

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) de raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) pretratado con ácido y álcali para la producción de etanol de segunda generación

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

BERNARDO DAVID BASTIDAS MAYORGA

Quito, 2013

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Bernardo David Bastidas Mayorga ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

MSc. Patricia Portero

Directora de la Disertación

Quito, 16 de Diciembre del 2013

A mi querida familia

AGRADECIMIENTOS

A la facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y, de manera muy especial a la Master Patricia Portero, directora de esta investigación, por su gran apoyo, paciencia, consejos y amistad.

Al director del CNIB, Dr. Javier Carvajal, quien fue de gran apoyo en la culminación de este trabajo gracias a sus observaciones, consejos y amistad.

Al Dr. Carlos Soria y a la Dra. María Eugenia Ordoñez por sus valiosas sugerencias y recomendaciones como lectores.

A mi querida familia, por su apoyo, comprensión, amor y en especial a mi madre quien ha sido mi modelo a seguir durante mi vida, quien me ha enseñado que con perseverancia se alcanzan las metas.

A Carolina Tufiño, quien con sus valiosos consejos y amistad me apoyó en varias etapas de este trabajo, y me ayudó cuando lo necesite.

A mis amigos (as) del colegio y la universidad, gracias por todo su apoyo ya que de alguna manera me ayudaron a salir adelante durante este proceso.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANCUPA	Asociación de Cultivadores de Palma aceitera
CNIB	Centro Neotropical para Investigación de la Biomasa
CLQCA	Colección de levaduras Quito-Católica
EMP	Embden-Meyerhoff-Parnas (ruta metabólica)
g	gramos
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography” (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia)
INT-005	Cepa de levadura de la especie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Internacional 005
L	Litro
min	minutos
ml	mililitros (1×10^{-3} litros)
OH	hidroxilo
p	peso
RESETA	Recursos Sustentables para Etanol
rpm	revoluciones por minuto
SSF	“Simultaneous Saccharification and Fermentation” (Sacarificación y Fermentación Simultánea)
SSFC	“Simultaneous Saccharification and Cofermentation” (Sacarificación y Cofermentación Simultánea)

SHF	“Separate Hydrolysis and Fermentation” (Hidrólisis y Fermentación Separadas)
μl	microlitro (10^{-6} litros)
v	volumen
YPD	“Yeast Peptone Dextrose” (Caldo de cultivo)

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Bioetanol como combustible	4
3.2 Obtención de bioetanol.....	4
3.2.1 Bioetanol de primera generación.....	5
3.2.1.1 Plataforma de los azúcares	5
3.2.1.2 Plataforma de almidón.....	6
3.2.2 Bioetanol de segunda generación.....	7
3.2.1.2 Plataforma de celulosa	7
Celulosa.....	8
Hemicelulosa.....	8
Lignina	9
3.3 Proceso de producción de bioetanol de segunda generación	9
3.3.1 Pretratamiento de biomasa lignocelulósica	10
3.3.2 Hidrólisis Enzimática	11
3.3.3 Fermentación	12

3.3.4 Purificación de bioetanol combustible	13
3.4 Estrategias para hidrólisis enzimática y fermentación	14
3.4.1 Hidrólisis enzimática y fermentación separadas (SHF)	15
3.4.2 Sacarificación y fermentación simultánea (SSF).....	15
3.4.3 Sacarificación y cofermentación simultánea(SSFC)	16
3.5 Justificación	16
3.6 OBJETIVOS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Materia prima	20
4.2 Pretratamiento físico	20
4.3 Pretratamiento químico	21
4.3.1 Pretratamiento ácido y alcalino	21
4.4 Hidrólisis enzimática	21
4.5 Fermentación	22
4.6 Diseño experimental	24
4.7 Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)	25
4.7.1 Obtención del producto de prehidrólisis	25
4.7.2 Sacarificación y fermentación simultánea(SSF)	26
4.8 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	26

5. RESULTADOS	28
5.1 Pretratamiento físico químico e hidrólisis enzimática	28
5.2 Fermentación	30
5.3 Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)	31
6. DISCUSIÓN	33
6.1 Pretratamiento físico químico e hidrólisis enzimática	33
6.2 Fermentación	37
6.3 Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)	40
7. CONCLUSIONES	43
7. RECOMENDACIONES	44
8. LITERATURA CITADA.....	45
9. FIGURAS	52
10. TABLAS	60
11. ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema del proceso de Sacarificación y fermentación simultánea	53
Figura 2	Rendimiento (%) de sacáridos totales obtenidos por hidrólisis enzimática de biomasa de palma pretratada con ácido y álcali.....	54
Figura 3	Concentración de sacáridos totales obtenidos por hidrólisis enzimática de biomasa de palma pretratada con ácido y álcali	55
Figura 4	Concentración de glucosa obtenida por hidrólisis enzimática de biomasa de palma pretratada con ácido y álcali	56
Figura 5	Concentración de etanol obtenida por hidrólisis enzimática de biomasa de palma pretratada con ácido y álcali	57
Figura 6	Evolución de la concentración de etanol durante el proceso de SSF por 10 días de raquis de palma africana	58
Figura 7	Evolución de la liberación de xilosa y el consumo de glucosa durante el proceso de SSF por 10 días de raquis de palma africana	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Ensayos resultantes del diseño experimental	61
Tabla 2	Rendimiento de sacáridos totales obtenidos por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido y álcali	62
Tabla 3	Concentración de sacáridos totales: glucosa, xilosa, celobiosa, celotriosa y celodextrina obtenidos por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido y álcali.	63
Tabla 4	Concentración xilosa obtenida por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido y álcali.....	64
Tabla 5	Concentración de glucosa inicial y glucosa residual después de un proceso de fermentación (24 horas).....	64
Tabla 6	Rendimiento de etanol obtenido en los 12 ensayos.....	65
Tabla 7	Evolución de la concentración de productos de fermentación obtenidos en el proceso de SSF del raquis de palma africana durante 10 días	66
Tabla 8	Evolución de la concentración de sacáridos totales (celodextrina, celotriosa, celobiosa, glucosa y xilosa) obtenido en el proceso de SSF del raquis de palma africana durante 10 días	67

Tabla 9	Comparación del rendimiento en la obtención de sacáridos totales entre los ensayos que fueron pretratados con ácido y álcali.....	68
Tabla 10	Comparación del rendimiento en la obtención de glucosa entre los ensayos que fueron pretratados con ácido y álcali	69

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Emisiones de gases de invernadero producidas	71
Anexo 2	Procesos involucrados en la producción de bioetanol	72
Anexo 3	Estructura de la biomasa lignocelulósica en el tejido vegetal	73
Anexo 4	Cambio de la estructura del material lignocelulósico después del pretratamiento	74
Anexo 5	Esquema que representa la acción de los tres tipos de enzimas que participan en la degradación de la fibra de celulosa en glucosa.....	75
Anexo 6	Potencial hipotético de biomasa lignocelulósica en Ecuador que podría producir etanol celulósico	76
Anexo 7	Análisis de la viabilidad del desecho de palma africana para ser utilizado en biorrefinerías en Ecuador.....	77
Anexo 8	Valores de la media y desviación estándar de sacáridos totales para cada ensayo	78
Anexo 9	Valores de la media y desviación estándar de glucosa para cada ensayo	79
Anexo 10	Valores de la media y desviación estándar de etanol para cada ensayo	80
Anexo 11	Composición de las fracciones principales que conforman la pared celular del desecho de palma africana	81
Anexo 12	Datos de las 3 repeticiones obtenidas para cada ensayo del proceso de	

	hidrólisis enzimática de biomasa de raquis de palma pretratada con ácido y álcali.....	82
Anexo 13	Datos de las 3 repeticiones obtenidas para cada ensayo del proceso de fermentación de biomasa de raquis de palma pretratada con ácido y álcali e hidrolizada.....	84
Anexo 14	Datos de las 3 repeticiones obtenidas de los productos de fermentación y sacáridos por 10 días durante el proceso de SSF	86
Anexo 15	Cromatogramas obtenidos por HPLC en la hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido.....	88
Anexo 16	Cromatogramas obtenidos por HPLC en la hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con álcali.....	106
Anexo 17	Cromatogramas obtenidos por HPLC en la fermentación de biomasa pretratada con ácido e hidrolizada.....	124
Anexo 18	Cromatogramas obtenidos por HPLC en la fermentación de biomasa pretratada con álcali e hidrolizada.....	142
Anexo 19	Cromatogramas obtenidos por HPLC en el proceso de SSF.....	160

1. RESUMEN

El bioetanol de segunda generación se produce a partir de biomasa celulósica. La biomasa celulósica requiere de un pretratamiento e hidrólisis enzimática que permiten liberar azúcares que puedan ser convertidos en etanol. En el presente estudio se probó y comparó la efectividad de dos pretratamientos (ácido y alcalino) junto con condiciones de tiempo (10, 20 y 30 minutos), y temperatura (160 °C y 170 °C). Además se realizó una técnica que acopla los procesos de degradación de la biomasa en un sistema de conversión a etanol denominado Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) por sus siglas en inglés. De acuerdo con los resultados obtenidos, las condiciones con las que se obtuvieron las mayores concentraciones de sacáridos totales y el mayor rendimiento de etanol correspondieron a pretratamiento alcalino, 160 °C y 20 minutos para el raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*). La producción de etanol en términos de volumen llega a ser suficientemente alta como para presentar viabilidad a nivel industrial, en la cual lo mínimo aceptable es obtener un 5 % v/v de concentración de etanol en el mosto. En este trabajo el proceso de SSF se realizó por un periodo de 10 días en los cuales se obtuvieron concentraciones de etanol que oscilaron entre los 5,2 g/L p/v y 5,8 g/L p/v que corresponden en porcentaje (v/v) a 6,6 % v/v y 7,4 % v/v respectivamente. Adicionalmente, un avance consiste en reducir el tiempo durante la fermentación que generalmente dura 72 horas a solo 36 horas. La concentración del mosto permite una producción de etanol continua, debido a que la levadura produce alcohol a la vez que consume glucosa lo que ha permitido establecer las bases para optimizar la técnica de SSF en la producción de etanol de segunda generación.

Palabras clave: etanol de segunda generación, pretratamiento ácido y alcalino, raquis de palma africana, sacarificación y fermentación simultánea.

2. ABSTRACT

Second generation ethanol is produced through cellulosic biomass. Cellulosic biomass requires a pretreatment and an enzymatic hydrolysis in order to release sugars than can be converted to ethanol. In the present study we tested and compared the efficiency of two pretreatments (acid, alkaline) along with time (10, 20, 30 minutes) and temperature (160 °C, 170 °C) conditions. We also carried out a technique that allows the process of biomass degradation in an ethanol conversion system which is known as Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). According to the results the conditions under which the highest concentration of sugars and hence a higher yield of ethanol was obtained, corresponded to alkaline pretreatment, 160 °C, 20 minutes for the oil palm empty fruit bunch (*Elaeis guineensis*). Ethanol production becomes sufficiently high in terms of volume as to present technical feasibility of production processes at industrial level in which the minimum acceptable is 5 % v/v of ethanol in the must. In the present study the SSF process was carried out for a period of 10 days in which concentrations of ethanol ranging from 5,2 g/L w/v and 5,8 g/L w/v were obtained, that expressed in percentage (v/v) corresponds to 6,6 % v/v and 7,4 % v/v respectively. Additionally, this technique speeds up the fermentation process that usually lasts 72 hours to just 36 hours reducing ethanol production time. The concentration of the must allows continuous ethanol production because the yeast produces alcohol while consuming glucose, which is the basis for optimizing the technique of SSF for the production of second-generation ethanol in future studies.

Key words: acid and alkaline pretreatment, oil palm empty fruit bunch, second generation ethanol, simultaneous saccharification and fermentation.

3. INTRODUCCIÓN

El consumo de energía, ha aumentado debido al incremento de la población humana y el desarrollo industrial. El mundo enfrenta el agotamiento progresivo de sus recursos energéticos basados principalmente en combustibles no renovables (carbón, gas natural y petróleo), los cuales se han formado por restos de materia orgánica vegetal y animal en estado de descomposición a lo largo de millones de años (Walters, 2006). Las reservas se consumen a una velocidad mayor que la que se generan (Sánchez y Cardona, 2005; Walters, 2006). Además, existen problemas ambientales asociados al uso de los combustibles fósiles, por lo que se ha optado por desarrollar fuentes de energía renovable (Sun y Cheng, 2002; Hui, Nag, Min, Wong y Chang, 2009).

Los recursos renovables son de gran importancia, debido a que se regeneran por medio de procesos naturales a una velocidad superior a la de su consumo. La energía solar, las mareas, el viento, la biomasa, entre otros, son recursos que no corren el riesgo de agotarse por el uso del ser humano durante periodos de tiempo prolongados (Sawin *et al.*, 2006) El término de biomasa es utilizado para describir a toda la materia orgánica renovable que se genera, a través de la fotosíntesis y otros tipos de procesos biológicos (Takashi y Sinichi, 2006). La biomasa fue una de las primeras fuentes de energía que conoció la humanidad y abarca un amplio rango de materia biológica y vegetal que forman parte del planeta (Cortínez, 2010; Carvajal *et al.*, 2013).

A partir de biomasa residual, como desechos maderables, los remanentes sólidos orgánicos de las ciudades, los residuos utilizados en la agricultura y cultivos dedicados a

producción exclusiva de energía (Lin y Tanaka 2006), se pueden producir biocombustibles que se utilizan como fuente de energía en los motores de combustión interna. Los biocombustibles se pueden encontrar en estado líquido o gaseoso, entre los más importantes se menciona al biodiesel, biogás y alcoholes (etanol) (Rutz y Janssen, 2008; Cortínez, 2010).

3.1. BIOETANOL COMO BIOCOMBUSTIBLE

El biocombustible más utilizado es el bioetanol (etanol celulósico) que es considerado como un combustible alternativo el cual puede ser mezclado con gasolina reciclando el contenido de CO₂ que se libera durante la combustión, al mismo tiempo que reduce las emisiones contaminantes como el monóxido de carbono de hidrocarburos que no son oxidados completamente (Anexo 1).

La mezcla más común de etanol-gasolina en Estados Unidos es la E85 que contiene 85 % de etanol y 15 % de gasolina, este biocombustible se conoce como gasohol. El bioetanol es un líquido soluble en agua, incoloro, volátil e inflamable, que se genera por medio de un proceso biológico que consiste en la fermentación de azúcares. Su fórmula molecular es CH₃-CH₂-OH y posee una densidad de 0,789 (kg/L) (Cheng, 2010; Balat, 2011).

3.2. OBTENCIÓN DE BIOETANOL

La producción de bioetanol es llevada a cabo por la fermentación de azúcares que pueden ser obtenidos a partir de recursos como el almidón o la celulosa (Cheng, 2010) (Anexo 2). Según el tipo de materias primas utilizadas en su producción, el etanol combustible ha sido

clasificado en dos tipos: bioetanol de primera y bioetanol de segunda generación (Lynd, Cushman, Nichols y Wyman, 2006).

3.2.1. BIOETANOL DE PRIMERA GENERACIÓN

El bioetanol de primera generación se obtiene a partir de productos de procedencia agrícola, en los cuales se destacan los cultivos que tienen un alto contenido de azúcares y almidón, ejemplos de este tipo de materiales son los granos de maíz, los jugos de la caña de azúcar y de la remolacha, entre otros. Las ventajas que presenta el biocombustible de primera generación son la facilidad de procesamiento y las bajas emisiones de gases de invernadero, sin embargo, su principal desventaja radica en el uso de materia prima que corresponden a cultivos destinados a la alimentación humana (Álvarez, 2009; Cortínez, 2010; Juri, 2011).

3.2.1.1. PLATAFORMA DE LOS AZÚCARES

Las principales fuentes de azúcares para producción de bioetanol de primera generación son la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), la remolacha (*Beta vulgaris*) y el sorgo dulce (*Sorghum spp.*). Estos productos son ricos en azúcar y contienen sacarosa. Para la obtención de bioetanol se utiliza a la caña de azúcar en forma de jugo de caña o como melazas (subproducto de la industria azucarera). El bagazo resultante se seca y es quemado para la producción de energía que se emplea en el proceso de destilación. La melaza de caña y el jugo de remolacha poseen altas concentraciones de sacarosa que es fácilmente fermentada por medio de microorganismos en etanol (Alarcón, 2010; Cheng, 2010).

3.2.1.2. PLATAFORMA DE ALMIDÓN

El bioetanol también se puede obtener, a través de la fuente de almidón, la cual incluye a granos como el maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*) y tubérculos como la papa (*Solanum tuberosum*) y el camote (*Ipomoea batatas*). El contenido de almidón en los granos se encuentra en un rango del 60 % al 75 % mientras que en los tubérculos se halla entre el 10 % al 30 % (Cheng, 2010).

El almidón que se encuentra en las semillas y raíces de las plantas, es un polisacárido que está conformado por unidades de glucosa, se encuentra constituido químicamente por amilosa y amilopectina. La amilosa es un polisacárido compuesto de 200 a 1000 unidades de glucosa, las cuales se encuentran unidas mediante enlaces glucosídicos α -1,4. La amilopectina es una mezcla de polisacáridos ramificados, unidos por enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 y se compone de 10.000 a 100.000 unidades de glucosa (Barroso, 2010; Cheng, 2010).

La conversión de almidón en bioetanol involucra un paso adicional, denominado sacarificación para producción de azúcares fermentables. La sacarificación es un proceso en el cual los polisacáridos (amilosa y amilopectina) terminan convirtiéndose en oligosacáridos, dextrinas y glucosa, la cual puede ser fermentada por levaduras o bacterias. El proceso es catalizado por la enzima glucoamilasa, la cual hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 de los extremos no reductores de la cadena de almidón para liberar glucosa (Sauer *et al.*, 2000; Cheng, 2010).

El maíz es utilizado para la producción de bioetanol comercial en EEUU debido al alto contenido de almidón que posee. Los granos secos de maíz son triturados en molinos

mecánicos hasta obtener harina de maíz, esa harina se mezcla con agua a altas temperaturas (90 °C a 110 °C) a este proceso se lo denomina licuefacción. Seguidamente se añaden amilasas y se disminuye la temperatura hasta alcanzar un rango de 60 °C a 70 °C para degradar al almidón en moléculas más pequeñas como oligosacáridos y dextrinas, luego se añade la enzima glucoamilasa, la cual va a descomponer al almidón hasta obtener glucosa finalizando así el proceso de sacarificación (Sánchez y Cardona, 2005; Alarcón, 2010; Cheng, 2010).

3.2.2 BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

El bioetanol de segunda generación se obtiene a partir de fuentes que no son comestibles, como materiales de desecho agroindustriales y forestales. Estos materiales ricos en celulosa contienen un gran potencial energético, debido a que contienen azúcares que eventualmente pueden ser hidrolizados y fermentados para producir bioetanol (Sun y Cheng, 2002).

3.2.2.1 PLATAFORMA DE CELULOSA

Los materiales lignocelulósicos están conformados por componentes primarios que incluyen a la celulosa (30 - 45 %), hemicelulosa (25-30 %), lignina (15-20 %) y componentes secundarios que son hidrosolubles de bajo peso molecular denominados extractivos y cenizas (Barroso, 2010). Los compuestos lignocelulósicos son componentes de la pared celular vegetal de las plantas y se encuentran conformando una estructura molecularmente fuerte y sólida (Anexo 3) (Cuervo, Folch y Quiroz, 2009; Juri, 2011; Alonso, Wettstein y Dumesic, 2012).

Celulosa

La celulosa es el material orgánico más abundante en la naturaleza, es un homopolímero compuesto por unidades de glucosa con enlaces glucosídicos β 1-4 (Sánchez, Gutiérrez, Muñoz y Rivera Barrero, 2010). Posee una estructura lineal y fibrosa la cual está constituida de regiones cristalinas y amorfas. En la región cristalina, las fibras de celulosa se encuentran altamente ordenadas, en la región amorfa, las moléculas se hallan desordenadas (Sun *et al.*, 2008).

La fibra de celulosa está formada por estructuras conocidas como microfibrillas, las mismas que se encuentran constituidas por fibrillas elementales conformadas por 10.000 y 14.000 moléculas de glucosa (Barroso, 2010). La celulosa se encuentra entrelazada con la hemicelulosa por medio de puentes de hidrógeno, fuerzas van der Waals y grupos acetilo formando una estructura en red. La lignina se encuentra recubriendo a la red de celulosa y hemicelulosa (Wyman *et al.*, 2005; Cuervo *et al.*, 2009).

Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero ramificado complejo y heterogéneo conformado por azúcares de cinco carbonos (arabinosa, xilosa) y azúcares de seis carbonos (glucosa, manosa, galactosa) además de ácido glucurónico (Sánchez *et al.*, 2010). La hemicelulosa se clasifica generalmente de acuerdo con el residuo de azúcar que compone a la cadena como los xilanos, mananos y glucomananos, siendo los xilanos los que más prevalecen en la hemicelulosa de la pared de la célula vegetal de las plantas, estos se encuentran unidos por enlaces glucosídicos β -1,4, su grado de polimerización es menor que el de la celulosa, por lo tanto es más fácil degradar su estructura (Wyman *et al.*, 2005; Cuervo *et al.*, 2009).

Lignina

La lignina es un heteropolímero aromático de estructura tridimensional y amorfa, muy ramificada y compleja que consta de tres diferentes unidades de fenil-propano las cuales son p-coumaril, coniferil y sinapil alcohol (Sánchez *et al.* 2010). La lignina recubre a la celulosa y hemicelulosa, provee de soporte mecánico a la holocelulosa y actúa en la defensa natural de la planta en contra de la degradación enzimática impidiendo la entrada de enzimas a través de la pared celular (Sjöström, 1993).

La conversión de la plataforma de celulosa a etanol es más compleja frente a las plataformas de almidón y azúcar ya que involucra un paso adicional en el proceso, que se conoce como pretratamiento (Cheng, 2010).

La principal desventaja que presenta la plataforma de materiales celulósicos es el elevado costo de los procesos de producción de bioetanol. Sin embargo, el avance de la tecnología podría reducir los costos de producción, además la gran abundancia de dichos materiales permiten que esta plataforma pueda ser aprovechada en la producción de etanol combustible (Cheng, 2010).

3.3. PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA

GENERACIÓN

La producción de bioetanol de segunda generación comprende cuatro procesos, los cuales son: pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y purificación.

3.3.1 PRETRATAMIENTO DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

El pretratamiento permite separar a los tres componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina (Juri, 2011) (Anexo 4) modificando la estructura cristalina de la celulosa que consiste en el aumento de regiones amorfas (Anderson, Martínez y Valencia, 2009). Además aumenta la capacidad de absorción de solventes, modificando la estructura de los poros en el material para permitir la entrada de las enzimas y facilitar la posterior hidrólisis enzimática (Sánchez, *et al.* 2010).

Los pretratamientos se pueden dividir en cuatro grupos principales lo cuales corresponden a:

- Pretratamientos físicos.
 - Trituración mecánica, pirolisis e irradiación
- Pretratamientos físico-químicos.
 - Explosión de vapor
 - Explosión de fibras con amonio (AFEX)
 - Explosiones con CO₂ y SO₂
- Pretratamientos químicos
 - Ozonólisis
 - Hidrólisis ácida
 - Hidrólisis alcalina
- Pretratamientos biológicos.
 - Uso de hongos (Cortínez, 2010).

Los pretratamientos deben cumplir con las siguientes condiciones:

- Contribuir en la liberación de azúcares.

- Evitar la degradación y pérdida de carbohidratos.
- Evitar la formación de inhibidores de fermentación.
- Ser rentables (Cheng, 2010).

Sin embargo, no todos los pretratamientos han sido lo suficientemente desarrollados como para ser aplicados técnica o económicamente en procesos a mayor escala, por lo que se ha visto necesario utilizar un pretratamiento combinado que permita incrementar la eficiencia de otros pretratamientos (Mosier *et al.*, 2005; Taherzadeh y Karimi, 2007).

3.3.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática permite la obtención de monosacáridos a partir de polisacáridos, mediante el uso de enzimas, las cuales son catalizadores altamente específicos y producen la ruptura de enlaces por agua. Este proceso requiere de condiciones como temperatura y pH adecuados.

El proceso de hidrólisis enzimática empieza con el ingreso de varios de tipos de enzimas como celulasas que ingresan a través de los poros que se encuentran en la superficies de la fibra vegetal, posteriormente las enzimas atacan a la cadena de celulosa, liberando una gama de oligosacáridos y azúcares simples que pueden ser fermentados (Leustean, 2009).

La transformación de celulosa a glucosa se da por medio de la acción sinérgica de tres diferentes tipos de enzimas, las cuales son: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, denominadas en conjunto enzimas celulasas (Taherzadeh y Karimi, 2007).

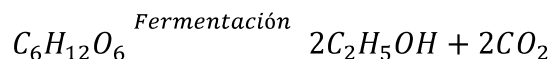
Las endoglucanasas atacan regiones de baja cristalinidad de la cadena de celulosa y rompen los enlaces glucosídicos para producir oligosacáridos, generando así extremos libres en la cadena de celulosa (Sánchez *et al.*, 2010). Las exoglucanasas atacan gradualmente a las moléculas de celulosa de los terminales no reductores de la cadena, liberando subunidades de celobiosa. Y finalmente las β -glucosidasas o celobiasas hidrolizan celobiosa en glucosa (Anexo 5) (Cheng, 2010; Sánchez *et al.*, 2010).

Además de estos tres grupos principales de enzimas también existen enzimas hemicelulasas que atacan a la hemicelulosa, se menciona algunas como las glucuronidasas, xilanasas y glucomanasas (Juri, 2011).

3.3.3. FERMENTACIÓN

El proceso de fermentación alcohólica puede ser llevado a cabo mediante bacterias y levaduras (Cheng, 2010). La fermentación por levaduras sigue la ruta metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), en dicha ruta, la glucosa ingresa en las células de la levadura y es transformada por medio de varias reacciones enzimáticas, en un compuesto llamado piruvato, dependiendo de la reacción enzimática dicho compuesto es convertido en diferentes productos como etanol, ácido láctico y ácidos carboxílicos. Sin embargo, las células de levadura normalmente convierten el piruvato en etanol por medio de un compuesto intermediario llamado acetaldehído que se forma en la ruta (EMP) bajo condiciones anaeróbicas (Berg, Tymoczko y Stryer, 2009).

La reacción que se produce en la fermentación por medio de levaduras, que convierten glucosa en etanol y CO_2 se expresa en la siguiente ecuación:



Las burbujas de CO₂ contribuyen con la homogenización de la concentración de etanol que se encuentra alrededor de las células de levadura en el caldo de fermentación, lo que evita que el alcohol se concentre en grandes cantidades ya que podría ser tóxico para las levaduras (Cheng, 2010).

La levadura más utilizada es *Saccharomyces cerevisiae*, especie muy conocida por sus aplicaciones en el campo de la industria de alimentos, ya que participa en la elaboración de bebidas alcohólicas y pan (Carvajal *et al.*, 2010). Dicha especie es utilizada debido a que posee una gran tolerancia a altas concentraciones de etanol y utiliza azúcares fermentables de seis carbonos como la glucosa. Por lo tanto, la biomasa lignocelulósica que contenga altos niveles de glucosa tendrá mejor rendimiento con respecto a la producción de bioetanol, dependiendo del pretratamiento físico químico previo y de la hidrólisis enzimática que se hayan utilizado en el procedimiento (Taherzadeh y Karimi 2007; Juri, 2011).

3.3.4 PURIFICACIÓN DE BIOETANOL COMBUSTIBLE

Al finalizar el proceso de fermentación, se requiere extraer el etanol del caldo de fermentación para lo cual se realiza dos procesos de separación, primero una destilación y posteriormente una deshidratación (Cheng, 2010).

La destilación es un proceso de separación por diferencias en los puntos de ebullición de los componentes de una solución, cuando estos componentes son sometidos al calor, los compuestos más volátiles como el alcohol se evaporan y se concentran en una fase de vapor, que posteriormente al enfriarse se convierte en líquido (Cheng, 2010).

En la obtención de bioetanol luego de la destilación el resultado es una mezcla de agua-etanol, esto quiere decir que se obtiene un etanol con una pureza entre el 90 % y 95 % (Cheng, 2010). Es por esta razón que se necesita de un proceso de deshidratación, que retire el agua y permita conseguir un alcohol anhidro.

Existen diferentes tipos de tecnología para producir alcohol anhidro, una de las más utilizadas es el tamizaje molecular. Los tamices moleculares son materiales sintéticos que tienen microporos uniformes que pueden absorber las moléculas de agua, mientras que las moléculas de etanol se encuentran fuera de los microporos separando así el alcohol del agua (Cheng, 2010). Posteriormente al proceso de deshidratación el bioetanol tiene una pureza aproximada del 99 %, de esta manera se cumple con las especificaciones para su uso como combustible. El bioetanol anhidro se condensa y enfría para ser almacenado (Cheng, 2010; Balat, 2011).

3.4. ESTRATEGIAS PARA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN

Para maximizar la eficiencia de producción de bioetanol se ha utilizado técnicas que permiten los procesos de hidrólisis y fermentación de forma concomitante, a continuación se describen las estrategias principales que se utilizan.

3.4.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN SEPARADAS (SHF)

Este proceso se lo conoce también como fermentación en batch o por lotes en el que, los materiales celulósicos pretratados son hidrolizados a glucosa por medio de enzimas y subsecuentemente fermentados en etanol por medio de levaduras en biorreactores separados. La principal ventaja que presenta el método, consiste en llevar a cabo las operaciones de hidrólisis y fermentación en condiciones óptimas de temperatura para cada proceso (50 °C - 55 °C para hidrólisis y 20 °C - 35 °C para fermentación) (Tahezadeh y Karimi, 2007).

En contraste, este método presenta varias desventajas en las que se menciona a la inhibición de enzimas por los azúcares liberados (celobiosa y glucosa). Se ha reportado que en una concentración de celobiosa de 6 g/L, la actividad de esta enzima se reduce en un 60 %. La glucosa es un fuerte inhibidor de la enzima β -glucosidasa, a una concentración de 3 g/L, haciendo que la actividad de esta enzima se reduzca a un 75 %. Otra desventaja que presenta este proceso, es la contaminación de la solución de azúcar por medio de bacterias debido al tiempo de fermentación que dura tres días (Tahezadeh y Karimi 2007).

3.4.2. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF)

En la SSF por sus siglas en inglés, la glucosa es transformada a etanol rápidamente lo que produce una minimización de los efectos de inhibición de la glucosa hacia las enzimas que actúan en este proceso. Este método mantiene una baja concentración de los azúcares en el medio, lo que hace que el rendimiento de etanol aumente y en consecuencia exista una mayor disponibilidad de sustrato para la fermentación, además la continua presencia de etanol

disminuye el riesgo de contaminación por bacterias (Ballesteros, Oliva, Manzanares y Ballesteros, 2004; Taherzadeh y Karimi 2007).

Un factor importante que se debe tomar en cuenta en este método es el establecer condiciones adecuadas para el proceso, tales como encontrar un compromiso en el cual la temperatura permita la actividad enzimática así como la fermentación debido a que ambos procesos ocurren en un mismo reactor a diferencia de la SHF (Taherzadeh y Karimi 2007; Balat, 2008).

3.4.3 SACARIFICACIÓN Y COFERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSFC)

En este método el término de cofermentación se refiere a la fermentación alcohólica de azúcares de cinco y seis carbonos que provienen de la fracción de hemicelulosa y celulosa debido a que dichas fracciones no son separadas luego del pretratamiento. En este proceso se utiliza un solo biorreactor, en el que se fermentan con un solo tipo de microorganismo las hexosas y pentosas respectivamente (Taherzadeh y Karimi 2007).

3.5. JUSTIFICACIÓN

A partir del año 2010 en el Ecuador se impulsó una nueva matriz energética que establece la adición de 5 % v/v de etanol en la gasolina regular para ser utilizada en vehículos en la ciudad de Guayaquil. El requerimiento de etanol combustible al 2010 fue de 32'187, 9 galones; no obstante, la producción de etanol alcanzada fue de sólo 1'195, 4. Esto es solo el 3,7 % de las necesidades a nivel nacional, lo que demuestra que existe una gran demanda insatisfecha de etanol combustible que corresponde al 96,3 % de déficit (Carvajal *et al.*, 2013).

Para suplir el déficit de etanol se han realizado varios estudios para la obtención de etanol carburante, entre ellos se destaca el proyecto RESETA (Recursos Sustentables para Etanol) cuyo objetivo principal es la utilización de productos que no atenten contra la seguridad alimentaria, ya que no se utilizan cultivos destinados a la alimentación humana sino desechos agrícolas, que permiten una reutilización de los materiales orgánicos lo que impide la ampliación de la frontera agrícola, que en última instancia podría contribuir a la devastación de grandes zonas naturales (Carvajal *et al.*, 2013).

De esta manera, en el Centro Neotropical para Investigación de la Biomasa (CNIB), se han realizado varios estudios e investigaciones que han podido determinar que el raquis de palma, el raquis de banano y el bagazo de caña son los desechos agrícolas con mayor abundancia y potencial uso para etanol de segunda generación en Ecuador. Este tipo de desechos lignocelulósicos posee una importante cantidad de celulosa, que puede ser aprovechada en la producción de bioetanol de segunda generación (Carvajal *et al.*, 2013).

Para la presente disertación se eligió trabajar con el desecho de palma africana, en este caso su raquis. Este desecho produce al año 2'071,9 toneladas en peso seco, posee una importante cantidad de celulosa, alrededor de 828,7 toneladas. La celulosa podría producir un rendimiento de bioetanol en teoría de 157'457,7 millones de galones al año, cantidad que sería suficiente para cubrir el 22 % de la demanda de combustible en el parque automotor que el país podría necesitar (Anexo 6) (Carvajal *et al.*, 2013). Además el raquis de palma posee mayores ventajas que el resto de los desechos lignocelulósicos, tomando en cuenta parámetros como ambiente, accesibilidad, disponibilidad y abundancia (Anexo 7) (Carvajal *et al.*, 2013).

En resumen, la posibilidad de desarrollar los procesos de pretratamiento y sacarificación anteriormente señalados, permitiría obtener nuevos resultados en cuanto al rendimiento de etanol lignocelulósico de palma africana que sirvan para estudios futuros y contribuyan al desarrollo biotecnológico en el Ecuador.

3.6. OBJETIVOS

General:

Realizar el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) de raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) pretratado con ácido y álcali para la producción de bioetanol de segunda generación.

Específicos:

1. Determinar las condiciones óptimas del pretratamiento físico-químico sobre el raquis de palma africana.
2. Determinar el rendimiento de la hidrólisis enzimática a partir del desecho de palma.
3. Determinar el rendimiento de etanol a partir del desecho de palma africana.
4. Obtener una concentración de etanol igual o superior al 5 % p/v por medio de la técnica de SSF.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIA PRIMA

En el proceso de producción de etanol lignocelulósico se utilizó raquis de palma africana. El raquis fue proporcionado al Centro Neotropical para la Investigación de la Biomasa (CNIB) por medio de la colaboración de la Asociación de Cultivadores de Palma Aceitera (ANCUPA).

4.2. PRETRATAMIENTO FÍSICO

Es necesario un pretratamiento físico de la materia prima antes de los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación. Para reducir el tamaño de las fibras de los materiales lignocelulósicos, se utiliza procesos mecánicos como corte, trituración, molienda y tamizado (Galbe y Zacchi, 2007).

El raquis de palma se cortó en una guillotina Krause y se redujo el tamaño de las fibras a 20-30 cm de largo, posteriormente las fibras se pulverizaron en un molino de platos WEG hasta obtener un tamaño de 2-3 mm de largo. El producto de la molienda se pasó por un tamiz Rotap-II DS y se obtuvo partículas de menos de 100 μm de tamaño (Granda, 2011).

4.3. PRETRATAMIENTO QUÍMICO

4.3.1. PRETRATAMIENTO ÁCIDO Y ALCALINO

Para el pretratamiento ácido, en un reactor Parr Instruments modelo 4331 de capacidad 300 mL, se adicionó 100 ml de un solución de pretratamiento que consistió de 10 % p/v de sólidos de raquis de palma africana obtenido en el apartado 4.2 y ácido sulfúrico al 1 % p/v (Panreac™ Sulfuric acid). En el pretratamiento alcalino se utilizó hidróxido de sodio (Panreac™ Sodium hydroxide) al 1% p/v. En ambos pretratamientos se ensayaron diferentes condiciones de operación las cuales fueron temperaturas de 160 °C y 170 °C y tiempos de reacción de 10, 20, 30 minutos respectivamente para cada temperatura. El producto de la solución de pretratamiento se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. Consecutivamente, en un proceso de lavado de biomasa y centrifugación, el pellet obtenido de la primera centrifugación se lavó 5 veces con agua destilada en una centrífuga Sorvall® RC 6 y posteriormente se secó en una estufa a 100 °C por 24 horas.

4.4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

En frascos de vidrio de capacidad 100 mL, se colocó una solución de hidrólisis que estuvo conformada por 5 g raquis de palma pretratado al 15 % p/v de sólidos, 1,8 mL de un coctel de enzimas (Biomass Kit de Novozymes®) compuesto de celulasa (NS50013 Cellulase complex), β -glucosidasa (NS50010 β -glucosidase), endoxilanas (NS50030 Xylanase), y tampón citrato de sodio 5M pH 4,8 hasta alcanzar un volumen de 40 mL. Los frascos se incubaron en un agitador mecánico Labnet 311 DS a 300 rpm, por 72 horas, a 55 °C. Posterior a las 72 horas, las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante o

mosto se analizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) Agilent technologies, series 1200 para determinar la concentración glucosa (azúcar fermentable).

Con los datos obtenidos por HPLC, se pudo determinar la concentración de sacáridos totales y glucosa. Se obtuvieron dos datos importantes, el dato de la concentración y el dato del rendimiento, partir del dato de la concentración se calculó rendimiento aplicando la ecuación 1, los datos obtenidos se realizaron por triplicado.

Ecuación 1: Rendimiento de azúcares (%)

$$\text{Rendimiento de azúcares (\%)} = \frac{\text{g de biomasa final consumida}}{\text{g de biomasa inicial añadida}} \times 100$$

4.5. FERMENTACIÓN

El proceso de fermentación del mosto obtenido del pretratamiento físico-químico y la hidrólisis enzimática se realizó con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa CLQCA- INT-005 la misma que fue previamente probada y presentó un mayor rendimiento de etanol en trabajos anteriores (Granda, 2011). Dicha cepa fue previamente aclimatada con proporciones de YPD (Yeast Peptone Dextrose) y mosto (1:0; 0,75:0,25; 0,50:0,50; 0,25:0,75; 0:1). Las condiciones en las que se realizó la aclimatación fueron temperatura de 25 °C y tiempo de 4 días.

La biomasa de levadura obtenida fue lavada con agua destilada y centrifugada a 5000 rpm por 3 minutos en una centrifuga Dynac 297 C antes de ser inoculada en el mosto obtenido

de la hidrólisis enzimática (Granda, 2011). El mosto fue enriquecido con una fuente de nitrógeno (peptona al 1 % p/v y extracto de levadura al 2 % p/v).

Posteriormente se inició el proceso de fermentación bajo condiciones de 300 rpm, 35 °C por un periodo de 72 horas en agitación continua. Al cabo de 72 horas se evaluó, por medio de HPLC, la concentración de etanol (producto de fermentación) y glucosa residual. Con los datos obtenidos se calculó el rendimiento de la fermentación alcohólica en dos pasos, primero se calculó el valor real de etanol utilizando los datos de glucosa (g/L) y etanol (g/L) aplicando la ecuación 2. Seguidamente se calculó el rendimiento con los datos del valor real de etanol y el valor teórico por medio de la ecuación 3.

Ecuación 2: Valor real de etanol

$$\text{Valor real de etanol} = \frac{\text{g/L de etanol}}{\text{g/L de glucosa}}$$

Ecuación 3: Rendimiento de etanol (%)

$$\text{Rendimiento de etanol \%} = \frac{\text{Valor real de etanol}}{\text{Valor teórico}} \times 100$$

4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el diseño experimental de los **pretratamiento** Ácido y Alcalino se tomaron en cuenta las condiciones de: tiempo 10, 20, 30 minutos y **temperatura**: 160 °C y 170 °C, se elaboraron 12 ensayos los cuales se detallan en la Tabla 1.

Para cada ensayo se realizaron 3 repeticiones con la finalidad de realizar los análisis de la prueba estadística de T de student y la aplicación de barras de error en las cuales se analizó el promedio y la desviación estándar.

La desviación estándar se calculó aplicando la ecuación 4 como se describe continuación:

Ecuación 4: Cálculo de la desviación estándar

$$s|D = \sqrt{\frac{\sum (X - M)^2}{n - 1}}$$

En donde: X = puntos individuales de los datos; M = media; Σ = sumatoria de las diferencias al cuadrado entre cada repetición y la media; y n = todos los datos (Cumming, Fidler y Vaux, 2007).

Para determinar si existieron diferencias significativas entre los pretratamientos utilizados (ácido y alcalino) se utilizó el análisis de la prueba de T de student en el cual se analizó las concentraciones de sacáridos totales, glucosa y etanol como variable dependiente mientras que el tipo de pretratamiento correspondió a la variable independiente. Los gráficos

de las barras de error, los cálculos de la media y el análisis de la prueba de T para las tres repeticiones de cada ensayo fueron realizados con el programa Microsoft Excel 2007.

El análisis de barras de error, desviación estándar y prueba de T de student se aplicó en los datos obtenidos por medio de HPLC en los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación en los cuales se utilizó el promedio de las 3 repeticiones para cada uno de los 12 ensayos. En la hidrólisis enzimática se analizó las concentraciones de sacáridos totales y glucosa, los sacáridos totales se determinaron por medio de la suma de las concentraciones de glucosa, xilosa, celobiosa, celotriosa y celodextrina. En el proceso de fermentación se analizaron las concentraciones de etanol. Para la SSF solo se aplicó el análisis de barras de error y desviación estándar.

4.7. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF)

Con los datos obtenidos de los ensayos en los que se utilizó los pretratamientos ácido y alcalino que fueron posteriormente sometidos a hidrólisis enzimática y fermentación, se seleccionó el ensayo con el que se obtuvo la mayor concentración de sacáridos totales y el mejor rendimiento de etanol. Con este dato se preparó biomasa pretratada para el proceso de SSF.

4.7.1. OBTENCIÓN DEL PRODUCTO DE PREHIDRÓLISIS

Un obstáculo que se presenta en el proceso de SSF es la consistencia de la biomasa en el momento de la hidrólisis enzimática, para superar esta desventaja se sometió a la biomasa a

una prehidrólisis con enzimas lo que permitió elevar la cantidad de sólidos iniciales de 15 % p/v al 25 % p/v de sólidos.

El producto de prehidrólisis que consistió de biomasa de raquis al 15 % p/v fue digerido con las enzimas del apartado 4.4 y tampón citrato de sodio 0,5 M pH 4,8, bajo las siguientes condiciones: 6 horas a 55 °C y 300 rpm, en agitación continua. Posteriormente agregó biomasa seca sin predigerir al 10 % de sólidos p/v.

4.7.2. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF)

En un biorreactor New Brunswick Technologies Bioflo[®]/Celligen[®] 310 de capacidad de 2 L se añadió el inóculo de levadura aclimatada obtenida en el apartado 4.5 y 1 L del producto de prehidrólisis de raquis de palma que se obtuvo en el apartado 4.7.1. Cada 24 horas por un periodo de 10 días, se añadió 100 mL de biomasa prehidrolizada al 25 % p/v de sólidos hasta completar el volumen final de 2 L en el biorreactor (Figura 1). Las condiciones de operación en el biorreactor fueron de 35 °C y 300 rpm en agitación continua. Durante los 10 días se determinó la concentración de los productos de fermentación y glucosa residual por HPLC.

4.8. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA-

HPLC

La concentración de los sacáridos como glucosa, xilosa, celobiosa, celotriosa, celodextrina y productos de fermentación como etanol, glicerol, que fueron obtenidos a partir de los procesos de pretratamiento físico-químico, hidrólisis enzimática, fermentación y SSF

del raquis de palma africana, se determinaron con un cromatógrafo líquido de alta eficiencia Agilent Technologies series 1200, equipado con una columna de resina de intercambio iónico Rezex ROA Organic acid H+.

Las condiciones de operación en el cromatógrafo fueron las siguientes: fase móvil utilizada que estuvo compuesta de agua grado HPLC o tipo 1 y H_2SO_4 0,005 N que se obtuvo por medio de filtración al vacío con un filtro Millipore de 0,45 μm ; velocidad de flujo 0,6 mL/min; temperatura de la columna y detector 79 °C; volumen de inyección de la muestra 10 μL ; tiempo de corrida 28 minutos y factor de dilución 1:100.

5. RESULTADOS

5.1. PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Para determinar el rendimiento (%) de sacáridos totales obtenidos después de los procesos de pretratamiento físico-químico (ácido y alcalino) e hidrólisis enzimática, se utilizó la fórmula descrita en el apartado 4.4. Se observó que con el ensayo 8 (alcalino, 160 °C y 20 minutos) se obtuvo el 94 % de sacáridos totales, lo cual se evidenció como el mayor rendimiento. En contraste con el ensayo 6 (ácido, 170 °C y 30 minutos) fue con el que se obtuvo el menor rendimiento que correspondió al 26 % de sacáridos totales (Tabla 2 y Figura 2).

En la Figura 3 se muestran los resultados de los análisis de HPLC, correspondientes a las concentraciones (g/L) de glucosa, xilosa, celobiosa, celotriosa y celodextrina obtenidos luego de los procesos de pretratamiento físico químico e hidrólisis enzimática de raquis de palma. Los datos evidencian que los ensayos 7, 8, 9, 10, 11 y 12, en los que se utilizó el pretratamiento alcalino (NaOH al 1 % p/v), se obtuvo una mayor concentración de sacáridos totales en el rango de 115,9 g/L y 134,1 g/L. En contraste, para los ensayos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 en los cuales se utilizó el pretratamiento ácido (H₂SO₄ al 1 % p/v), se obtuvo una menor concentración luego de la hidrólisis enzimática en el rango de 37,5 g/L y 52,6 g/L (Figura 3).

Al analizar estos datos por medio de la prueba de T ($T = -22,92$; grados de libertad = 9) con respecto a la concentración de sacáridos totales se demuestra que existen diferencias altamente significativas de los ensayos ácidos con respecto a los ensayos alcalinos mostrando un valor de significación de 0,000.

Los datos evidencian que con el ensayo número 8 (alcalino, 160 °C y 20 minutos) se obtuvo la mayor concentración de sacáridos totales 134,1 g/L, lo cual corresponde a la suma de glucosa, xilosa, celobiosa, celotriosa y celodextrina con concentraciones de 66,3 g/L; 23,6 g/L; 19,5 g/L; 2,9 g/L y 21,8 g/L respectivamente (Tabla 3).

Por el contrario, con el ensayo número 6 (ácido, 170 °C y 30 minutos) se obtuvo la menor concentración de sacáridos totales 37,5 g/L lo cual corresponde a la suma de glucosa, xilosa, celobiosa celotriosa y celodextrina con concentraciones de 34,8 g/L; 0,5 g/L; 0 g/L; 1,0 g/L y 1,1 g/L respectivamente (Tabla 3).

La concentración de glucosa obtenida por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido y álcali se observa en la Figura 4 en la cual los ensayos se encuentran de manera ascendente con respecto a la concentración obtenida. El ensayo con el que se obtuvo la mayor concentración de glucosa después de la digestión enzimática fue el número 7 (alcalino, 160 °C y 10 minutos) con 69,2 g/L. Por el contrario el ensayo con el que se evidenció la menor concentración de glucosa fue el número 6 (ácido, 160 °C y 10 minutos) con 34,8 g/L.

Los resultados de la prueba de T ($T = -11,042$; grados de libertad= 6) con respecto a la concentración de glucosa, demuestra que existen diferencias altamente significativas entre los ensayos ácidos con relación a los ensayos alcalinos, presentando un valor de significación de 0,000.

Para el análisis de las barras de error de sacáridos totales y glucosa, se utilizó los datos de la desviación estándar y el valor de la media de las 3 repeticiones de los 12 ensayos (Anexos 8 y 9), mediante este análisis se evidenció una diferencia significativa entre los ensayos ácidos con respecto a los ensayos alcalinos, datos que corroboran los resultados de la

prueba de T de student. Sin embargo no se evidenció diferencias significativas entre los ensayos individualmente (Figura 3).

Se eligió al ensayo 8 (alcalino; 160 °C y tiempo de 20 minutos), del cual se obtuvo 134.1 g/L de sacáridos totales con el cual se preparó biomasa pretratada para el proceso de SSF.

