se muestran en la figura 18. Se puede observar una relación lineal, la cual se empleó posteriormente para mediante determinaciones del índice de

refracción calcular la concentración del etanol destilado después de transcurrida la fermentación.

2. La primera fermentación se realizó en un volumen de 4 litros, tomando muestras cada dos horas; estos datos se graficaron sobre la curva de índice de refracción Vs. concentración de etanol.

La gráfica obtenida es la siguiente:

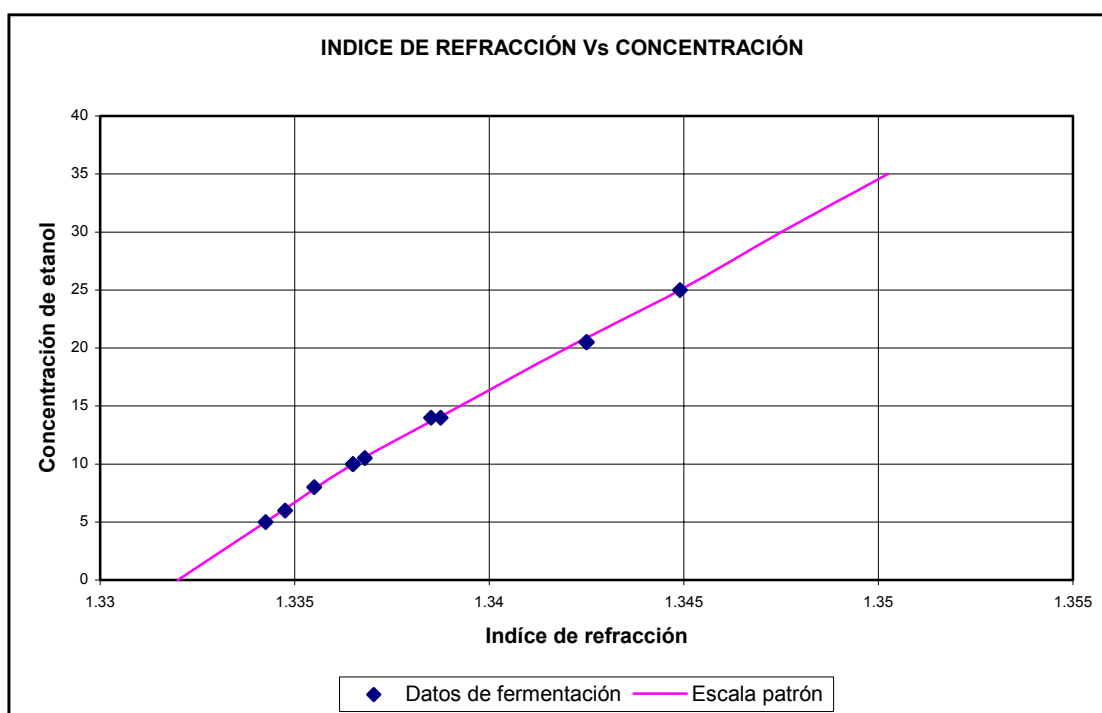


Figura 18. Curva de Índice de refracción Vs concentración de etanol

En la figura 19 se observa que los datos tomados en el transcurso de la fermentación, demuestran la producción de etanol durante el proceso.