Con relación a la obtención de xilosa, en los ensayos 7, 8, 9, 10,11 y 12 que fueron pretratados con álcali se evidenció, que las concentraciones de este azúcar se encuentran en el rango de 21,7 g/L y 27,8 g/L, además la concentración promedio fue de 24,0 g/L. Por el contrario para los ensayos 1, 2, 3, 4, 5 y 6, que fueron pretratados con ácido, la concentración de xilosa osciló en un rango de 0,5 g/L y 1,2 g /L, la concentración promedio obtenida fue de 0,8 g/L, estos datos evidencian que se obtuvo una mayor concentración de xilosa con los ensayos pretratados con álcali a diferencia de los ensayos pretratados con ácido (Tabla 4).

5.2. FERMENTACIÓN

En la Figura 5, se evidencia la concentración de etanol (g/L) obtenida por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido y álcali. El ensayo número 8 (alcalino, 160 °C y 20 minutos) con el cual se obtuvo 32,5 g/L de etanol evidenció la mayor concentración. En contraste, el ensayo 4 (ácido, 170 °C y 10 minutos) demuestra la menor concentración ya que obtuvo 14,0 g/L.

Los resultados de la prueba de T ($T = -7,65$; grados de libertad= 8) con respecto a la concentración de etanol, demuestran que existen diferencias altamente significativas entre los ensayos ácidos con relación a los ensayos alcalinos presentando un valor de significación de 0,001.

Para el análisis de las barras de error de etanol, se utilizó los datos de la desviación estándar y el valor de la media de las 3 repeticiones de los 12 ensayos (Anexo 10), mediante este análisis se evidenció una diferencia significativa entre todos los ensayos ácidos en relación a los ensayos alcalinos, datos que corroboran los resultados de la prueba de T de student. Sin embargo no se evidenció diferencias significativas entre los ensayos individualmente (Figura 5).

Al término de la fermentación (24 horas), para todos los ensayos no se evidenció glucosa residual como lo muestra la Tabla 5.

El rendimiento de etanol se calculó con las fórmulas número 2 y 3 descritas en el apartado 4.4. Se utilizó los datos de las concentraciones de glucosa y etanol que se detallan en la Tabla 6, determinando que el mejor valor real de etanol correspondió a 0,49 g de etanol/ g de glucosa obtenido con el ensayo 8 lo cual corresponde al 96 % del rendimiento teórico de etanol (Tabla 6).

5.3. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF)

La evolución de la concentración de los productos de fermentación (etanol, glicerol ácido acético y ácido láctico) azúcar fermentable (glucosa), oligosacáridos (celodextrina, celotriosa y celobiosa), obtenidos en el proceso de SSF se determinaron mediante HPLC. Los resultados se presentan en la Tablas 7 y 8.

Se evaluó por un periodo de diez días en el proceso de SSF, que la concentración de etanol fluctuó entre 51,8 g/L y 60,1 g/L, dando un promedio de 58, g/L (Figura 6). En la Tabla 7 se aprecia el valor promedio de 5,6 % p/v de etanol obtenido a lo largo de los 10 días que la SSF fue llevada a cabo dicho valor expresado en porcentaje v/v correspondió al 7,1 % de

etanol. En el quinto día se obtuvo la mayor concentración de etanol con 6,0 % p/v que correspondió a 7,6 % v/v.

Durante los días nueve y diez se detecta la presencia de una fluctuación en la concentración de ácido acético que osciló entre 0,2 y 0,4 g /L respectivamente, evidenciando un promedio de 0.1 g/L (Tabla 7).

El único oligosacárido que se encontró a lo largo de diez días fue la celobiosa con una concentración que estuvo dentro del rango de 12,6 y 20,02 g/L respectivamente, la concentración promedio fue de 17,1 g/L (Tabla 8).

A lo largo de diez días en el proceso de SSF se observó que la concentración de xilosa se mantuvo en un rango de 32,0 g/L y 64,0 g/L siendo la concentración promedio de 46,9 g/L. Además no se detectó la presencia de glucosa residual (Figura 7).

6. DISCUSIÓN

6.1. PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

En el proceso de pretratamiento físico-químico, las fracciones que componen a la biomasa lignocelulósica se descomponen en sus partes elementales, celulosa, hemicelulosa y lignina. La fracción celulósica y hemicelulósica fueron sometidas a hidrólisis enzimática generando azúcares fermentables y no fermentables (Cheng 2010).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio se pudo demostrar que el pretratamiento alcalino (NaOH al 1 % p/v) fue el más efectivo en cuanto a la obtención y rendimiento de sacáridos totales y azúcares fermentables para este tipo de desecho lignocelulósico, en contraste el pretratamiento ácido (H_2SO_4 al 1 % p/v) no fue el más adecuado debido a los menores rendimientos obtenidos como lo muestra la prueba de T evidenciando que existen diferencias altamente significativas entre ambos pretratamientos ensayados.

Con los resultados obtenidos en la presente investigación, en los cuales la media del rendimiento de sacáridos totales posterior al pretratamiento físico – químico e hidrólisis enzimática del desecho de palma africana, en los 6 ensayos alcalinos fue 2,8 veces mayor sobre la media que se obtuvo en los 6 ensayos ácidos. Al comparar a los ensayos 6 (ácido, 170 °C y 30 minutos) y 12 (alcalino, 170 °C y 30 minutos), en los que se analizó las mismas condiciones de temperatura y tiempo, con diferentes pretratamientos, se evidenció que el ensayo 12 obtuvo 3,2 veces más sacáridos totales por hidrólisis enzimática a diferencia del ensayo 6 (Tabla 9). Por lo tanto, estos resultados evidencian el mecanismo de acción a nivel

molecular del pretratamiento alcalino permitiendo la saponificación de los enlaces tipo éster que se encuentran interconectando a la hemicelulosa con la celulosa y la lignina.

De esta manera se incrementa la porosidad de los materiales lignocelulósicos y la fracción de lignina es removida en un 80 % aproximadamente (Sánchez *et al.* 2005; Balat 2008; Leustean 2009 y Cheng 2010). La remoción de lignina permite que las enzimas celulasas puedan ingresar y atacar a las regiones amorfas de la celulosa (Martínez, Balcázar, Dántan y Foch, 2008) degradando a los polisacáridos en oligosacáridos y azúcares fermentables (Cortínez, 2010). Esta información concuerda con los resultados de la concentración de sacáridos totales obtenida mediante el pretratamiento alcalino, que se encuentran en un rango de 115,9 y 134,1 g/L (Figura 3).

La efectividad del pretratamiento alcalino en este trabajo pudo depender del contenido de lignina que se encuentra en el material lignocelulósico que se pretrató, en este caso el raquis de palma. De acuerdo con Sánchez *et al.* (2005) el contenido de lignina no debería sobrepasar el 18 % de la composición total del desecho, debido a que la eficiencia de remoción de dicha fracción podría disminuir, lo que podría afectar al rendimiento de las enzimas utilizadas en el proceso de hidrólisis enzimática. En el presente estudio no se realizó un análisis de lignina, pero en un trabajo realizado por Misson, Haron, Kahmadkamaroddin y Amin (2009) se determinó que el raquis de palma tiene un 18,1 % de lignina en su conformación (Anexo 11). La presente investigación se enfocó en la producción de alcohol pero se sugiere que para futuros estudios se realice un experimento de cuantificación de lignina.

El hidróxido de sodio (NaOH) empleado en el pretratamiento físico – químico de palma fue el agente químico adecuado para la remoción de lignina debido a que en un estudio de caracterización, realizado por Misson *et al.* (2009) en raquis de palma africana, se demostró que el hidróxido de Sodio (NaOH) removió un mayor porcentaje, alrededor del 65 % de lignina en comparación con el hidróxido de Calcio (CaOH)₂ el cual se removió solo 9%.

El mecanismo del pretratamiento ácido rompe los enlaces de hidrógeno entre la celulosa y hemicelulosa liberándose la hemicelulosa, y en menor grado la celulosa (40 % - 60 %). (Taherzadeh y Karimi, 2007); Sánchez *et al.*, 2010), además remueve una menor cantidad de lignina (Sánchez *et al.* 2010) se evidencia con el rendimiento de la media de glucosa de todos los ensayos pretratados con ácido que fue menor con respecto a los ensayos pretratados con álcali, este rendimiento fue 1,7 veces mayor sobre el rendimiento obtenido con los ensayos ácidos. Se compararon los ensayos 7 (alcalino, 160 °C y 10 minutos) y 1 (ácido, 160 °C y 10 minutos), en los que se analizó las mismas condiciones de temperatura y tiempo, pero con diferentes pretratamientos, se evidenció que el ensayo 7 obtuvo 1,9 veces más glucosa por hidrólisis enzimática que el ensayo 1 (Tabla 10). Estos resultados evidencian una menor concentración de glucosa obtenida ya que tal vez las enzimas celulasas no tuvieron acceso a los polisacáridos para poder degradarlos en monómeros de glucosa, debido a que la lignina actúa como barrera y es por eso que se obtuvieron menores rendimientos.

El análisis con barras de error permite establecer rangos, y la desviación estándar indica como los datos están dispersos (Cumming *et al.*, 2007). No fue posible determinar una diferencia significativa entre los 6 ensayos alcalinos (Figura 3), sin embargo, se eligió al ensayo número 8 (alcalino, 160 °C y tiempo de 20 minutos) como el mejor en cuanto a la

obtención de sacáridos totales por hidrólisis enzimática, debido a que numéricamente representa el mayor valor de concentración con 134,1 g/L de etanol. Además se podría haber elegido a los ensayos número 9 y 11 debido a que los valores de concentración se acercan al valor obtenido con el ensayo número 8.

En este trabajo la obtención de glucosa fue muy importante debido a que es el azúcar a partir del cual se obtiene etanol por medio de microorganismos que pueden fermentar azúcares de seis carbonos (Taherzadeh y Karimi, 2007). El ensayo 6 (alcalino 160 °C y tiempo de 10 minutos) con 69,2 g/L de glucosa fue elegido ya que numéricamente representa al ensayo con la mayor concentración, sin embargo en la Figura 4 se observa que los ensayos número 8 y 11 se encuentran dentro del rango que establecen las barras de error, y podría haber seleccionado a estos ensayos también.

La fracción de hemicelulosa posee azúcares de cinco carbonos como xilosa, en este trabajo se utilizó los pretratamientos ácido y alcalino además de enzimas endoxilanasas que permitieron liberar a la xilosa que se encontraba en dicha fracción. El mecanismo del pretratamiento alcalino degrada alrededor del 60 % de hemicelulosa (Cortínez, 2010). Mientras que el pretratamiento ácido remueve alrededor del (80 % - 95 %) de esta fracción, lo antes mencionado concuerda con los resultados obtenidos ya que la concentración de xilosa, fue mayor en todos los ensayos con pretratamiento alcalino siendo su promedio 24,0 g/L que se obtuvo debido a que las enzimas endoxilanasas pudieron haber liberado xilosa de la fracción de hemicelulosa restante (40 %). En contraste los ensayos con pretratamiento ácido mostraron concentraciones menores del azúcar con un promedio de 0,8 g/L lo cual se podría deber a la pérdida de esta fracción durante el pretratamiento ácido lo cual se evidencia con la menor concentración obtenida (Tabla 4).

6.2. FERMENTACIÓN

Los materiales lignocelulósicos, que fueron sometidos al pretratamiento físico-químico e hidrólisis enzimática, pasaron a un proceso de fermentación, en este paso la concentración de azúcares fermentables liberados, fueron convertidos en etanol y CO₂ por levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Sánchez *et al*, 2010).

El uso de un pretratamiento adecuado, influye de manera directa en el proceso de fermentación, debido a que desorganiza la estructura cristalina de las fibras de celulosa y hemicelulosa por lo tanto las enzimas ingresan dentro de las fibras iniciando así el proceso de hidrólisis enzimática ya que se desea obtener la mayor cantidad de azúcares fermentables (Galbe y Zacchi, 2007; Cheng, 2010). Por lo que al comparar los dos tipos de pretratamiento químico utilizados en este estudio, se pudo notar que en todos los ensayos pretratados con NaOH al 1 % p/v fueron con los que se obtuvieron las mayores concentraciones de etanol. El ensayo que mayor concentración de etanol obtuvo después de la fermentación realizada por lotes fue el número 8 que corresponde a 4,1 % v/v (32,5 g/L) en contraste el ensayo con el que se obtuvo la menor concentración fue el número 4 en el cual utilizó H₂SO₄ al 1 % p/v que corresponde a 1,8 % v/v (14,0 g/L). La diferencia en la concentración de etanol con respecto al pretratamiento utilizado, se debió a la concentración de glucosa que fue producida a partir de la biomasa pretratada con álcali y sometida a una posterior hidrólisis enzimática, mientras que en el pretratamiento ácido se obtuvo una menor concentración de glucosa. Esto indica que la cantidad de etanol obtenida en fermentación es directamente proporcional con la cantidad de azúcar fermentable (Figuras 4 y 5).

Además la prueba de T de student revela que sí existieron diferencias altamente significativas entre el tipo de pretratamiento utilizado, lo cual provee de un soporte estadístico que demuestra que el pretratamiento alcalino utilizado en los ensayos superó al pretratamiento ácido en la obtención de etanol del proceso de fermentación por lo que se eligió al ensayo número 8 debido a que numéricamente presentó la mayor concentración de etanol, sin embargo se podría haber elegido también a los ensayos 9 y 11 debido a que los valores obtenidos de la concentración de etanol se acercan al valor del ensayo número 8.

La fermentación involucra microorganismos que utilizan azúcares de seis carbonos (glucosa) como fuente de carbono y lo convierten en alcohol, por lo que la biomasa que contenga un alto contenido de glucosa, sería la más fácil de convertir en alcohol, además de que se produciría un mayor rendimiento por peso seco de biomasa. El uso de la levadura *S. cerevisiae*, como microorganismo etanológico (que produce etanol) (Balat, 2008), permitió comprobar la importancia de su manejo en procesos de producción de bioetanol carburante, debido a las características que posee tales como la tolerancia a altas concentraciones de alcohol y su gran capacidad fermentativa Taherzadeh y Karimi (2007).

No se realizó un análisis de comparación de especies de levadura en este trabajo sin embargo un estudio realizado por Chayanoot y Sairudee (2013) en el que se utilizó biomasa de raquis de palma que fue sometido a un pretratamiento alcalino durante un proceso de fermentación por lotes, en el cual se partió de 30 g de biomasa seca de palma, la cual posterior a una hidrólisis enzimática obtuvo una concentración de glucosa de 33,45 g/L. Estos datos revelan que la especie de levadura *S. cerevisiae* utilizada en procesos de obtención de etanol celulósico es la adecuada, debido a que obtuvieron concentraciones de etanol en el rango de

6,2 g/L p/v y 8,4 g/L p/v, en contraste la otra especie de levadura ensayada *Saccharomycopsis fibuligera* cepa LOO-PANG con la que se obtuvo un rango que osciló entre los 0,05 g/L p/v y 0,2 g/L p/v. Los resultados de producción de etanol por etapas en este estudio para los ensayos que fueron pretratados con álcali, se ubicaron en un rango de 23,1 g/L p/v y 32,5 g/L p/v (Figura 5) lo cual podría demostrar la gran capacidad fermentativa de esta especie, como se mencionó en el trabajo de Chayanoot y Sairudee (2013) la especie que obtuvo mayor concentración fue *S. cerevisiae* lo que demuestra que el uso de esta especie fue la adecuada en el presente estudio.

Teóricamente el rendimiento máximo de etanol a partir de un gramo de glucosa es de 0,51 g de etanol y 0,49 g de CO₂ (Granda, 2011). En el presente estudio, los valores de rendimiento obtenidos en la fermentación con la especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa CLQCA- INT-005 se aproximaron al valor del rendimiento teórico siendo el valor obtenido mediante el ensayo número 8 con 0,49 g (Tabla 6). Los resultados de rendimiento de etanol obtenidos, fueron muy similares a un estudio realizado por Geng (2013) en el cual se utilizó raquis de palma africana que fue pretratado con NaOH al 1 % p/v que fue sometido a una posterior hidrólisis enzimática y aun proceso de fermentación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el rendimiento obtenido fue de 0,51g de etanol. Estos datos permiten determinar que el raquis de palma africana es un sustrato potencial para ser utilizado en la obtención de etanol celulósico.

6.3. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF)

Las estrategias utilizadas en el proceso de producción de bioetanol pueden combinar los pasos de hidrólisis enzimática y fermentación que tradicionalmente se realizan por etapas separadas, en un solo paso, lo que permite aumentar la producción de etanol.

La SSF produce una alta tasa de la hidrólisis debido a la rápida conversión de azúcares que podrían inhibir la actividad de las celulasas, produce mayor rendimiento y concentración de etanol (Tahezadeh y Karimi 2007; Barlet, 2011; Menon y Rao 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo permiten evidenciar una alta concentración de etanol luego de 24 horas (Figura 6). El porcentaje de etanol expresado en v/v obtenido osciló entre el 6,6 y 7,6 % v/v (Tabla 7). Barlet, (2011) reporta que para optimizar el proceso de obtención de etanol a escala industrial se debería sobrepasar el 5 % p/v que correspondería 6,33 % v/v. En este trabajo esta concentración se logró superar durante los 10 primeros días obteniéndose un promedio de 7,1 % en v/v (Tabla 7). Lo antes mencionado demuestra que el objetivo específico # 4 el cual fue: Obtener una concentración de etanol igual o superior al 5 % p/v por medio de la técnica de SSF fue cumplido a cabalidad en este trabajo.

Una de las ventajas que presenta esta técnica es el mantener una concentración de etanol por un determinado periodo de tiempo independientemente del volumen en el que se esté trabajando lo que permite utilizar un solo biorreactor y por ende reducir los costos de operación, en este trabajo se observa que a pesar de que existe un incremento del volumen de biomasa que fue añadida en el biorreactor por un periodo de 10 días, la concentración de etanol se mantiene (Tabla 7 y Figura 6).

La constante producción de bioetanol en el proceso de SSF, se observa desde el primer día con 6,6 % v/v (51,8 g/L) y el día 10 con 7,4 % v/v (58,2 g/L) (Tabla 7) (Figura 6), esta concentración obtenida podría deberse al porcentaje de biomasa inicial que fue añadida cada 24 horas durante los 10 días que duró el experimento el cual fue del 25 % de sólidos p/v. Para llegar a tener esta concentración fue necesario realizar una prehidrólisis que permitió aligerar la consistencia de la biomasa solubilizándola y permitiendo que se hidrolice más fácilmente.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en comparación con un estudio realizado por Zhao, Song y Liu, (2011) en el cual se utilizó bagazo de caña, se podría decir que existe una relación entre el porcentaje de sólidos agregados inicialmente y la producción de bioetanol, se reportó que al 5 % p/v de sólidos iniciales se obtenía una concentración de 15,5 g/L de etanol, mientras que cuando se elevó el porcentaje a 20 % p/v de sólidos iniciales la concentración de etanol también aumentó a 50,1 g/L en el mosto. Además, estudios realizados por Granda (2011) en bagazo de caña, en donde el porcentaje inicial de sólidos añadidos correspondió al 15 % p/v durante el proceso de SSF, la concentración obtenida de etanol fue menor con 29,8 g/L en comparación con el presente trabajo en el cual la concentración al 25 % p/v de sólidos iniciales obtenida fue de 51,9 g /L de etanol ,a pesar de utilizar el mismo procedimiento mas no el mismo sustrato , por lo que se pensaría que si se incrementa el porcentaje de sólidos desde el inicio del experimento las levaduras van a tener una mayor cantidad de sustrato que les va a permitir aumentar la concentración y obtención de etanol.

De acuerdo con Taherzadeh y Karimi (2007) en el proceso de SSF, la continua presencia de etanol en el mosto contribuye a mantener las poblaciones de bacterias acéticas y lácticas en menor cantidad que las poblaciones de levaduras, por lo que las concentraciones de los compuestos que evidencian contaminación (ácidos acético y láctico) no fueron detectados

a excepción del ácido acético que presentó una mínima concentración a partir de día 9 como se aprecia en la Tabla 7.

La evidencia de la degradación parcial de cadenas de celulosa por medio de enzimas se demostró con la concentración de celobiosa (dímero de glucosa) la cual presentó una concentración promedio de 17,1 g/L a lo largo de los 10 días de SSF. También, se observa la efectividad de las enzimas debido a que la acción conjunta de celulasas permitieron la degradación de polisacáridos creando extremos libres de cadena en la celulosa que fueron subsecuentemente descompuestos en oligosacáridos y dextrinas (Tahezadeh y Karimi, 2007; Cheng 2010), esto se evidencia debido a que no se obtuvo concentraciones de celodextrina y celotriosa, durante la SSF, por lo cual se cree que las enzimas degradaron a estos compuestos por lo que no fueron detectados (Tabla 8).

Se confirma la efectividad de fermentación por levaduras debido a que desde el día 1 hasta el día 10 que duró el proceso, la concentración de glucosa fue de 0 g/L lo que indica que mientras el microorganismo consumía la glucosa, producía a la vez etanol. Además debido que *S. cerevisiae* solo fermenta hexosas. Se pudo evidenciar una alta concentración de xilosa durante los 10 días que duró el proceso la cual fue obtenida de la fracción de hemicelulosa que fue degradada por medio de las enzimas endoxilanasas que fueron utilizadas durante la SSF, por lo que este azúcar se acumuló y no pudo ser fermentado como se evidencia en la Figura 7.

7. CONCLUSIONES

- En este estudio se pudo concluir que para el raquis de palma africana el mejor pretratamiento es el alcalino, con una concentración al 1 % de sólidos p/v de NaOH. El álcali ayuda a la remoción de lignina, por lo que para procesos a nivel industrial de producción de bioetanol, se recomienda utilizar este pretratamiento.
- La cepa CLQCA-INT-005 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en este estudio resultó ser efectiva en la producción de bioetanol de segunda generación ya que consumió glucosa y produjo etanol de manera rápida y eficiente. Esto se evidenció ya que los rendimientos obtenidos de etanol se acercaron al valor máximo teórico de 0,51 g demostrando la alta capacidad fermentativa del microorganismo.
- El proceso de SSF presenta ventajas frente a la SHF, se obtiene mayores concentraciones de etanol por medio de la acción continua de las levaduras, un ahorro en el tiempo de fermentación y en la utilización de enzimas.

7. RECOMENDACIONES

- Se sugiere conocer la estructura de la biomasa lignocelulósica del desecho con el que se desee trabajar, ya que de esa manera se puede elegir las condiciones óptimas que permitan un adecuado procedimiento que maximice la liberación de azúcares fermentables y la producción de etanol celulósico.
- Se sugiere utilizar levaduras que permitan fermentar azúcares de cinco carbonos como xilosa, lo que permitiría aumentar la producción de etanol.
- Se debe optimizar la técnica de extracción /adición de muestra durante la SSF para evitar contaminación bacteriana que reduce el rendimiento de etanol.
- Se puede aplicar la ingeniería genética mediante la inserción de genes que produzcan antibióticos, que eviten la proliferación de bacterias en el medio. Así como también genes involucrados en el metabolismo de la xilosa para su fermentación alcohólica.

8. LITERATURA CITADA

- Alarcón, E. 2010. *Producción de bioetanol con Zymomonas mobilis*. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional Unidad Profesional interdisciplinaria de Biotecnología, México D.F.
- Alonso, D., Wettstein, S., & Dumesic, J. 2012. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chem. Soc. Rev*, **41**: 8075-8098.
- Álvarez, C. 2009. Biocombustibles: desarrollo-histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional, *Revista Economía Informa*, **359**: 63-64.
- Anderson, F., Martínez, P., & Valencia, H. 2009. Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. *Scientia et Technica*, **42**: 284-286.
- Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway. *Energy Conversion and Management*, **52**: 858–875.
- Ballesteros, M., Oliva, J., Manzanares, P., & Ballesteros, I. 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, **39**: 1843-1848.

Barroso, M. 2010. *Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería*. Tesis de Ingeniería, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.

Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. 2007. Glicolisis and Gluconeogenesis. *Biochemistry* (Sixth edition, ed págs 433 – 434) USA. Library of Congress.

Chayannot, S., Sairudee, D. 2013. Fermentation of oil palm empty fruit bunch hydrolysate to ethanol by bakers' yeast and Loog-Pang. *Bioresource Technology*, **2**: 1-3.

Carvajal, J., Guamán, C., Portero, P., Salas, E., Tufiño, C., Bastidas, B. 2013. Second Generation Ethanol from Residual Biomass: Research and Perspectives in Ecuador, *Biomass Now - Sustainable Growth and Use*, Dr. Miodrag Darko Matovic (Ed.), ISBN: 978-953-51-1105-4, InTech, DOI: 10.5772/51951.

Carvajal, J., Libkind, D., Briones, A., Úbeda, J., Portero, P., Roberts, I., James, S., Morais, P., Rosa, C. 2010. Yeast biodiversity and its significance: Case studies in natural and human-related environments, *ex situ* preservation, applications and challenges. *Yeast a Newsletter for Persons Interested in Yeast*, Oscar Grillo and Gianfranco Venora (Ed.), ISBN 978-953-307-796-3.

- Cheng, J. 2010. Biological Process for Ethanol Production . En J. Cheng, *Biomass to Renewable Energy Processes* (págs. 209-272). CRC Press Taylor .
- Cortínez, A. 2010. *Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: Hidrolisis ácida y líquidos iónicos*. Tesis de Maestría, Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio-Tecnología*, **13**:11-20
- Cumming, G., Fidler, F., & Vaux, D. 2007. Error bars in experimental biology, *The Journal of Cell Biology*, **177**: 7-11.
- Galbe, M., & Zacchi, G. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Biochem Engin/Biotechnology*, **108**: 41-65
- Geng, A. 2013. Liquid, Gaseous and Solid Biofuels- Conversion Techniques. *Conversion of Oil Palm Empty Fruit Bunch to Biofuels*, 484-486.

- Granda, M.G. 2011. *Determinación de azúcares, productos de fermentación por HPLC en un proceso de obtención de etanol lignocelulósico*. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Hui, L., Nag, J., Min, J., Wong, J., & Chang, H. 2009. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production. *Bioresource technology*, **100**: 3245-3251.
- Juri, S. 2011. *Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: líquidos, iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca*. Tesis de Ingeniería, Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Leustean, I. 2009. Bioethanol from lignocellulosic materials. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, **15**: 94-101.
- Lin, Y., & Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Microbiology Biotechnology*, **69**: 627-642.
- Lynd, L. R., Cushman, J. H., Nichols, R. J., & Wyman, C. E. 2006. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science*, **251**: 1318-1323.

- Martínez, C., Balcázar, E., Dantán, E., & Foch, J. 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **50**: 119-131.
- Menon, V., & Rao, M. 2012. Trends in bioconversion of lignocelullose: Biofuels, platform chemical & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, **38**: 522-550.
- Misson, M., Haron, R., Ahmadkamaroddin, M., & Amin, N. 2009. Pretreatment of empty palm fruit bunch for lignin degradation. *Jurnal Teknologi*, **50**: 89-98
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y., Holtzappe, M., & Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **96**: 673-686.
- Rutz, D., & Janssen, R. 2008. Biofuel technology handbook. *Renewable Energies*, 40-56.
- Sánchez, R., Gutiérrez, A., Muñoz, A., & Rivera Barrero, C. 2010. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, **5**: 61-91.

- Sánchez, O. V., & Cardona, C. A. 2005. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, **30**: 671-678.
- Sauer, J., Sigurskjold, B., Christensen, U., Frandsen, T., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., Roesostor, P., & Svensson, B. 2000. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica*, **1543**: 275-293
- Sawin, J., Mastny, L., Hull, M., Hunt, S., MacEvitt, A., & Stair, P. 2006. The renewable path to energy security. *American Energy*, 21-33.
- Sjöström, E. 1993. Fundamentals and Applications of Wood Chemistry. En *Wood Chemistry* (Second edition ed., pág. 293). Academic Press.
- Sun, Y., Lu, L., Deng, H., Jiazhe L., Beihai, H., Runchang, S., & Pingkai. O. 2008. Structural changes of bamboo cellulose in formic acid. *Bio Resource Technology*, 3: 297-315.
- Sun, Y., & Cheng. J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, **83**: 1-11.

- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. 2007. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *Bioresources*, **4**: 472- 479.
- Takashi, E., & Sinichi, Y. 2006. Production of wood based ethanol for automobile fuel. *Biomass Energy*, **7**.
- Walters, C. 2006. The origin of Petroleum. En *Practical advances in petroleum processing* (págs. 79-82). USA: Springer Science_Business Media.
- Wyman, C., Decker, S., Himmel, M., Brady, J., Skopec, C., & Viikari, L. 2005. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. En *Polyssacharides* (págs. 995-1000). USA: Librar of Congress.
- Zhao, X., Song, Y., & Liu, D. 2011. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of alkali/peracetic acid-pretreated sugarcane bagasse for ethanol and 2, 3-butanediol production. *Enzyme and Microbial Technology*, **49**: 413-419.

9. FIGURAS

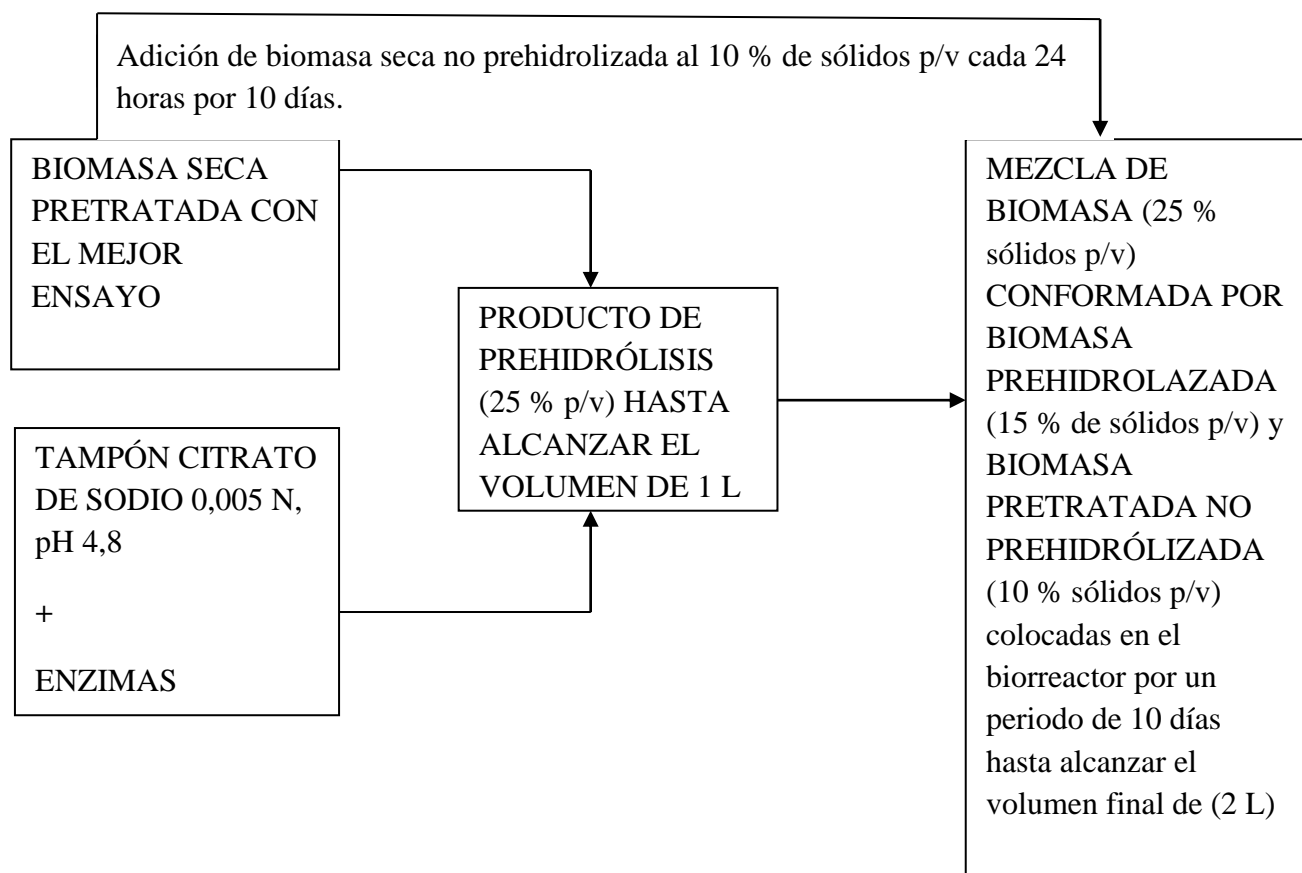


Figura 1 Esquema del proceso de Sacarificación y fermentación simultánea (SSF).

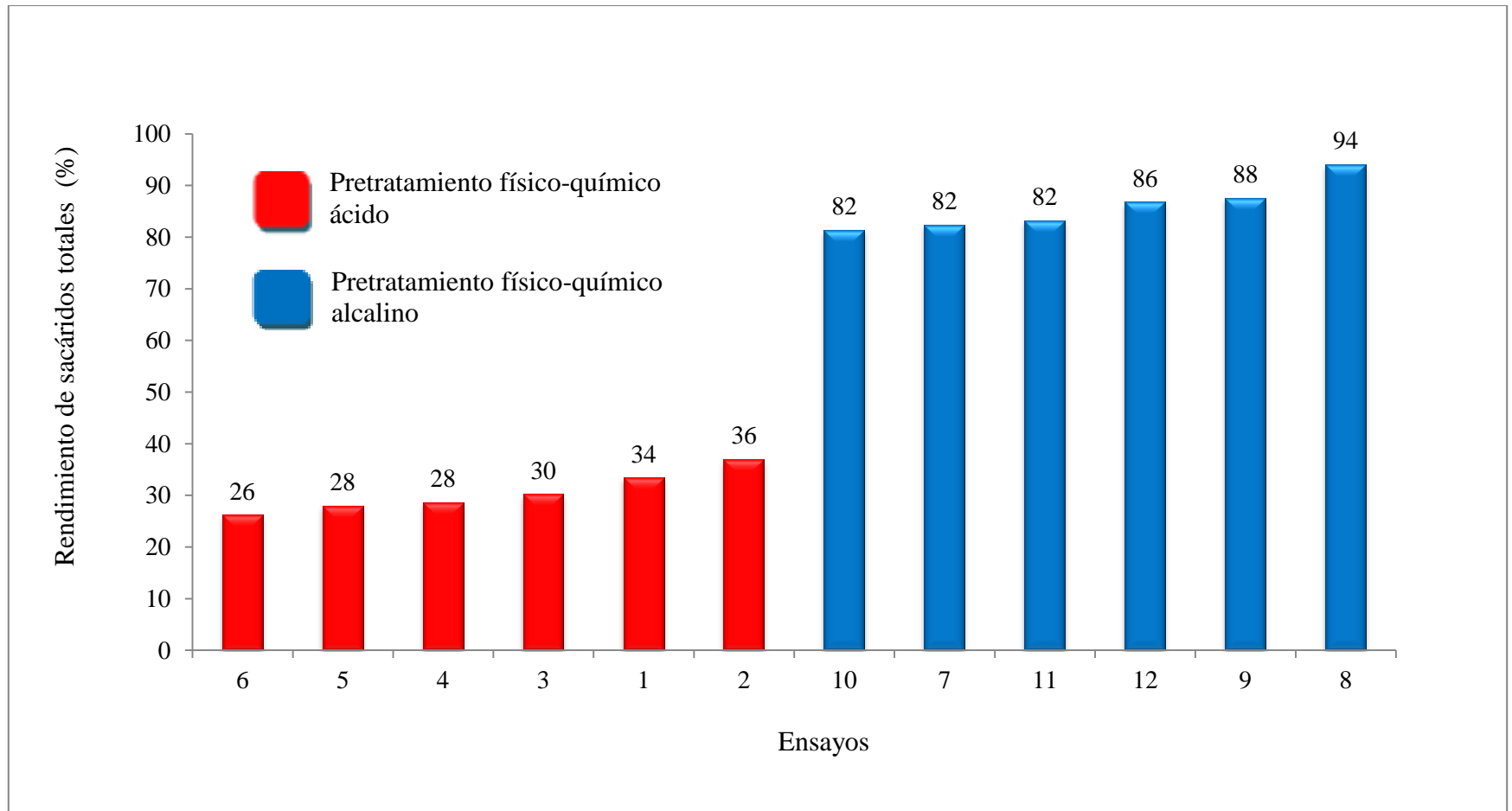


Figura 2 Rendimiento (%) de sacáridos totales obtenidos por hidrólisis enzimática de biomasa de palma pretratada con ácido y álcali.

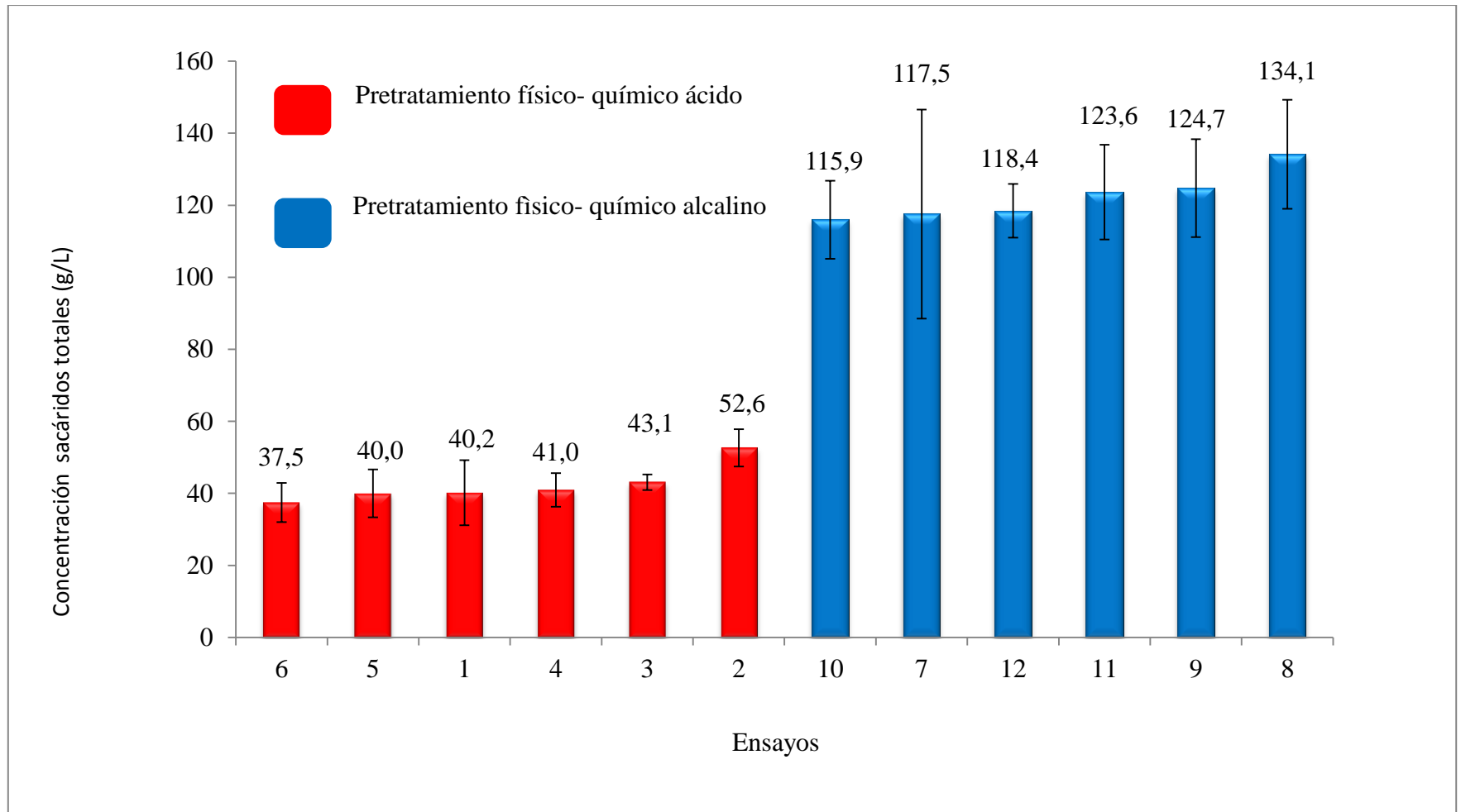


Figura 3 Concentración de sacáridos totales obtenidos por hidrólisis enzimática de biomasa de palma pretratada con ácido y álcali.

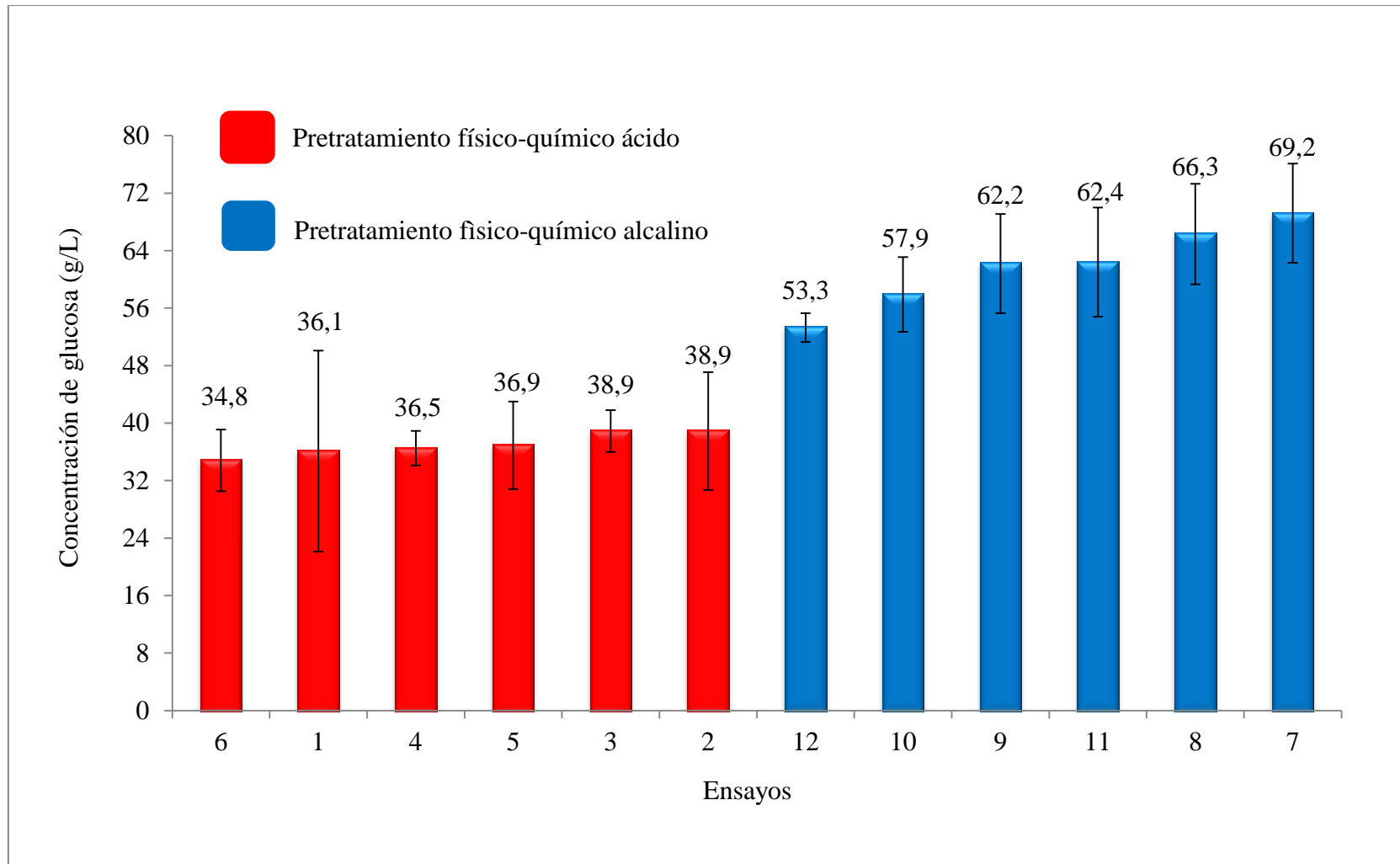


Figura 4 Concentración de glucosa obtenida por hidrólisis enzimática de biomasa de palma pretratada con ácido y álcali.

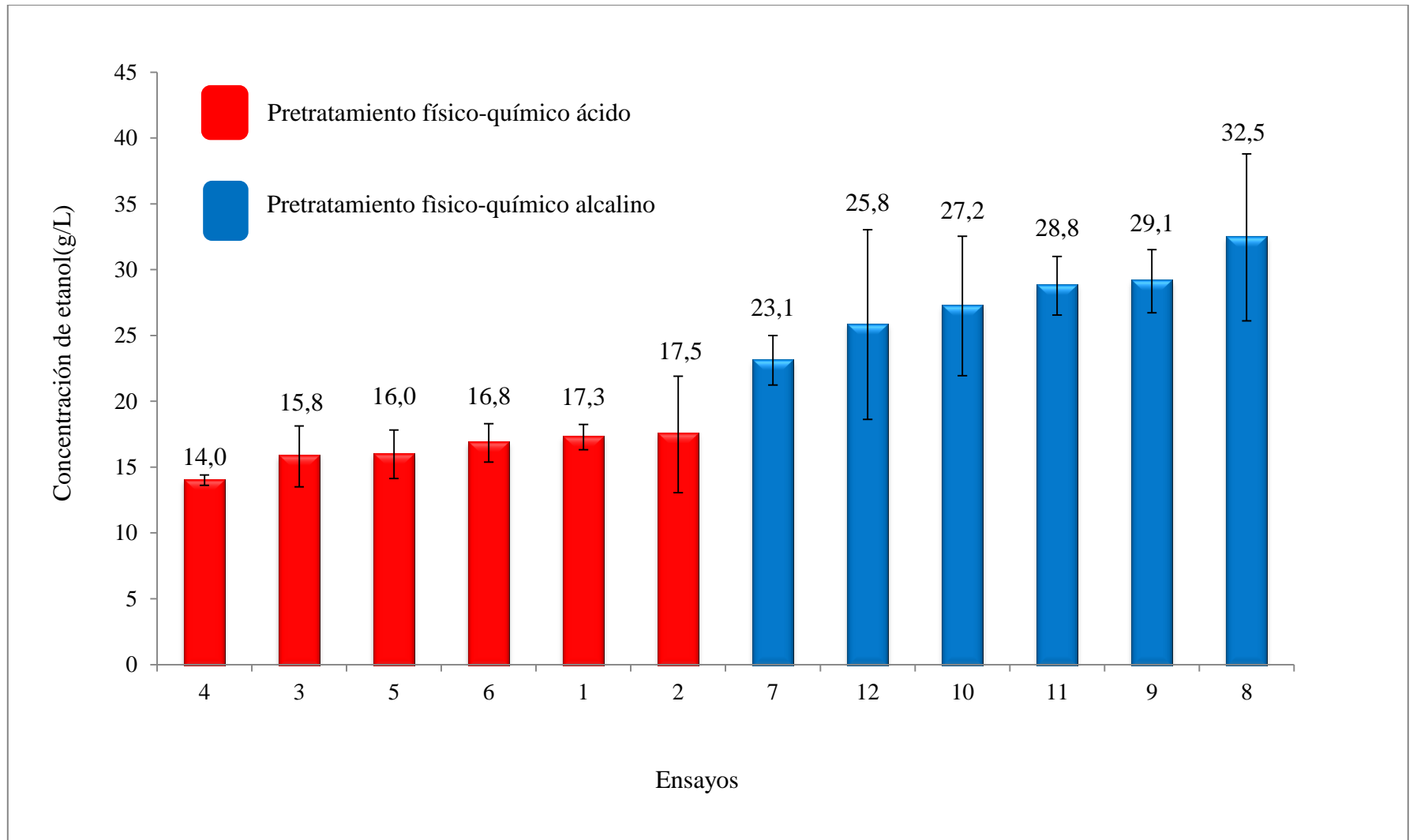


Figura 5 Concentración de etanol obtenida por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido y álcali.

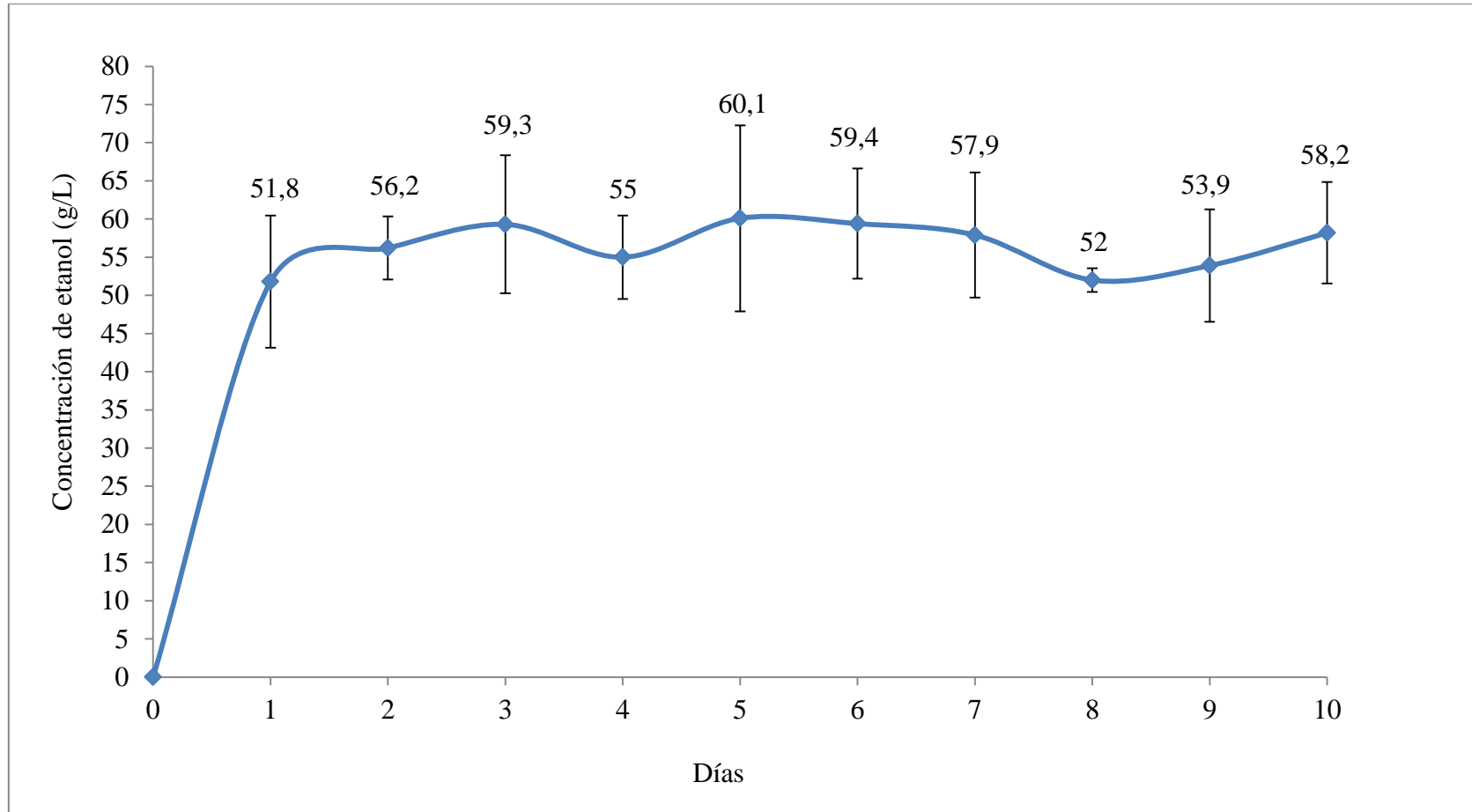


Figura 6 Evolución de la concentración de etanol durante el proceso de SSF por 10 días de raquis de palma africana.

Se muestran las barras de error que permiten establecer rangos en cuanto a la producción de etanol obtenida por 10 días.

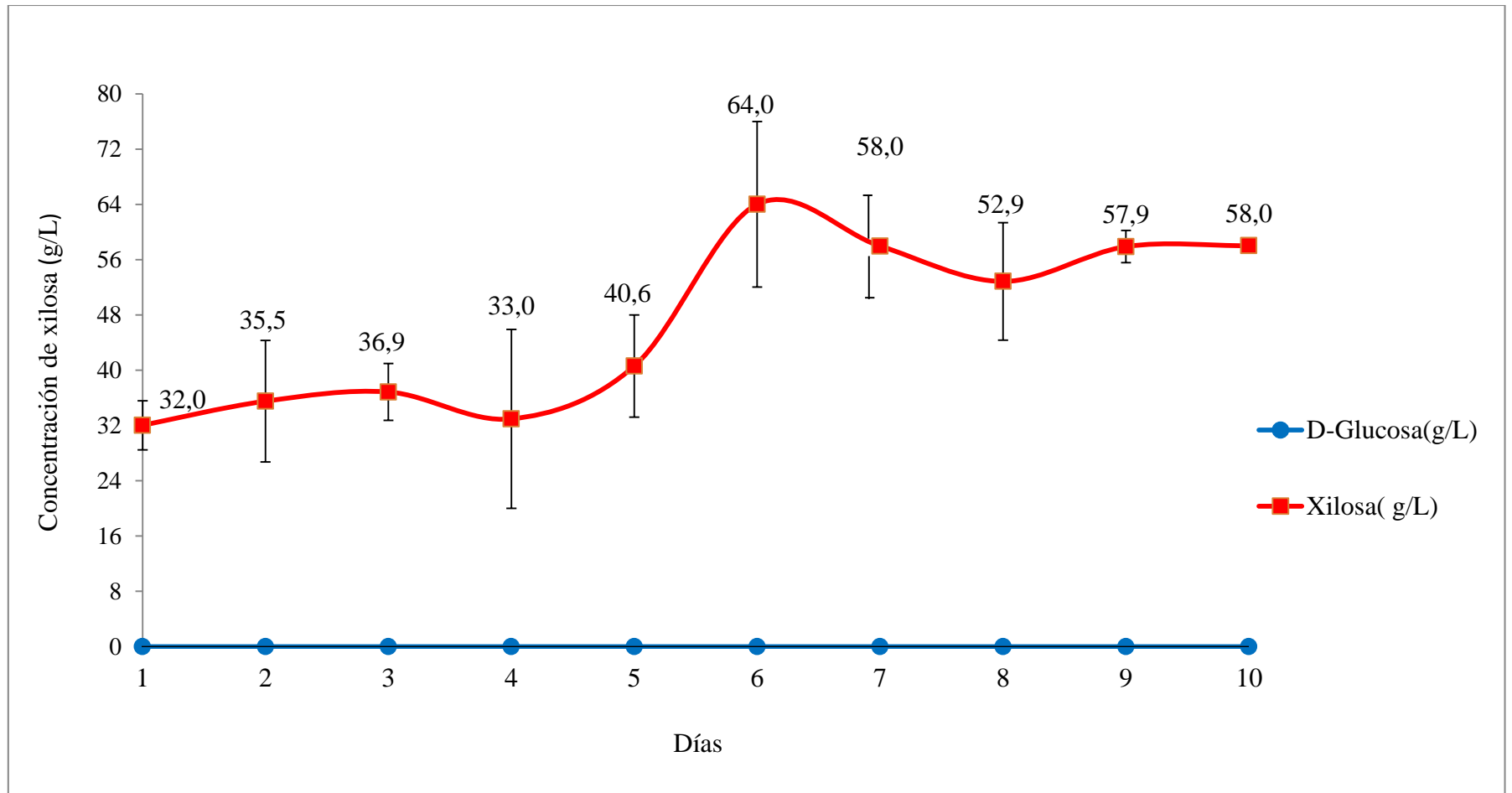


Figura 7 Evolución de la liberación de xilosa y el consumo de glucosa durante el proceso de SSF por 10 días de raquis de palma africana. Se muestran las barras de error que permiten establecer rangos en cuanto a la producción de xilosa.

10. TABLAS

Tabla 1 Ensayos resultantes del diseño experimental de los pretratamientos

Ensayo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Pretratamiento
1	160	10	ácido
2	160	20	
3	160	30	
4	170	10	
5	170	20	
6	170	30	
7	160	10	alcalino
8	160	20	
9	160	30	
10	170	10	
11	170	20	
12	170	30	

Tabla 2 Rendimiento de sacáridos totales obtenidos por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido y álcali.

Ensayos	Biomasa inicial añadida (g) ^a	Biomasa final consumida (g) ^b	Rendimiento de sacáridos totales (%) ^c
1	5	1,7	34
2	5	1,8	36
3	5	1,5	30
4	5	1,4	28
5	5	1,4	28
**6	5	1,3	26
7	5	4,1	82
*8	5	4,7	94
9	5	4,4	88
10	5	4,1	82
11	5	4,3	86
12	5	4,1	82

a Cantidad de biomasa seca pretratada con ácido y álcali.

b Cantidad de biomasa seca pretratada que se convirtió en sacáridos totales por acción de las enzimas del biomass kit

(celulasa, endoxilanasas y β -glucosidasas).

c Rendimiento de sacáridos totales que se determinó dividiendo la cantidad de biomasa final consumida para la cantidad de biomasa inicial añadida, el valor obtenido de la división fue multiplicado por 100.

* Mayor rendimiento

** Menor rendimiento

Tabla 3 Concentración de sacáridos totales: glucosa, xilosa, celobiosa, celotriosa y celodextrina

obtenidos por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido y álcali.

Ensayos	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Celobiosa (g/L)	Celotriosa (g/L)	Celodextrina (g/L)	Sacáridos Totales(g/L)
1	36,1	1,2	0,0	3,0	0,6	40,2
2	38,9	1,0	8,8	2,6	1,2	52,6
3	38,9	0,8	0,0	1,5	1,9	43,1
4	36,5	0,7	0,0	2,7	1,0	41,0
5	36,9	0,6	0,0	0,9	1,6	40,0
** 6	34,8	0,5	0,0	1,0	1,1	37,5
7	69,2	25,4	14,1	1,1	7,7	117,5
* 8	66,3	23,6	19,5	2,9	21,8	134,1
9	62,2	22,3	17,6	2,7	20,0	124,7
10	57,9	21,7	15,7	2,0	18,7	115,9
11	62,4	22,9	16,8	2,3	19,3	123,6
12	53,3	27,8	15,5	2,0	19,9	118,4

* Ensayo con el que se obtuvo la mayor concentración de sacáridos totales

* Ensayo con el que se obtuvo la menor concentración de sacáridos totales.

Tabla 4 Concentración de xilosa obtenida por la hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido y álcali.

Pretratamiento	Ensayos	Xilosa (g/L)
Ácido	1	1,2
Ácido	2	1,0
Ácido	3	0,8
Ácido	4	0,7
Ácido	5	0,6
Ácido	6	0,5
	Promedio	0,8
Alcalino	7	25,4
Alcalino	8	23,6
Alcalino	9	22,3
Alcalino	10	21,7
Alcalino	11	22,9
Alcalino	12	27,8
	Promedio	24,0

Tabla 5 Concentración de glucosa inicial y glucosa residual después de un proceso de fermentación (24horas).

Ensayos	Concentración de glucosa inicial (g/L)	Concentración de glucosa residual (g/L)
1	36,1	0
2	38,9	0
3	38,9	0
4	36,5	0
5	36,9	0
6	34,8	0
7	69,2	0
8	66,3	0
9	62,2	0
10	57,9	0
11	62,4	0
12	53,3	0

Tabla 6 Rendimiento de etanol obtenido en los 12 ensayos.

Ensayo	Glucosa (g/L)	Etanol (g/L)	Valor real de etanol (g _{etanol} /g _{glucosa})	Valor teórico de etanol (g _{etanol} /g _{glucosa})	Rendimiento (%) ^a
1	36,1	17,3	0,48	0,51	94%
2	38,9	17,5	0,45	0,51	88%
3	38,9	15,8	0,41	0,51	80%
4	36,5	14,0	0,38	0,51	75%
5	36,9	16,0	0,43	0,51	84%
6	34,8	16,8	0,48	0,51	94%
7	69,2	23,1	0,33	0,51	65%
*8	66,3	32,5	0,49	0,51	96%
9	62,2	29,1	0,47	0,51	92%
10	57,9	27,2	0,47	0,51	92%
11	62,4	28,8	0,46	0,51	90%
12	53,3	25,8	0,48	0,51	94%

a El rendimiento se calculó a partir del valor real de etanol, el cual se obtuvo dividiendo la concentración de etanol (g/L) para la concentración de glucosa (g/L) el valor real obtenido se dividió para el valor teórico y se multiplicó por 100.

* Mejor rendimiento

Tabla 7 Evolución de la concentración de productos de fermentación obtenidos en el proceso de SSF de raquis de palma africana durante 10 días.

Tiempo (Días)	Volumen de biomasa (L) ^a	Ácido Láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Concentración de etanol en porcentaje (p/v)	Concentración de etanol en porcentaje (v/v)
1	1,1	0,0	0,0	13,0	51,8	5,2	6,6
2	1,2	0,0	0,0	14,5	56,2	5,6	7,1
3	1,3	0,0	0,0	16,5	59,3	5,9	7,5
4	1,4	0,0	0,0	14,9	55,0	5,5	7,0
*5	1,5	0,0	0,0	17,3	60,1	6,0	7,6
6	1,6	0,0	0,0	19,7	59,4	5,9	7,5
7	1,7	0,0	0,0	18,3	57,9	5,8	7,3
8	1,8	0,0	0,0	15,9	52,0	5,2	6,6
9	1,9	0,0	0,2	17,6	53,9	5,4	7,0
10	2	0,0	0,4	17,2	58,2	5,8	7,4
Promedio total		0,0	0,1	16,5	56,4	5,6	7,1

^a Volumen final luego de agregar 100 mL de biomasa al 25 % de sólidos p/v cada 24 horas dentro del biorreactor hasta completar los 2 L por diez días.

*Día en que se obtuvo el mayor porcentaje de etanol expresado en v/v.

Tabla 8 Evolución de la concentración de sacáridos (celodextrina, celotriosa, celobiosa, glucosa y xilosa) obtenidos en el proceso de SSF de raquis de palma africana durante 10 días.

Tiempo (Días)	Volumen de biomasa final (L)^a	Celodextrina (g/L)	Celotriosa (g/L)	Celobiosa (g/L)	D-Glucosa(g/L)	Xilosa (g/L)
1	1,1	0	0	12,6	0	32,0
2	1,2	0	0	16	0	35,5
3	1,3	0	0	18,5	0	36,9
4	1,4	0	0	15,7	0	33,0
5	1,5	0	0	18,3	0	40,6
6	1,6	0	0	20,2	0	64,0
7	1,8	0	0	18,3	0	58,0
8	1,9	0	0	16,1	0	52,9
9	2	0	0	17,8	0	57,9
10		0	0	17,1	0	58,0
Promedio total		0	0	17,1	0	46,9

^a Volumen final luego de agregar 100 mL de biomasa al 25 % de sólidos p /v cada 24 horas dentro del biorreactor hasta completar los

2 L por diez días.

Tabla 9 Comparación del rendimiento en la obtención de sacáridos totales entre los ensayos que fueron pretratados con ácido y álcali .

Ensayos ácidos	Ensayos alcalinos	Rendimiento de sacáridos totales ácido (%)^a	Rendimiento de sacáridos totales alcalino (%)^b	Comparación rendimientos^c
1	7	34	82	2,4
2	8	36	94	2,6
3	9	30	88	2,9
4	10	28	82	2,9
5	11	28	86	3,1
*6	12	26	82	3,2
Promedio total		30	86	2,9

a Rendimiento de sacáridos totales obtenidos por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido que se determinó dividiendo la cantidad de biomasa final consumida para la cantidad de biomasa inicial añadida.

b Rendimiento de sacáridos totales obtenidos por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con álcali que se determinó dividiendo la cantidad de biomasa final consumida para la cantidad de biomasa inicial añadida.

c División de los rendimientos mayores para los menores obteniéndose el número de veces más de sacáridos totales comparando ambos pretratamientos.

* Comparación del mejor rendimiento de sacáridos totales entre los ensayos ácidos y alcalinos

Tabla 10 Comparación del rendimiento en la obtención de glucosa entre los ensayos que fueron pretratados con ácido y álcali

Ensayos ácidos	Ensayos alcalinos	Rendimiento de glucosa (%) ácido^a	Rendimiento de glucosa (%) alcalino^b	Comparación rendimientos^c
*1	7	24,6	48,5	1,9
2	8	27,2	46,4	1,7
3	9	27,2	43,6	1,6
4	10	25,6	40,5	1,6
5	11	25,8	43,6	1,7
6	12	24,4	37,2	1,5
Promedio total		25,8	43,3	1,7

a Rendimiento de glucosa obtenido por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con ácido que se determinó dividiendo la cantidad de biomasa final consumida para la cantidad de biomasa inicial añadida.

b Rendimiento de glucosa obtenido por hidrólisis enzimática de biomasa pretratada con álcali que se determinó dividiendo la cantidad de biomasa final consumida para la cantidad de biomasa inicial añadida.

c División de los rendimientos mayores para los menores obteniéndose el número de veces más de glucosa comparando ambos pretratamientos.

* Comparación de mayor rendimiento glucosa entre los ensayos ácidos y alcalinos

11. ANEXOS

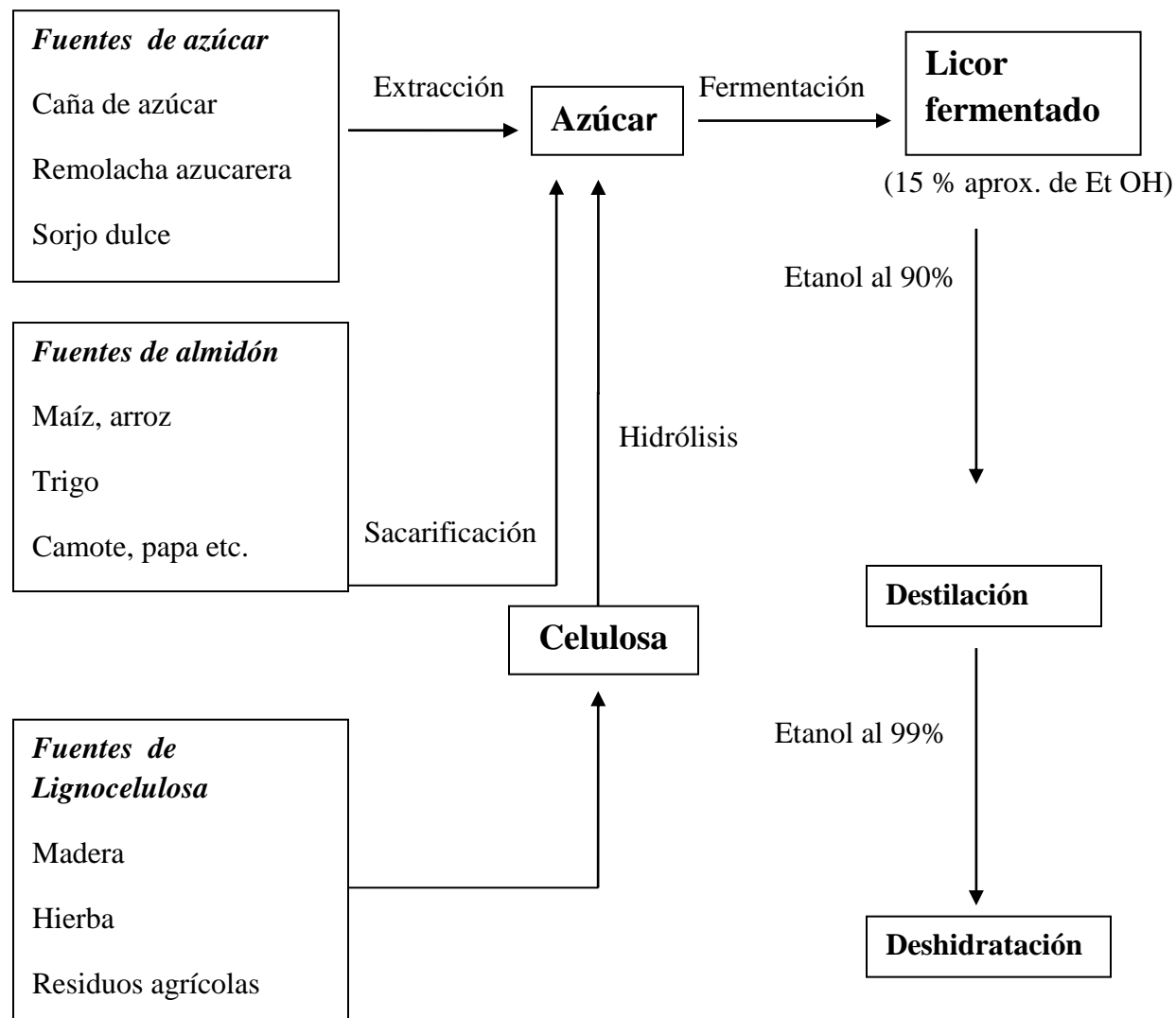
ANEXO 1 EMISIONES DE GASES DE INVERNADERO PRODUCIDAS

	Petróleo *(MJ)	Gas natural (MJ)	Carbon (MJ)	Otros (MJ)	Total	Emisiones de Gases de invernadero (MJ/kg)
Gasolina	1.10	0.03	0.05	0.01	1.19	94
Etanol actual	0.04	0.28	0.41	0.04	0.77	77
Etanol celulosico	0.08	0.02	0.02	0.02	0.14	11

* MJ = mega jouls

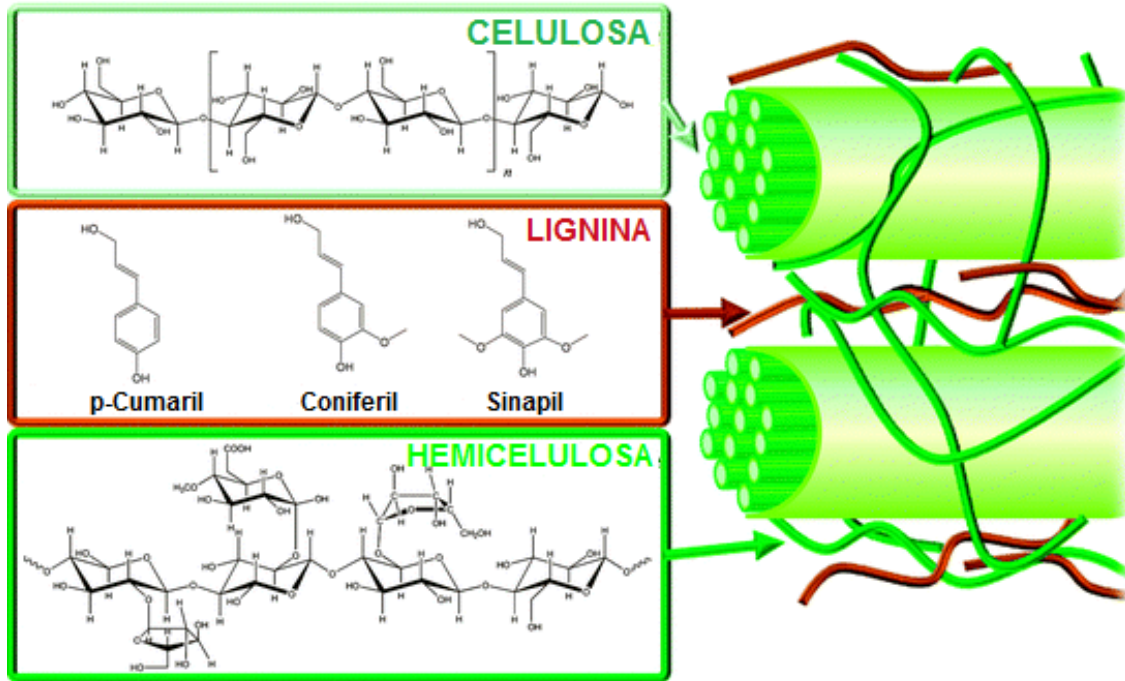
Fuente: Carvajal *et al*, (2013)

ANEXO 2 PROCESOS INVOLUCRADOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL



Fuente: Cheng (2010)

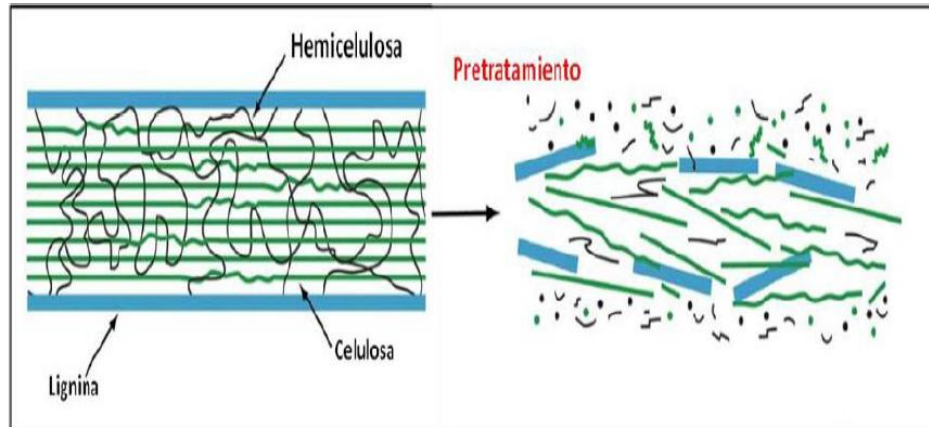
ANEXO 3 ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA EN EL TEJIDO VEGETAL



Fuente: Alonso *et al*, (2012)

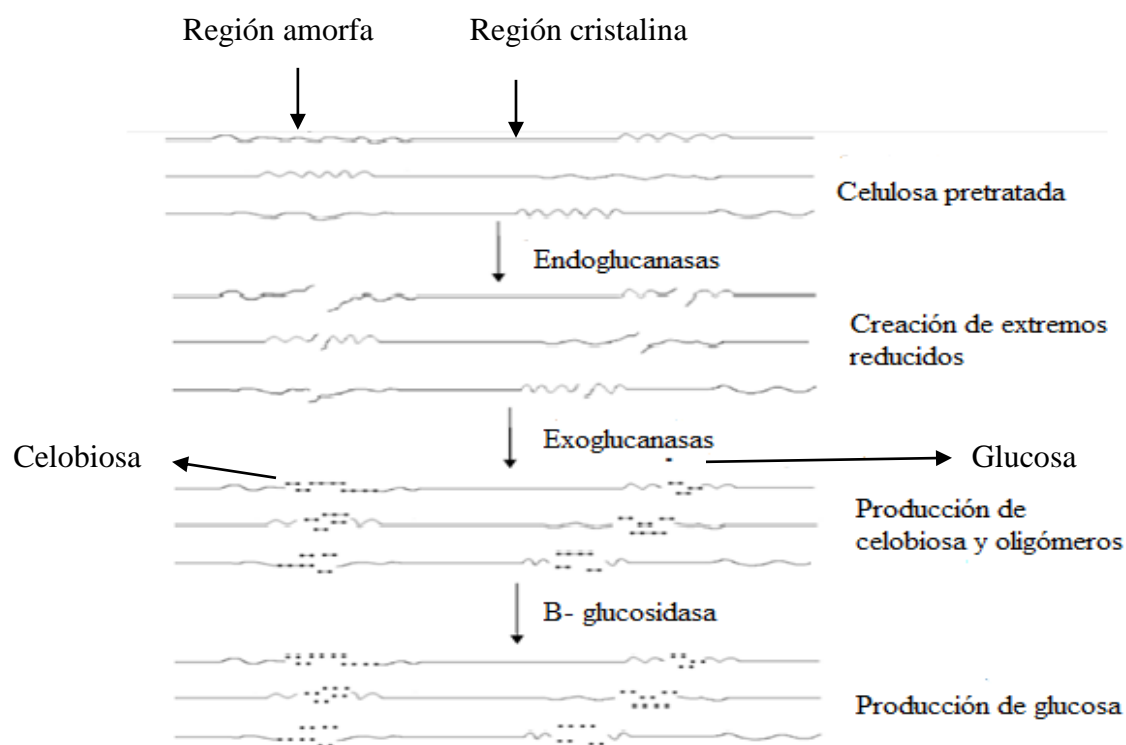
ANEXO 4 CAMBIO DE LA ESTRUCTURA DEL MATERIAL

LIGNOCELULÓSICO DESPUÉS DEL PRETRATAMIENTO



Fuente: Juri (2011)

ANEXO 5 ESQUEMA QUE REPRESENTA LA ACCIÓN DE LOS TRES TIPOS DE ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN LA DEGRADACIÓN DE LA FIBRA DE CELULOSA EN GLUCOSA



Las enzimas que llevan a cabo el proceso de degradación son las endoglucanasas que atacan a los extremos reductores de la cadena de celulosa que fue pretratada, las exoglucanasas que permiten la liberación de celobiosa y finalmente interviene la β -glucosidasa que libera glucosa a partir de celobiosa.

Fuente: Taherzadeh y Karimi (2007)

ANEXO 6 POTENCIAL HIPÓTETICO DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA EN ECUADOR QUE PODRIA

PRODUCIR ETANOL CELULÓSICO

Potencial de producción de etanol de segunda generación de desechos agrícolas en el Ecuador					
Residuos por producto	Peso neto *(T/M) por año	Contenido de celulosa en promedio (T/M) por año	Potencial teórico de etanol (Gal)	Cantidad de vehículos que podrían ser suministrados/Año (TM /Vehículos)	Porcentaje de la Cantidad de vehículos que podrían ser suministrados/Año
Soya	19,8	7,9	1'510,1	3,2	0,2
Palmito	24,2	9,7	1,845,5	3,6	0,3
Flores	29,2	11,7	2'223,4	4,4	0,3
Papas	66,7	26,7	5'075,6	10,1	1
Arroz	90,7	36,2	6'895,8	13,7	1
Plátano	138,7	55,5	10'546,9	21,0	2
Maíz suave	288,3	115,3	21'911,9	43,8	3
Caña de azúcar	327,4	130,9	24'881,8	49,764	4
Cacao	343,2	137,3	26'084,6	52,1	4
Banana	351,0	140,4	26'675,9	53,3	4
Maíz seco	447,3	178,9	33'996,7	67,9	5
Cáfe	568,7	227,4	43'220,1	86,4	6
Palma aceitera	2'071,9	828,7	157'457,7	314,9	22
TOTALES	4'767,8	1'907,1	362'326,5	724,6	51,8

*(T/M)= Toneladas métricas

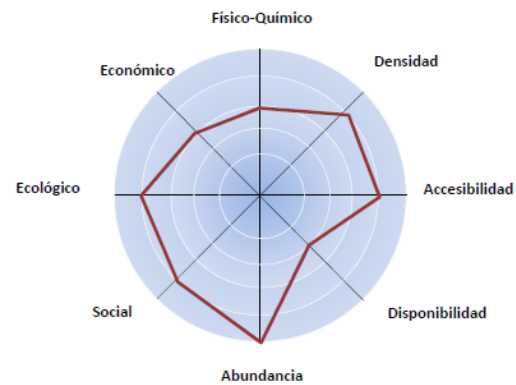
Fuente: Carvajal *et al*, (2013)

ANEXO 7 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD DEL DESECHO DE PALMA AFRICANA PARA SER UTILIZADO EN BIORREFINERIAS EN ECUADOR.



Evaluación de residuos potenciales para biorrefinerías en Ecuador

Raquis de palma africana



Índice de real de impacto	Área real de impacto	Intensidad real de impacto	Log. Intensidad real de impacto	Calificación
0.725	3,5	23040	4.3624	AB



10/04/2013

Javier Carvajal Barriga

15

Fuente: Carvajal *et al*, (2013)

ANEXO 8 VALORES DE LA MEDIA Y DESVIACIÓN ESTANDAR DE SACÁRIDOS TOTALES PARA CADA ENSAYO

Ensayos	Sacáridos Totales (g/L)	Desviación estandar
1	40,2	9,0
2	52,6	5,2
3	43,1	2,2
4	41,0	4,7
5	40,0	6,6
6	37,5	5,4
7	117,5	29,0
8	134,1	15,1
9	124,7	13,6
10	115,9	10,8
11	123,6	13,6
12	118,4	7,5

ANEXO 9 VALORES DE LA MEDIA Y DESVIACIÓN ESTANDAR DE GLUCOSA PARA CADA ENSAYO

Ensayos	Etanol (g/L)	Desviación estandar
1	17,3	1,0
2	17,5	4,4
3	15,8	2,3
4	14,0	0,4
5	16,0	1,8
6	16,8	1,5
7	23,1	1,9
8	32,5	6,3
9	29,1	2,4
10	27,2	5,3
11	28,8	2,2
12	25,8	7,2

ANEXO 10 VALORES DE LA MEDIA Y DESVIACIÓN ESTANDAR DE ETANOL PARA CADA ENSAYO

Ensayos	Glucosa (g/L)	Desviación estandar
1	36,1	14,0
2	38,9	8,2
3	38,9	2,9
4	36,5	2,4
5	36,9	6,1
6	34,8	4,3
7	69,2	6,9
8	66,3	7,0
9	62,2	6,9
10	57,9	5,2
11	62,4	7,6
12	53,3	2,0

**ANEXO 11 COMPOSICIÓN DE LAS FRACCIONES PRINCIPALES QUE CONFORMAN LA PARED
CELULAR DEL DESECHO DE PALMA AFRICANA.**

Residuo	% Celulosa	% Hemicelulosa	% Lignina
Raquis	59,7	22,1	18,1

Fuente: Misson *et al*, (2009)

**ANEXO 12 DATOS DE LAS 3 REPETICIONES OBTENIDAS PARA CADA ENSAYO DEL PROCESO DE
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA DE RAQUIS DE PALMA PRETRATADA CON ÁCIDO
Y ÁLCALI**

Ensayos	Glucosa (g/L)	Celotriosa (g/L)	Celobiosa (g/L)	Celodextrina (g/L)	Xilosa (g/L)	Sacáridos Totales(g/L)
	23,3	5,1	0,0	0,0	0,0	54,7
1	33,8	1,9	0,0	1,9	0,9	38,4
	51,1	2,1	0,0	0,0	1,4	54,6
Promedio	36,1	3,0	0,0	0,6	1,2	40,2
	30,4	1,6	12,2	2,1	0,9	47,1
2	39,9	1,3	14,3	0,9	1,0	57,3
	46,6	5,1	0,0	0,8	1,0	53,5
Promedio	38,9	2,6	8,8	1,2	1,0	52,6
	42,1	1,6	0,0	0,6	0,9	45,2
3	36,5	1,6	0,0	4,5	0,7	43,2
	38,1	1,4	0,0	0,5	0,8	40,9
Promedio	38,9	1,5	0,0	1,9	0,8	43,1
	33,7	1,3	0,0	0,9	0,5	36,5
4	37,5	1,5	0,0	1,2	0,7	40,8
	38,3	5,4	0,0	1,1	0,8	45,6
Promedio	36,5	2,7	0,0	1,0	0,7	41,0
	30,0	0,0	0,0	2,5	0,5	33,1
5	38,7	1,2	0,0	0,0	0,7	40,6
	41,8	1,5	0,0	2,3	0,6	46,3
Promedio	36,9	0,9	0,0	1,6	0,6	40,0

**ANEXO 12 DATOS DE LAS 3 REPETICIONES OBTENIDAS PARA CADA ENSAYO DEL PROCESO DE
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA DE RAQUIS DE PALMA PRETRATADA CON ÁCIDO
Y ALCALI (CONTINUACIÓN)**

	30,5	0,0	0,0	0,9	0,4	31,7
6	34,8	1,0	0,0	1,2	0,6	38,1
	39,1	1,7	0,0	1,2	0,6	42,6
Promedio	34,8	1,0	0,0	1,1	0,5	37,5
	62,4	0,0	0,0	0,0	22,5	84,9
7	69,0	3,3	20,6	23,1	24,6	140,5
	76,3	0,0	21,7	0,0	29,2	127,2
Promedio	69,2	1,1	14,1	7,7	25,4	117,5
	62,4	3,0	18,3	20,8	21,7	126,2
8	74,5	3,4	22,5	24,7	26,5	151,5
	62,1	2,5	17,6	20,0	22,5	124,7
Promedio	66,3	2,9	19,5	21,8	23,6	134,1
	70,0	3,4	19,0	22,2	25,5	140,1
9	56,9	2,4	16,5	18,7	20,0	114,4
	59,7	2,3	17,4	19,0	21,3	119,7
Promedio	62,2	2,7	17,6	20,0	22,3	124,7
	55,4	1,8	14,6	18,1	20,3	110,2
10	64,0	2,4	17,7	20,4	23,9	128,4
	54,4	1,8	14,7	17,5	20,8	109,2
Promedio	57,9	2,0	15,7	18,7	21,7	115,9
	54,5	1,9	15,2	18,7	20,6	110,9
11	69,6	2,7	19,1	21,1	24,6	137,1
	63,1	2,3	16,0	18,0	23,5	122,9
Promedio	62,4	2,3	16,8	19,3	22,9	123,6
	52,1	2,0	15,0	18,9	38,5	126,5
12	52,1	1,8	15,5	20,6	21,7	111,7
	55,6	2,0	16,1	20,3	23,2	117,2
Promedio	53,3	2,0	15,5	19,9	27,8	118,4

ANEXO 13 DATOS DE LAS 3 REPETICIONES OBTENIDAS PARA CADA

ENSAYO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE BIOMASA DE

RAQUIS DE PALMA PRETRATADA CON ÁCIDO Y ÁLCALI E

HIDROLIZADA

Ensayos	Etanol (g/L)
	18,2
1	16,3
	17,4
Promedio	17,3
	14,9
2	14,9
	22,6
Promedio	17,5
	13,7
3	15,5
	18,3
Promedio	15,8
	14,0
4	14,4
	13,6
Promedio	14,0
	14,2
5	15,9
	17,9
Promedio	16,0
	15,6
6	16,6
	18,4
Promedio	16,8
	21,3
7	25,0
	23,0
Promedio	23,1
	39,8
8	29,1
	28,5
Promedio	32,5
	31,5

**ANEXO 13 DATOS DE LAS 3 REPETICIONES OBTENIDAS PARA CADA
ENSAYO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE BIOMASA DE
RAQUIS DE PALMA PRETRATADA CON ÁCIDO Y ÁLCALI E
HIDROLIZADA (CONTINUACIÓN)**

Promedio	32,45
	31,46
9	29,23
	26,71
Promedio	29,13
	28,5
10	21,42
	31,79
Promedio	27,24
	29,46
11	26,3
	30,58
Promedio	28,78
	22,09
12	21,29
	34,13
Promedio	25,83

**ANEXO 14 DATOS DE LAS 3 REPETICIONES OBTENIDAS DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN Y
SACÁRIDOS POR 10 DÍAS DURANTE EL PROCESO DE SSF.**

Tiempo	Celodextrina (g/L)	Celotriosa (g/L)	Celobiosa (g/L)	D- Glucosa(g/L)	Xilosa (g/L)	Ácido Láctico (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (g/L)	% v/v Et OH
	0,0	0,0	19,2	0,0	38,9	0,0	16,3	0,0	61,7	7,8
Día 1	0,0	0,0	6,2	0,0	27,4	0,0	11,9	0,0	47,6	6,1
	0,0	0,0	12,5	0,0	29,8	0,0	10,8	0,0	46,0	5,8
Promedio	0,0	0,0	12,6	0,0	32,0	0,0	13,0	0,0	51,8	6,6
	0,0	0,0	18,0	0,0	38,5	0,0	15,2	0,0	57,4	7,3
Día 2	0,0	0,0	15,8	0,0	36,5	0,0	15,1	0,0	59,6	7,6
	0,0	0,0	14,1	0,0	31,6	0,0	13,2	0,0	51,6	6,5
Promedio	0,0	0,0	16,0	0,0	35,5	0,0	14,5	0,0	56,2	7,1
	0,0	0,0	17,0	0,0	36,5	0,0	14,4	0,0	55,4	7,0
Día 3	0,0	0,0	22,4	0,0	45,8	0,0	20,0	0,0	69,6	8,8
	0,0	0,0	16,0	0,0	28,3	0,0	15,2	0,0	52,8	6,7
Promedio	0,0	0,0	18,5	0,0	36,9	0,0	16,5	0,0	59,3	7,5
	0,0	0,0	14,3	0,0	30,1	0,0	14,2	0,0	53,7	6,8
Día 4	0,0	0,0	18,1	0,0	37,7	0,0	16,2	0,0	61,0	7,7
	0,0	0,0	14,8	0,0	31,2	0,0	14,4	0,0	50,3	6,4
Promedio	0,0	0,0	15,7	0,0	33,0	0,0	14,9	0,0	55,0	7,0
	0,0	0,0	15,3	0,0	33,4	0,0	14,9	0,0	53,9	6,8
Día 5	0,0	0,0	24,8	0,0	55,5	0,0	22,2	0,0	74,1	9,4
	0,0	0,0	14,9	0,0	32,9	0,0	14,7	0,0	52,2	6,6
Promedio	0,0	0,0	18,3	0,0	40,6	0,0	17,3	0,0	60,1	7,6
	0,0	0,0	21,3	0,0	67,1	0,0	20,6	0,0	63,7	8,1
Día 6	0,0	0,0	22,5	0,0	69,4	0,0	21,2	0,0	63,5	8,1
	0,0	0,0	16,8	0,0	55,6	0,0	17,4	0,0	51,1	6,5

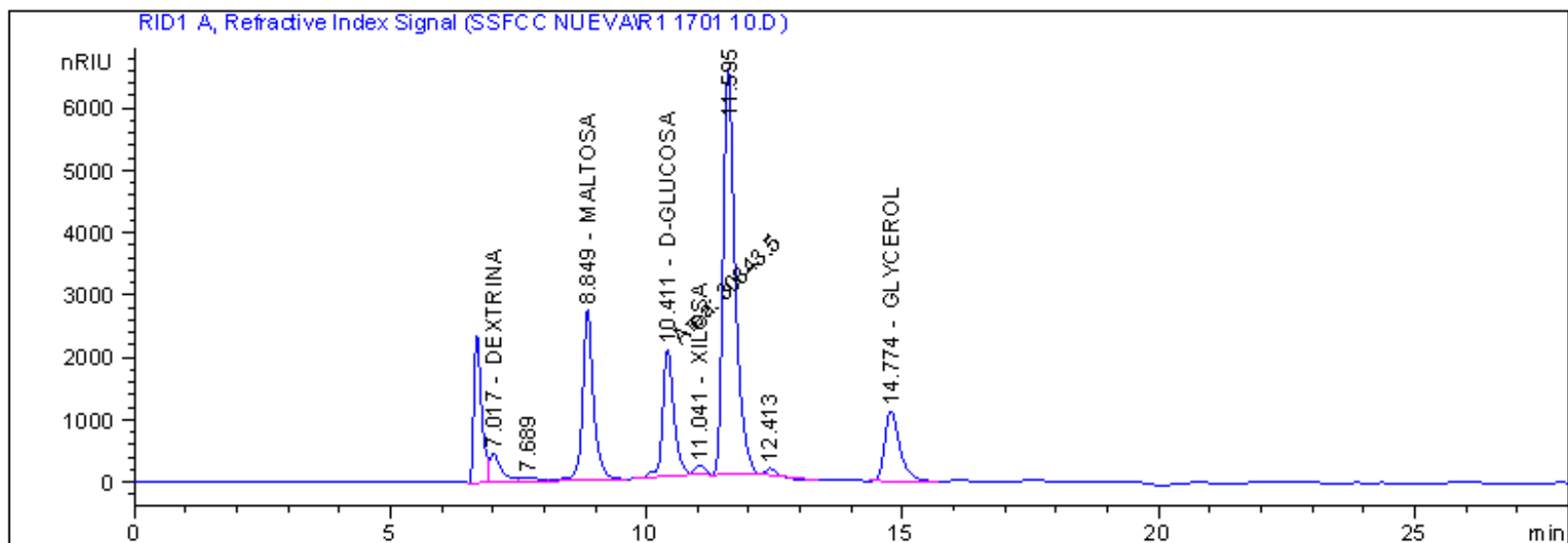
ANEXO 14 DATOS DE LAS 3 REPETICIONES OBTENIDAS DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN Y SACÁRIDOS POR 10 DÍAS DURANTE EL PROCESO DE SSF (CONTINUACIÓN)

Promedio	0,0	0,0	20,2	0,0	64,0	0,0	19,7	0,0	59,4	7,5
	0,0	0,0	21,9	0,0	67,3	0,0	21,1	0,0	66,2	8,4
Día 7	0,0	0,0	19,0	0,0	62,1	0,0	18,9	0,0	57,8	7,3
	0,0	0,0	14,1	0,0	44,5	0,0	14,7	0,0	49,8	6,3
Promedio	0,0	0,0	18,3	0,0	58,0	0,0	18,3	0,0	57,9	7,3
	0,0	0,0	16,6	0,0	52,7	0,0	15,7	0,0	52,9	6,7
Día 8	0,0	0,0	16,8	0,0	53,5	0,0	16,4	0,0	52,9	6,7
	0,0	0,0	15,0	0,0	52,4	0,0	15,5	0,0	50,2	6,4
Promedio	0,0	0,0	16,1	0,0	52,9	0,0	15,9	0,0	52,0	6,6
	0,0	0,0	20,7	0,0	65,9	0,0	19,5	0,7	61,4	7,8
Día 9	0,0	0,0	17,8	0,0	58,8	0,0	17,6	0,0	53,6	7,1
	0,0	0,0	14,9	0,0	49,0	0,0	15,5	0,0	46,7	5,9
Promedio	0,0	0,0	17,8	0,0	57,9	0,0	17,6	0,2	53,9	7,0
	0,0	0,0	17,4	0,0	55,4	0,0	17,8	0,7	65,8	8,3
Día 10	0,0	0,0	16,8	0,0	59,7	0,0	16,4	0,0	53,9	6,8
	0,0	0,0	17,1	0,0	59,0	0,0	17,5	0,6	54,7	6,9
Promedio	0,0	0,0	17,1	0,0	58,0	0,0	17,2	0,4	58,2	7,4