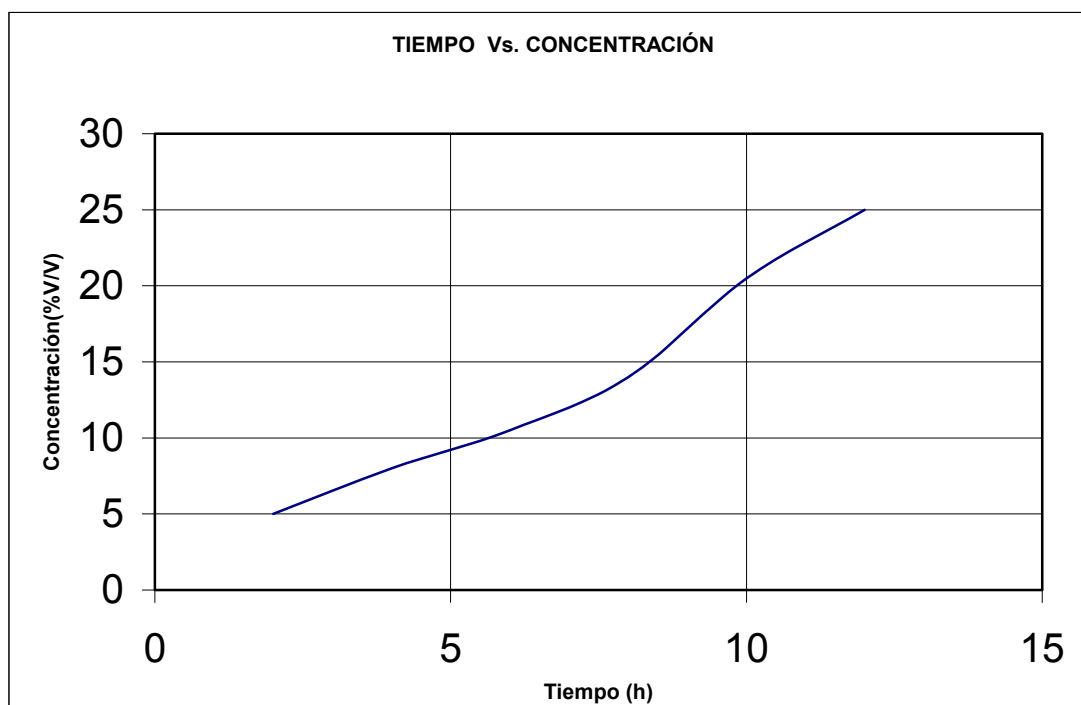


Figura 19. Tiempo Vs. Curva de concentración de etanol

Para determinar las mejores condiciones en la fermentación, se trabajó un volumen de 1 litro con un porcentaje de inóculo del 15%, realizando tres determinaciones por cada experimento para cada una de las variables a manipular.

Destilación. La destilación del etanol se realizó a una temperatura de 90°C obteniéndose volúmenes mayores con concentraciones menores en un tiempo de una hora; ya que las que se realizarón entre 78 – 80 °C reportarán volúmenes menores, concentraciones mayores y el tiempo de destilación fue alrededor de 5 horas, con los mismos rendimientos que la destilación a temperatura de 90 °C.

1. Fermentaciones realizadas variando el pH:

Tabla 13. Resultados obtenidos para diferentes pH

pH	VOLUMEN RECUPERADO	ÍNDICE DE REFRACCIÓN	CONCENTRACIÓN DE ETANOL	RENDIMIENTO DESTILACIÓN
4,00	160 ml	1,335	7,760	1,242
4,25	300 ml	1,334	4,951	1.485
4,80	140 ml	1,335	6,824	0.955
5,00	86 ml	1,340	16,632	1.451
5,30	134 ml	1,335	7,220	0.970
5,50	98 ml	1,339	15,047	1.505
5,70	178 ml	1,334	4,950	0.880

El pH con el que se obtuvieron los mejores resultados, fue de 5.5. El rendimiento en estos experimentos no presento tendencia a aumentar o disminuir correspondiente con los cambios realizados en el pH.

El rendimiento para la destilación fue calculado, como: porcentaje en volumen recuperado de etanol por la concentración del etanol en el destilado, sobre el volumen total a destilar.

2. Con un pH de 5,5 se realizaron las siguientes pruebas de fermentación para diferentes temperaturas, los resultados promediados fueron:

Tabla 14. Resultados obtenidos para diferentes temperaturas

T(°C) FERMENTACIÓN	VOLUMEN RECUPERADO	INDICE DE REFRACCIÓN	CONCENTRACIÓN DE ETANOL	RENDIMIENTO DESTILACIÓN
28	208 ml	1.3355	7.76	1.61
30	164 ml	1.3367	10.46	1.71
32	200 ml	1.3365	9.63	1.93
34	174 ml	1.3362	9.44	1.64
35	257 ml	1.3345	5.89	1.51
38	254 ml	1.3342	5.42	1.37

Con estos resultados, se concluyó que la mejor temperatura de fermentación fue de 32°C.