ANEXO 15 CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA

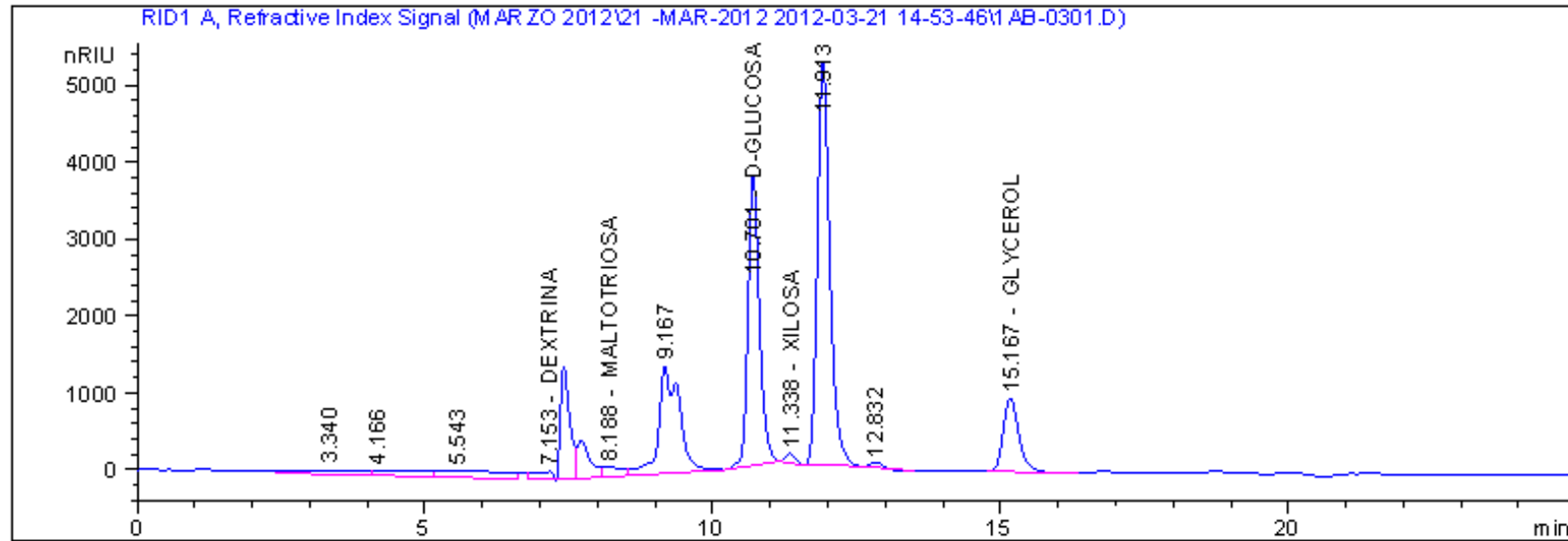
PRETRATADA CON ÁCIDO

R1 160°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



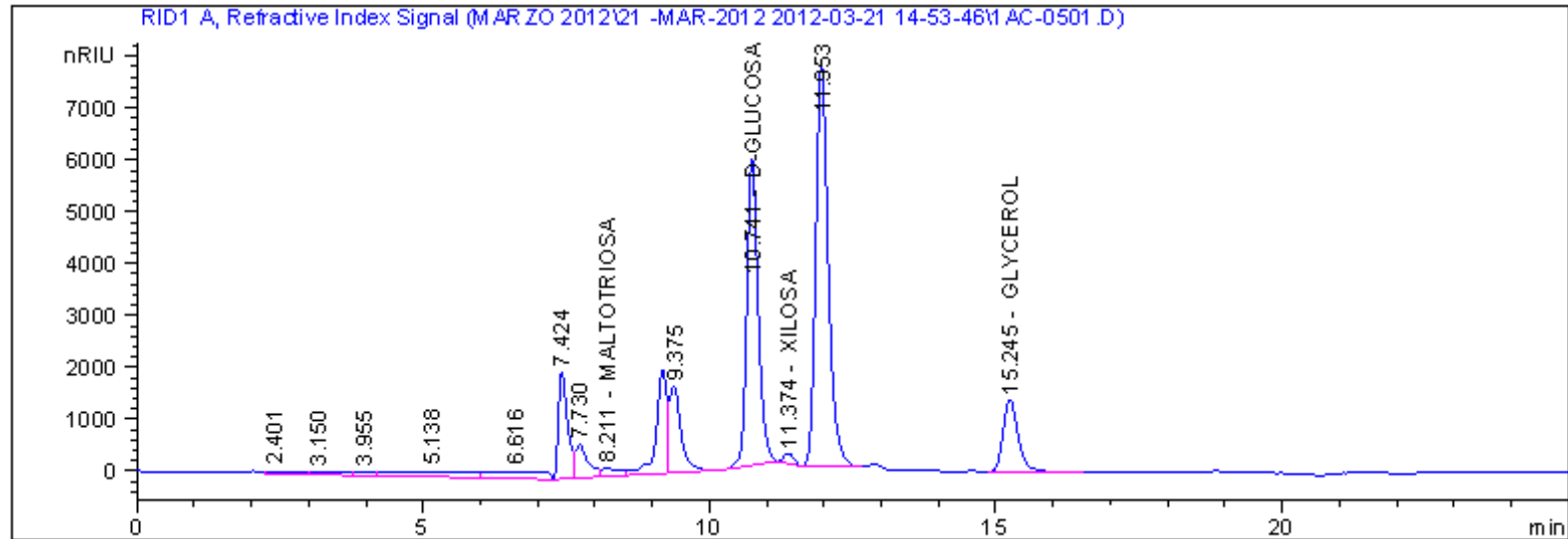
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.017	VV	7199.58838	7.71743e-3	55.56231		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSA
8.849	VB	4.11324e4	6.75013e-3	277.64889		MALTOSA
10.411	MM	3.08435e4	6.25113e-3	192.80693		D-GLUCOSA
11.041	BB	1690.06372	5.72177e-3	9.67015		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.774	BB	2.33120e4	7.86204e-3	183.28019		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				718.96847		

R2 160°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



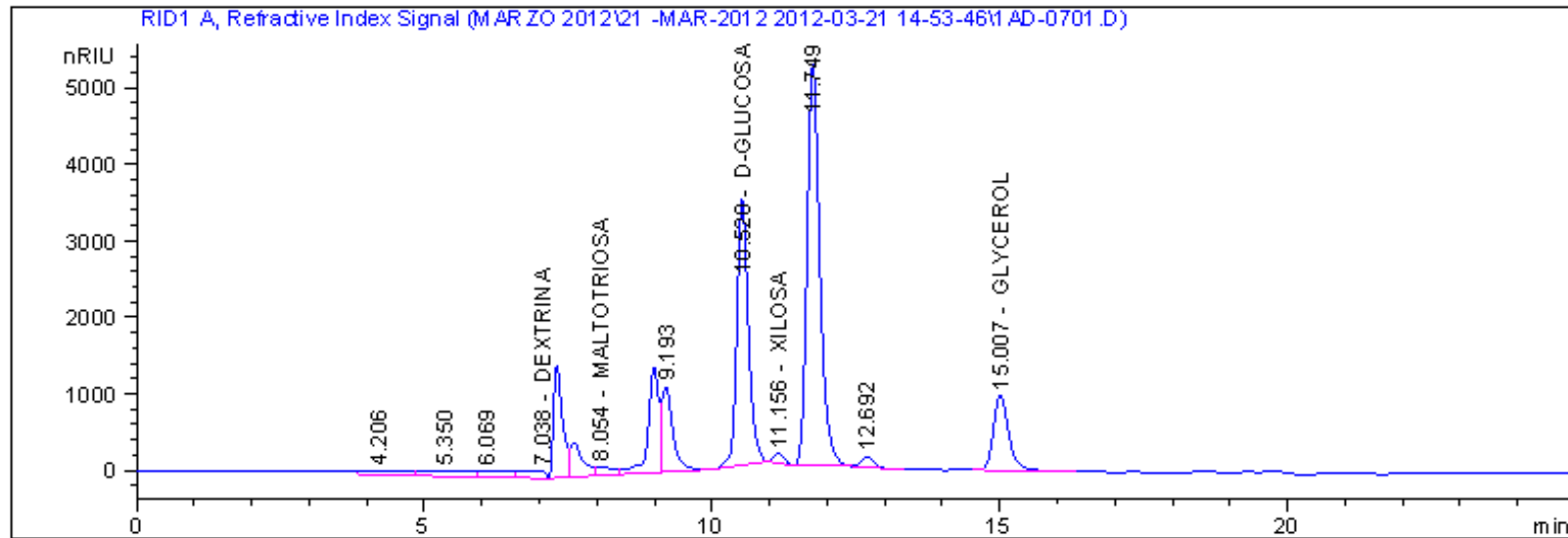
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.153	BV	2469.72510	7.71743e-3	19.05993		DEXTRINA
8.188	VV	2910.34521	6.42900e-3	18.71062		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.701	BB	5.24418e4	6.25113e-3	327.82080		D-GLUCOSA
11.338	BB	1502.20300	5.72177e-3	8.59525		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.167	BB	1.79712e4	7.86204e-3	141.29067		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				515.47728		

R3 160°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



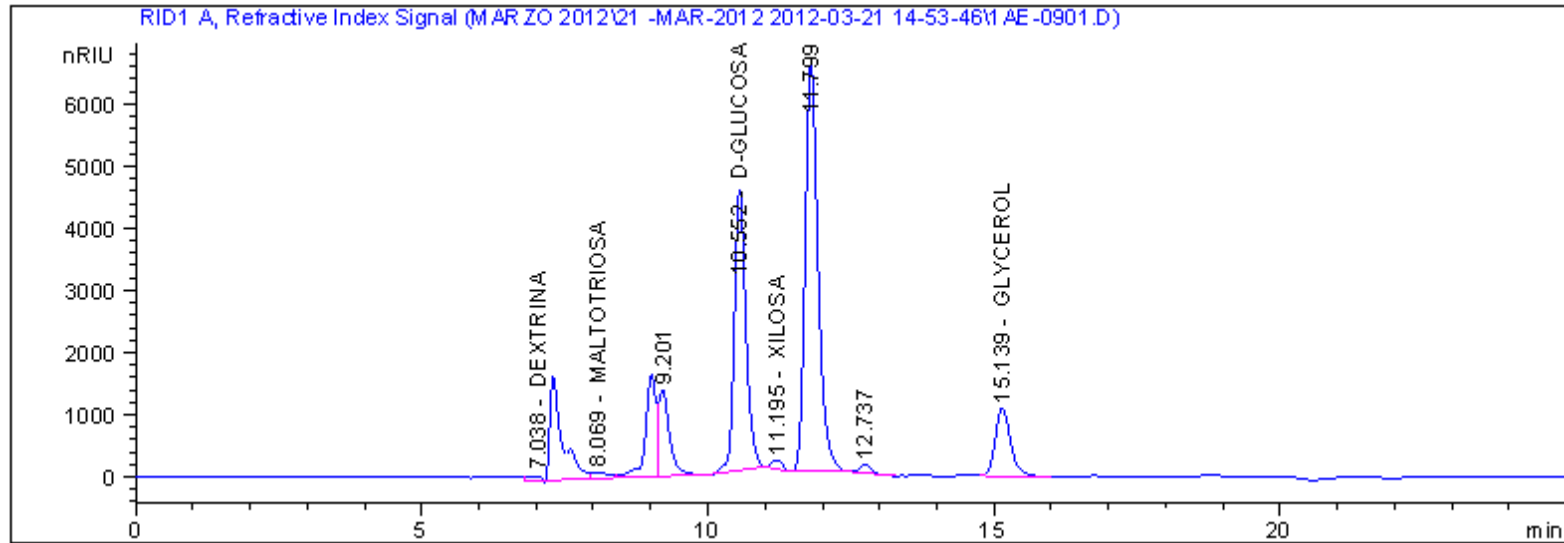
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
8.211	VV	3273.97412	6.42900e-3	21.04840	-	MALTOTRIOSIA
8.782	-	-	-	-	-	MALTOSA
10.741	BB	8.17360e4	6.25113e-3	510.94268	-	D-GLUCOSA
11.374	BB	2484.97729	5.72177e-3	14.21846	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
15.245	BB	2.58236e4	7.86204e-3	203.02606	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
23.187	-	-	-	-	-	ETHANOL
Totals :				749.23560		

R1 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



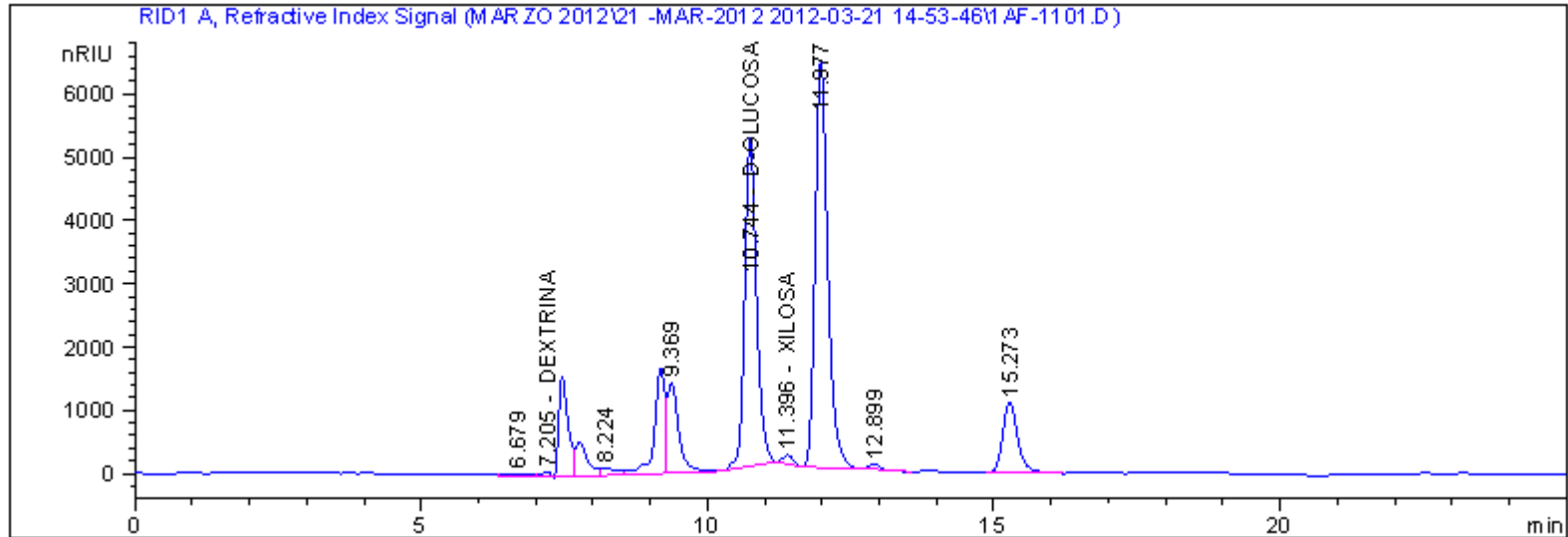
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.038	BV	2753.07617	7.71743e-3	21.24667		DEXTRINA
8.054	VV	2412.62720	6.42900e-3	15.51079		MALTOTRIOSIA
8.989	VV	1.80605e4	6.75013e-3	121.91079		MALTOSA
10.520	BB	4.85574e4	6.25113e-3	303.53841		D-GLUCOSA
11.156	BB	1540.30188	5.72177e-3	8.81325		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.007	BB	1.85300e4	7.86204e-3	145.68350		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				616.70339		

R2 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.038	VV	1103.61523	7.71743e-3	8.51707		DEXTRINA
8.069	VV	1949.08533	6.42900e-3	12.53068		MALTOTRIOSIA
9.011	VV	2.12557e4	6.75013e-3	143.47870		MALTOSA
10.552	BB	6.37771e4	6.25113e-3	398.67880		D-GLUCOSA
11.195	BB	1766.75281	5.72177e-3	10.10894		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.139	BB	2.05119e4	7.86204e-3	161.26512		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				734.57933		

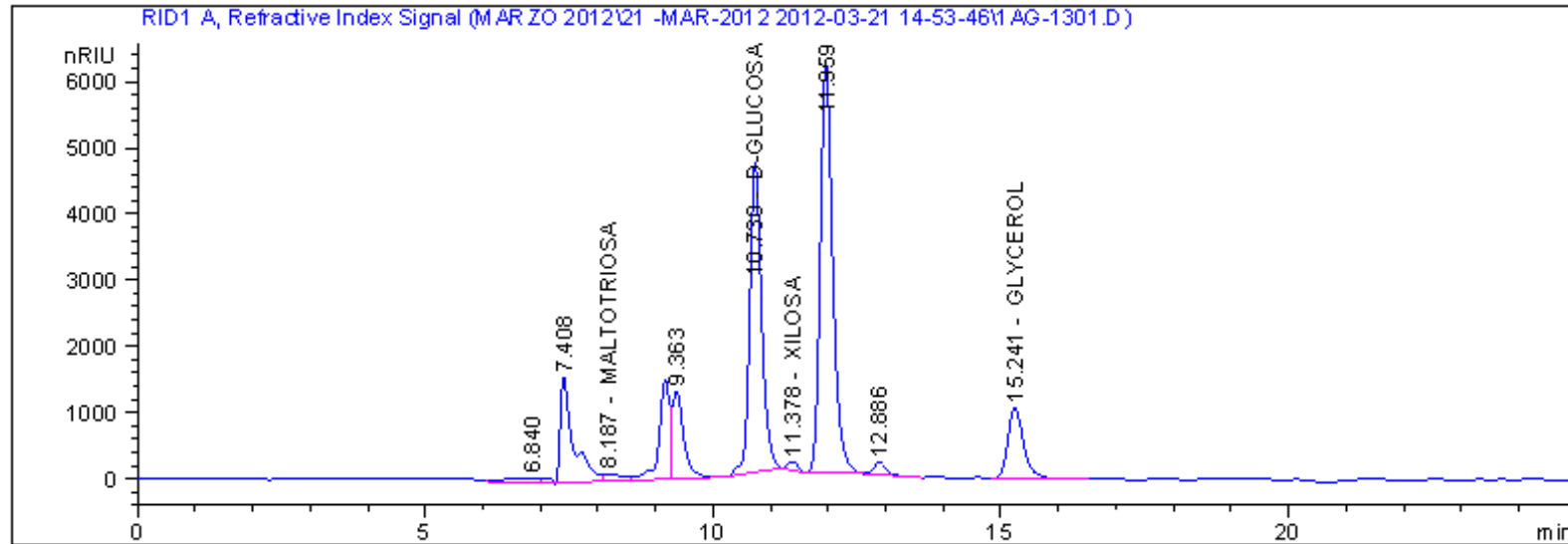
R3 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.205	VV	995.95972	7.71743e-3	7.68625		DEXTRINA
7.767	VV	7938.46094	6.42900e-3	51.03640		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.744	BB	7.45414e4	6.25113e-3	465.96780		D-GLUCOSA
11.396	BB	1804.39417	5.72177e-3	10.32432		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.816		-	-	-		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 535.01477

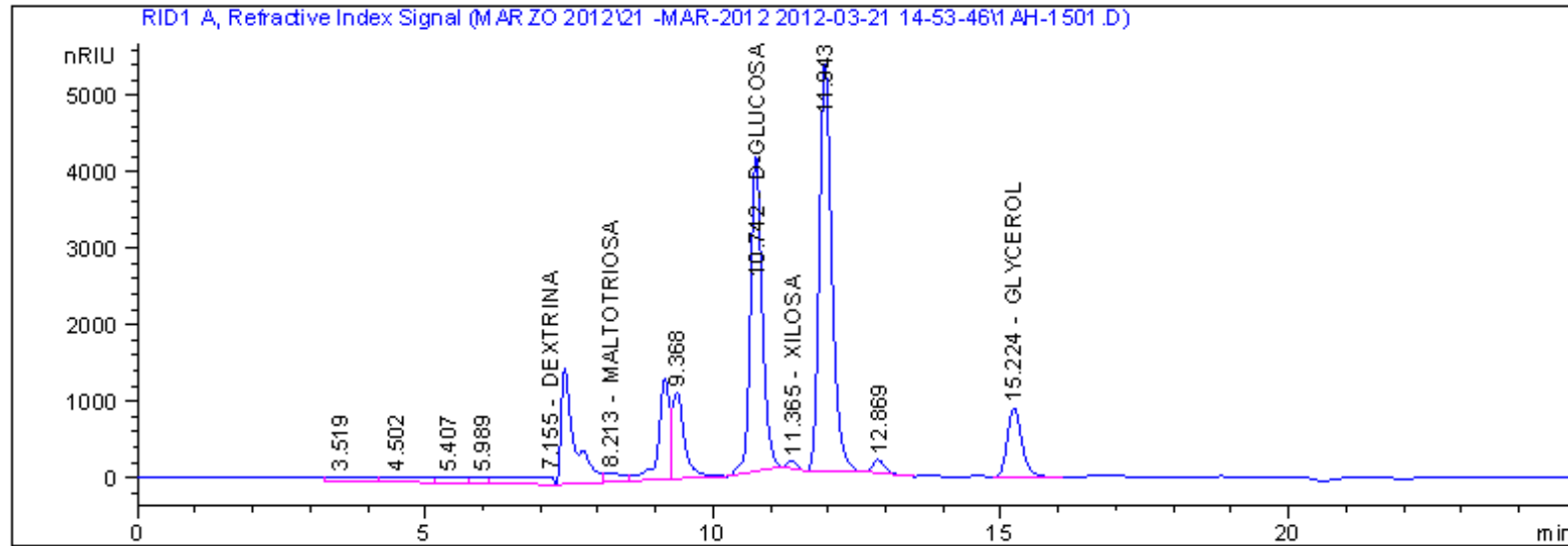
R1 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.156	VV	771.75470	7.71743e-3	5.95596		DEXTRINA
8.187	VV	2424.10693	6.42900e-3	15.58460		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.730	BB	6.73533e4	6.25113e-3	421.03438		D-GLUCOSA
11.378	BB	1624.32251	5.72177e-3	9.29399		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.241	BB	2.05350e4	7.86204e-3	161.44669		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

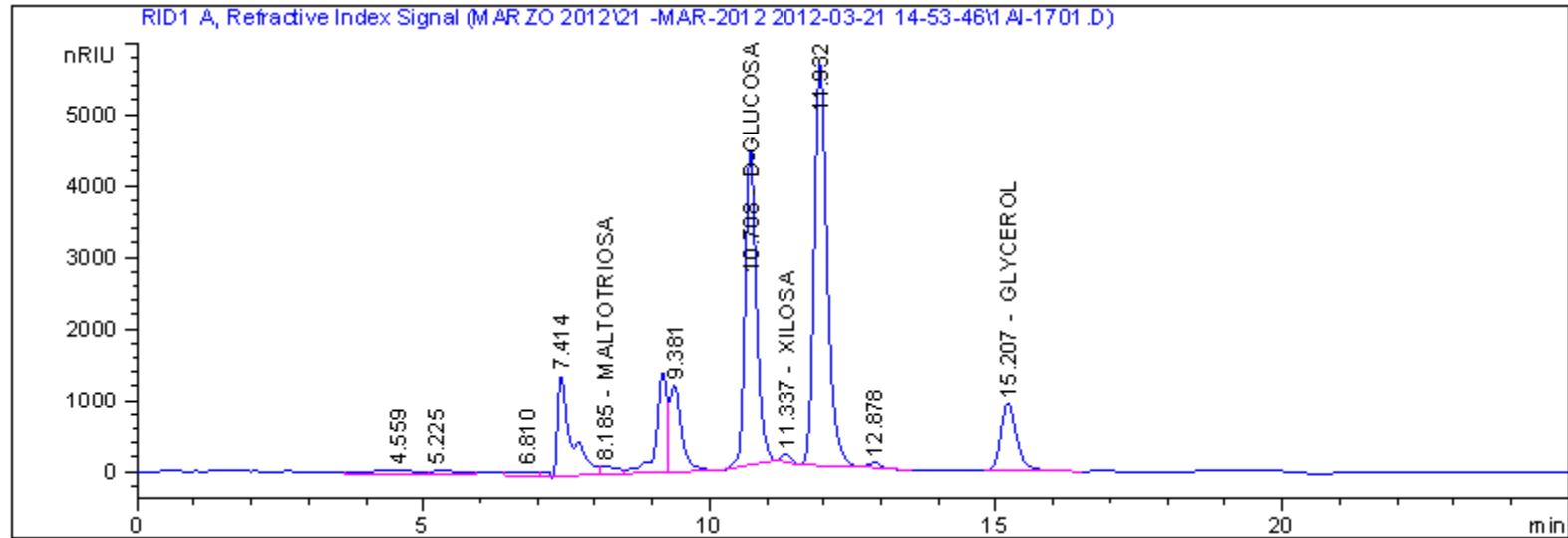
Totals : 613.31562

R2 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



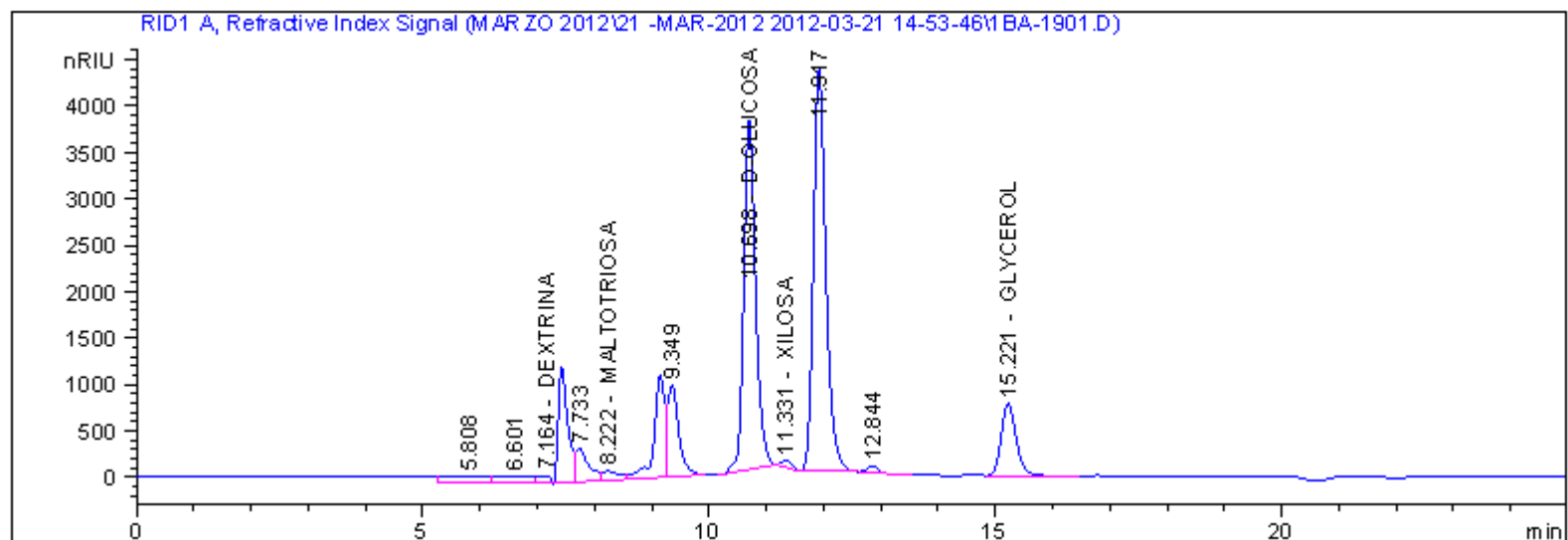
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.155	VV	5780.67383	7.71743e-3	44.61194		DEXTRINA
8.213	VV	2537.86694	6.42900e-3	16.31596		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.742	BB	5.83621e4	6.25113e-3	364.82881		D-GLUCOSA
11.365	BB	1174.87817	5.72177e-3	6.72238		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.224	BB	1.60715e4	7.86204e-3	126.35486		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				558.83394		

R3 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



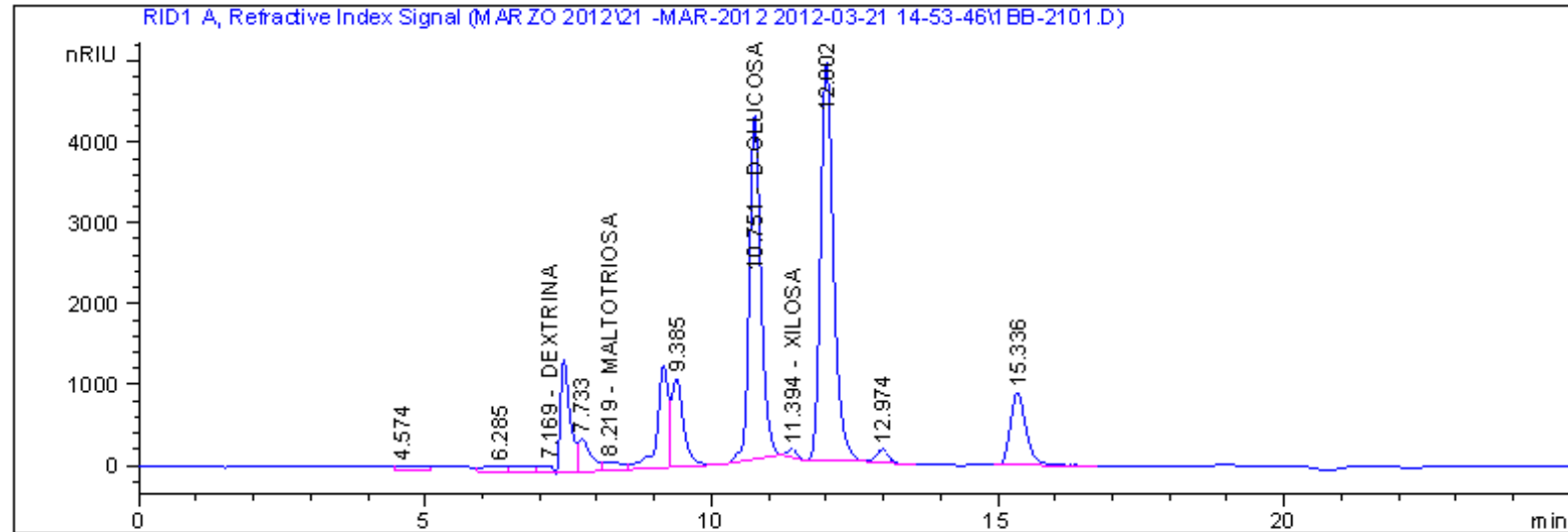
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.143	VV	658.58447	7.71743e-3	5.08258		DEXTRINA
8.185	VV	2206.67334	6.42900e-3	14.18671		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.708	BB	6.09979e4	6.25113e-3	381.30569		D-GLUCOSA
11.337	BB	1477.98047	5.72177e-3	8.45666		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.207	BB	1.82834e4	7.86204e-3	143.74500		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				552.77664		

R1 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.164	VV	1164.23462	7.71743e-3	8.98490		DEXTRINA
8.222	VV	2035.29797	6.42900e-3	13.08494		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.698	BB	5.39870e4	6.25113e-3	337.47960		D-GLUCOSA
11.331	BB	929.68054	5.72177e-3	5.31941		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.221	BB	1.42989e4	7.86204e-3	112.41887		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				477.28773		

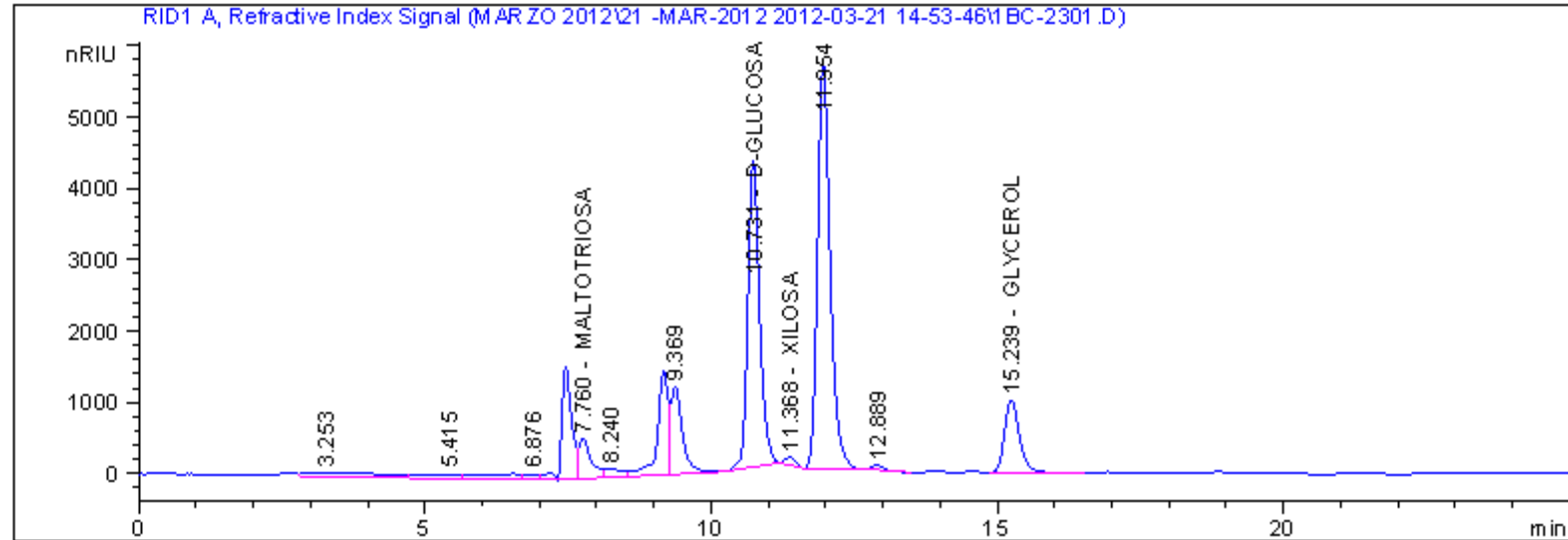
R2 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.169	VV	1493.19690	7.71743e-3	11.52364		DEXTRINA
8.219	VV	2362.07764	6.42900e-3	15.18581		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.751	BB	6.00318e4	6.25113e-3	375.26691		D-GLUCOSA
11.394	BB	1148.78918	5.72177e-3	6.57310		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.816		-	-	-		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

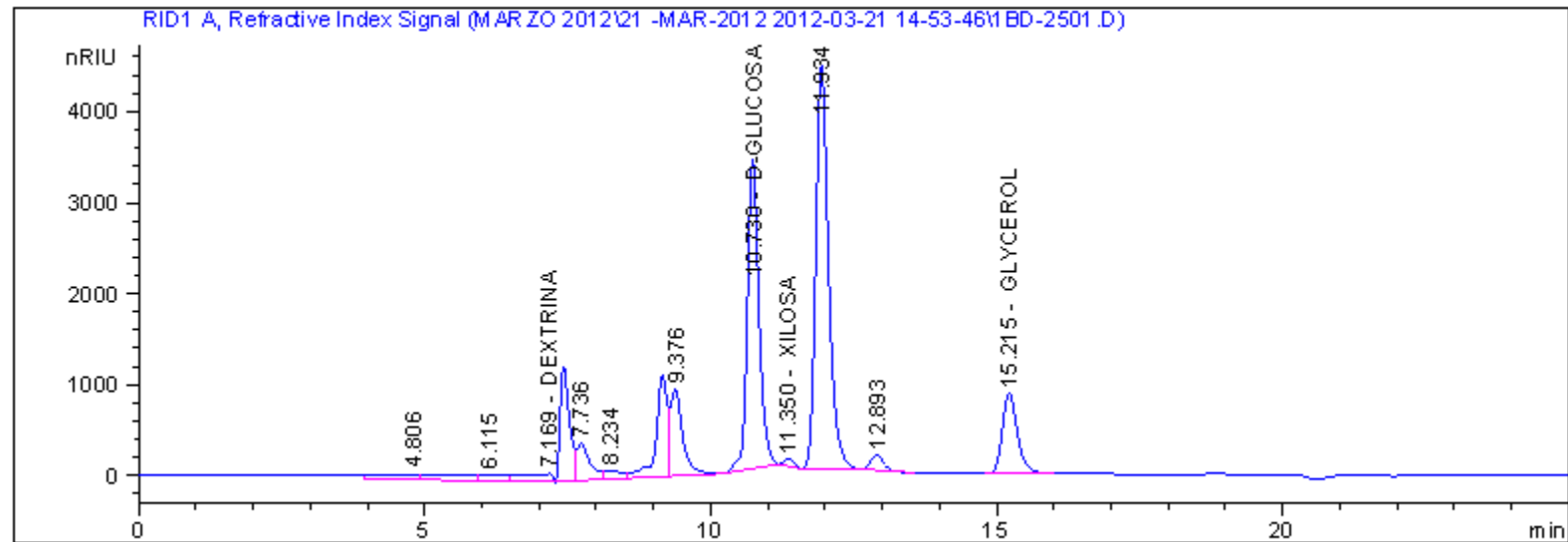
Totals : 408.54946

R3 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



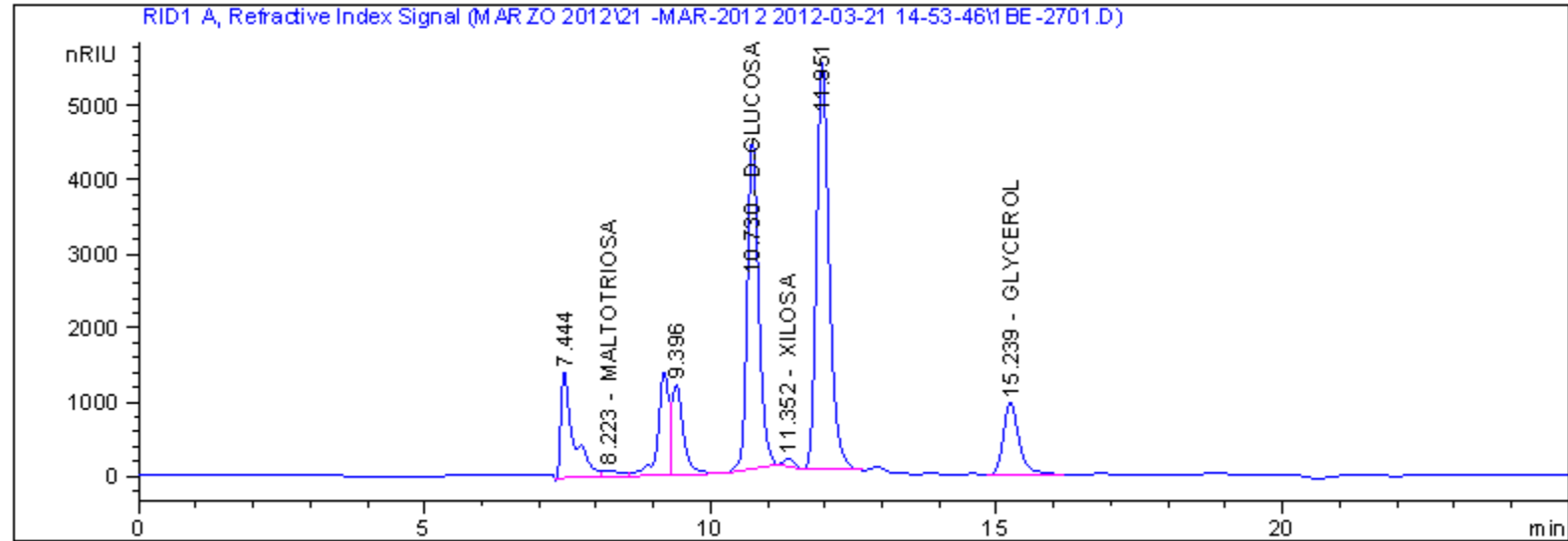
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.197	VV	1400.50427	7.71743e-3	10.80829		DEXTRINA
7.760	VV	8414.95703	6.42900e-3	54.09980		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.731	BB	6.12032e4	6.25113e-3	382.58915		D-GLUCOSA
11.368	BB	1449.01892	5.72177e-3	8.29095		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.239	BB	1.87366e4	7.86204e-3	147.30798		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				603.09616		

R1 170°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



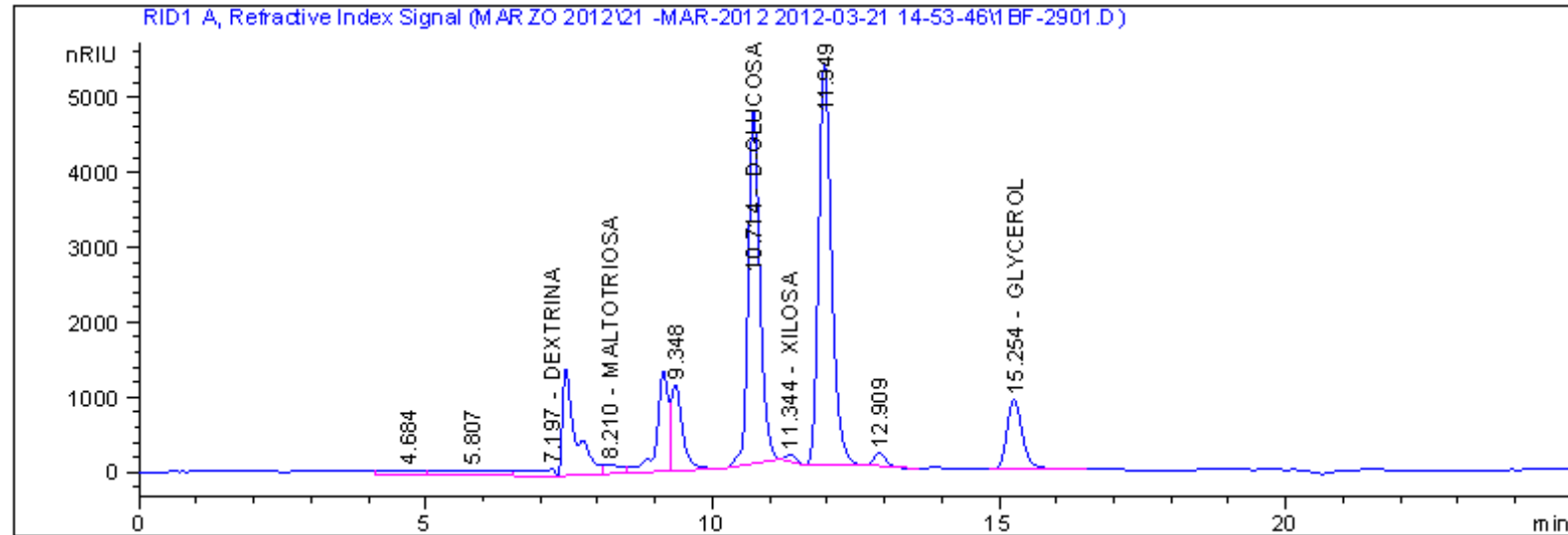
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.169	VV	3208.47827	7.71743e-3	24.76120		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.730	BB	4.81039e4	6.25113e-3	300.70372		D-GLUCOSA
11.350	BB	933.05560	5.72177e-3	5.33873		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.215	BB	1.61057e4	7.86204e-3	126.62339		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				457.42703		

R2 170°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



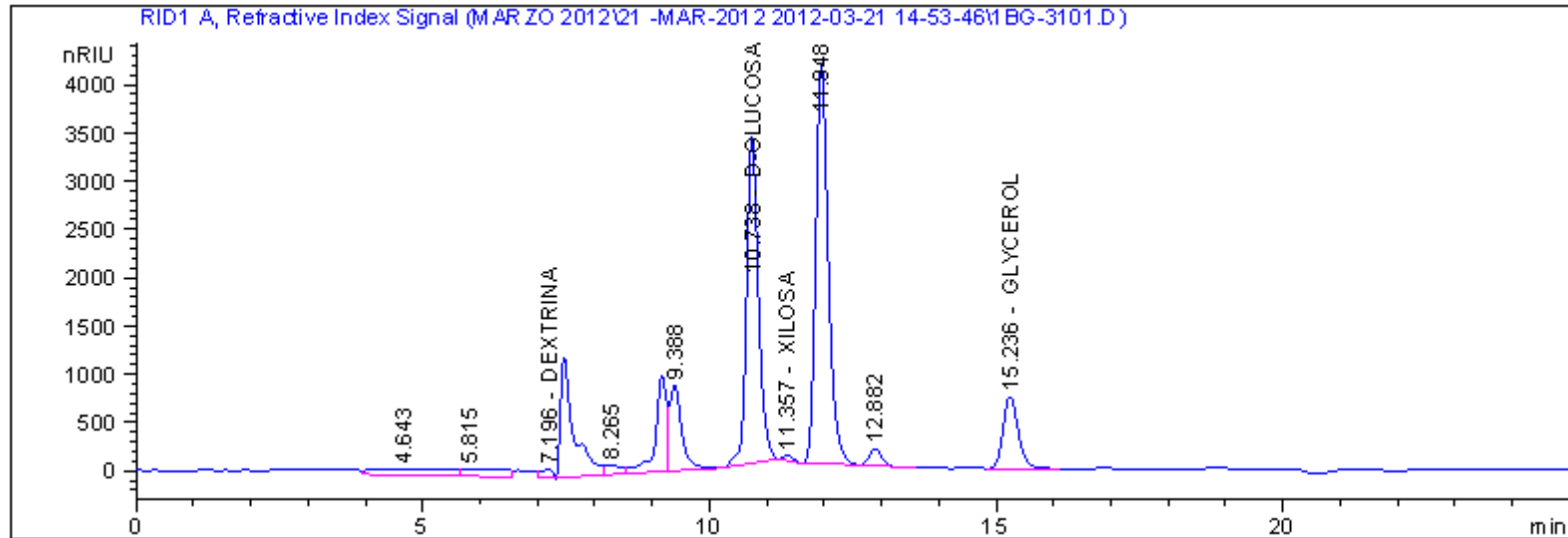
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
8.223	VV	1822.94006	6.42900e-3	11.71969	-	MALTOTRIOSIA
8.782	-	-	-	-	-	MALTOSA
10.730	BB	6.19333e4	6.25113e-3	387.15314	-	D-GLUCOSA
11.352	BB	1273.68982	5.72177e-3	7.28775	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
15.239	BB	1.84601e4	7.86204e-3	145.13392	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
23.187	-	-	-	-	-	ETHANOL
Totals :				551.29450		

R3 170°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.197	VV	2917.68335	7.71743e-3	22.51701		DEXTRINA
8.210	VV	2407.54272	6.42900e-3	15.47810		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.714	BB	6.69855e4	6.25113e-3	418.73504		D-GLUCOSA
11.344	BB	1092.88232	5.72177e-3	6.25322		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.254	BB	1.75238e4	7.86204e-3	137.77266		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				600.75603		

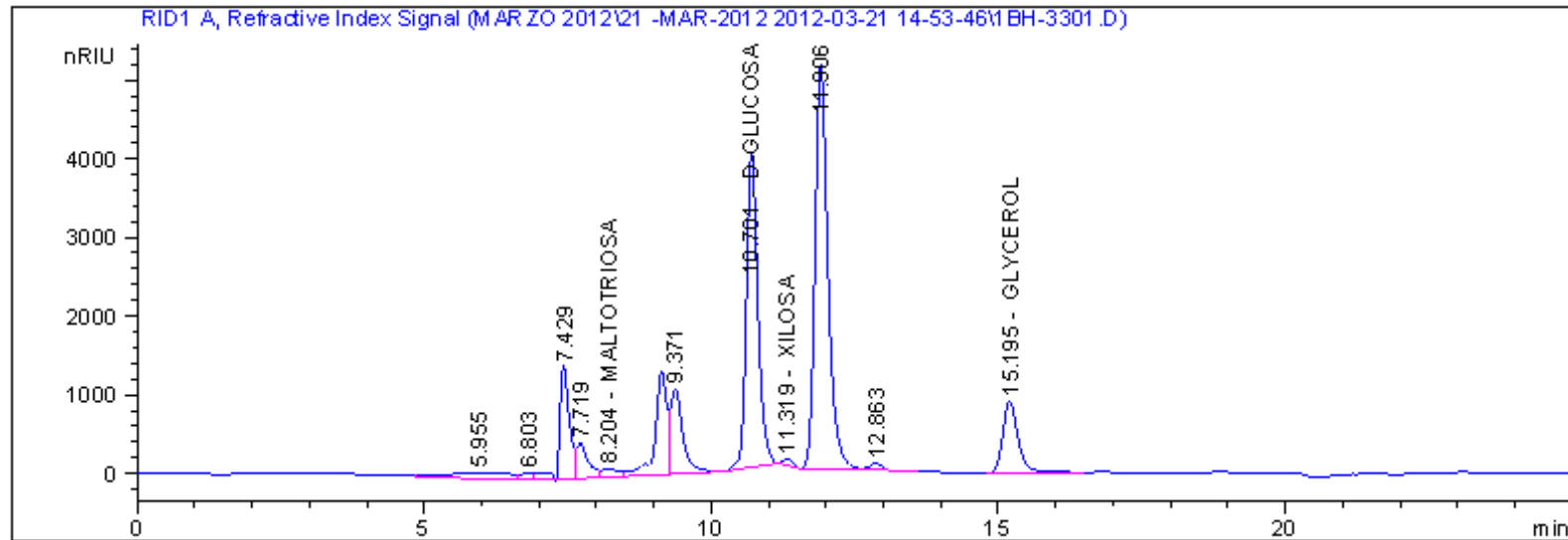
R1 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.196	BV	1146.85059	7.71743e-3	8.85074		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.738	BB	4.87326e4	6.25113e-3	304.63406		D-GLUCOSA
11.357	BB	692.71991	5.72177e-3	3.96358		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.236	BB	1.40095e4	7.86204e-3	110.14345		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

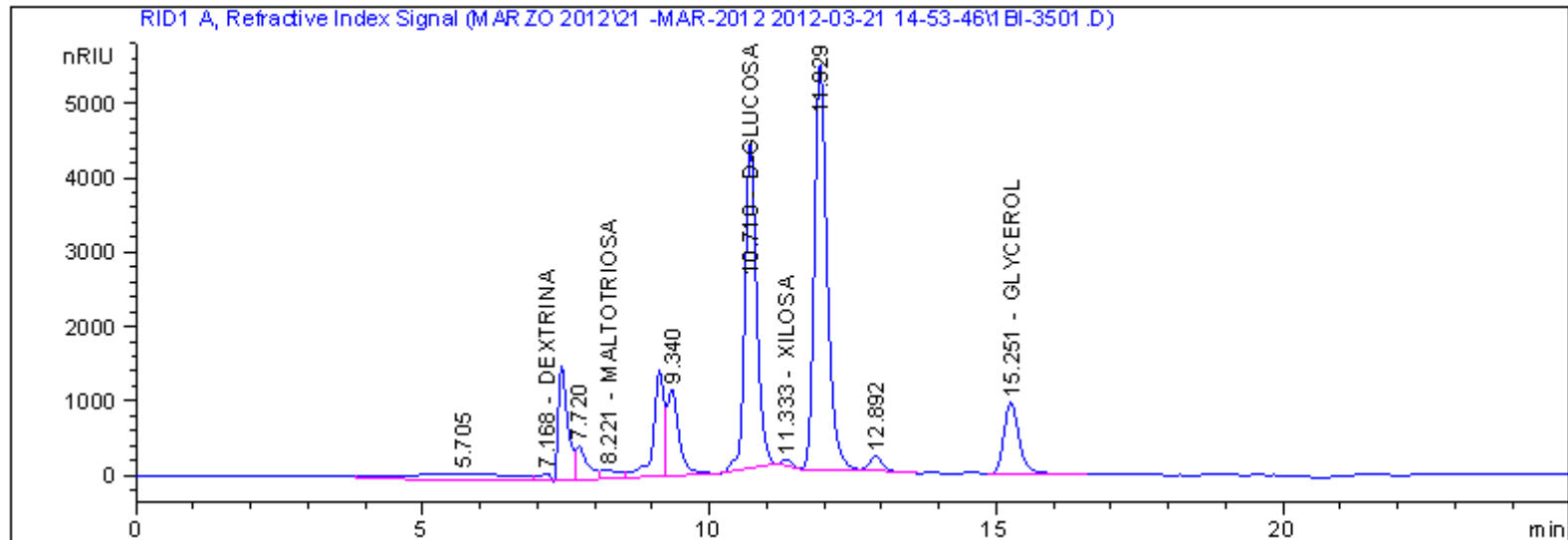
Totals : 427.59183

R2 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.173	VV	1553.68506	7.71743e-3	11.99045		DEXTRINA
8.204	VV	1979.22986	6.42900e-3	12.72448		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.701	BB	5.59918e4	6.25113e-3	350.01178		D-GLUCOSA
11.319	BB	1040.85730	5.72177e-3	5.95554		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.195	BB	1.70065e4	7.86204e-3	133.70580		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				514.38805		

R3 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v

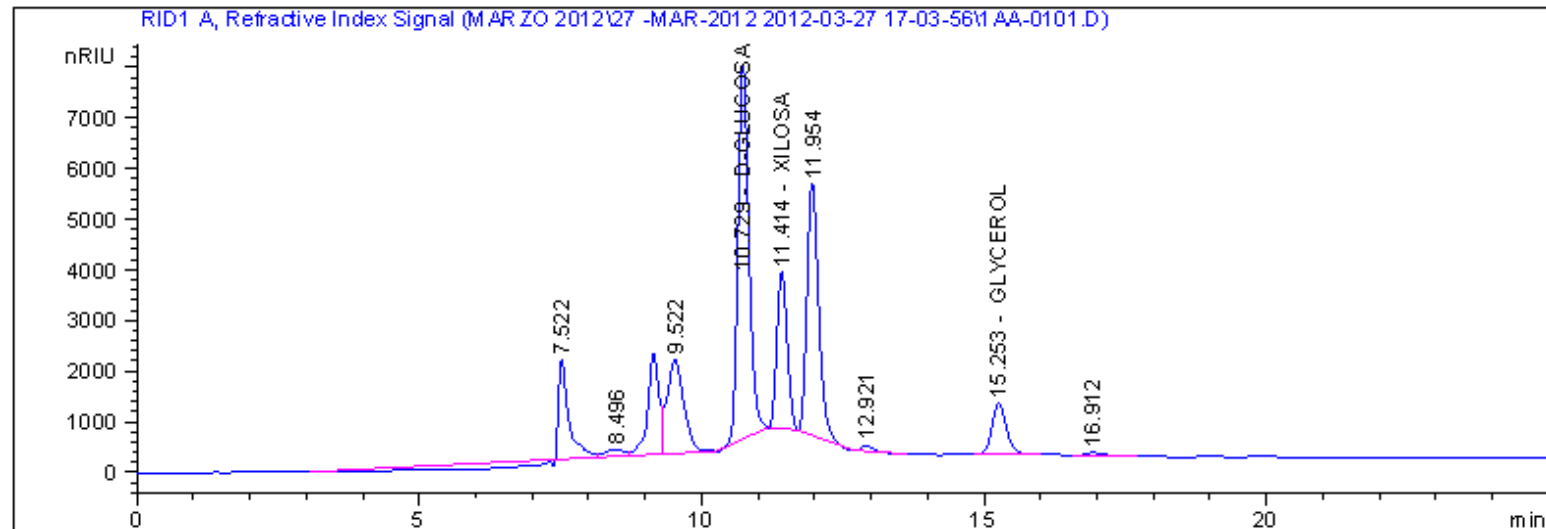


RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.168	VV	1563.11218	7.71743e-3	12.06321		DEXTRINA
8.221	VV	2641.30176	6.42900e-3	16.98094		MALTOTRIOSIA
8.782		-	-	-		MALTOSA
10.710	BB	6.24801e4	6.25113e-3	390.57136		D-GLUCOSA
11.333	BB	1067.14526	5.72177e-3	6.10595		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
15.251	BB	1.80271e4	7.86204e-3	141.72952		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 567.45098

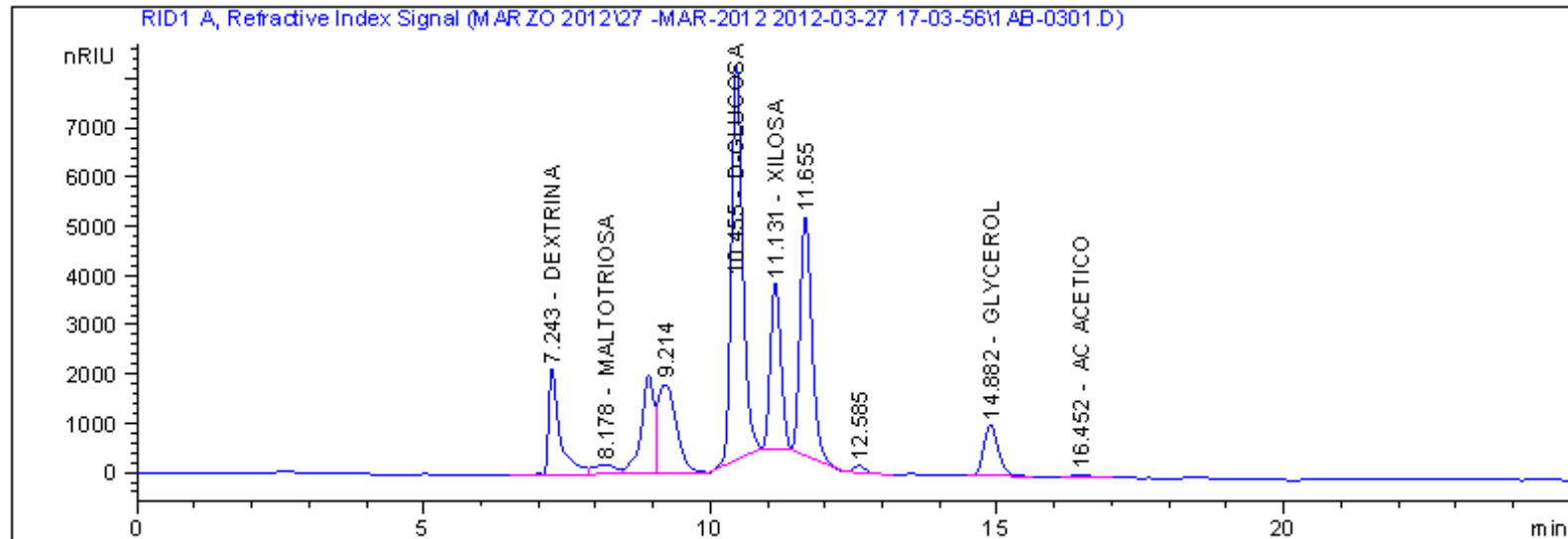
**ANEXO 16 CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE BIOMASA
PRETRATADA CON ÁLCALI**

R1 160°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.782	-	-	-	-	-	MALTOSA
10.729	BB	9.98613e4	6.25113e-3	624.24608	-	D-GLUCOSA
11.414	BB	3.93405e4	5.72177e-3	225.09733	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
15.253	BB	1.79325e4	7.86204e-3	140.98617	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
23.187	-	-	-	-	-	ETHANOL
Totals :				990.32958		

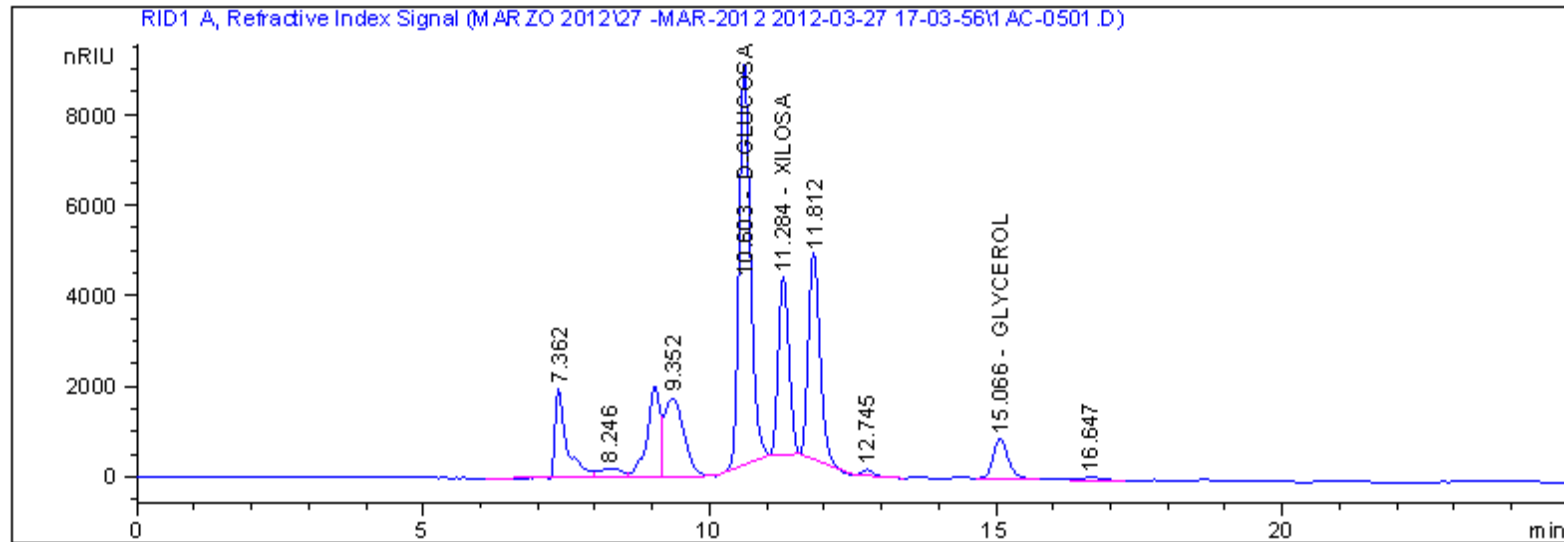
R2 160°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.243	VV	2.99354e4	7.71743e-3	231.02403		DEXTRINA
8.178	VV	5072.23193	6.42900e-3	32.60940		MALTOTRIOSIA
8.921	VV	3.05689e4	6.75013e-3	206.34432		MALTOSA
10.455	BB	1.10322e5	6.25113e-3	689.63984		D-GLUCOSA
11.131	BB	4.29718e4	5.72177e-3	245.87449		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.882	BB	1.86526e4	7.86204e-3	146.64769		GLYCEROL
16.452	BB	1358.48718	4.94623e-3	6.71938		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 1558.85916

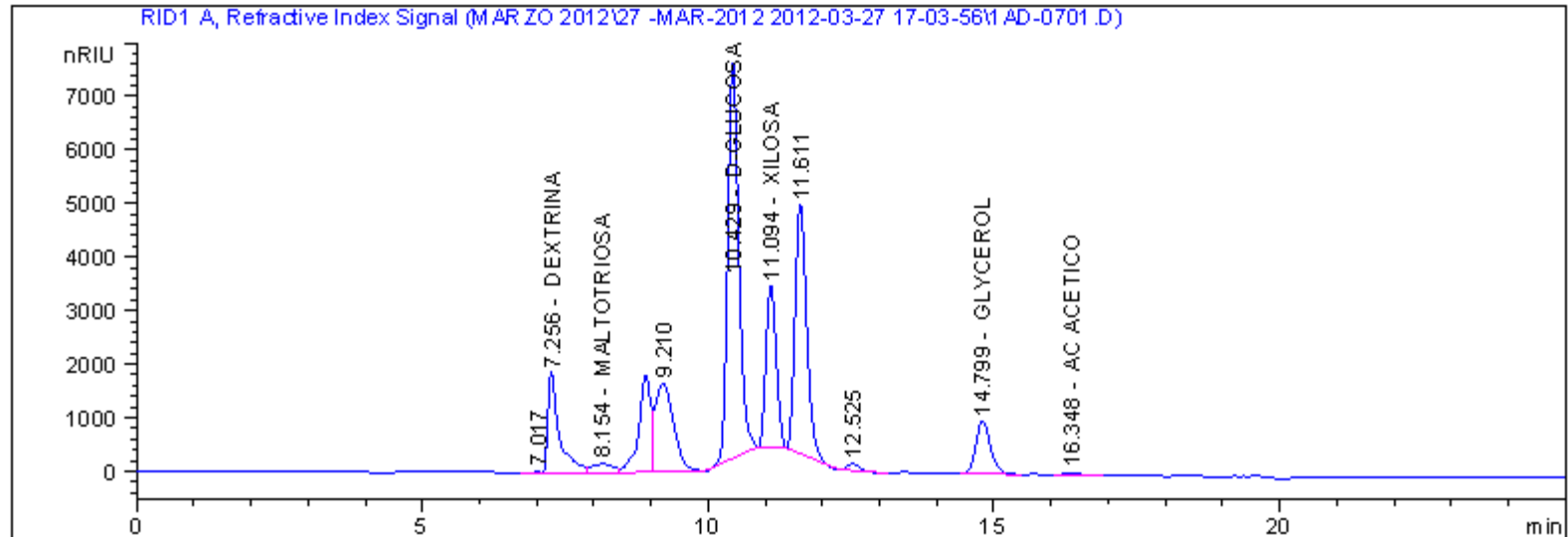
R3 160°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
9.041	VV	3.21643e4	6.75013e-3	217.11307	-	MALTOSA
10.603	BB	1.22077e5	6.25113e-3	763.11802	-	D-GLUCOSA
11.284	BB	5.09774e4	5.72177e-3	291.68064	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
15.066	BB	1.58802e4	7.86204e-3	124.85057	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
23.187	-	-	-	-	-	ETHANOL

Totals : 1396.76229

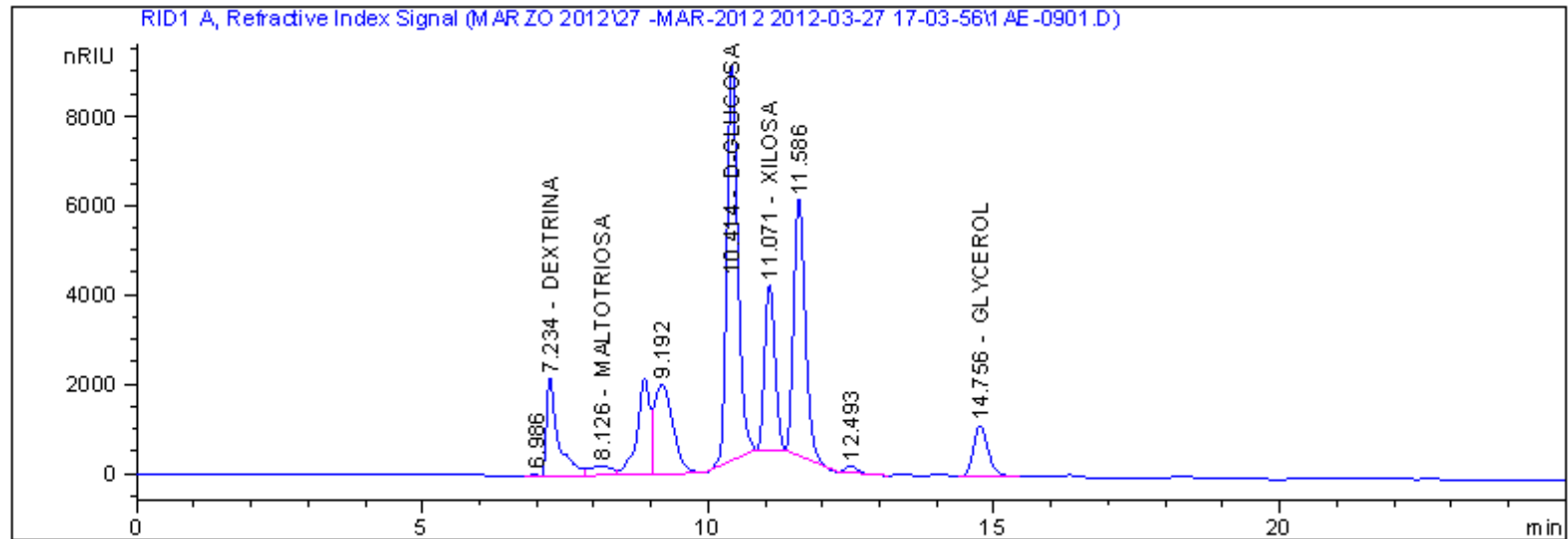
R1 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.256	VV	2.69737e4	7.71743e-3	208.16724		DEXTRINA
8.154	VV	4480.44482	6.42900e-3	28.80480		MALTOTRIOSIA
8.906	VV	2.70946e4	6.75013e-3	182.89225		MALTOSA
10.429	BB	9.98868e4	6.25113e-3	624.40514		D-GLUCOSA
11.094	BB	3.80103e4	5.72177e-3	217.48619		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.799	BB	1.75976e4	7.86204e-3	138.35334		GLYCEROL
16.348	BB	1071.48206	4.94623e-3	5.29979		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 1405.40876

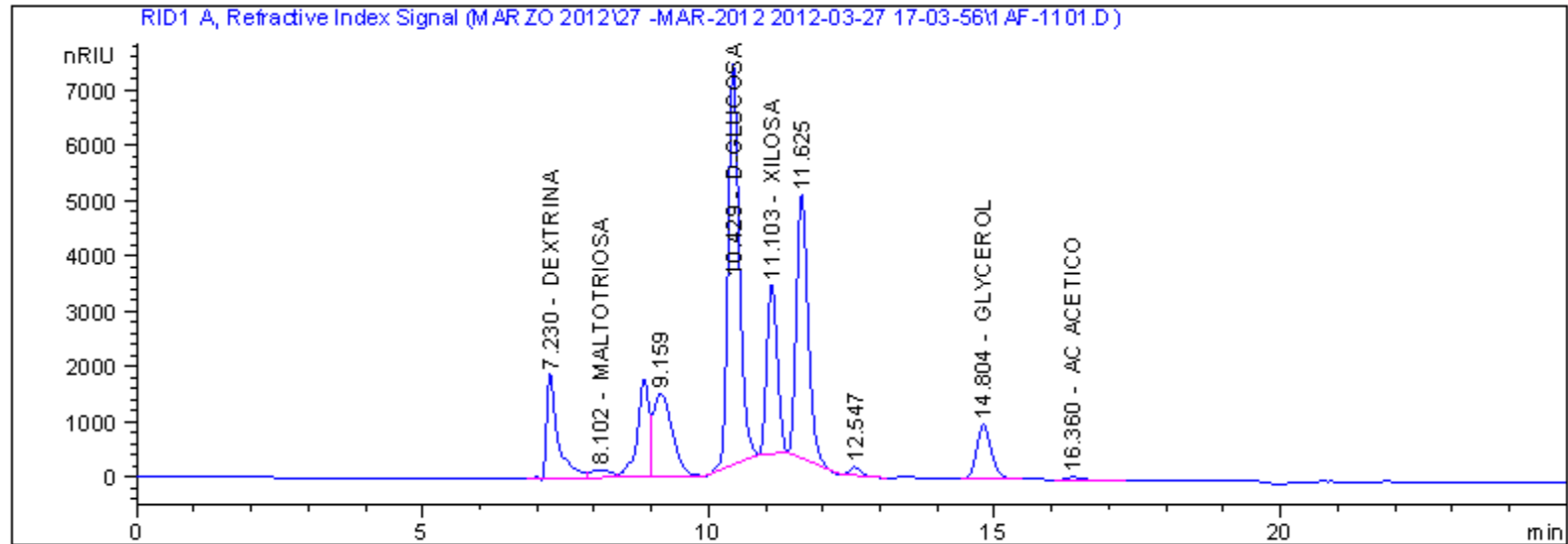
R2 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.234	VV	3.19814e4	7.71743e-3	246.81425		DEXTRINA
8.126	VV	5812.10742	6.42900e-3	37.36607		MALTOTRIOSIA
8.886	VV	3.32903e4	6.75013e-3	224.71389		MALTOSA
10.414	BB	1.19102e5	6.25113e-3	744.52266		D-GLUCOSA
11.071	BB	4.63231e4	5.72177e-3	265.05015		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.756	BB	2.03204e4	7.86204e-3	159.75950		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 1678.22653

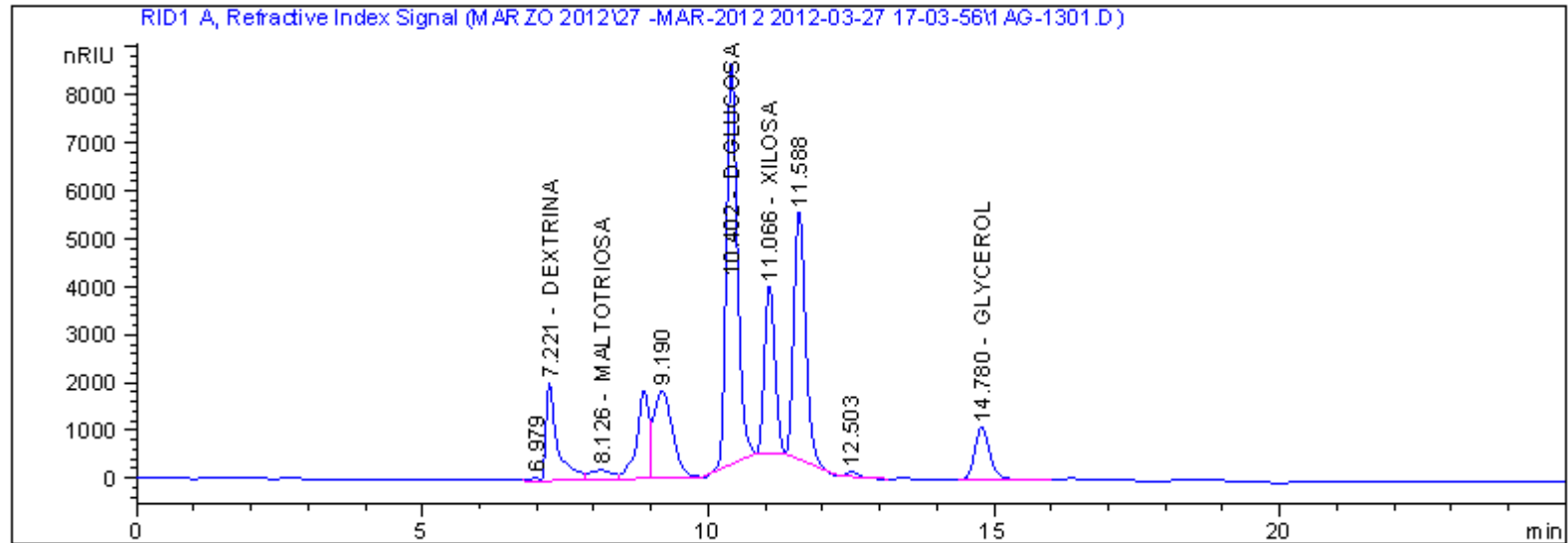
R3 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.230	VV	2.59588e4	7.71743e-3	200.33518		DEXTRINA
8.102	VV	3449.52759	6.42900e-3	22.17703		MALTOTRIOSIA
8.872	VV	2.61005e4	6.75013e-3	176.18164		MALTOSA
10.429	BB	9.93528e4	6.25113e-3	621.06753		D-GLUCOSA
11.103	BB	3.94091e4	5.72177e-3	225.48965		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.804	BB	1.73079e4	7.86204e-3	136.07538		GLYCEROL
16.360	BB	1326.47327	4.94623e-3	6.56104		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 1387.88744

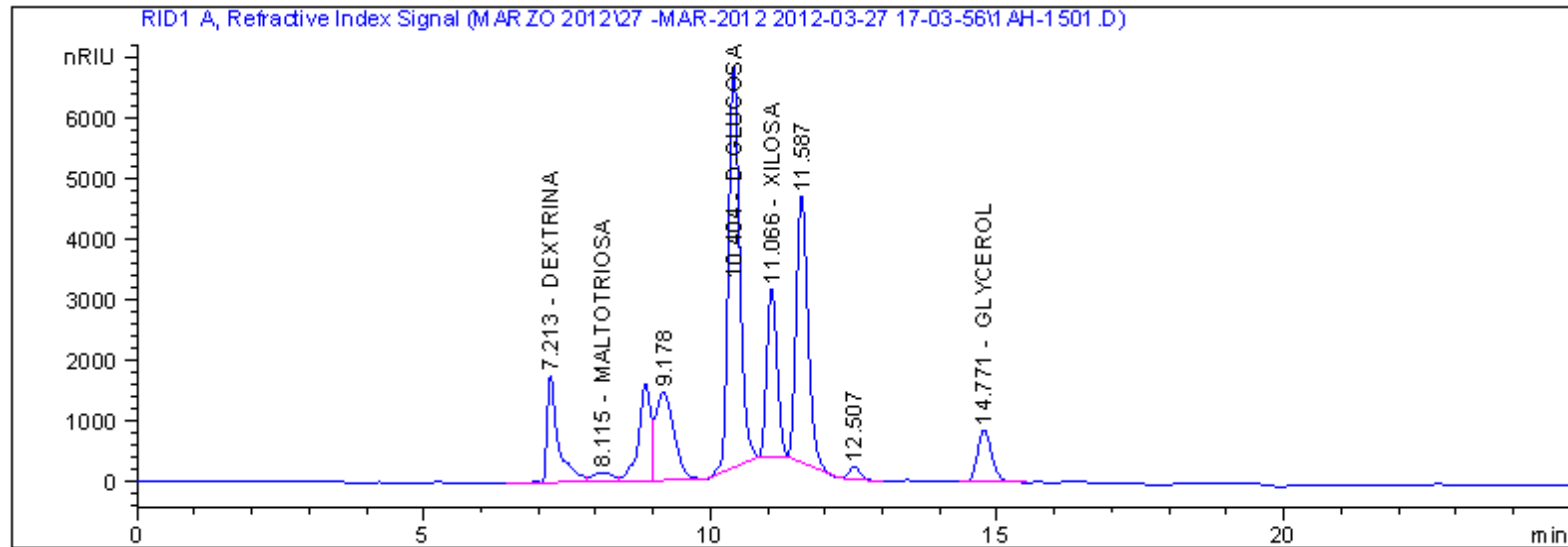
R1 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.221	VV	2.87738e4	7.71743e-3	222.05988		DEXTRINA
8.126	VV	5350.56738	6.42900e-3	34.39882		MALTOTRIOSIA
8.874	VV	2.81300e4	6.75013e-3	189.88137		MALTOSA
10.402	BB	1.12012e5	6.25113e-3	700.20425		D-GLUCOSA
11.066	BB	4.45034e4	5.72177e-3	254.63777		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.780	BB	2.01572e4	7.86204e-3	158.47666		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 1559.65876

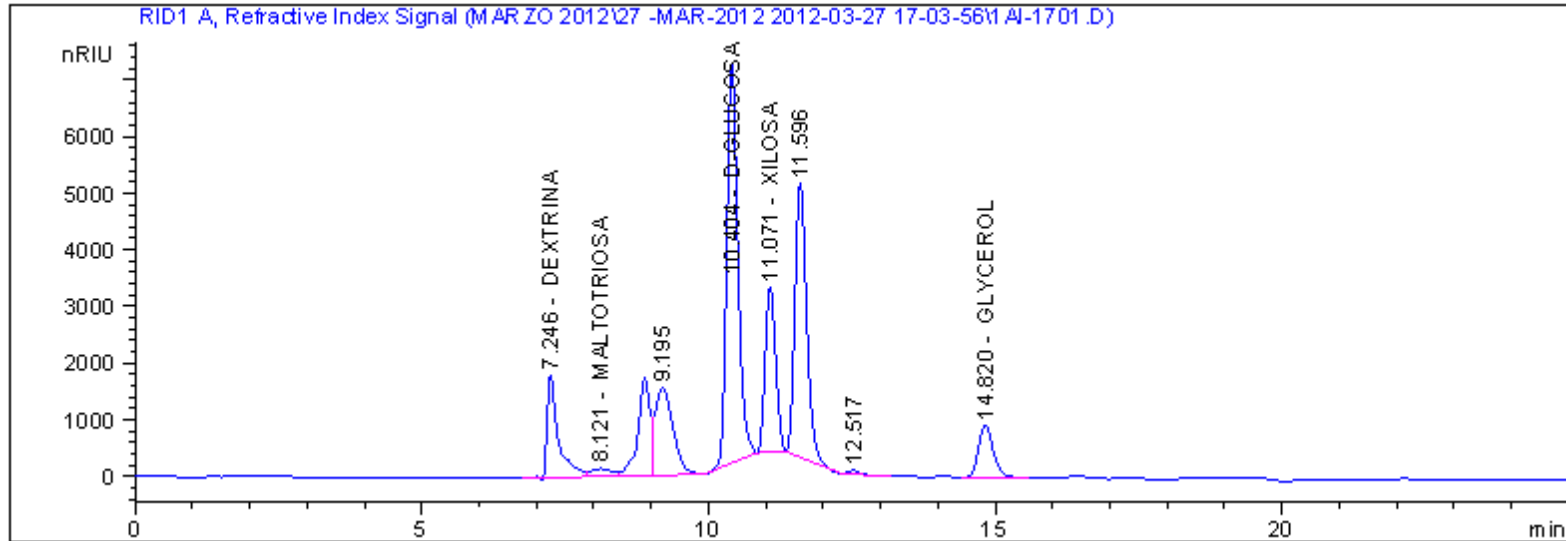
R2 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.213	VV	2.41675e4	7.71743e-3	186.51060		DEXTRINA
8.115	VV	3678.96558	6.42900e-3	23.65209		MALTOTRIOSIA
8.868	VV	2.44462e4	6.75013e-3	165.01520		MALTOSA
10.404	BB	9.09504e4	6.25113e-3	568.54304		D-GLUCOSA
11.066	BB	3.49839e4	5.72177e-3	200.16956		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.771	BB	1.49380e4	7.86204e-3	117.44301		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 1261.33350

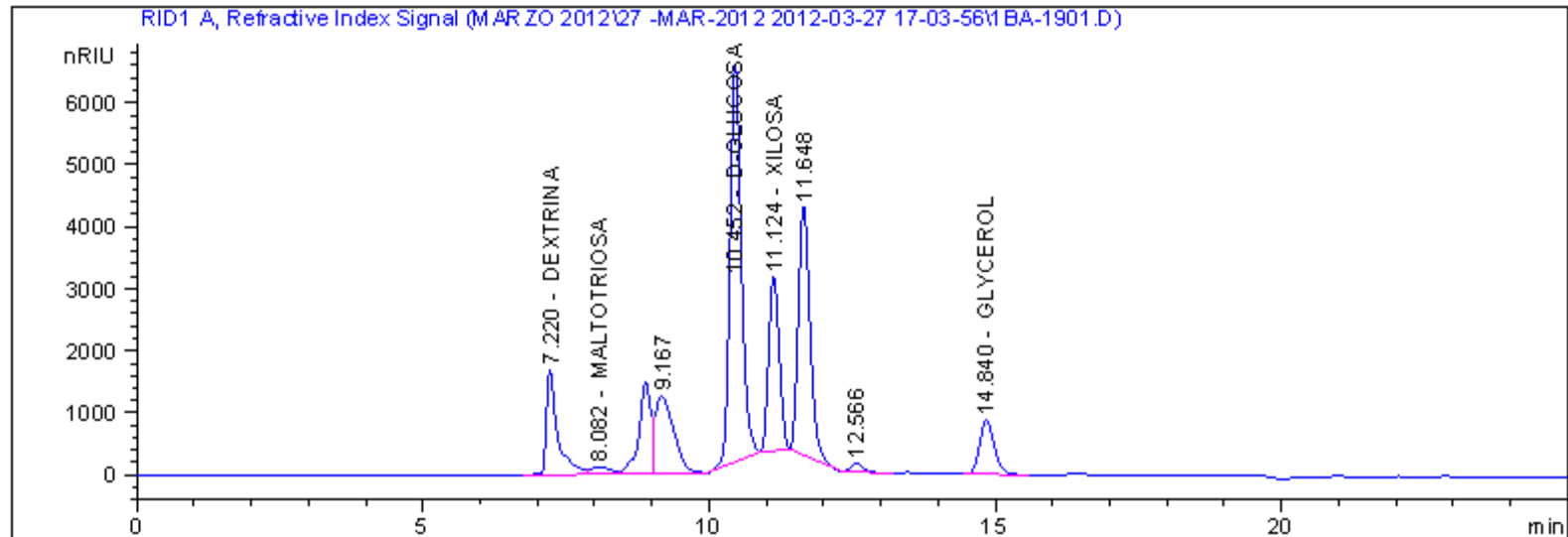
R3 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.246	VV	2.46123e4	7.71743e-3	189.94401		DEXTRINA
8.121	VV	3615.07300	6.42900e-3	23.24132		MALTOTRIOSIA
8.885	VV	2.57365e4	6.75013e-3	173.72472		MALTOSA
10.404	BB	9.55181e4	6.25113e-3	597.09620		D-GLUCOSA
11.071	BB	3.71863e4	5.72177e-3	212.77150		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.820	BB	1.64779e4	7.86204e-3	129.54968		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

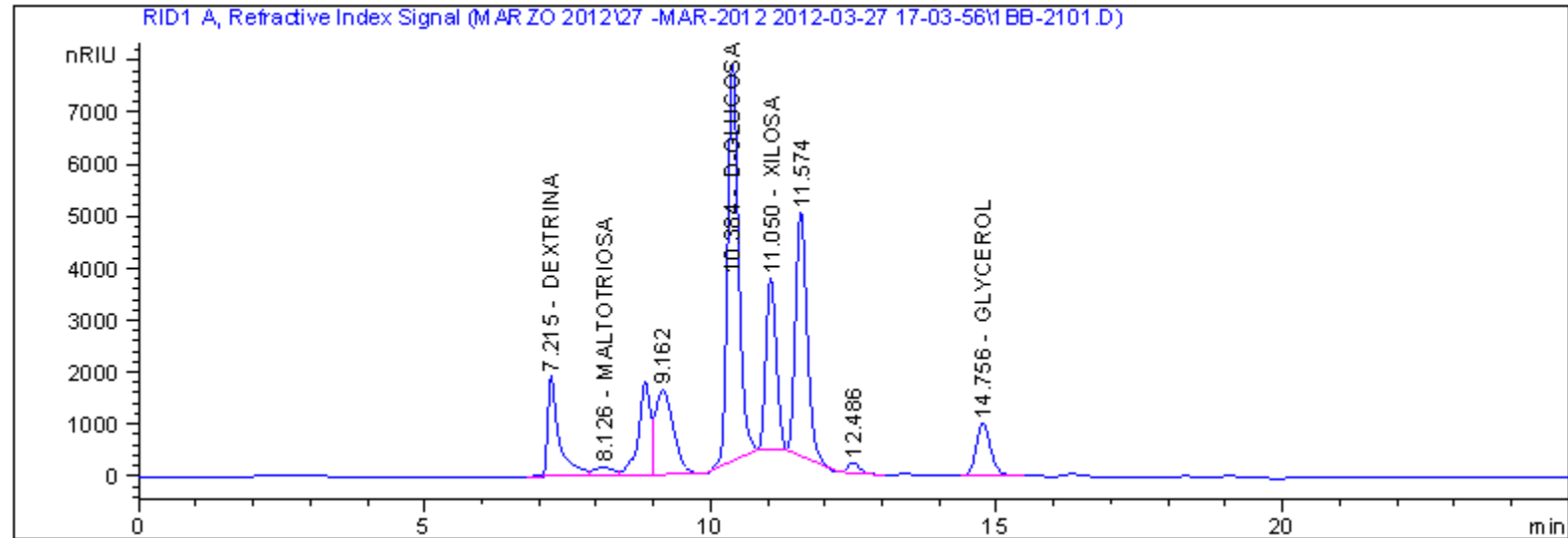
Totals : 1326.32745

R1 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.220	VV	2.34431e4	7.71743e-3	180.92061		DEXTRINA
8.082	VV	2863.91553	6.42900e-3	18.41213		MALTOTRIOSIA
8.887	VV	2.16652e4	6.75013e-3	146.24325		MALTOSA
10.452	BB	8.82097e4	6.25113e-3	551.41030		D-GLUCOSA
11.124	BB	3.62036e4	5.72177e-3	207.14835		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.840	BB	1.55674e4	7.86204e-3	122.39177		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				1226.52641		

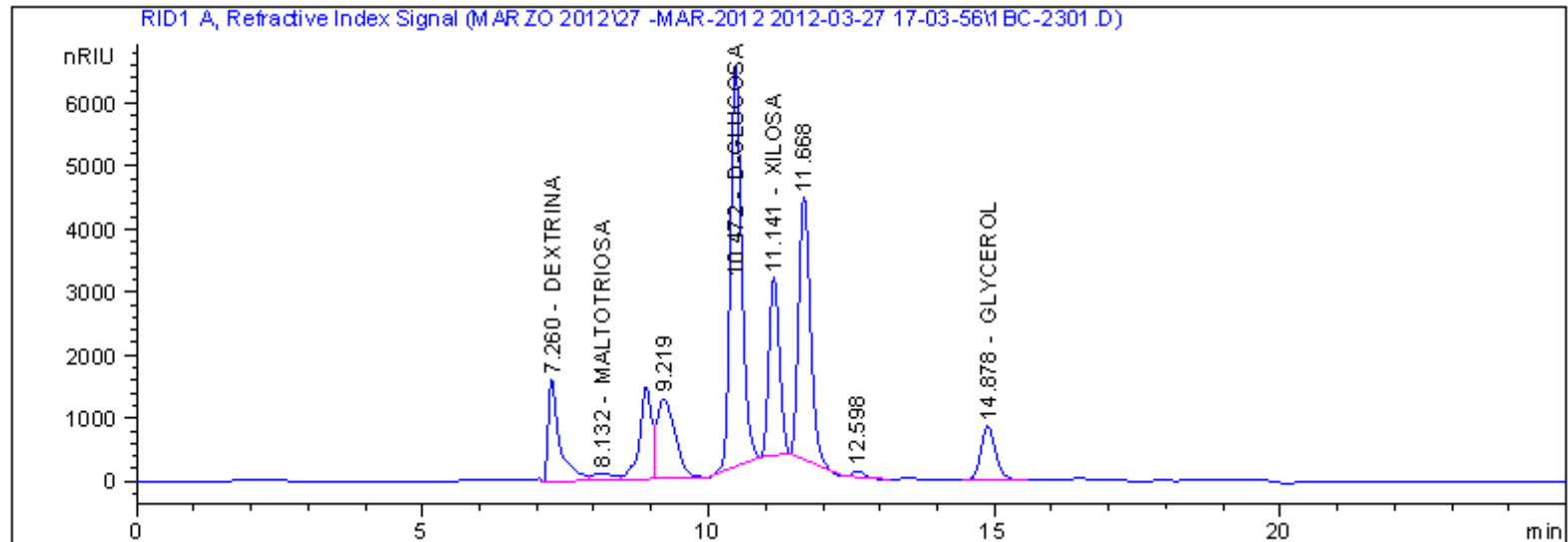
R2 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.215	VV	2.64615e4	7.71743e-3	204.21464		DEXTRINA
8.126	VV	3762.28882	6.42900e-3	24.18777		MALTOTRIOSIA
8.857	VV	2.62426e4	6.75013e-3	177.14127		MALTOSA
10.384	BB	1.02343e5	6.25113e-3	639.75665		D-GLUCOSA
11.050	BB	4.17927e4	5.72177e-3	239.12788		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.756	BB	1.77569e4	7.86204e-3	139.60562		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 1424.03382

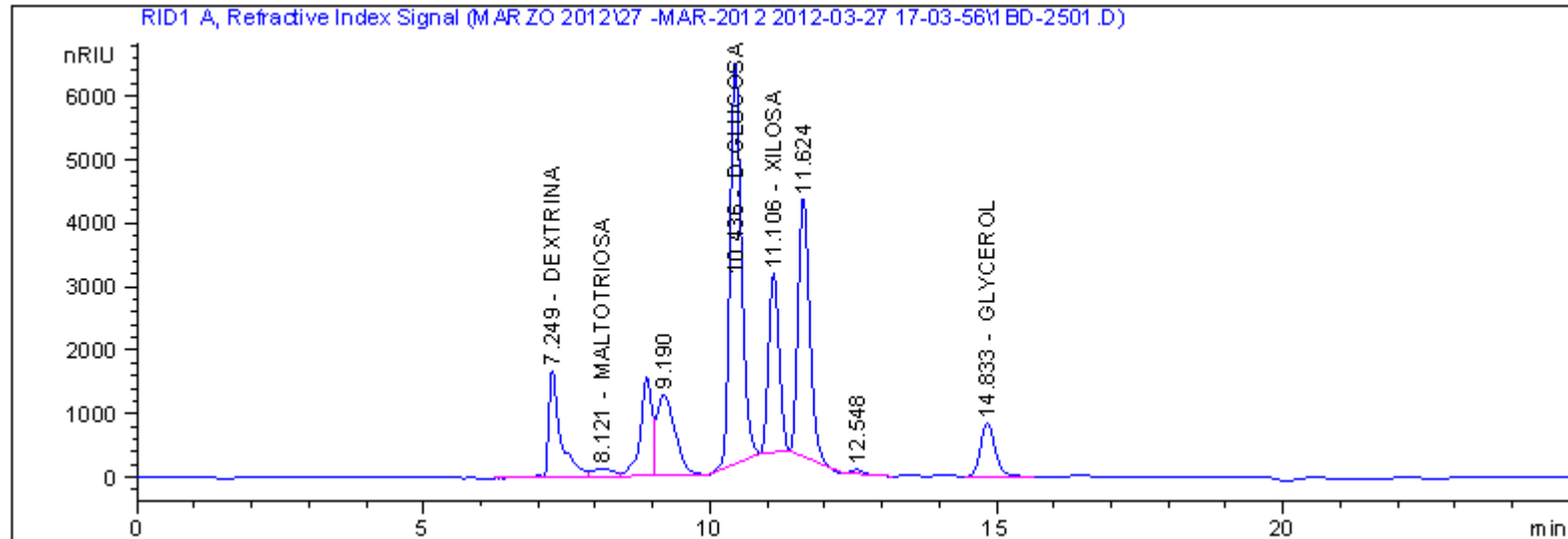
R3 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.260	VV	2.26885e4	7.71743e-3	175.09662		DEXTRINA
8.132	VV	2807.02319	6.42900e-3	18.04637		MALTOTRIOSIA
8.909	VV	2.17213e4	6.75013e-3	146.62156		MALTOSA
10.472	BB	8.70945e4	6.25113e-3	544.43893		D-GLUCOSA
11.141	BB	3.63179e4	5.72177e-3	207.80258		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.878	BB	1.52082e4	7.86204e-3	119.56745		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 1211.57350

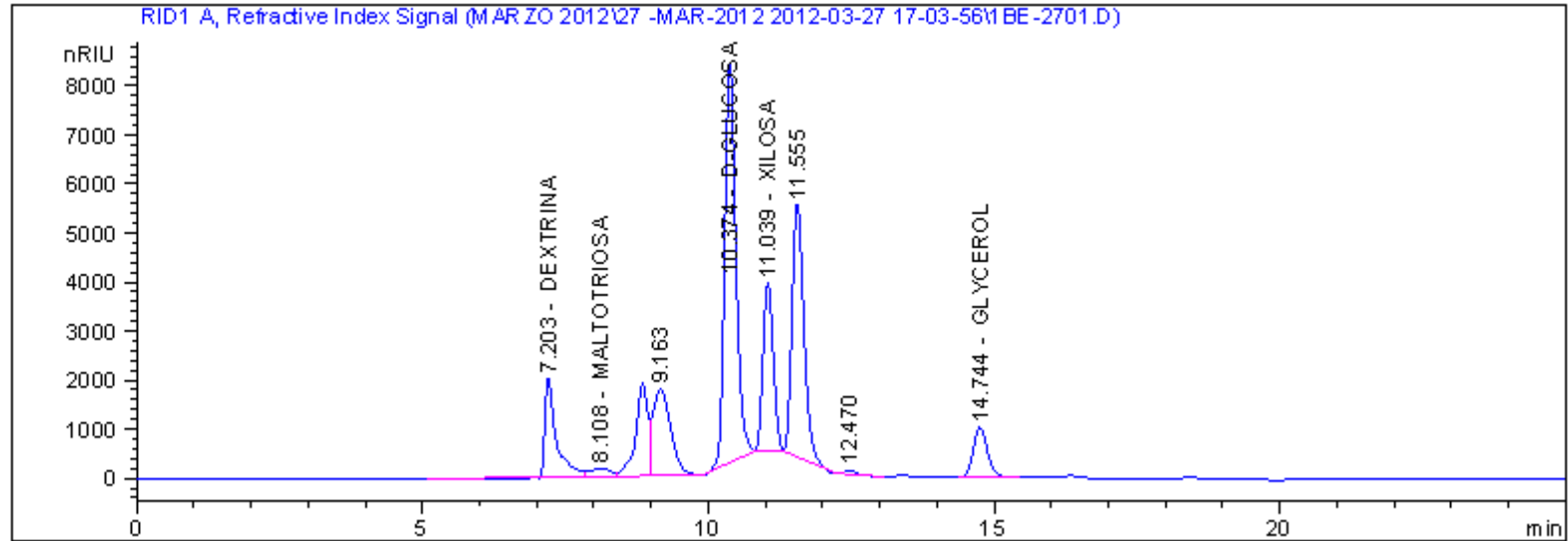
R1 170°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.249	BV	2.42517e4	7.71743e-3	187.16046		DEXTRINA
8.121	VV	2992.93213	6.42900e-3	19.24158		MALTOTRIOSIA
8.894	VV	2.25369e4	6.75013e-3	152.12677		MALTOSA
10.436	BB	8.71283e4	6.25113e-3	544.65005		D-GLUCOSA
11.106	BB	3.59441e4	5.72177e-3	205.66369		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.833	BB	1.49735e4	7.86204e-3	117.72261		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

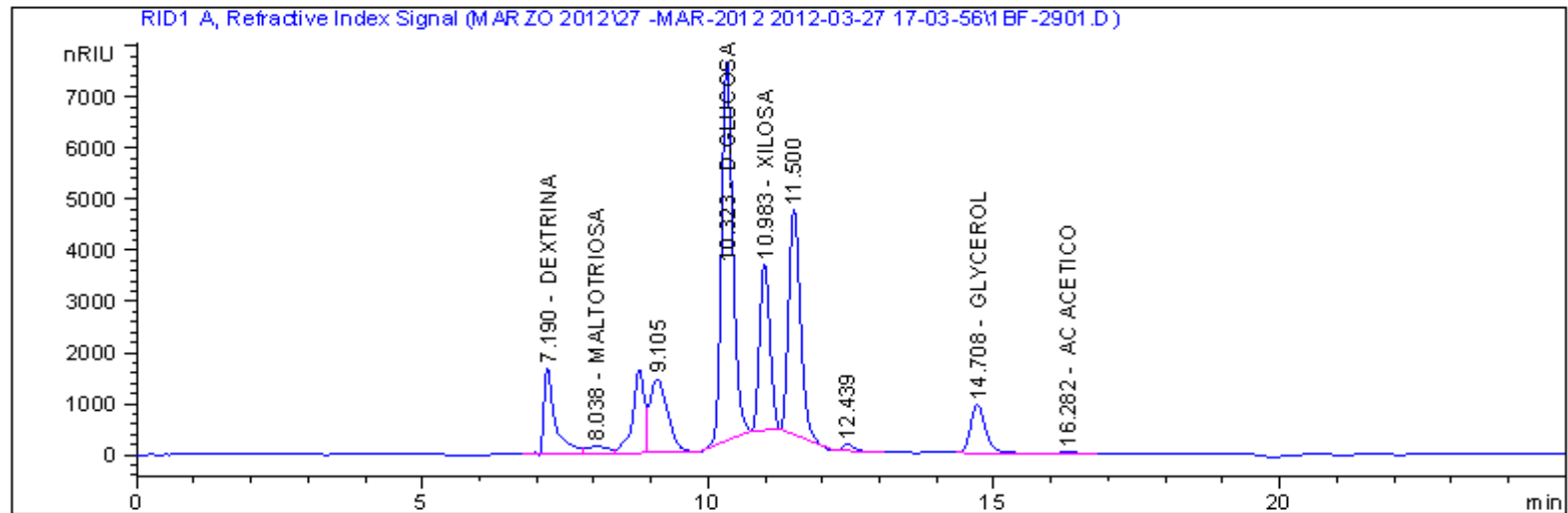
Totals : 1226.56515

R2 170°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.203	VV	2.73332e4	7.71743e-3	210.94199		DEXTRINA
8.108	VV	4246.02002	6.42900e-3	27.29768		MALTOTRIOSIA
8.849	VV	2.83099e4	6.75013e-3	191.09589		MALTOSA
10.374	BB	1.11382e5	6.25113e-3	696.26604		D-GLUCOSA
11.039	BB	4.30432e4	5.72177e-3	246.28321		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.744	BB	1.76857e4	7.86204e-3	139.04551		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				1510.93032		