Se observó que hasta 32°C los experimentos presentaron una tendencia al aumento en el rendimiento y a temperaturas mayores a esta decrece la producción de etanol.

3. Luego se probaron concentraciones de azúcares menores, para la máxima concentración de azúcares reductores presentes en el hidrolizado; con el pH de 5,5 y la temperatura de 32°C; obteniendo los siguientes resultados

Tabla 15. Resultados obtenidos para diferentes concentraciones de azúcares

CONCENTRACIÓN	VOLUMEN RECUPERADO	INDICE DE REFRACCIÓN	CONCENTRACIÓN DE ETANOL	RENDIMIENTO DESTILACIÓN
25%	178 ml	1.334	4.95	0.88
50%	150 ml	1.336	8.7	1.30
75%	204 ml	1.335	7.29	1.48

Se concluyó que al disminuir la concentración de azúcares presentes en el hidrolizado disminuye el rendimiento; esto se debe a que la concentración de glucosa es menor y la bacteria *Zymomonas mobilis* tolera hasta concentraciones del 10-15% en peso de glucosa. Se comprobó que debido a la concentración de azúcares presentes en el hidrolizado la *Zymomonas*

mobilis trabajaron por debajo de su máximo teórico; por lo tanto al disminuir la concentración de azúcares se reduce a su vez el rendimiento de la fermentación. Se estableció que el mejor rendimiento se obtuvo con la máxima concentración de azucares presentes en el hidrolizado.

4. Con las condiciones establecidas anteriormente se realizaron tres fermentaciones con un volumen de 4 litros (pH: 5,5 ; T: 32°C y concentración máxima de azucares: 7,72%)

Tabla 16. Resultados obtenidos para fermentaciones de 4 litros

VOLUMEN RECUPERADO	ÍNDICE DE REFRACCIÓN	CONCENTRACIÓN DE ETANOL	RENDIMIENTO DESTILACIÓN
710 ml	1.348	30,02	5,33
780 ml	1,347	28,80	5,61
720 ml	1,349	30,12	5,42

Se observó en la tabla 14 la reproducibilidad de resultados y el aumento proporcional a los resultados suministrados en fermentaciones de 1 litro.

5. Fermentaciones realizadas en el licor producto de la hidrólisis ácida

Tabla 17. Resultados obtenidos para la hidrólisis ácida

VOLUMEN RECUPERADO	ÍNDICE DE REFRACCIÓN	CONCENTRACIÓN DE ETANOL	RENDIMIENTO DESTILACIÓN
174 ml	1,336	9,93	1,73
187 ml	1,338	10,11	1,89

Los rendimientos obtenidos a partir de la hidrólisis ácida son iguales o menores a los que se obtuvieron a partir de la hidrólisis oxidativa. Las

hidrólisis ácidas presentan un mayor porcentaje de azúcares reductores pero al realizar las fermentaciones el azúcar consumido por el microorganismo es el mismo que en la hidrólisis oxidativa, esto mostró que el porcentaje mayor de azúcares es debido a la presencia de pentosanos que no son asimilados por *Zymomonas mobilis*.

6. Se realizaron análisis al licor después de la fermentación, para mirar que cantidad de azúcares quedaban en este residuo

Tabla 18. Resultados obtenidos para azúcares después de la fermentación

HIDRÓLISIS	% AZÚCARES REDUCTORES	%AZÚCARES DESPUÉS DE LA FERMENTACIÓN	% AZÚCARES FERMENTADOS	% AZÚCARES FERMENTADOS POR <i>Z. mobilis</i>
Oxidativa	7,72	3,83	30,03	70 ,56
Ácida	10,12	6,97	31,87	68,13

En la tabla 16 se observa que el porcentaje de azúcares reductores para la hidrólisis ácida es mayor que el de la hidrólisis oxidativa, los rendimientos son los mismos, porque la bacteria esta consumiendo las mismas cantidades de azúcares.