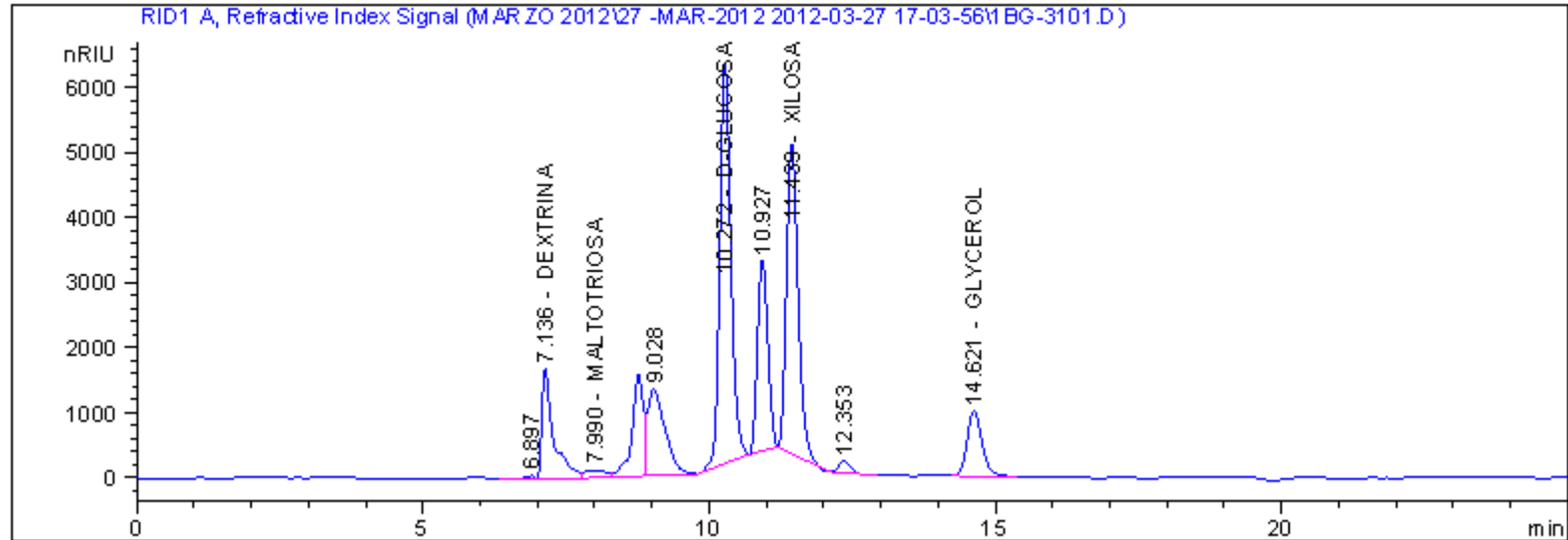
R3 170°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.190	VV	2.33491e4	7.71743e-3	180.19473		DEXTRINA
8.038	VV	3552.61353	6.42900e-3	22.83977		MALTOTRIOSIA
8.793	VV	2.37568e4	6.75013e-3	160.36153		MALTOSA
10.323	BB	1.00905e5	6.25113e-3	630.76801		D-GLUCOSA
10.983	BB	4.09849e4	5.72177e-3	234.50603		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.708	BB	1.74553e4	7.86204e-3	137.23441		GLYCEROL
16.282	BB	1185.26648	4.94623e-3	5.86260		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 1371.76708

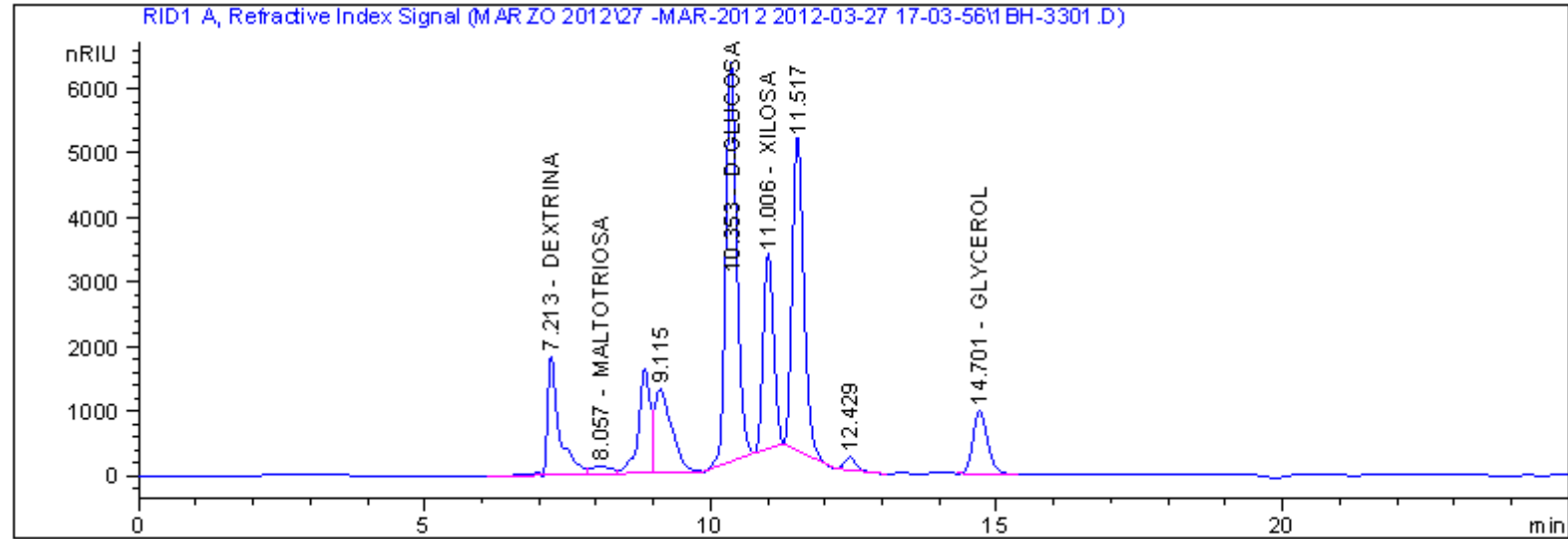
R1 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.136	VV	2.45118e4	7.71743e-3	189.16805		DEXTRINA
7.990	VV	3152.66113	6.42900e-3	20.26847		MALTOTRIOSIA
8.762	VV	2.21894e4	6.75013e-3	149.78125		MALTOSA
10.272	BB	8.32926e4	6.25113e-3	520.67296		D-GLUCOSA
11.439	BB	6.73044e4	5.72177e-3	385.09983		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.621	BB	1.79931e4	7.86204e-3	141.46256		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 1406.45312

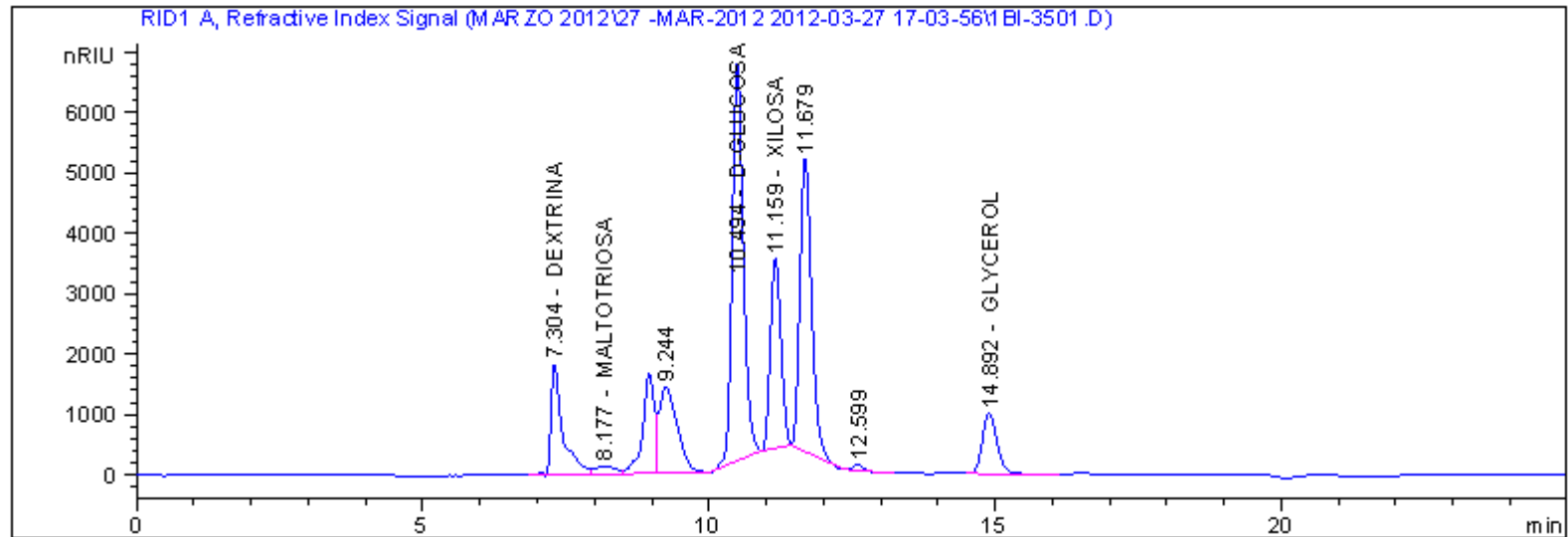
R2 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.213	VV	2.66450e4	7.71743e-3	205.63053		DEXTRINA
8.057	VV	2864.65161	6.42900e-3	18.41686		MALTOTRIOSIA
8.850	VV	2.29809e4	6.75013e-3	155.12423		MALTOSA
10.353	BB	8.33130e4	6.25113e-3	520.80018		D-GLUCOSA
11.006	BB	3.79429e4	5.72177e-3	217.10031		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.701	BB	1.73889e4	7.86204e-3	136.71234		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL

Totals : 1253.78444

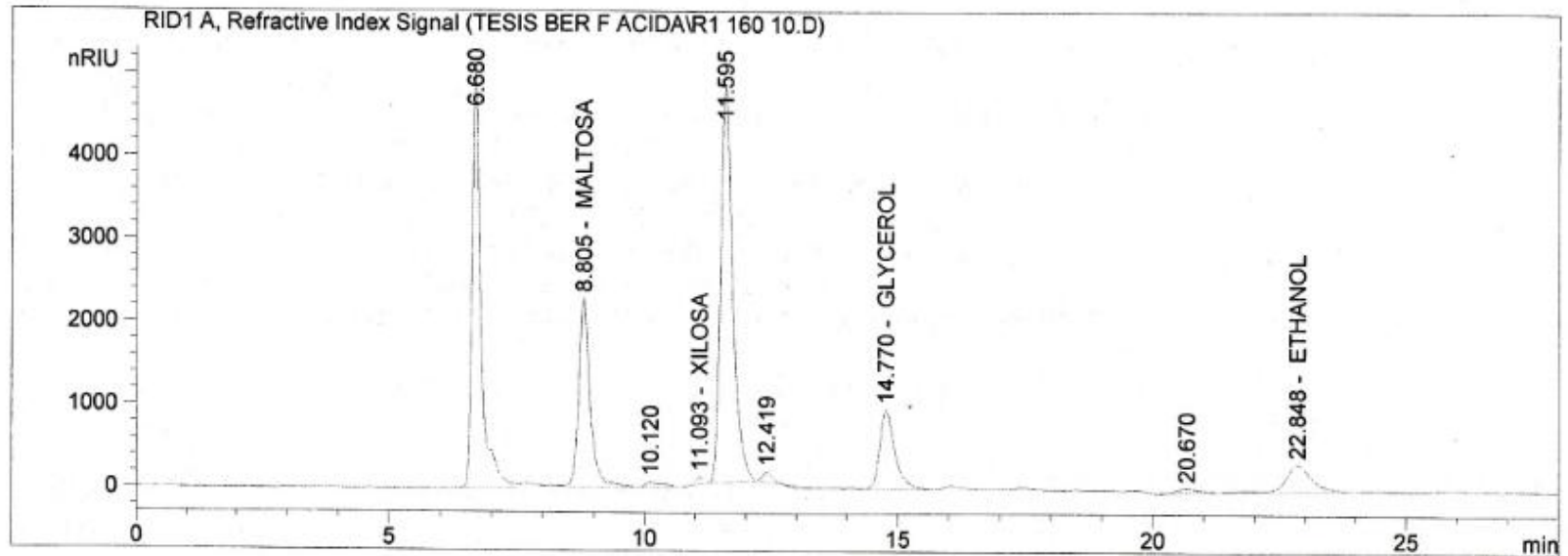
R3 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.304	VV	2.62858e4	7.71743e-3	202.85871		DEXTRINA
8.177	VV	3139.17920	6.42900e-3	20.18180		MALTOTRIOSIA
8.954	VV	2.38780e4	6.75013e-3	161.17957		MALTOSA
10.494	BB	8.89538e4	6.25113e-3	556.06188		D-GLUCOSA
11.159	BB	4.04778e4	5.72177e-3	231.60431		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.892	BB	1.78886e4	7.86204e-3	140.64087		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.187		-	-	-		ETHANOL
Totals :				1312.52714		

ANEXO 17 CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC EN LA FERMENTACIÓN DE BIOMASA PRETRATADA CON ÁCIDO E HIDROLIZADA

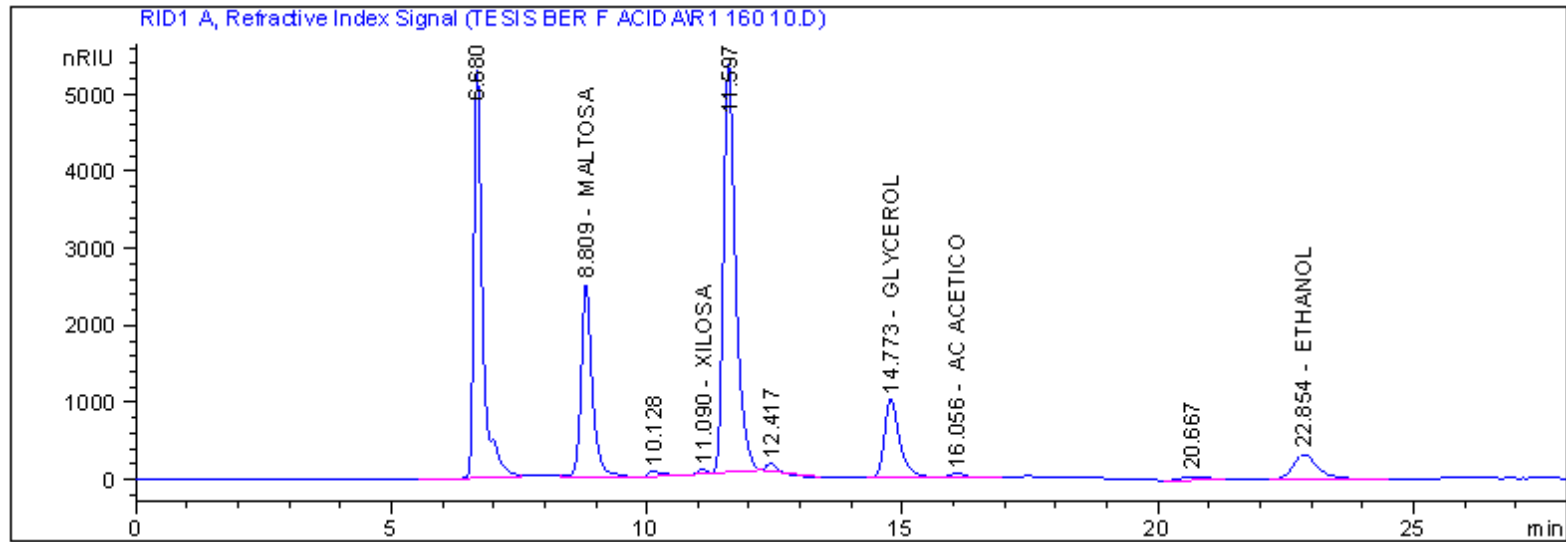
R1 160°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 Horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.805	VB	3.52222e4	6.75013e-3	237.75470	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.093	BB	910.71039	5.72177e-3	5.21087	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.770	BB	1.97060e4	7.86204e-3	154.92958	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.848	BB	1.19875e4	1.51736e-2	181.89342	-	ETHANOL
Totals :				579.78857		

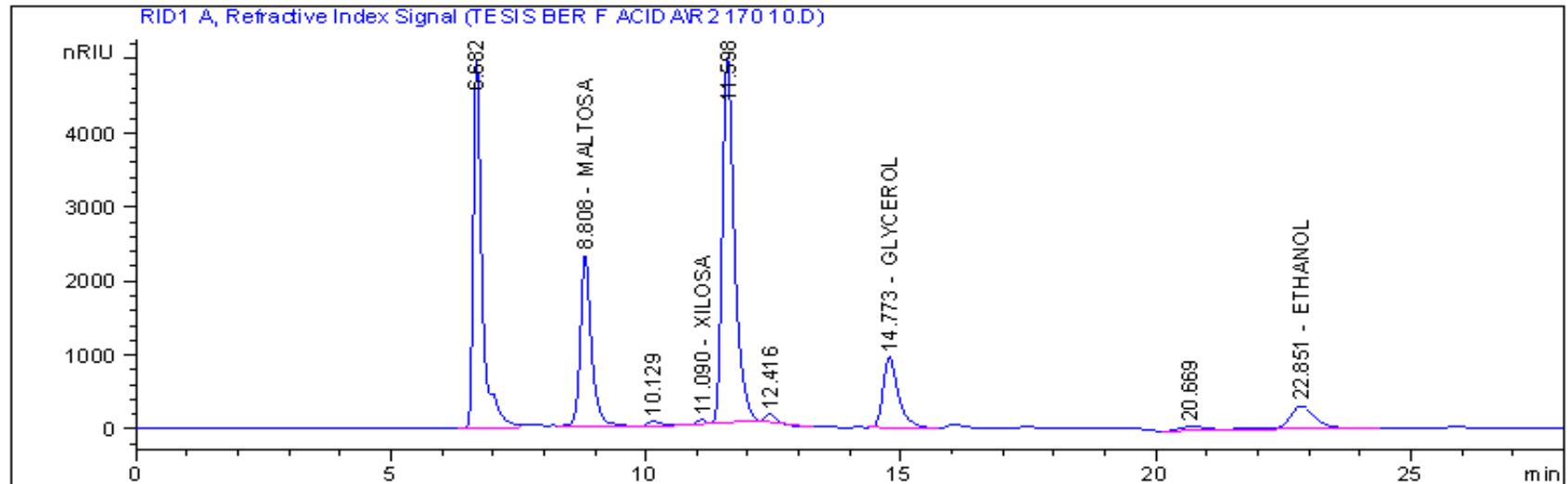
R2 160°C 10' Palma enzimas

Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



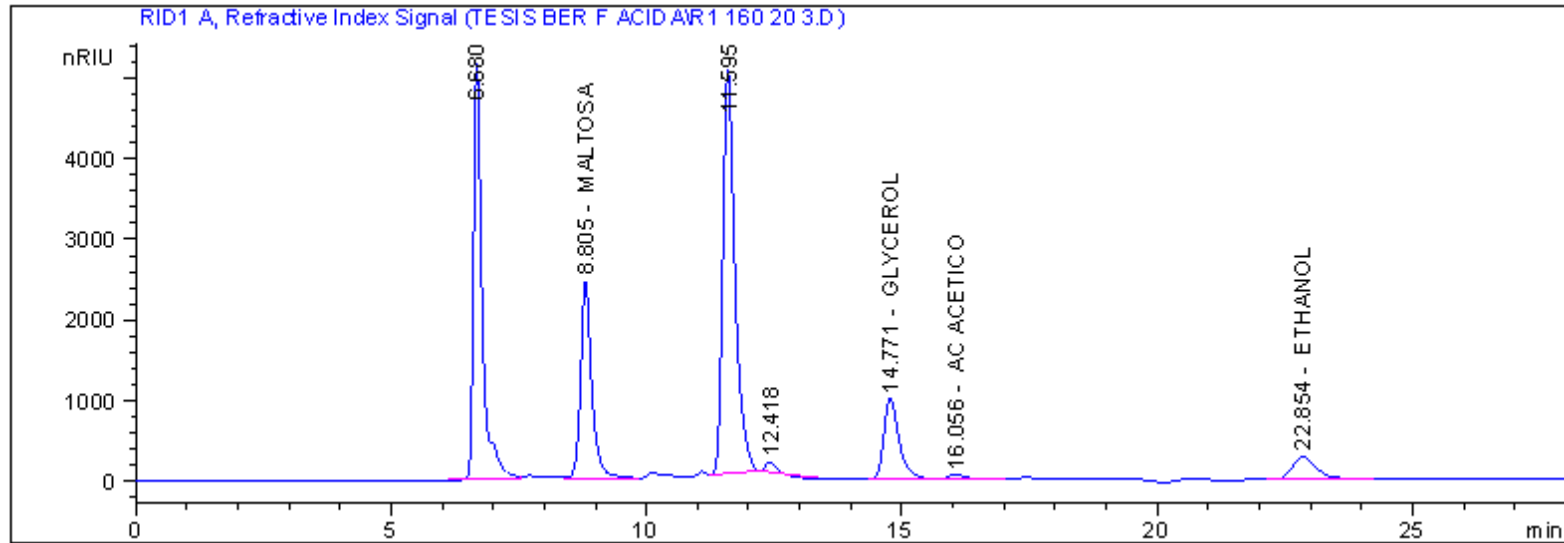
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.809	VB	3.84209e4	6.75013e-3	259.34622	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.090	BB	712.03369	5.72177e-3	4.07409	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.773	BB	2.10868e4	7.86204e-3	165.78498	-	GLYCEROL
16.056	BB	1272.60608	4.94623e-3	6.29460	-	AC ACETICO
22.854	BB	1.07258e4	1.51736e-2	162.74907	-	ETHANOL
Totals :				598.24896		

R3 160°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.808	VB	3.58947e4	6.75013e-3	242.29417	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.090	BB	671.44171	5.72177e-3	3.84183	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.773	BB	1.97760e4	7.86204e-3	155.47968	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.851	BB	1.14688e4	1.51736e-2	174.02315	-	ETHANOL
Totals :				575.63883		

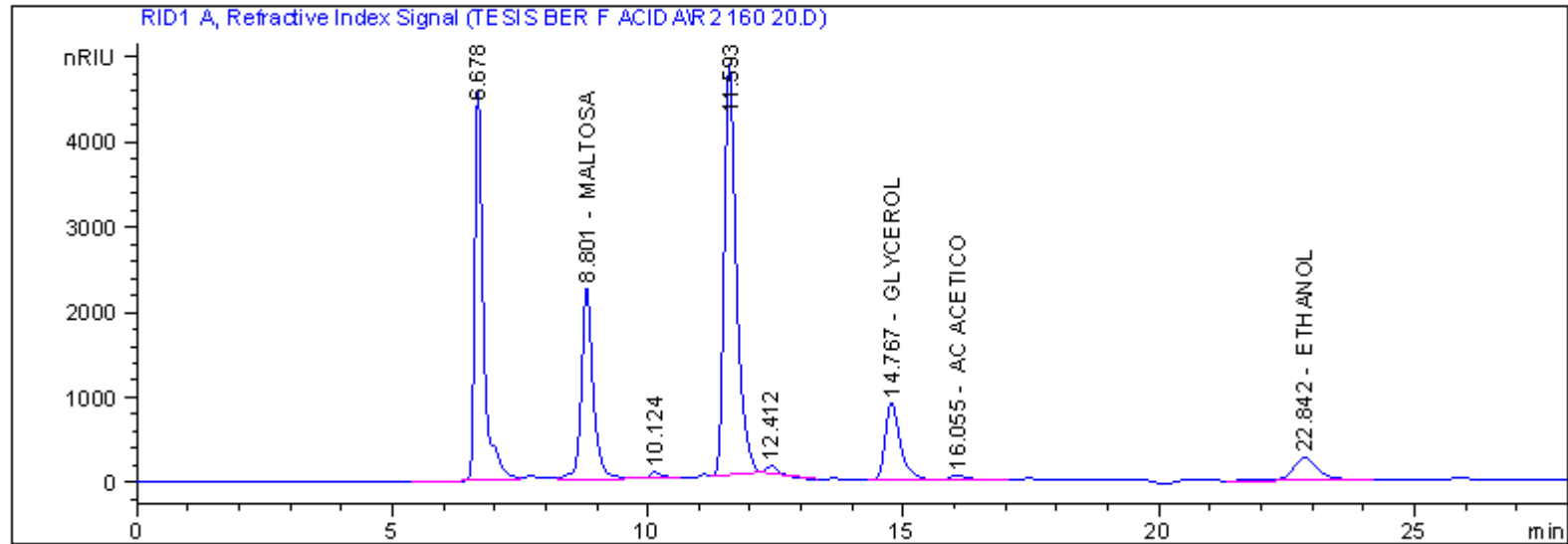
R1 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.805	VB	3.72966e4	6.75013e-3	251.75675		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.195		-	-	-		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.771	BB	2.06747e4	7.86204e-3	162.54498		GLYCEROL
16.056	BB	1369.07263	4.94623e-3	6.77174		AC ACETICO
22.854	BB	9847.15332	1.51736e-2	149.41709		ETHANOL

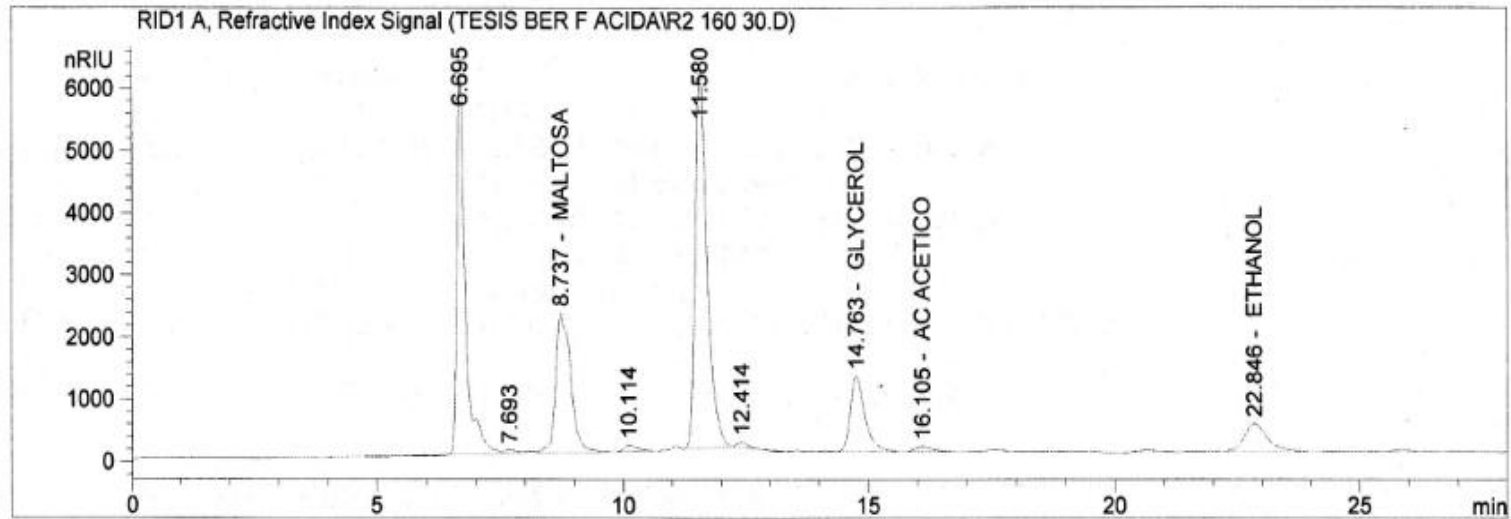
Totals : 570.49056

R2 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



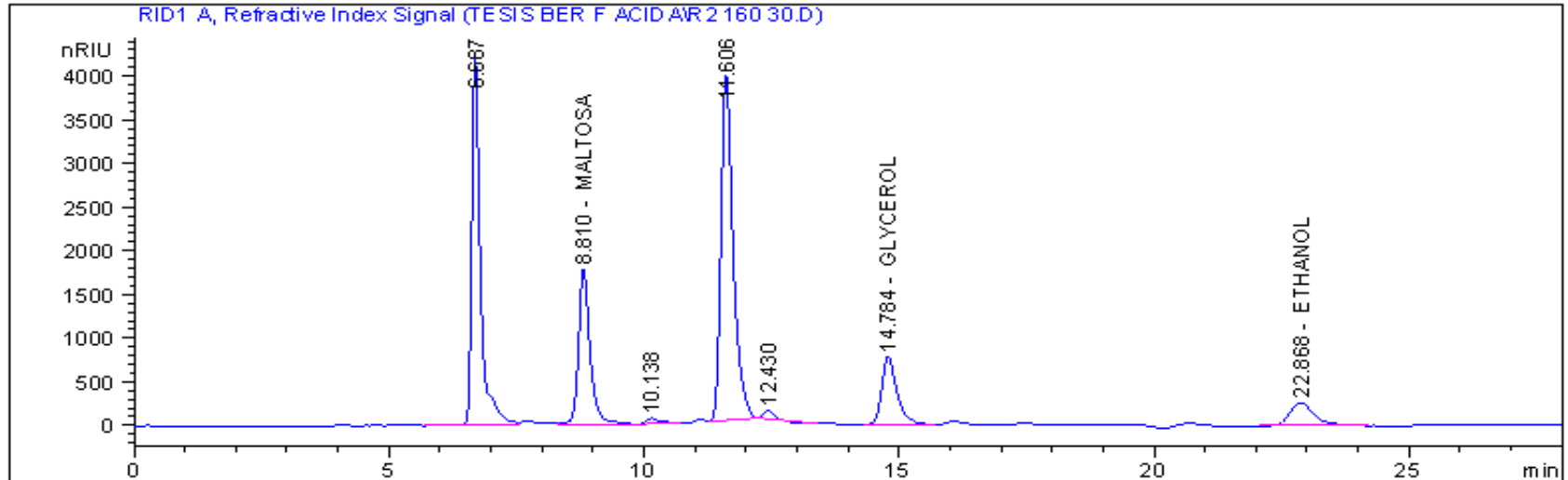
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.801	VB	3.58856e4	6.75013e-3	242.23247	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.195	-	-	-	-	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.767	BB	1.85208e4	7.86204e-3	145.61096	-	GLYCEROL
16.055	BB	1343.07703	4.94623e-3	6.64316	-	AC ACETICO
22.842	BB	9847.38965	1.51736e-2	149.42068	-	ETHANOL
Totals :				543.90726		

R3 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



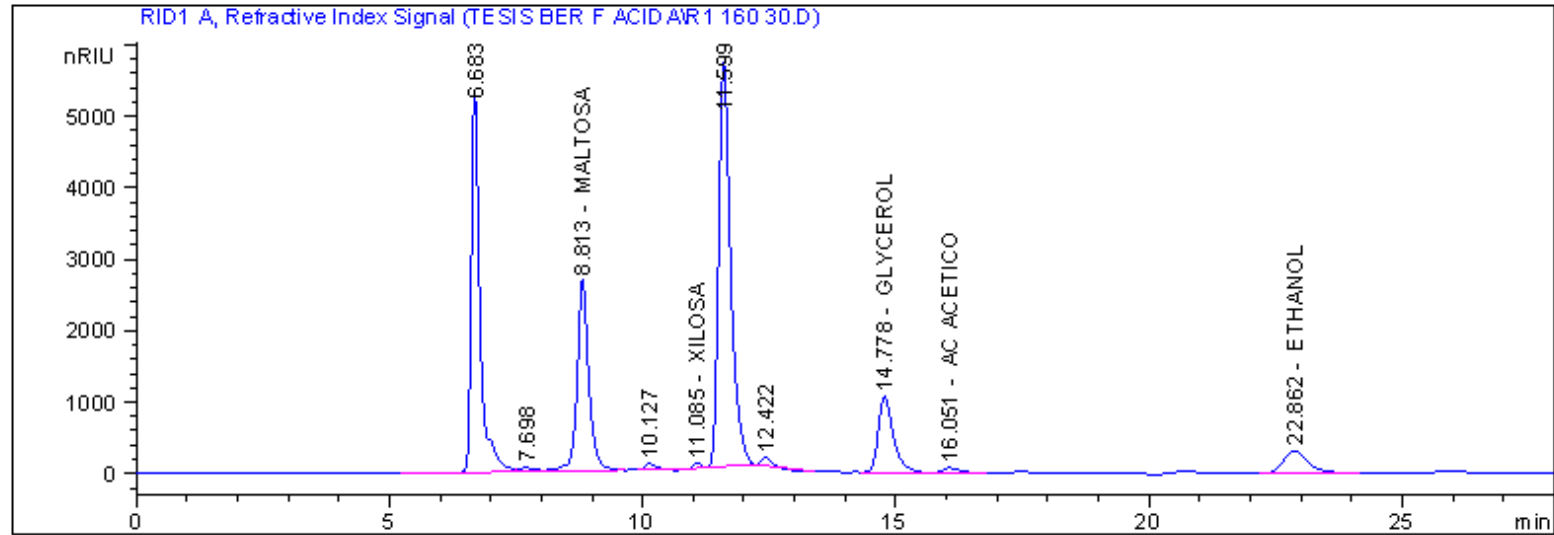
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.737	VB	4.78922e4	6.75013e-3	323.27880		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.195		-	-	-		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.763	BB	2.47008e4	7.86204e-3	194.19872		GLYCEROL
16.105	BB	1830.62158	4.94623e-3	9.05467		AC ACETICO
22.846	BB	1.48983e4	1.51736e-2	226.06203		ETHANOL
Totals :				752.59422		

R1 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.810	VB	2.83306e4	6.75013e-3	191.23523		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.195		-	-	-		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.784	BB	1.59573e4	7.86204e-3	125.45675		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
22.868	BB	9020.72656	1.51736e-2	136.87719		ETHANOL
Totals :				453.56917		

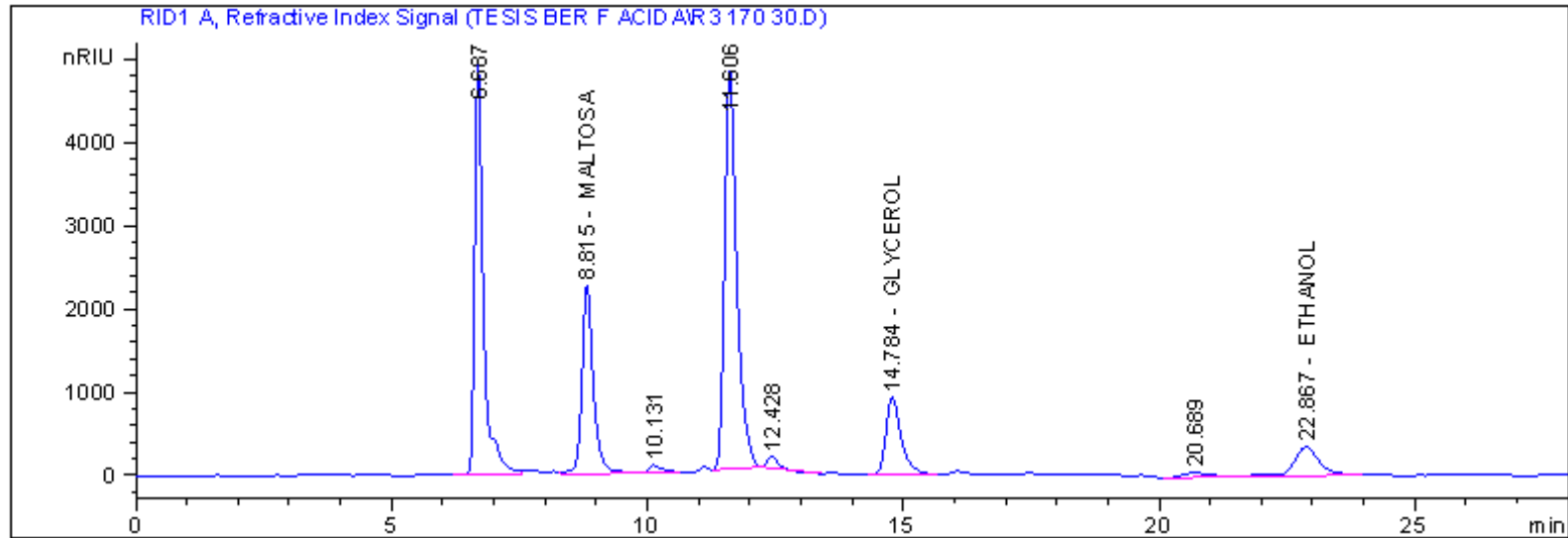
R2 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.813	VB	4.29244e4	6.75013e-3	289.74532	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.085	BB	741.00684	5.72177e-3	4.23987	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.778	BB	2.21853e4	7.86204e-3	174.42150	-	GLYCEROL
16.051	BB	1550.79529	4.94623e-3	7.67058	-	AC ACETICO
22.862	BB	1.02183e4	1.51736e-2	155.04901	-	ETHANOL

Totals : 631.12628

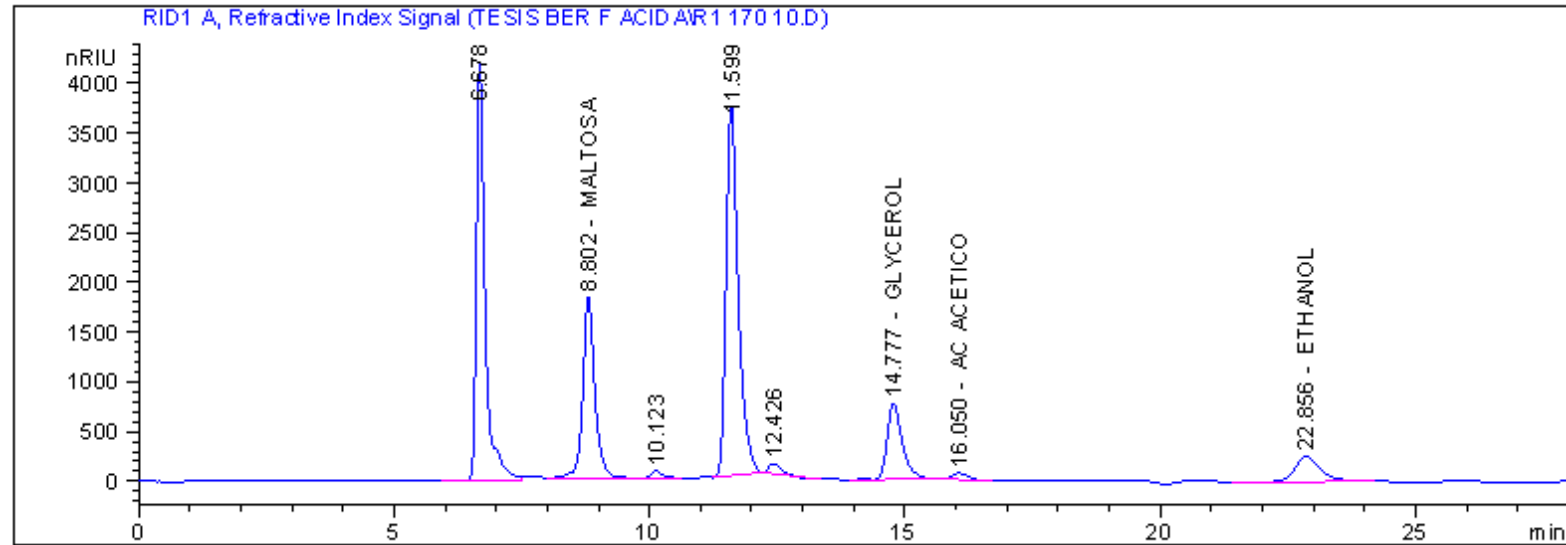
R3 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

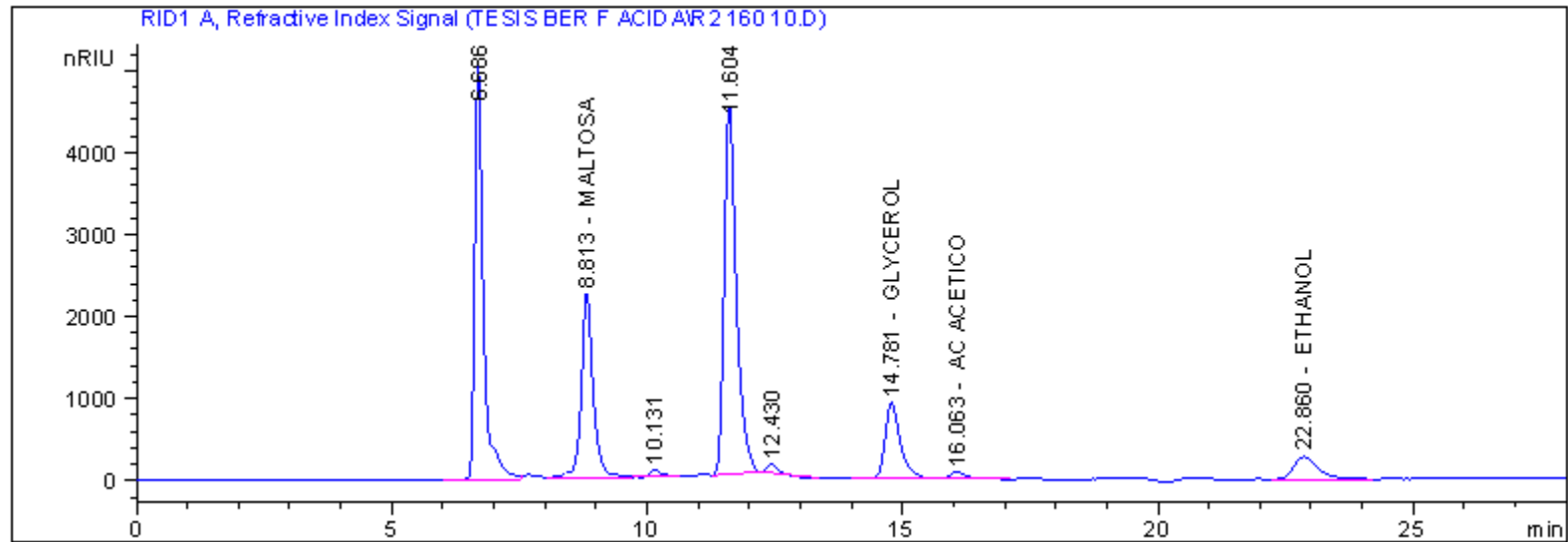
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.815	VB	3.53078e4	6.75013e-3	238.33231		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.195		-	-	-		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.784	BB	1.90572e4	7.86204e-3	149.82879		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
22.867	BB	1.20471e4	1.51736e-2	182.79772		ETHANOL
Totals :				570.95882		

R1 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas

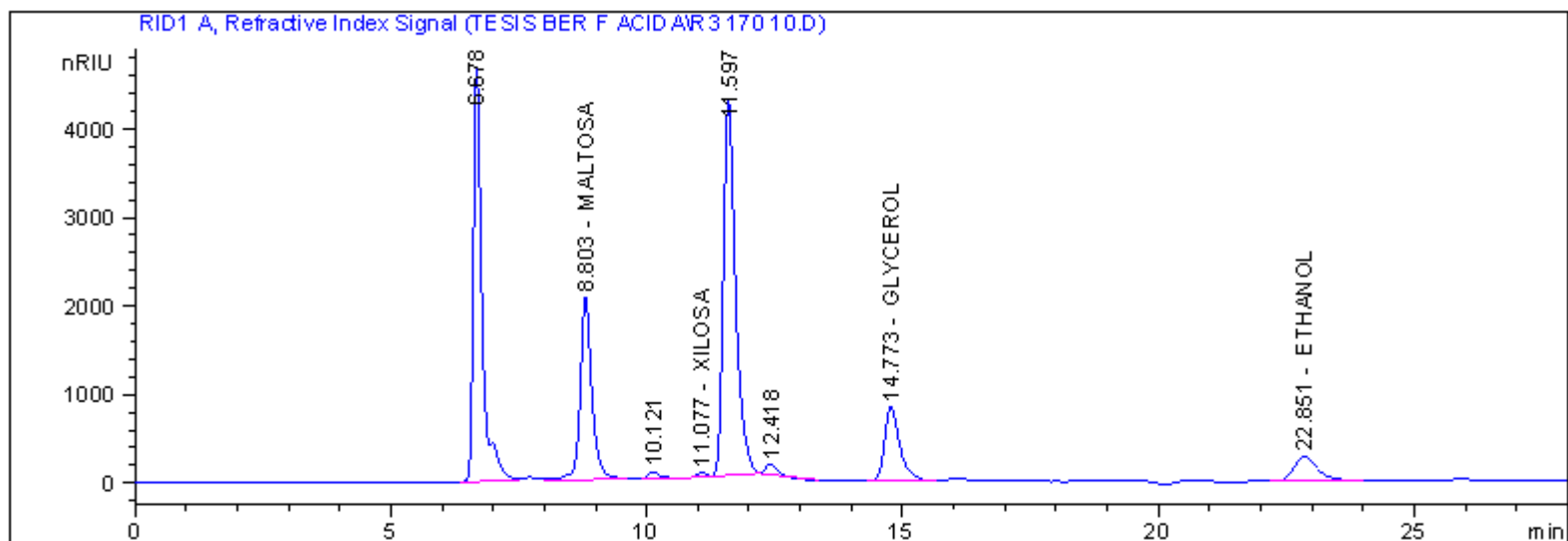


RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.802	VB	3.05498e4	6.75013e-3	206.21516		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.195		-	-	-		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.777	BB	1.59361e4	7.86204e-3	125.29015		GLYCEROL
16.050	BB	1526.34387	4.94623e-3	7.54964		AC ACETICO
22.856	BB	9237.75977	1.51736e-2	140.17038		ETHANOL
Totals :				479.22533		

R2 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas

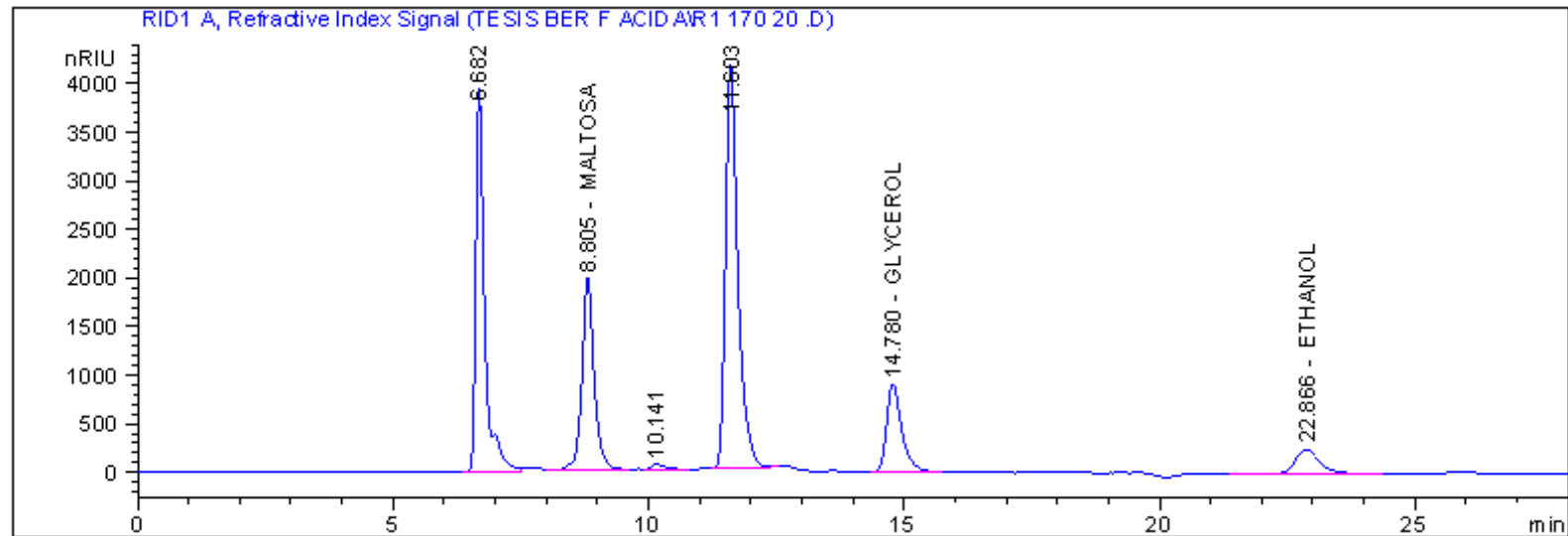


RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.813	VB	3.65527e4	6.75013e-3	246.73531		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.195		-	-	-		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.781	BB	1.92467e4	7.86204e-3	151.31866		GLYCEROL
16.063	BB	1878.74878	4.94623e-3	9.29272		AC ACETICO
22.860	BB	9492.10254	1.51736e-2	144.02968		ETHANOL
Totals :				551.37636		