4. CONCLUSIONES

- El análisis químico del parénquima muestra un contenido en lignina del 36.96 %, holocelulosa del 55.29%, con pentosas del 25,41 %. Se encuentra un alto contenido de lignina, lo que representa una menor cantidad de material que pueda ser hidrolizado.
- La hidrólisis oxidativa es un proceso exotérmico, económico y no contaminante debido a que no hay necesidad de adicionar ácidos al medio, sino que este mismo los produce
- La hidrólisis oxidativa produjo una concentración de azúcares del 7.72 % para una temperatura de 160 °C, presión de 180 psia y tiempo de reacción de 6 horas. Este es la concentración mayor de azúcares reductores que se pudo obtener por este proceso.
- La hidrólisis ácida generó un porcentaje de azúcares del 10.02% con rendimiento en volumen de etanol de 1.81; siendo aproximadamente el mismo rendimiento de la hidrólisis oxidativa.
- Las cepas aisladas de *Zymomonas mobilis* demostraron ser competitivas para la producción de etanol a nivel industrial.
- La bacteria *Zymomonas mobilis* en el hidrolizado de la palma africana tiene un tiempo de crecimiento de 12 horas; que es el tiempo requerido para la fermentación

- La bacteria *Zymomonas mobilis* se adapta fácilmente a diferentes medios que contengan glucosa, trabaja en un amplio rango de temperaturas y tolera concentraciones de etanol del 10%.
- Las condiciones mas adecuadas para la fermentación del licor producto de la hidrólisis con un 15% de inculo son: pH: 5,5 ; T: 32°C; tiempo de fermentación de 12 horas y concentración máxima de azúcares recuperados: 7,72% respecto al licor.

5. RECOMENDACIONES

- Recomendamos estudiar las posibles aplicaciones de los residuos sólidos de la hidrólisis oxidativa en procesos tales como la generación de ácidos orgánicos, compostage y biocompostage.
- El mejoramiento de la cepa de *Zymomonas mobilis* usando genética molecular, es un factor importante que permite mejorar tanto los porcentajes de conversión de glucosa como los del rendimientos de etanol.
- Realizar estudios con la bacteria *Zymomonas mobilis* a diferentes sustratos que contengan un mayor porcentaje de glucosa.
- Hacer estudios con microorganismos modificados genéticamente que tengan la capacidad de fermentar pentosas y hexosas, las cuales conforman un gran porcentaje de residuos lignocelulósicos.
- Estudiar y optimizar las variables de los procesos de hidrólisis y fermentación demostradas experimentalmente en el laboratorio, para llevarlas a escala industrial.
- Se sugiere hacer un estudio económico para la utilización del etanol obtenido en la producción de licores.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Cultivo e industria de la palma aceitera(*Elaeis guineensis*)

www.infoagro.go.cr/tecnologia/palma/palma.htm

2. Colombia: incentivo económico perverso para la plantación de palma Aceitera. <http://www.wrm.org.uy/boletin/47/Colombia.html>

3. FEDEPALMA. Abril-Mayo

www.fedepalma.org

4. **VEGA**,E. Análisis e hidrólisis del parénquima de la palma africana, Universidad Industrial de Santander, 1981.

5. Azucares reductores

www.alimentosargentinos.gov.ar

6. **MATEOS F**, Pedro F. Crecimiento microbiano. Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.

7. GARCIA L., Maria Dolores URUBURU F., Federico. La conservación de cepas microbianas. Colección Española de cultivos tipo(CECT). Universidad de Valencia. cect@uv.es. <http://www.uv.es/cect>

8. **BULLOCK, J. KRISTIAN, B.** Biotecnología Básica. Editorial Acribia S.A., Zaragoza España 1991.

9. **GARCIA, G. QUINTERO, M.** Et. al. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa 1993.