R3 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas


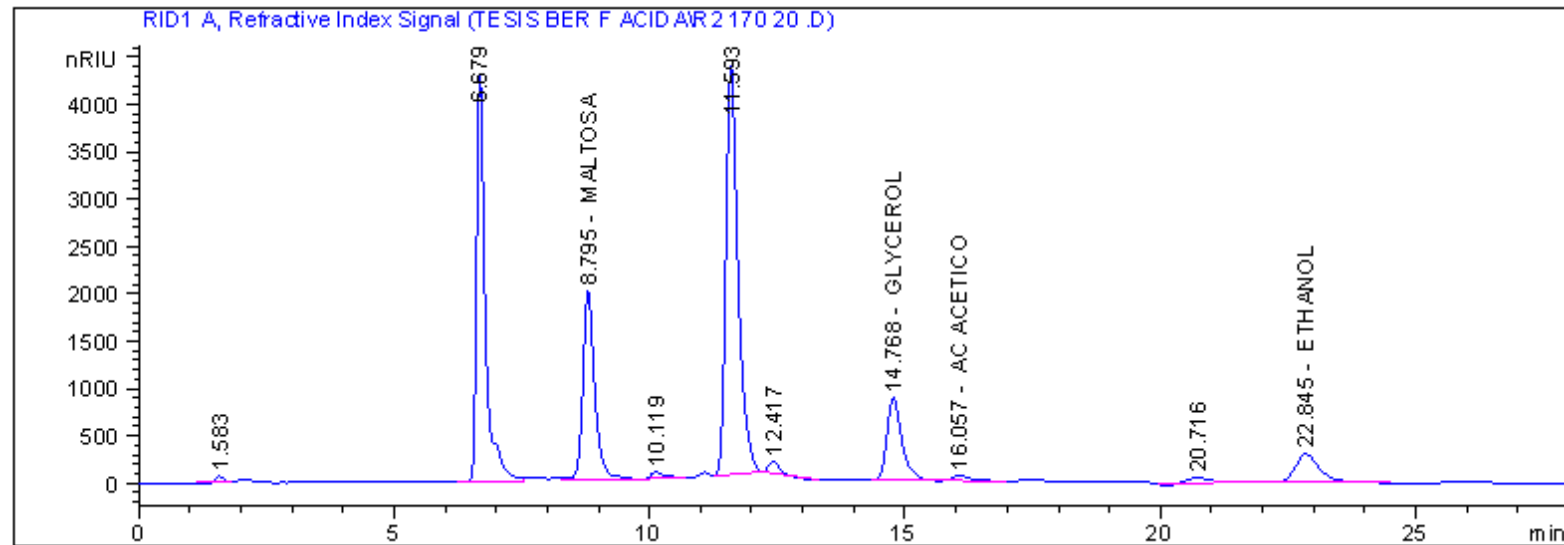
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.803	VB	3.28598e4	6.75013e-3	221.80780	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.077	BB	640.45160	5.72177e-3	3.66451	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.773	BB	1.73436e4	7.86204e-3	136.35640	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.851	BB	8983.27344	1.51736e-2	136.30889	-	ETHANOL
Totals :				498.13761		

R1 170°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.805	VB	3.33619e4	6.75013e-3	225.19726	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.195	-	-	-	-	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.780	BB	1.86530e4	7.86204e-3	146.65070	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.866	BB	9341.67480	1.51736e-2	141.74715	-	ETHANOL
Totals :				513.59511		

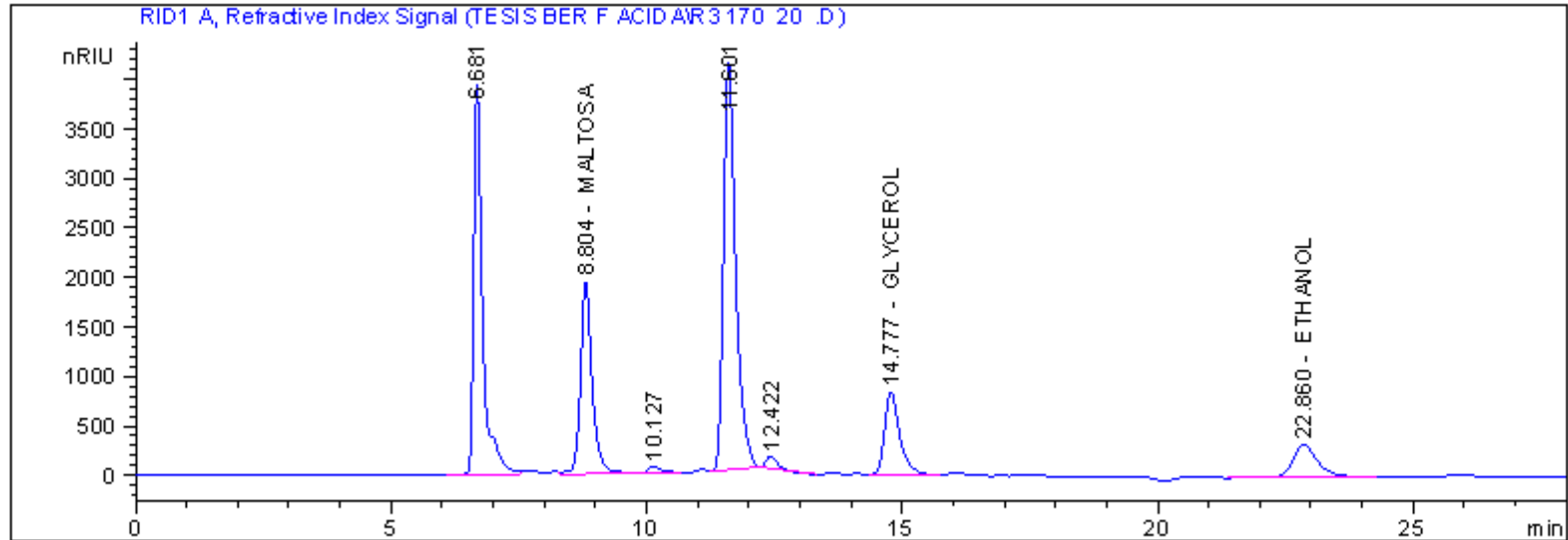
R2 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.795	VB	3.25571e4	6.75013e-3	219.76499	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.195	-	-	-	-	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.768	BB	1.79143e4	7.86204e-3	140.84260	-	GLYCEROL
16.057	BB	1414.89294	4.94623e-3	6.99838	-	AC ACETICO
22.845	BB	1.04879e4	1.51736e-2	159.13924	-	ETHANOL

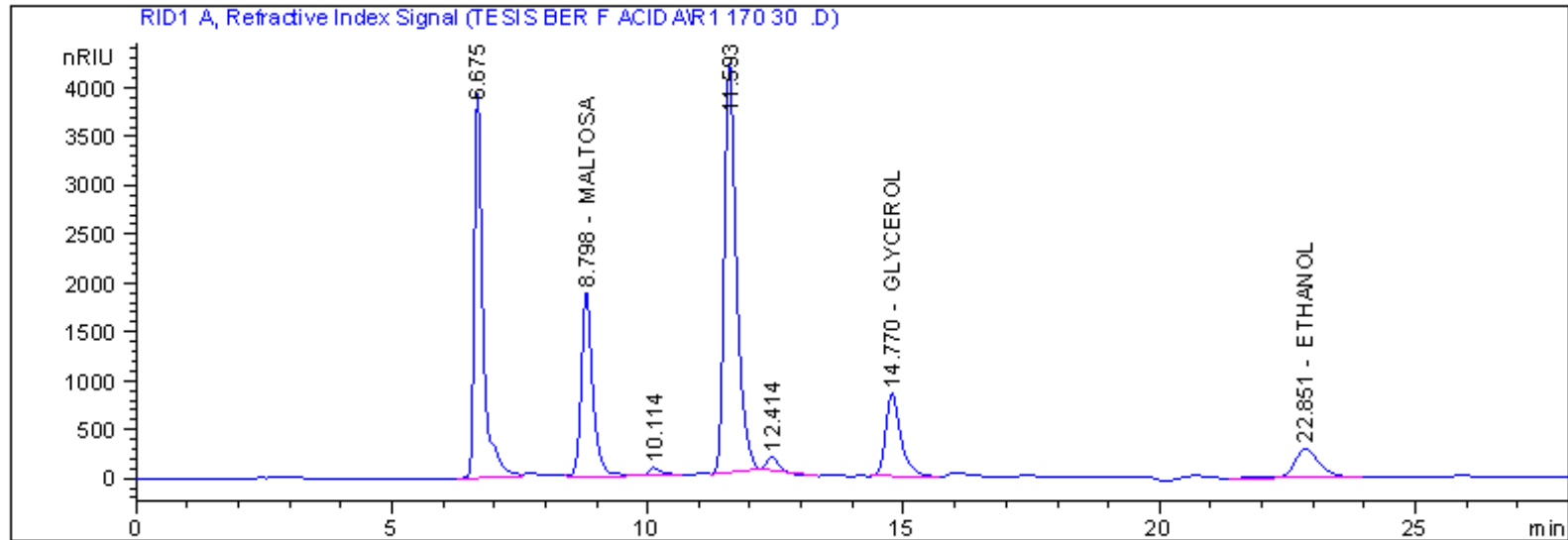
Totals : 526.74521

R3 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



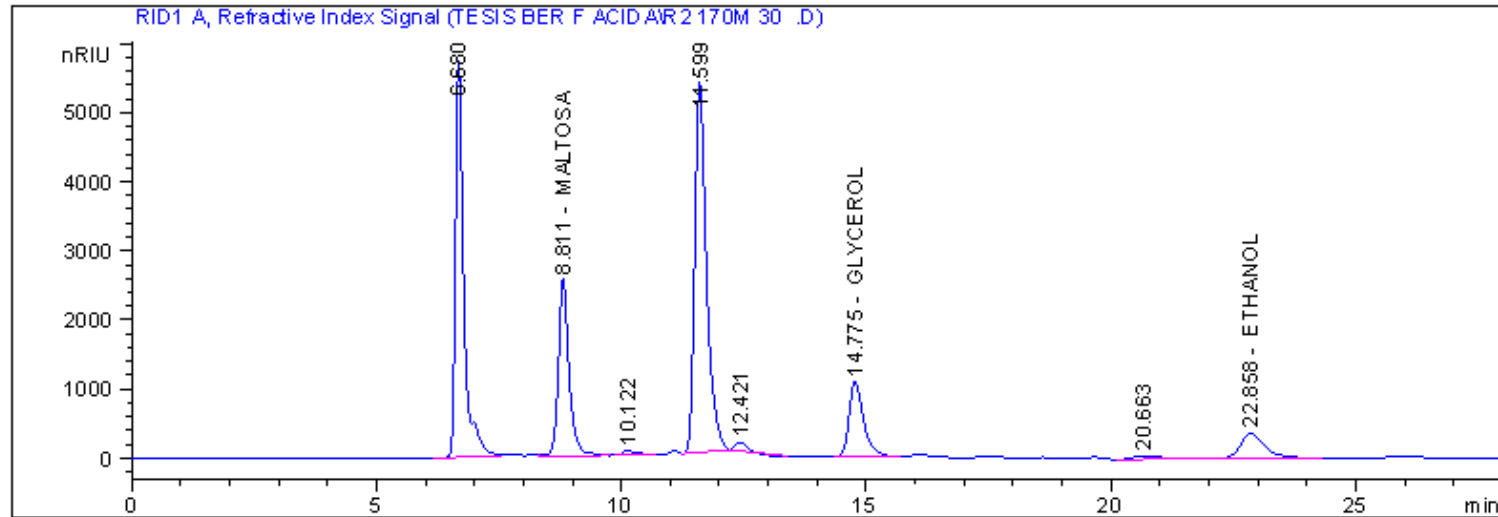
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.804	VB	3.09383e4	6.75013e-3	208.83784	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.195	-	-	-	-	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.777	BB	1.72780e4	7.86204e-3	135.84036	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.860	BB	1.17646e4	1.51736e-2	178.51209	-	ETHANOL
Totals :				523.19029		

R1 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



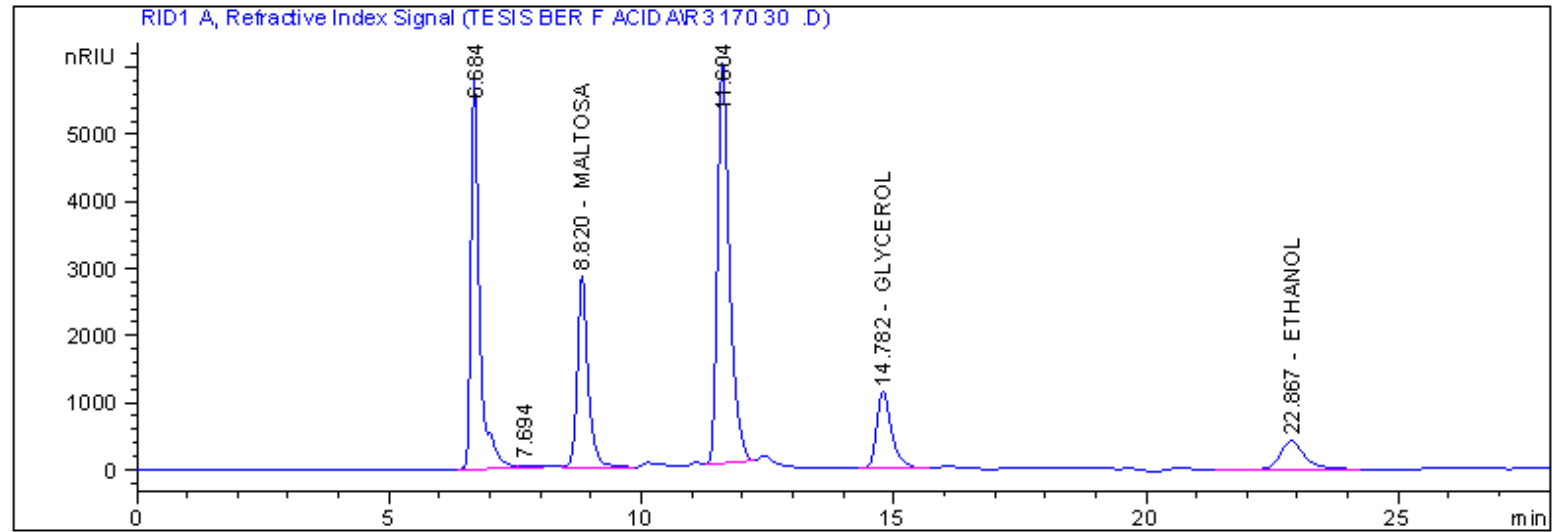
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.798	VB	2.95326e4	6.75013e-3	199.34904	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.195	-	-	-	-	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.770	BB	1.75181e4	7.86204e-3	137.72792	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.851	BB	1.02514e4	1.51736e-2	155.55031	-	ETHANOL
Totals :				492.62727		

R2 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.798	VB	2.95326e4	6.75013e-3	199.34904	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.195	-	-	-	-	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.770	BB	1.75181e4	7.86204e-3	137.72792	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.851	BB	1.02514e4	1.51736e-2	155.55031	-	ETHANOL
Totals :				492.62727		

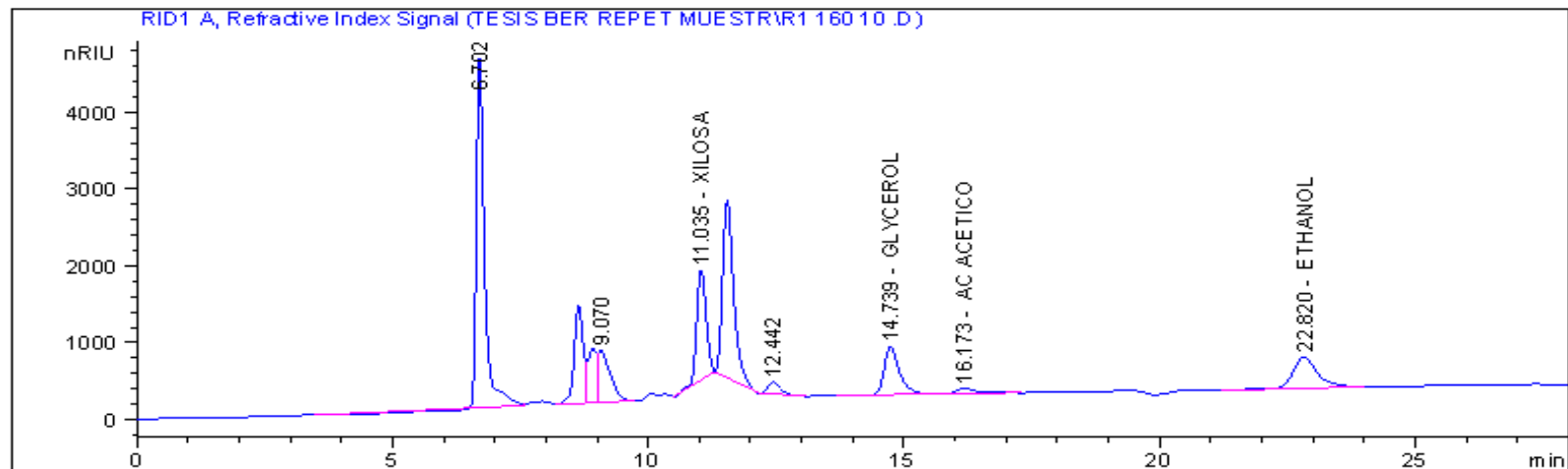
R3 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.795	VB	3.25571e4	6.75013e-3	219.76499	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.195	-	-	-	-	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.768	BB	1.79143e4	7.86204e-3	140.84260	-	GLYCEROL
16.057	BB	1414.89294	4.94623e-3	6.99838	-	AC ACETICO
22.845	BB	1.04879e4	1.51736e-2	159.13924	-	ETHANOL
Totals :				526.74521		

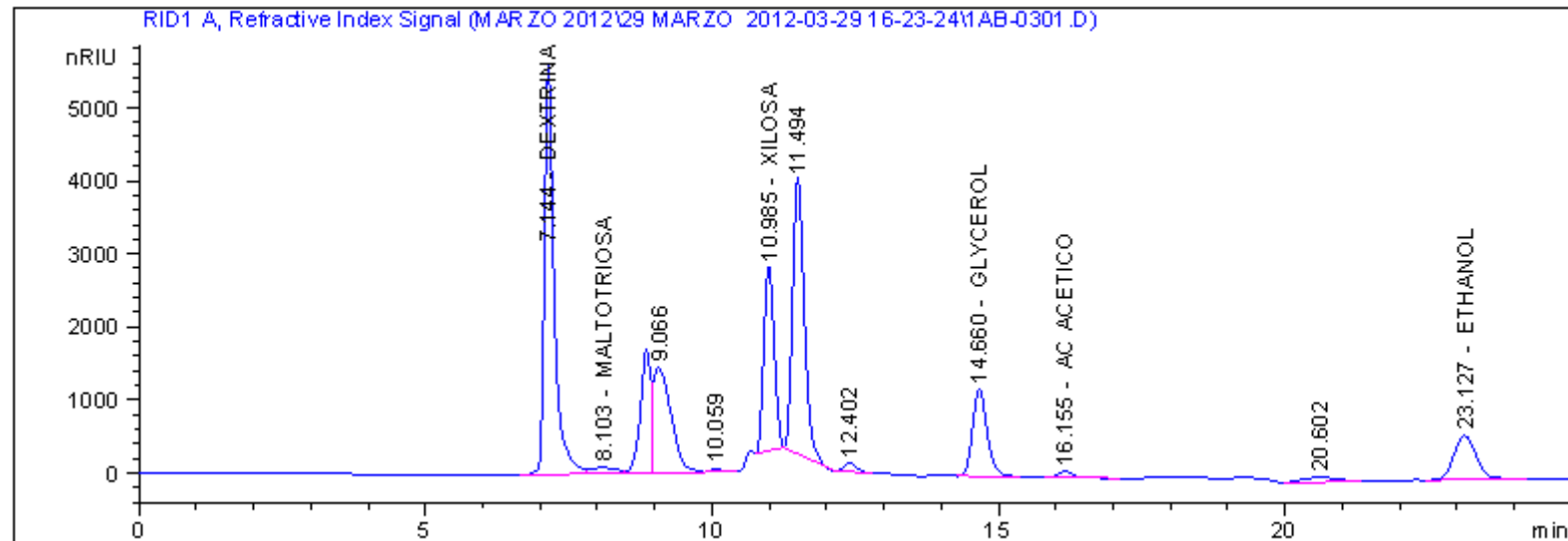
**ANEXO 18 CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC EN LA FERMENTACIÓN DE BIOMASA
PRETRATADA CON ÁLCALI E HIDROLIZADA**

R1 160°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.919	VV	7797.98779	6.75013e-3	52.63746	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.035	BB	1.85171e4	5.72177e-3	105.95048	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.739	BB	1.30024e4	7.86204e-3	102.22574	-	GLYCEROL
16.173	BB	1791.73132	4.94623e-3	8.86231	-	AC ACETICO
22.820	BB	1.40227e4	1.51736e-2	212.77529	-	ETHANOL
Totals :				482.45129		

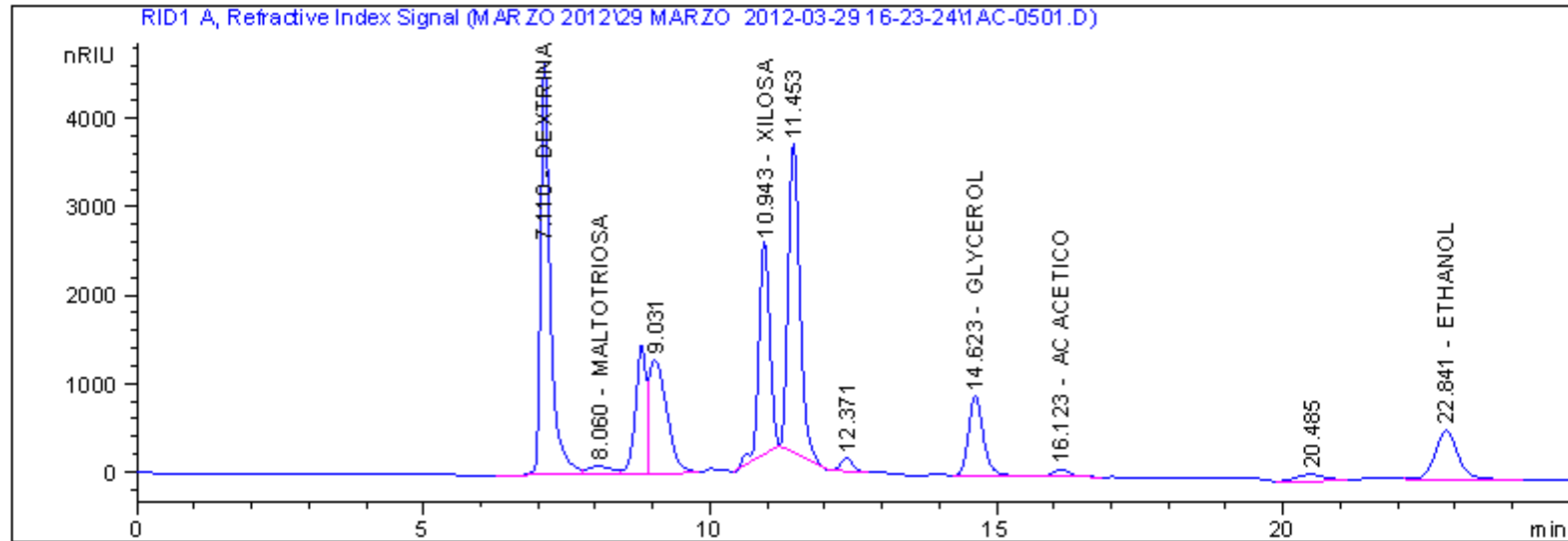
R2 160°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.144	VV	6.66856e4	7.71743e-3	514.64099		DEXTRINA
8.103	VV	2629.66650	6.42900e-3	16.90614		MALTOTRIOSIA
8.853	VV	2.18619e4	6.75013e-3	147.57066		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
10.985	BB	3.17744e4	5.72177e-3	181.80566		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.660	BB	2.11917e4	7.86204e-3	166.61025		GLYCEROL
16.155	BB	1447.57385	4.94623e-3	7.16003		AC ACETICO
23.127	BB	1.64999e4	1.51736e-2	250.36320		ETHANOL

Totals : 1285.05691

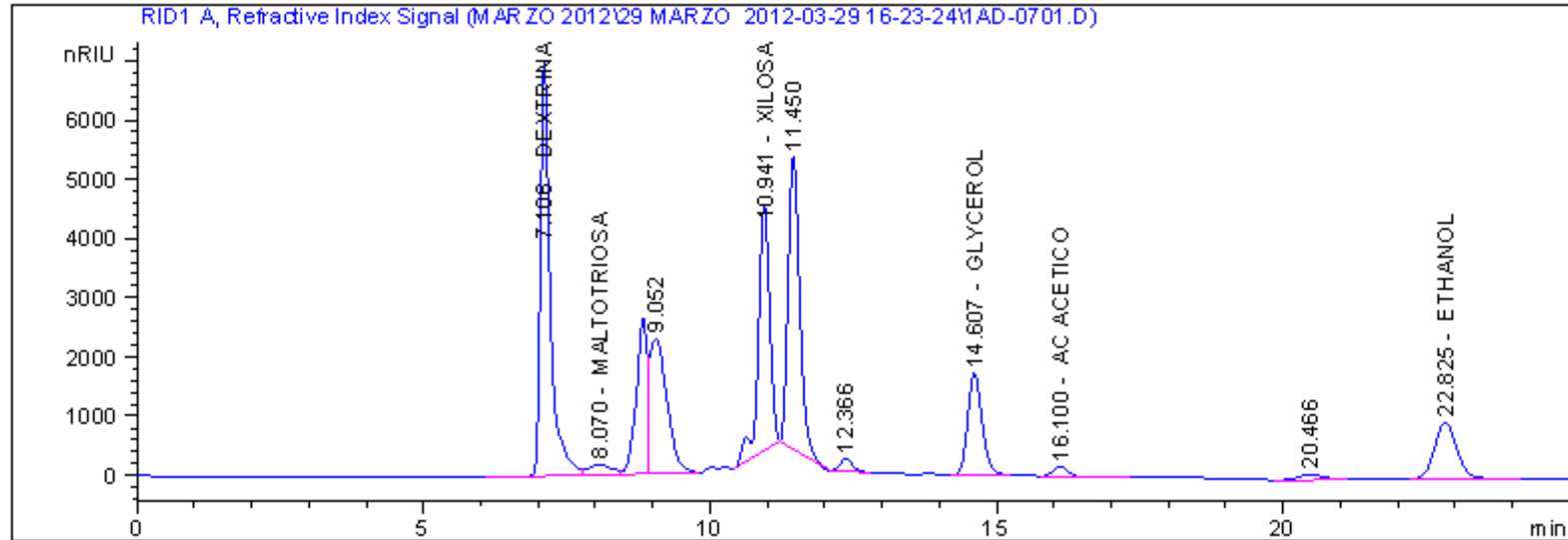
R3 160°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.110	VV	5.51863e4	7.71743e-3	425.89641		DEXTRINA
8.060	VV	2768.22754	6.42900e-3	17.79695		MALTOTRIOSIA
8.803	VV	1.87235e4	6.75013e-3	126.38602		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
10.943	BB	3.18497e4	5.72177e-3	182.23635		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.623	BB	1.62499e4	7.86204e-3	127.75767		GLYCEROL
16.123	BB	1554.56824	4.94623e-3	7.68925		AC ACETICO
22.841	BB	1.51793e4	1.51736e-2	230.32560		ETHANOL

Totals : 1118.08825

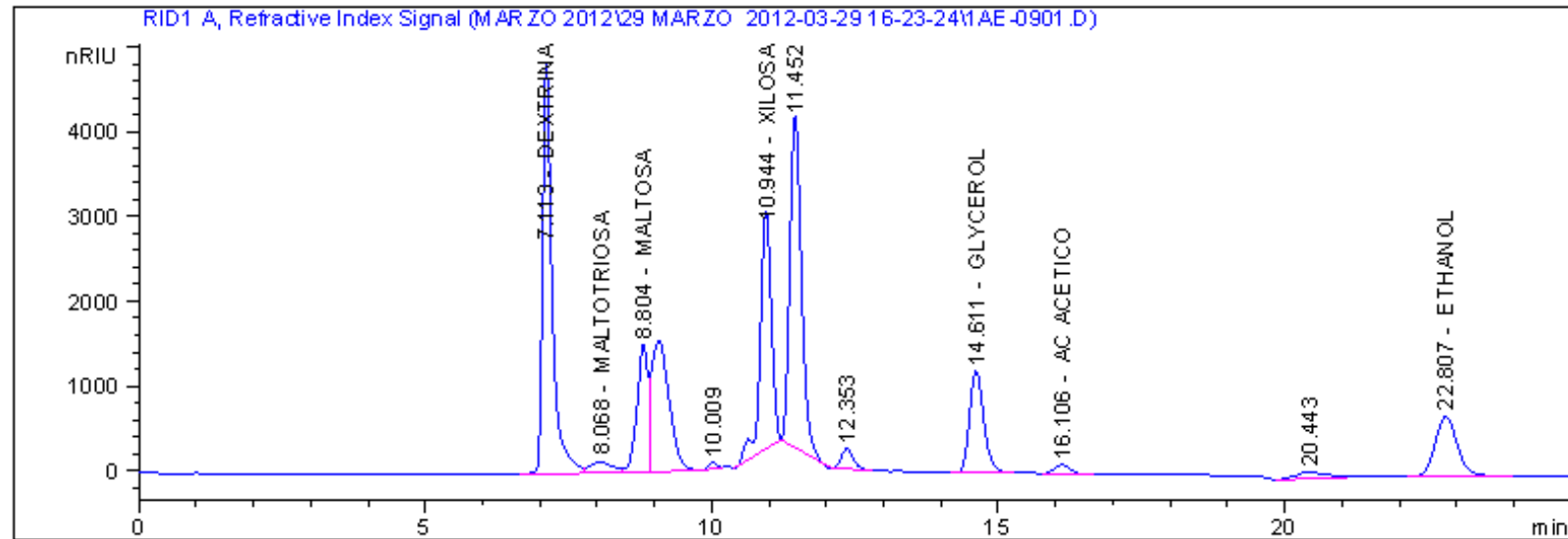
R1 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72 horas



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.106	BV	8.41218e4	7.71743e-3	649.20381		DEXTRINA
8.070	VV	4968.29980	6.42900e-3	31.94122		MALTOTRIOSIA
8.827	VV	3.58275e4	6.75013e-3	241.84043		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
10.941	BB	5.75363e4	5.72177e-3	329.20893		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.607	BB	3.02003e4	7.86204e-3	237.43611		GLYCEROL
16.100	BB	3088.95679	4.94623e-3	15.27868		AC ACETICO
22.825	BB	2.62063e4	1.51736e-2	397.64414		ETHANOL

Totals : 1902.55333

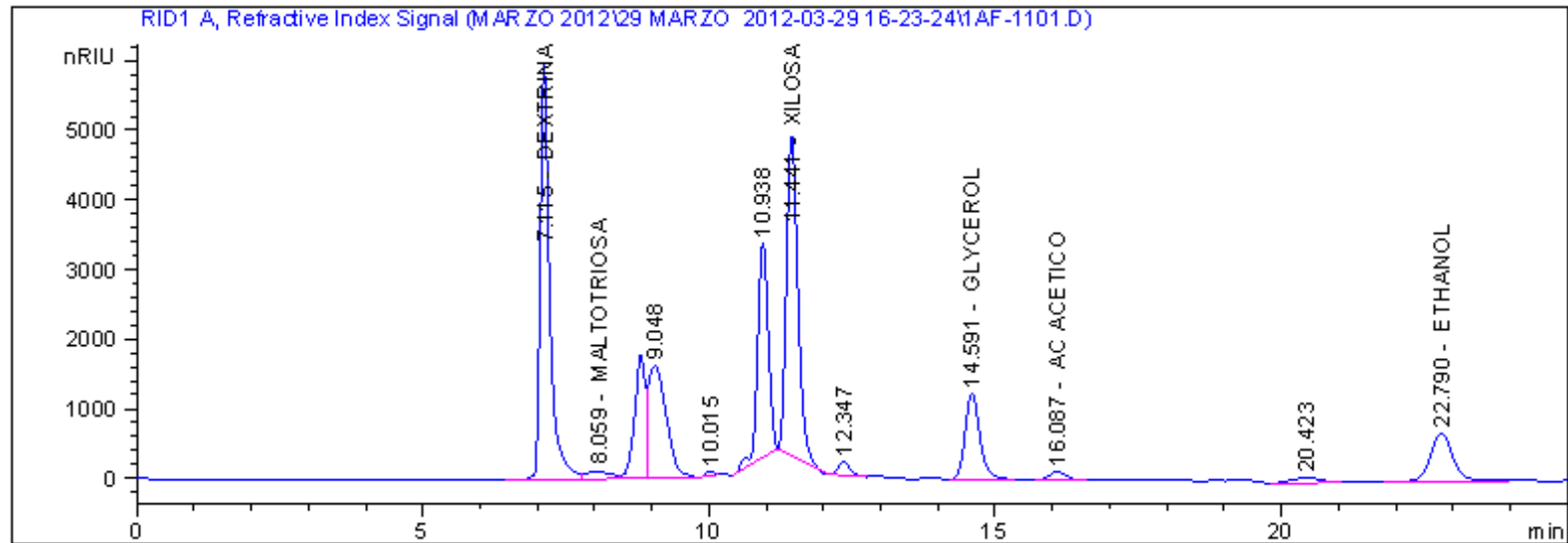
R2 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.113	VV	5.68486e4	7.71743e-3	438.72516		DEXTRINA
8.068	VV	3656.12183	6.42900e-3	23.50523		MALTOTRIOSIA
8.804	VV	1.97377e4	6.75013e-3	133.23205		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
10.944	BB	3.81650e4	5.72177e-3	218.37137		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.611	BB	2.10231e4	7.86204e-3	165.28410		GLYCEROL
16.106	BB	2042.71875	4.94623e-3	10.10375		AC ACETICO
22.807	BB	1.92059e4	1.51736e-2	291.42328		ETHANOL

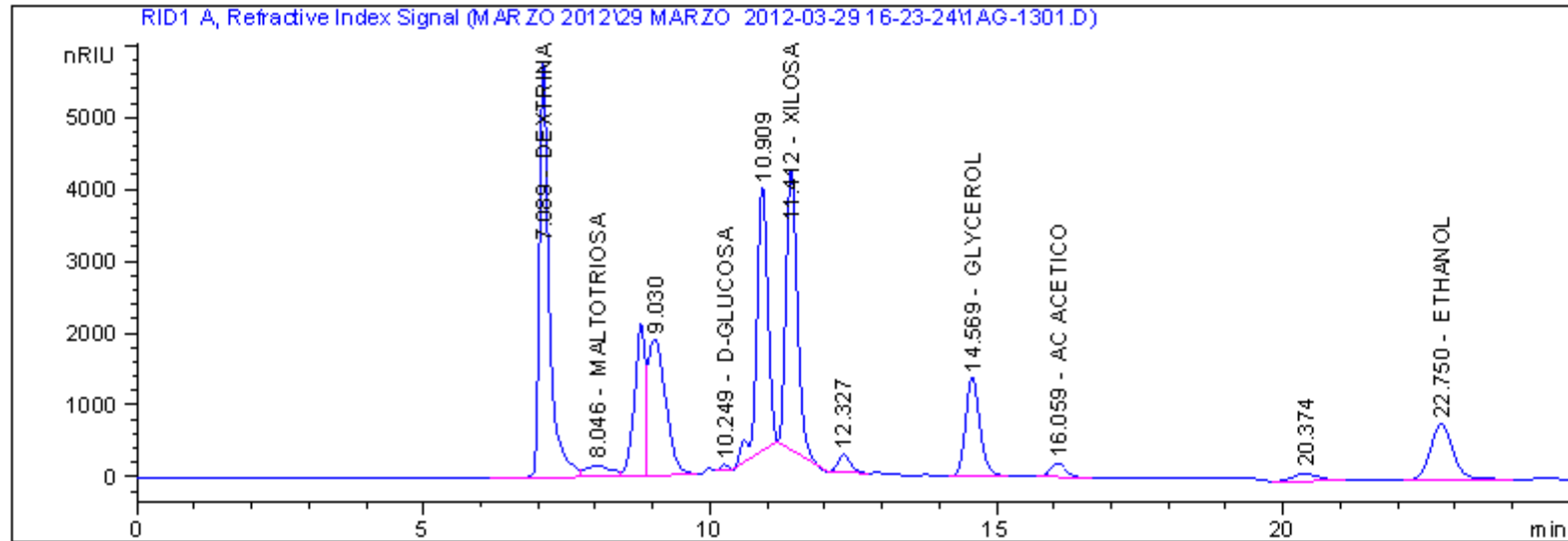
Totals : 1280.64494

R3 160°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.115	VV	6.98018e4	7.71743e-3	538.69054		DEXTRINA
8.059	VV	3427.54687	6.42900e-3	22.03572		MALTOTRIOSIA
8.806	VV	2.30814e4	6.75013e-3	155.80275		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.441	BB	6.42770e4	5.72177e-3	367.77797		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.591	BB	2.17924e4	7.86204e-3	171.33274		GLYCEROL
16.087	BB	2216.96924	4.94623e-3	10.96563		AC ACETICO
22.790	BB	1.87540e4	1.51736e-2	284.56670		ETHANOL

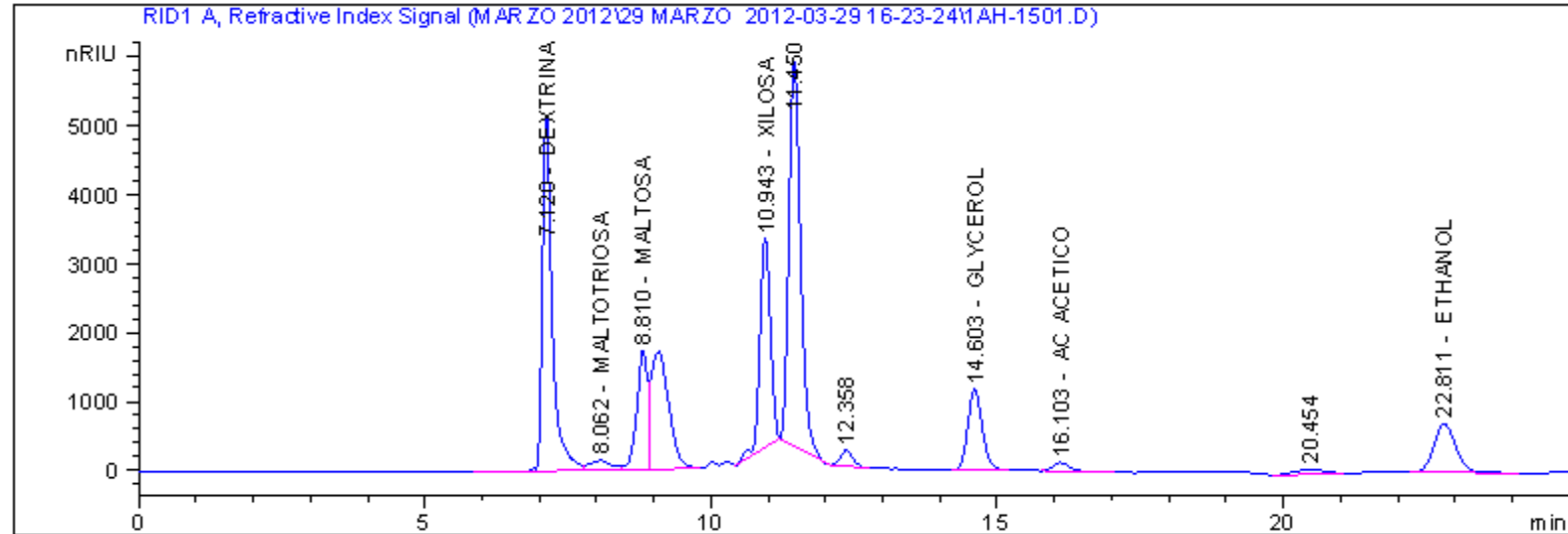
Totals : 1551.17205

R1 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72


RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.089	VV	6.94852e4	7.71743e-3	536.24689		DEXTRINA
8.046	VV	4679.02002	6.42900e-3	30.08144		MALTOTRIOSIA
8.793	VV	2.83889e4	6.75013e-3	191.62885		MALTOSA
10.249	BB	611.86505	6.25113e-3	3.82485		D-GLUCOSA
11.412	BB	5.37604e4	5.72177e-3	307.60426		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.569	BB	2.38312e4	7.86204e-3	187.36226		GLYCEROL
16.059	BB	3641.69824	4.94623e-3	18.01266		AC ACETICO
22.750	BB	2.07378e4	1.51736e-2	314.66772		ETHANOL

Totals : 1589.42894

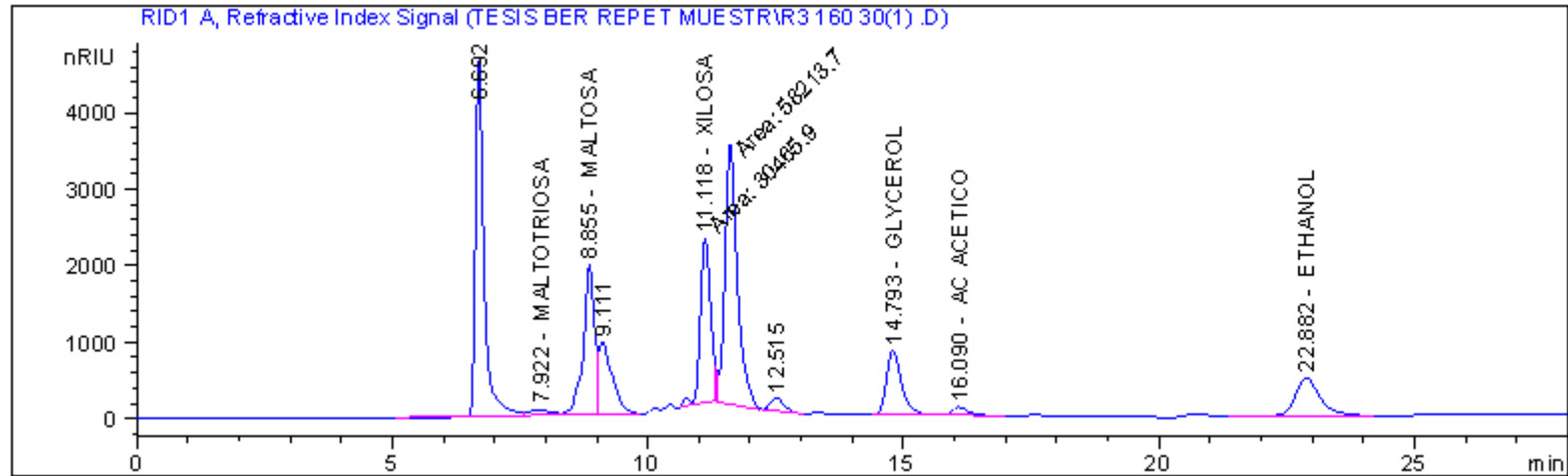
R2 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.120	VV	6.22502e4	7.71743e-3	480.41127		DEXTRINA
8.062	VV	3814.71802	6.42900e-3	24.52484		MALTOTRIOSIA
8.810	VV	2.23259e4	6.75013e-3	150.70289		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
10.943	BB	3.93921e4	5.72177e-3	225.39247		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.603	BB	2.06208e4	7.86204e-3	162.12121		GLYCEROL
16.103	BB	2507.46436	4.94623e-3	12.40248		AC ACETICO
22.811	BB	1.92641e4	1.51736e-2	292.30605		ETHANOL

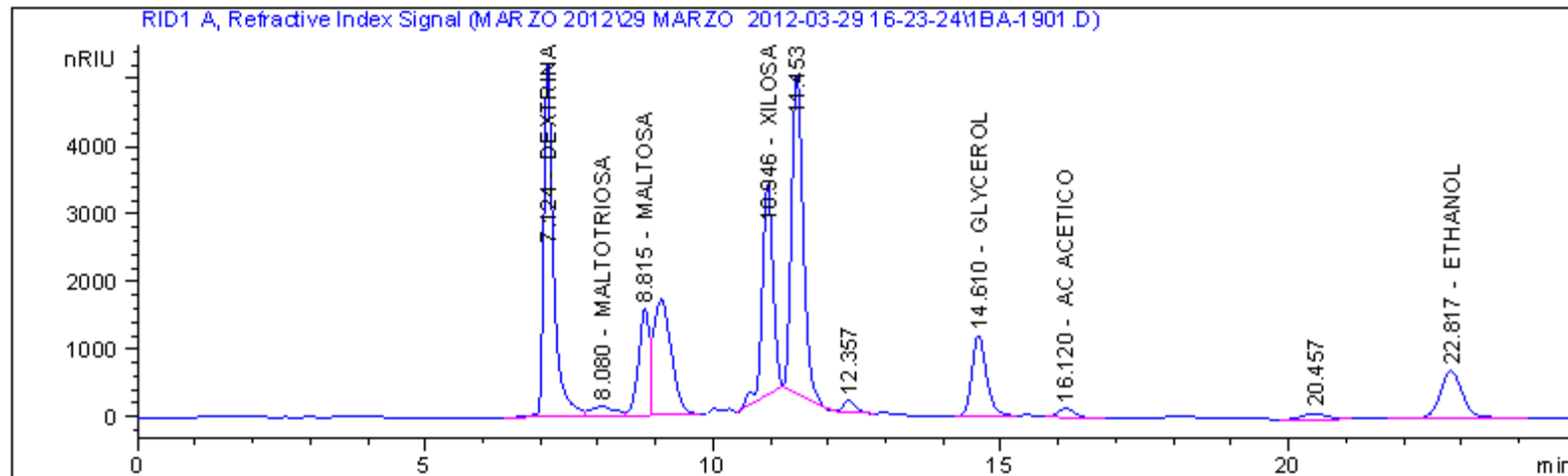
Totals : 1347.86121

R3 160°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.922	VV	2122.54956	6.42900e-3	13.64588		MALTOTRIOSIA
8.855	VV	3.05197e4	6.75013e-3	206.01201		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.118	MM	3.04659e4	5.72177e-3	174.31852		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.793	BB	1.70740e4	7.86204e-3	134.23626		GLYCEROL
16.090	BB	2177.31396	4.94623e-3	10.76949		AC ACETICO
22.882	BB	1.76083e4	1.51736e-2	267.18258		ETHANOL
Totals :				806.16473		