10. **GUNASEKARAN, P. CHANDRA RAJ, K.** Ethanol fermentation technology Zymomonas mobilis.
<http://ces.iisc.ernet.in/curscinev/july10/articles14.htm>

11. **MOREIRA, J. R.**, Combustibles leñosos y energía de biomasa: Del hogar a la industria .
<http://www.fao.org/montes/foda/wforcong/PUBLI/V3/T16S/1-4.HTM#TOP>

12. Etanol combustible a partir de la hidrólisis ácida de la celulosa del bagazo
<http://www.corpodib.com/proyectos.htm#curso1>

13. GASOHOL
<http://www.upme.gov.co/revista/web/contra.htm>

14. **FERNANDEZ**, J. M., Microbiología industrial
imb.usal.es/castellano/personales/rss/MIIQ0203.pdf.

15. **BOUIX**, M. **LEVEAU**, J., Microbiologia Industrial. Los microorganismos de interés industrial. Editorial Acribia, Zaragoza (España)

16. **MONTOYA**, D., **MORENO**, N., Opción tecnológica para la obtención de etanol combustible a partir de la hidrólisis de la celulosa del bagazo de caña. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, 2001.

17. Etanol combustible
<http://www.upme.gov.co/revista/web/contra.htm>

18. **GONZALEZ**. Erenio, **LOPRETTI**, Mari, **LOPEZ**, Gerardo, Alternativas tecnológicas para la producción de bioetanol mediante el uso integral de biomasa. Subprograma IV “Biomasa como fuente de materia prima y energía” Diciembre 2002, Cartagena-Colombia.

19. Ethanol production technologies
<http://www.hawaii.gov/dbedt/ert/ethanol/f407.html>

20. Al bagazo mucho caso
<http://www.dnic.unal.edu.co/unprograma/sem103/tprimera.htm>

21. **INGRAM**, L.O, **DORAN**, J.B. Conversion of cellulosic materials to ethanol. FEMS Microbiology Reviews 16 , (1995) 235-241.
22. Better “Bugs” Lead to cheaper ethanol from biomass. New agreements Could Boost U.S: Biofuels Industry.
[http:// www.nrel.gov/hot-stuff/press/1999/5799bugs.html](http://www.nrel.gov/hot-stuff/press/1999/5799bugs.html)
23. **WOOLEY**, R., **GLASSNER**, D. **SHEEHAN**, J. **RUTH**, M. Process Design and Costing of Bioethanol Technology: A tool for Determining the Status and Direction of Research and Development. Biotechnol. Prog 1999, 15, 794-803.
24. **LADISCH**, M.R. **HSU**, T.A. **TSAO**, T. Alcohol from cellulose. Chemtech may 1980, 315-319.
25. **EMERT**, G.H. **KATZEN**, R. Gulf’s cellulose to-ethanol-, process. Chemtech october 1980, 610-614.
26. Del azúcar a la gasolina ecológica
<http://www.el-mundo.es/nuevaeconomia/2000/NE050/NE050-08.html>
27. Fermentación alcohólica con *Zymomonas sp.* Estudio de modelos matemáticos y su verificación mediante ensayos de fermentación.
<http://fai.unne.edu.ar/biologia/tesis/tabga.htm>
28. Efecto antagonico de *Zymomonas mobilis* spp. frente a salmonella sp. y proteus mirabilis.
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/universitas/vol6n2/ART2.htm>

29. **LEE**, J., Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, Journal of Biotechnology 56 (1997) 1-24.
30. Bacterial Metabolism
<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch004.htm>
31. Fermentation Organism Development Investigate Pentose Sugar Transport in *Zymomonas*
<http://bioenergy.ornl.gov/99summaries/fermentation.html>
32. Energy metabolism as a supply-demand system
<http://bip.cnrs-mrs.fr/bip10/hofmeyr3.htm>
33. New Effort to Develop Better "Bugs" for Cellulose-to-Ethanol Conversion
<http://www.ethanol-gec.org/winter99/win9916.htm>
34. El futuro del alcohol combustible.
http://www.novozymes.com/library/Publications/Biotimes_Sprog/ES_looking.pdf
35. Biocombustibles Líquidos.
<http://www.fisicaysociedad.es/pdfs/biomasavector.pdf>
36. Biocombustibles. Ventajas del uso de etanol
www.cipres.cec.uchile.cl