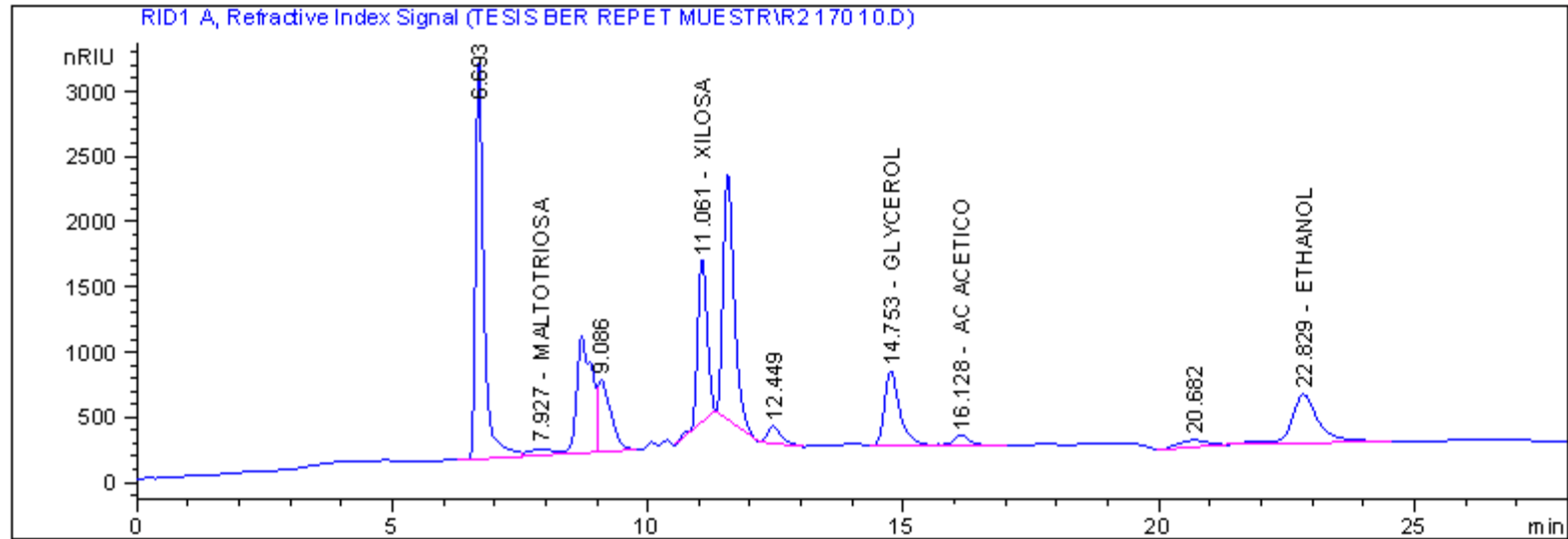
R1 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.124	VV	6.21469e4	7.71743e-3	479.61408		DEXTRINA
8.080	VV	4246.20996	6.42900e-3	27.29890		MALTOTRIOSIA
8.815	VV	2.08745e4	6.75013e-3	140.90537		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
10.946	BB	4.08070e4	5.72177e-3	233.48814		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.610	BB	2.09968e4	7.86204e-3	165.07775		GLYCEROL
16.120	BB	2547.63501	4.94623e-3	12.60118		AC ACETICO
22.817	BB	1.87827e4	1.51736e-2	285.00116		ETHANOL

Totals : 1343.98659

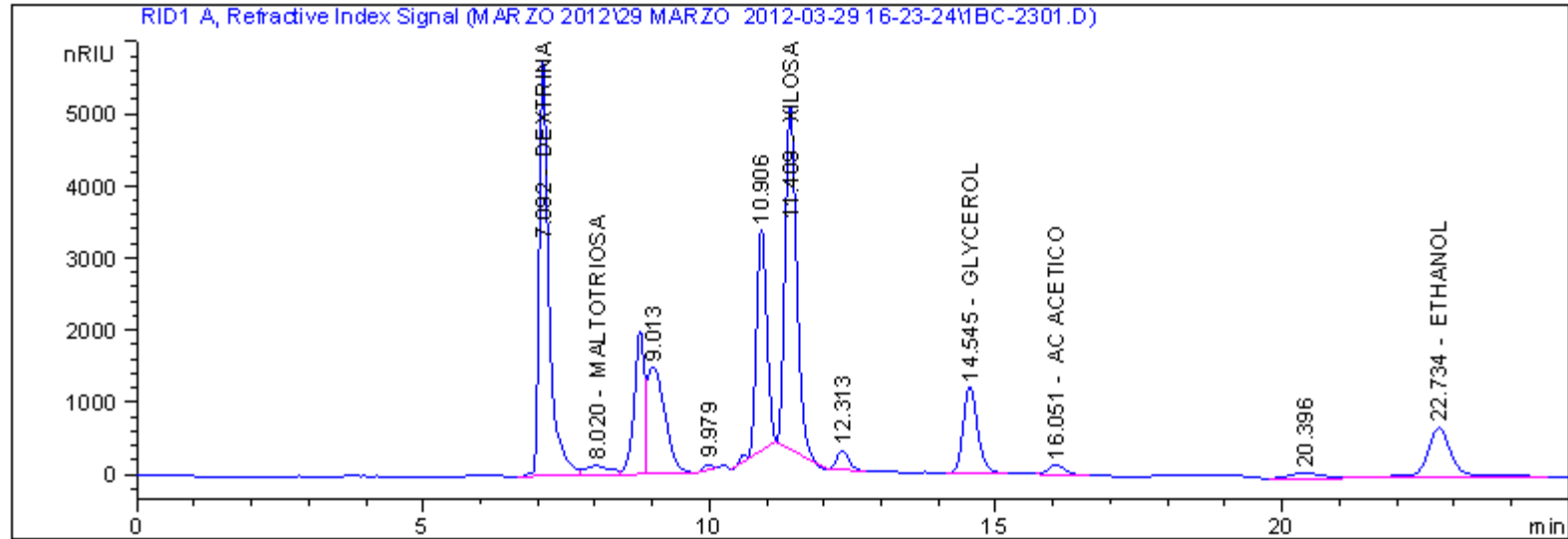
R2 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.927	VV	1653.50659	6.42900e-3	10.63040	-	MALTOTRIOSIA
8.707	VV	1.84150e4	6.75013e-3	124.30342	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.061	BB	1.61407e4	5.72177e-3	92.35330	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.753	BB	1.16212e4	7.86204e-3	91.36623	-	GLYCEROL
16.128	BB	1645.04443	4.94623e-3	8.13676	-	AC ACETICO
22.829	BB	1.41206e4	1.51736e-2	214.26016	-	ETHANOL

Totals : 541.05027

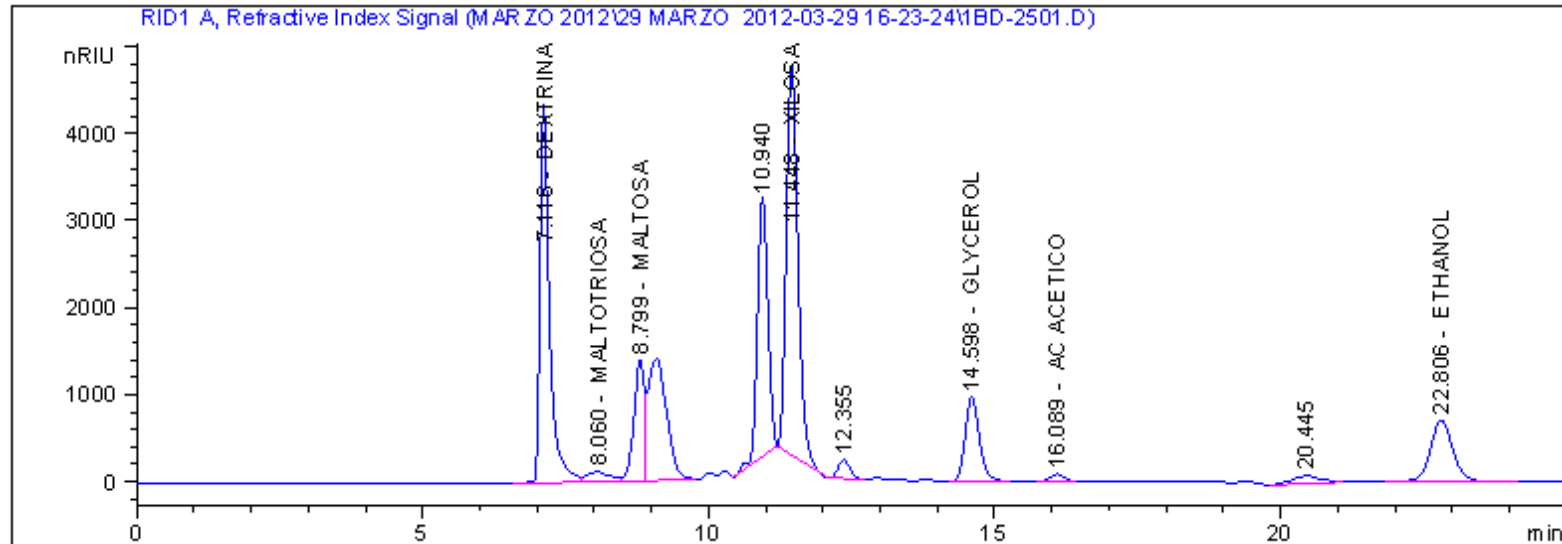
R3 170°C 10' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.092	VV	6.90471e4	7.71743e-3	532.86593		DEXTRINA
8.020	VV	3817.51611	6.42900e-3	24.54283		MALTOTRIOSIA
8.785	VV	2.60087e4	6.75013e-3	175.56253		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.409	BB	6.68172e4	5.72177e-3	382.31257		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.545	BB	2.10878e4	7.86204e-3	165.79309		GLYCEROL
16.051	BB	2645.66675	4.94623e-3	13.08607		AC ACETICO
22.734	BB	2.09571e4	1.51736e-2	317.99483		ETHANOL

Totals : 1612.15785

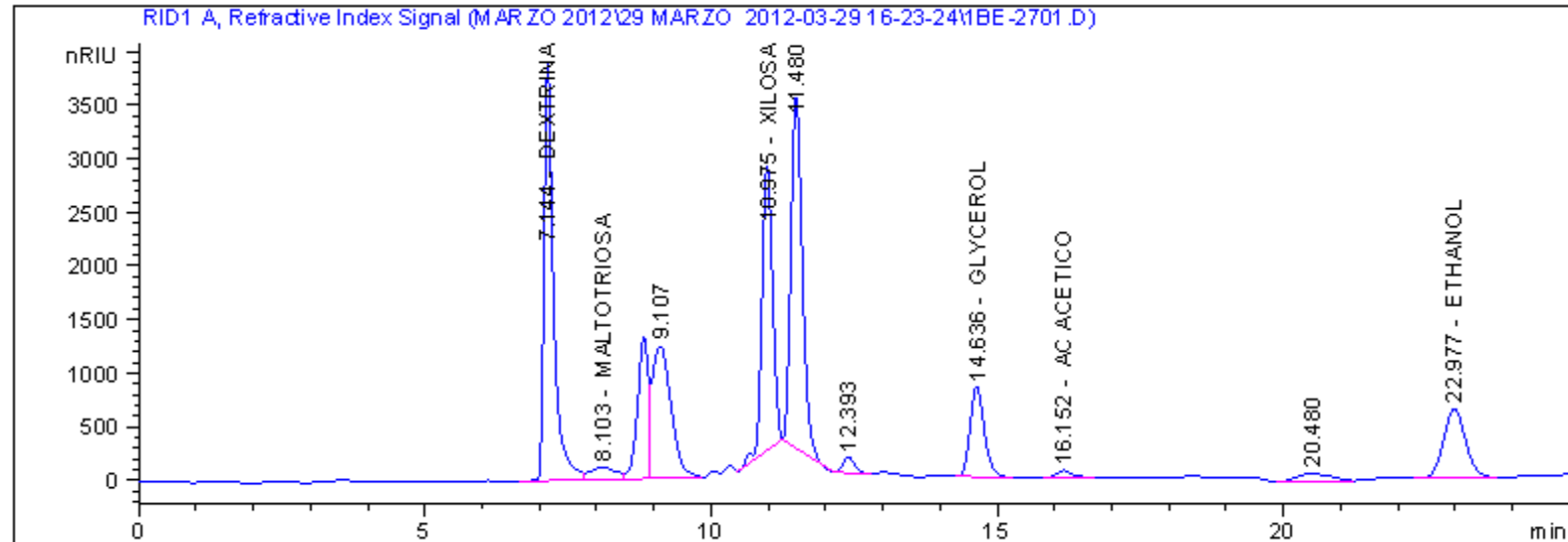
R1 170°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.116	VV	5.07475e4	7.71743e-3	391.64034		DEXTRINA
8.060	VV	3207.53418	6.42900e-3	20.62125		MALTOTRIOSIA
8.799	VV	1.80530e4	6.75013e-3	121.85997		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.448	BB	6.34955e4	5.72177e-3	363.30656		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.598	BB	1.66713e4	7.86204e-3	131.07073		GLYCEROL
16.089	BB	1397.16931	4.94623e-3	6.91071		AC ACETICO
22.806	BB	1.94154e4	1.51736e-2	294.60225		ETHANOL

Totals : 1330.01182

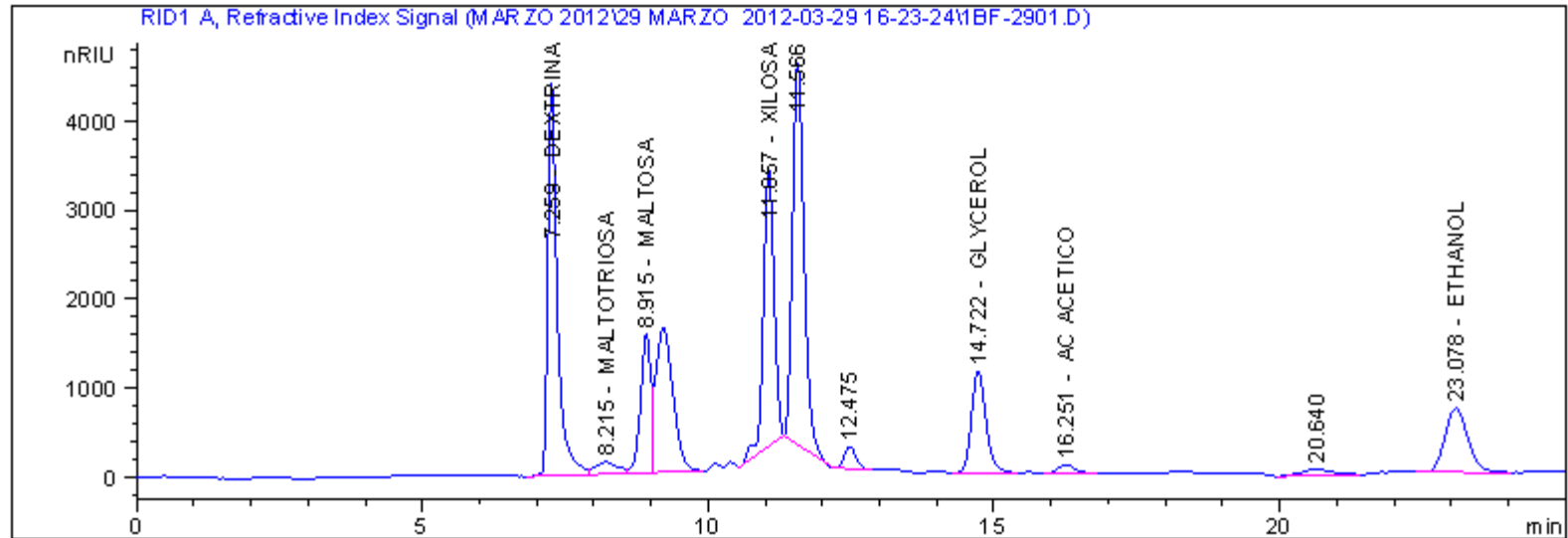
R2 170°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.144	VV	4.54295e4	7.71743e-3	350.59867		DEXTRINA
8.103	VV	3587.03833	6.42900e-3	23.06109		MALTOTRIOSIA
8.820	VV	1.78086e4	6.75013e-3	120.21070		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
10.975	BB	3.44613e4	5.72177e-3	197.17945		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.636	BB	1.45559e4	7.86204e-3	114.43876		GLYCEROL
16.152	BB	1413.64368	4.94623e-3	6.99220		AC ACETICO
22.977	BB	1.73360e4	1.51736e-2	263.05046		ETHANOL

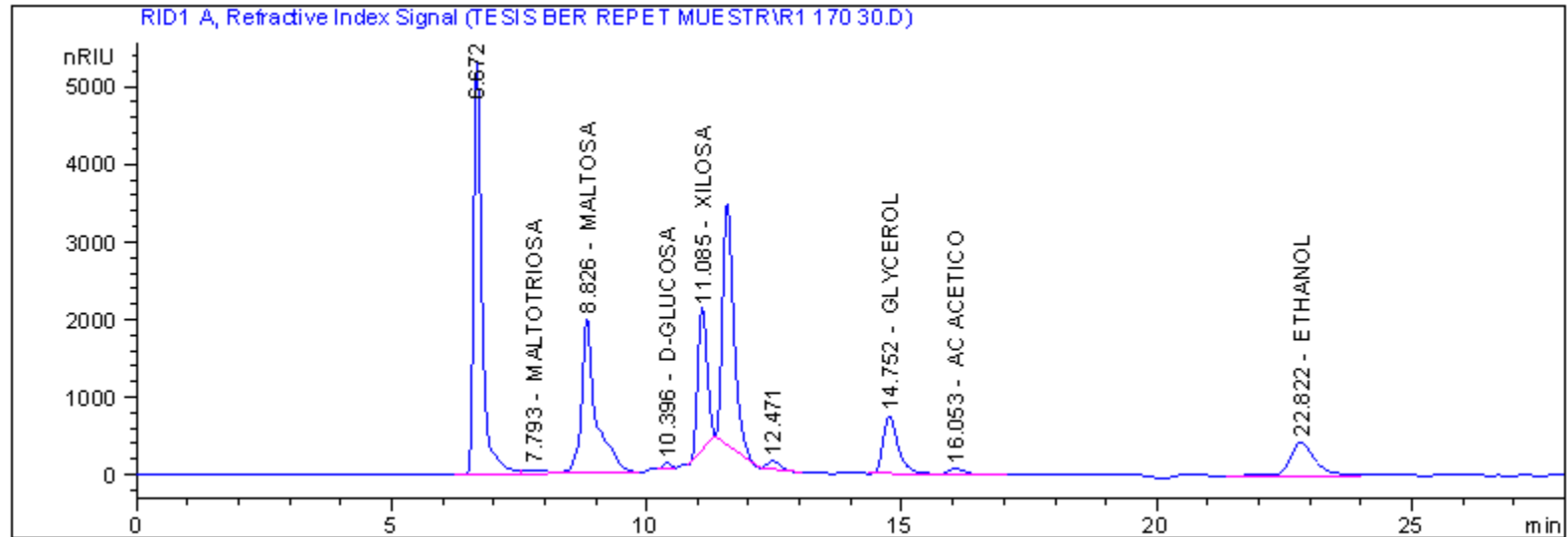
Totals : 1075.53132

R3 170°C 20' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



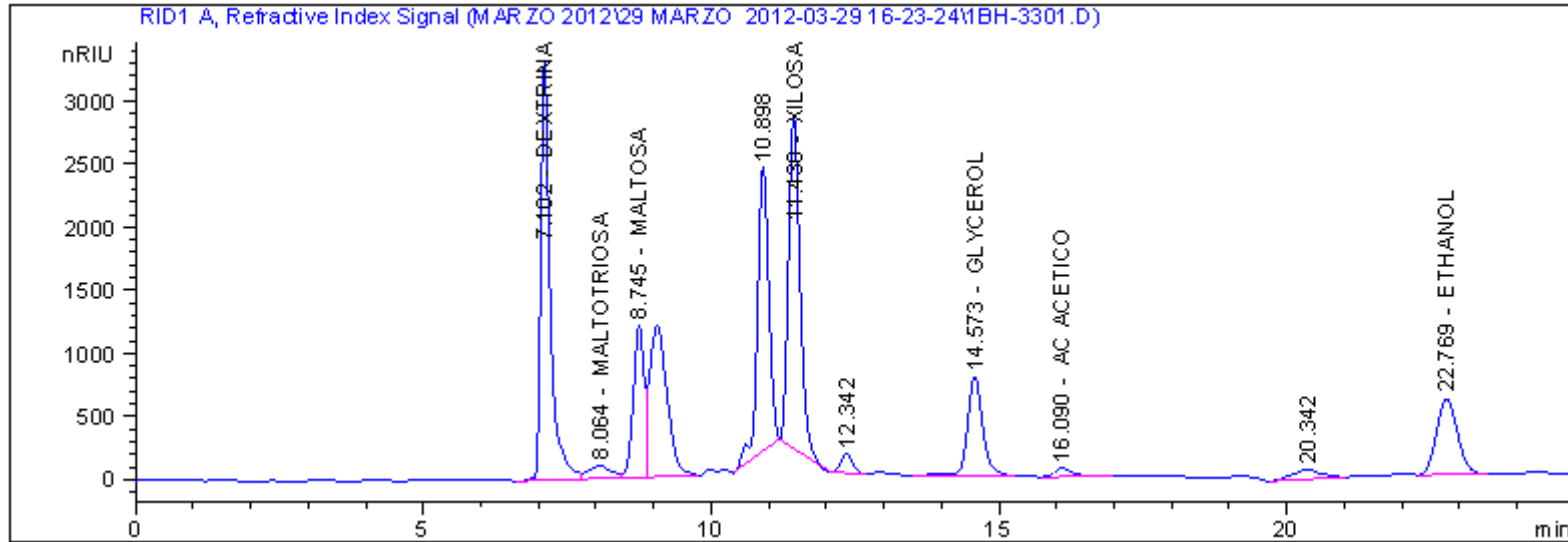
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.259	VV	5.17425e4	7.71743e-3	399.31924		DEXTRINA
8.215	VV	3830.33228	6.42900e-3	24.62522		MALTOTRIOSIA
8.915	VV	1.98550e4	6.75013e-3	134.02360		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.057	BB	4.07196e4	5.72177e-3	232.98818		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.722	BB	2.03354e4	7.86204e-3	159.87806		GLYCEROL
16.251	BB	1891.68311	4.94623e-3	9.35669		AC ACETICO
23.078	BB	2.01594e4	1.51736e-2	305.89125		ETHANOL
Totals :				1266.08225		

R1 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.793	VV	1767.19299	6.42900e-3	11.36129		MALTOTRIOSIA
8.826	VB	3.90768e4	6.75013e-3	263.77362		MALTOSA
10.396	BB	695.24048	6.25113e-3	4.34604		D-GLUCOSA
11.085	BB	2.32745e4	5.72177e-3	133.17146		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.752	BB	1.53355e4	7.86204e-3	120.56828		GLYCEROL
16.053	BB	1505.73792	4.94623e-3	7.44772		AC ACETICO
22.822	BB	1.52214e4	1.51736e-2	230.96454		ETHANOL
Totals :				771.63295		

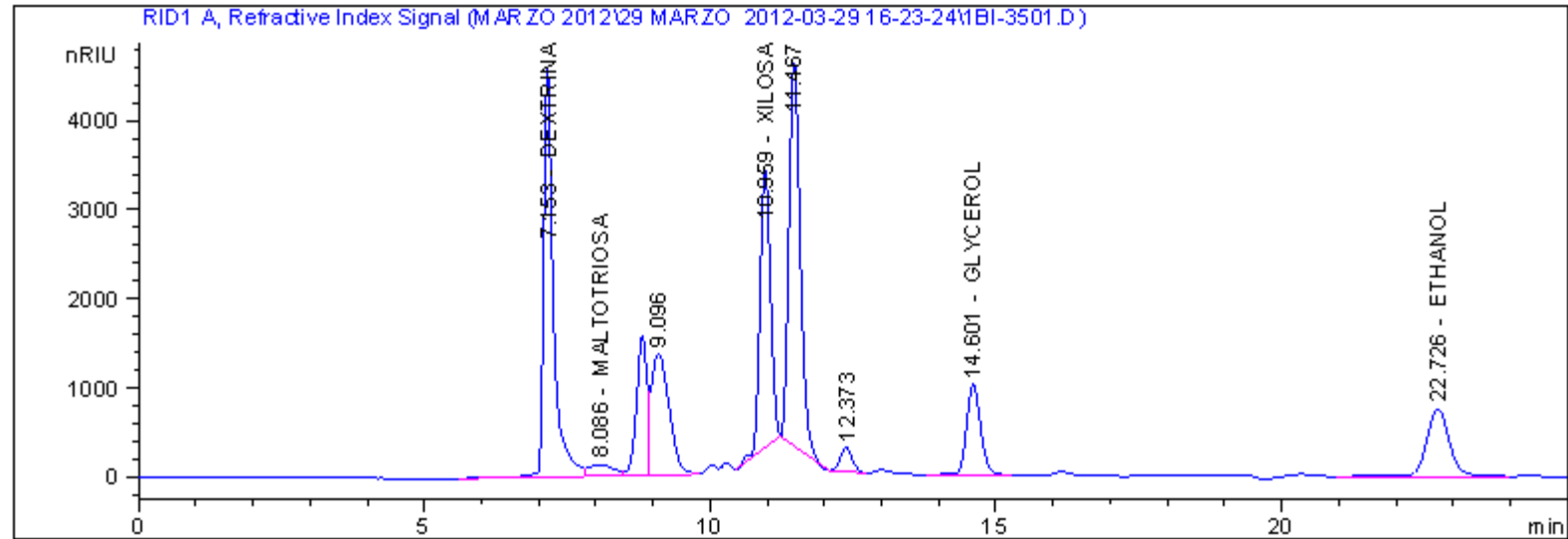
R2 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.102	VV	3.82514e4	7.71743e-3	295.20279		DEXTRINA
8.064	VV	2822.65039	6.42900e-3	18.14683		MALTOTRIOSIA
8.745	VV	1.57120e4	6.75013e-3	106.05777		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.430	BB	3.66222e4	5.72177e-3	209.54356		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.573	BB	1.46377e4	7.86204e-3	115.08257		GLYCEROL
16.090	BB	1588.96399	4.94623e-3	7.85937		AC ACETICO
22.769	BB	1.53503e4	1.51736e-2	232.91945		ETHANOL

Totals : 984.81234

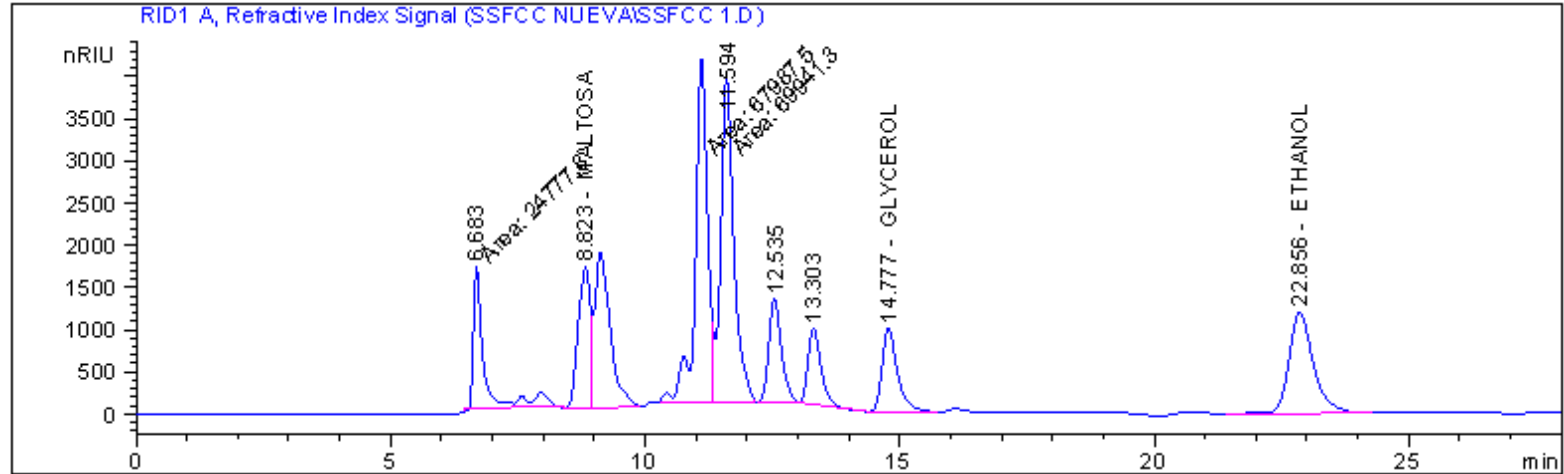
R3 170°C 30' Palma enzimas Biomass Kit 15 % de sólidos p/v Fermentación 72



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.153	VV	5.51330e4	7.71743e-3	425.48494		DEXTRINA
8.086	VV	3947.53613	6.42900e-3	25.37873		MALTOTRIOSIA
8.812	VV	2.05603e4	6.75013e-3	138.78482		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
10.959	BB	4.02175e4	5.72177e-3	230.11534		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.601	BB	1.79710e4	7.86204e-3	141.28860		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
22.726	BB	2.24989e4	1.51736e-2	341.38988		ETHANOL
Totals :				1302.44230		

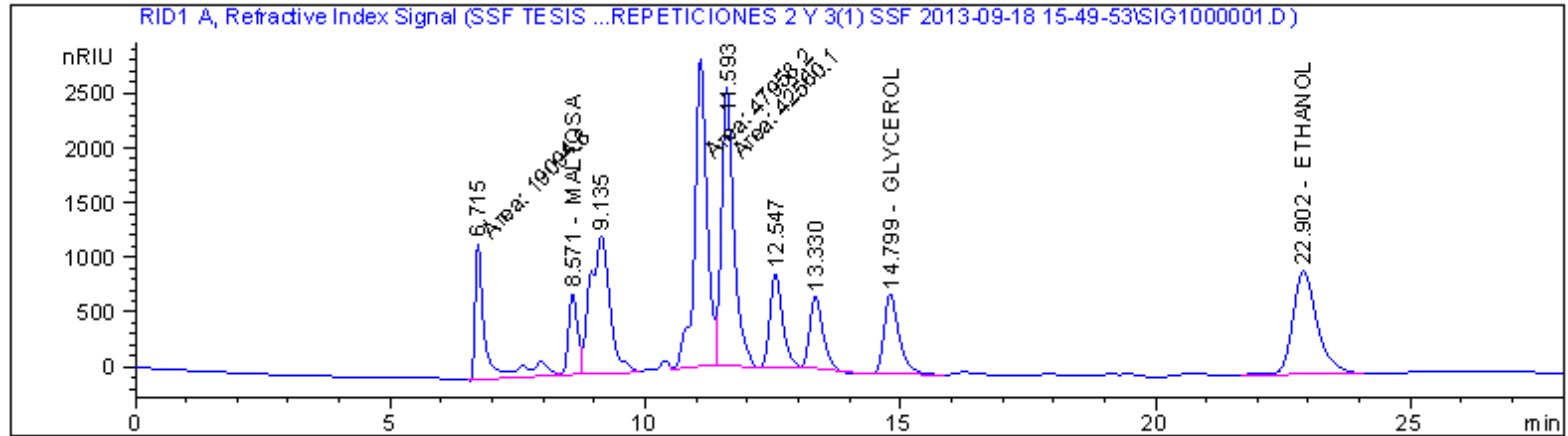
ANEXO 19 CROMATOGRAMAS OBTENIDOS POR HPLC EN EL PROCESO DE SSF

Día 1 R1 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



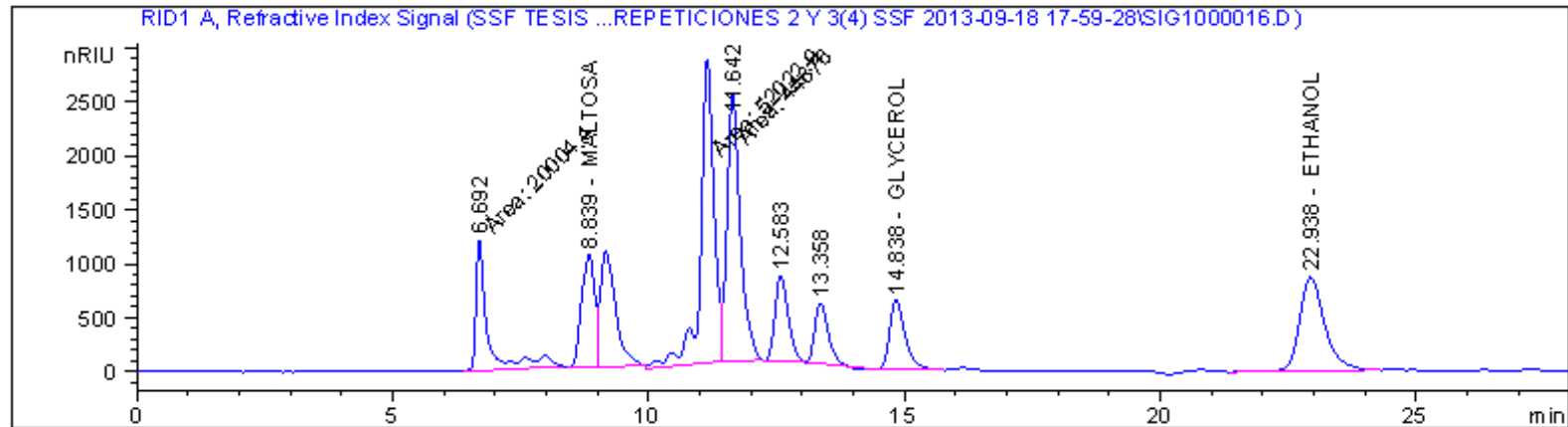
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.823	VV	2.84003e4	6.75013e-3	191.70592	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.102	MM	6.79875e4	5.72177e-3	389.00869	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.777	BB	2.07789e4	7.86204e-3	163.36438	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.856	BB	4.06948e4	1.51736e-2	617.48827	-	ETHANOL
Totals :				1361.56726		

Día 1 R2 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



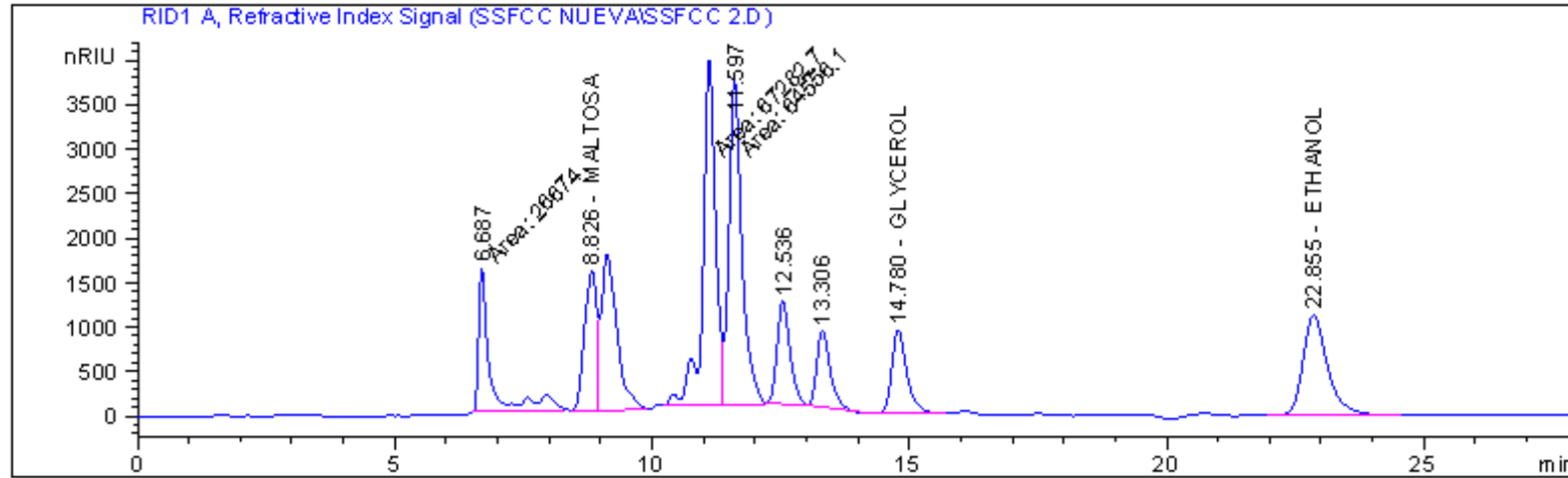
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.571	VV	9173.04004	6.75013e-3	61.91925	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.078	MM	4.79582e4	5.72177e-3	274.40569	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.799	BB	1.51548e4	7.86204e-3	119.14744	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.902	BB	3.13669e4	1.51736e-2	475.95055	-	ETHANOL
Totals :				931.42293		

Día 1 R3 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



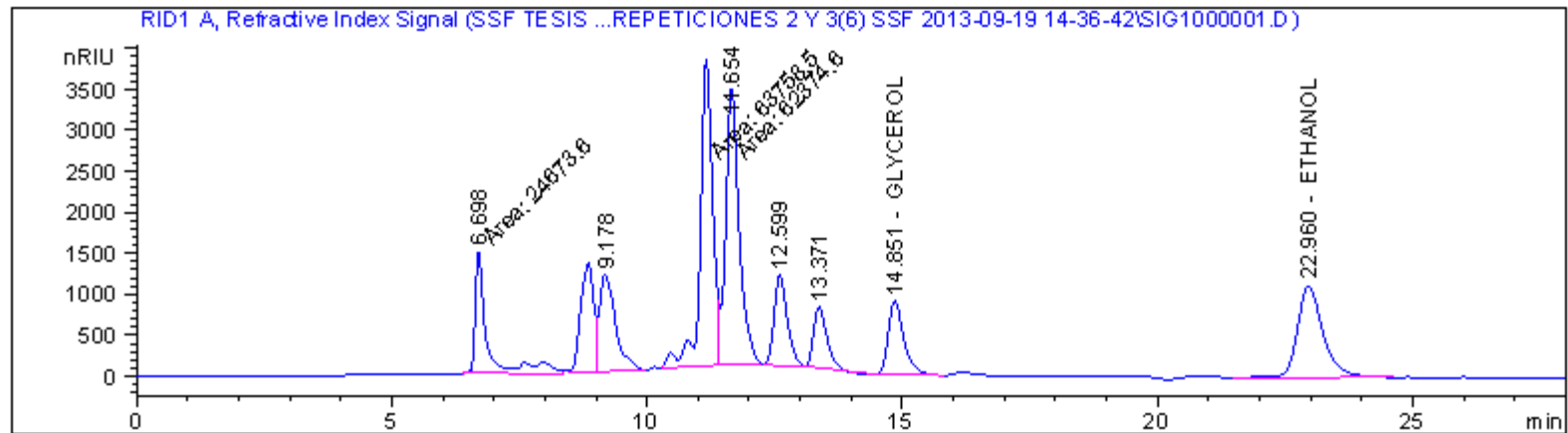
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.839	VV	1.84807e4	6.75013e-3	124.74704	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.147	MM	5.20229e4	5.72177e-3	297.66261	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.838	BB	1.37953e4	7.86204e-3	108.45934	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.938	BB	3.02863e4	1.51736e-2	459.55384	-	ETHANOL
Totals :				990.42283		

Día 2 R1 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



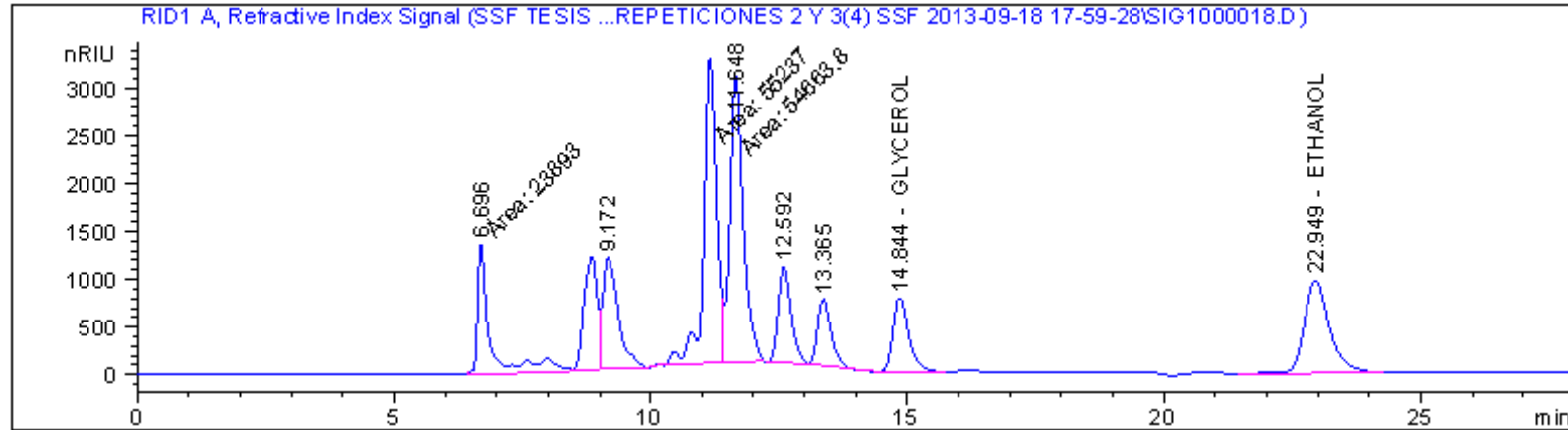
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.826	VV	2.67681e4	6.75013e-3	180.68850	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.105	MM	6.72827e4	5.72177e-3	384.97587	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.780	BB	1.93790e4	7.86204e-3	152.35835	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.855	BB	3.78537e4	1.51736e-2	574.37832	-	ETHANOL
Totals :				1292.40105		

Día 2 R2 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



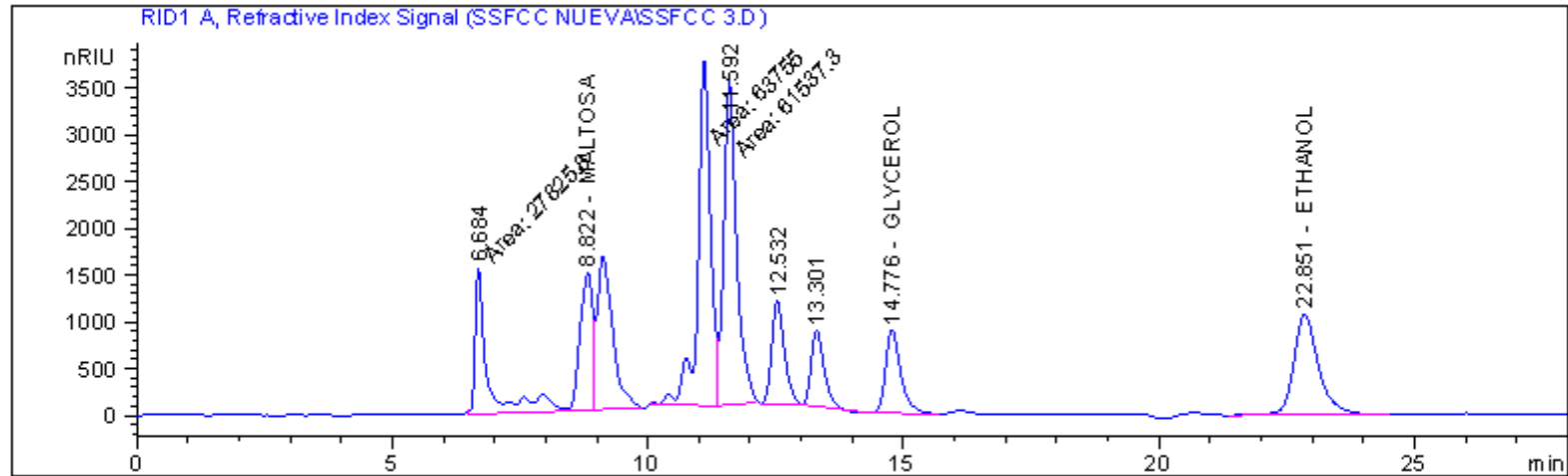
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.846	VV	2.34793e4	6.75013e-3	158.48831	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.157	MM	6.37585e4	5.72177e-3	364.81137	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.851	BB	1.92229e4	7.86204e-3	151.13122	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.960	BB	3.92545e4	1.51736e-2	595.63403	-	ETHANOL
Totals :				1270.06492		

Día 2 R3 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



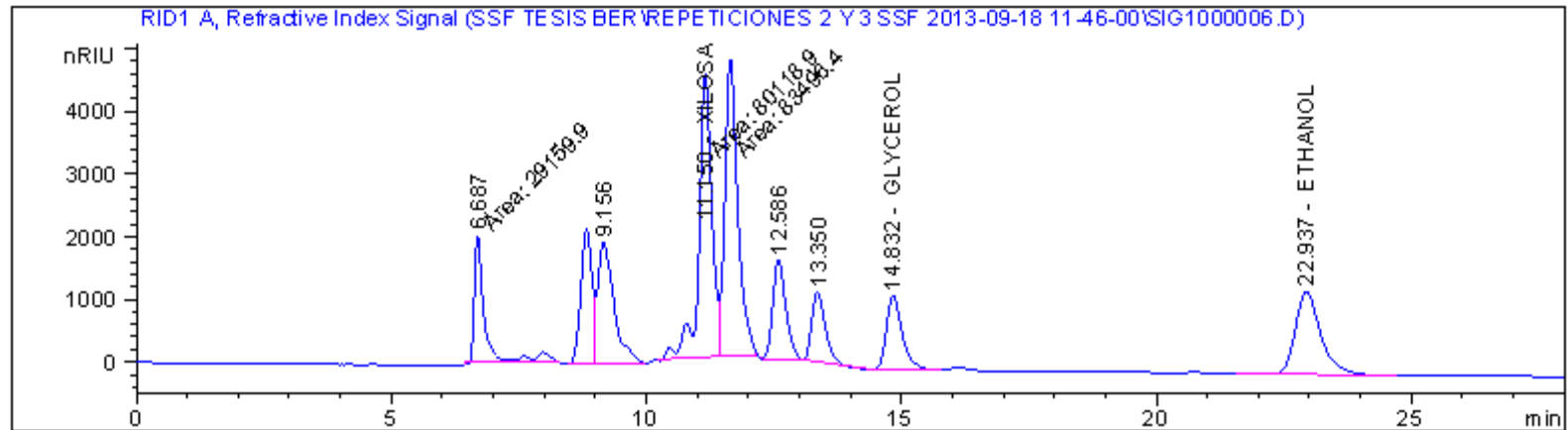
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.843	VV	2.09423e4	6.75013e-3	141.36325	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.152	MM	5.52370e4	5.72177e-3	316.05303	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.844	BB	1.67549e4	7.86204e-3	131.72762	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.949	BB	3.40002e4	1.51736e-2	515.90678	-	ETHANOL
Totals :				1105.05068		

Día 3 R1 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



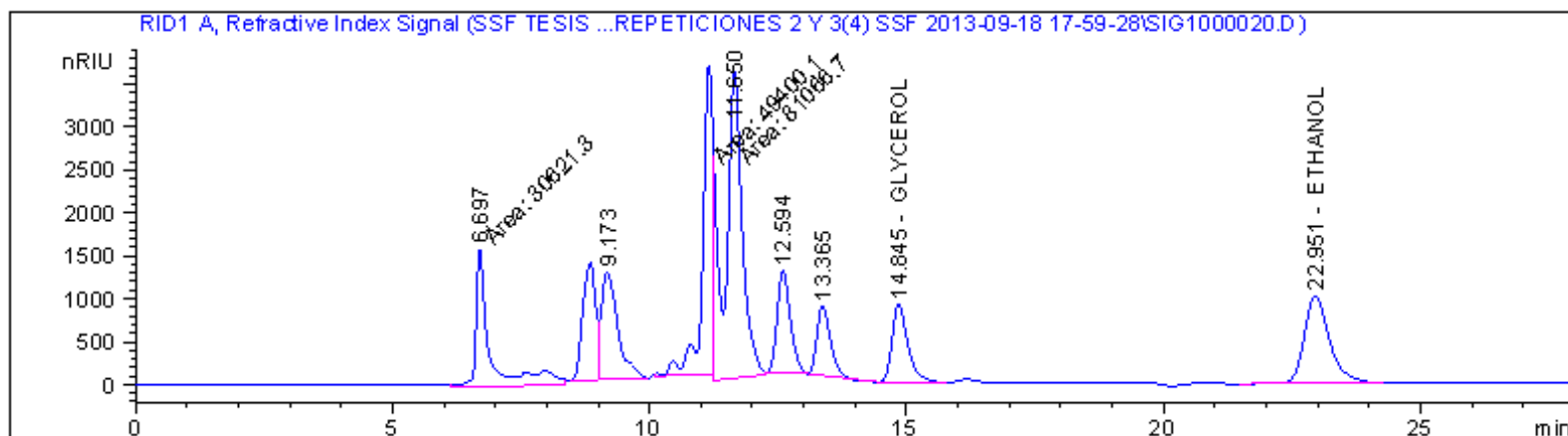
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.822	VV	2.52025e4	6.75013e-3	170.11994	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.100	MM	6.37550e4	5.72177e-3	364.79103	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.776	BB	1.83493e4	7.86204e-3	144.26275	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.851	BB	3.64985e4	1.51736e-2	553.81473	-	ETHANOL
Totals :				1232.98845		

Día 3 R2 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



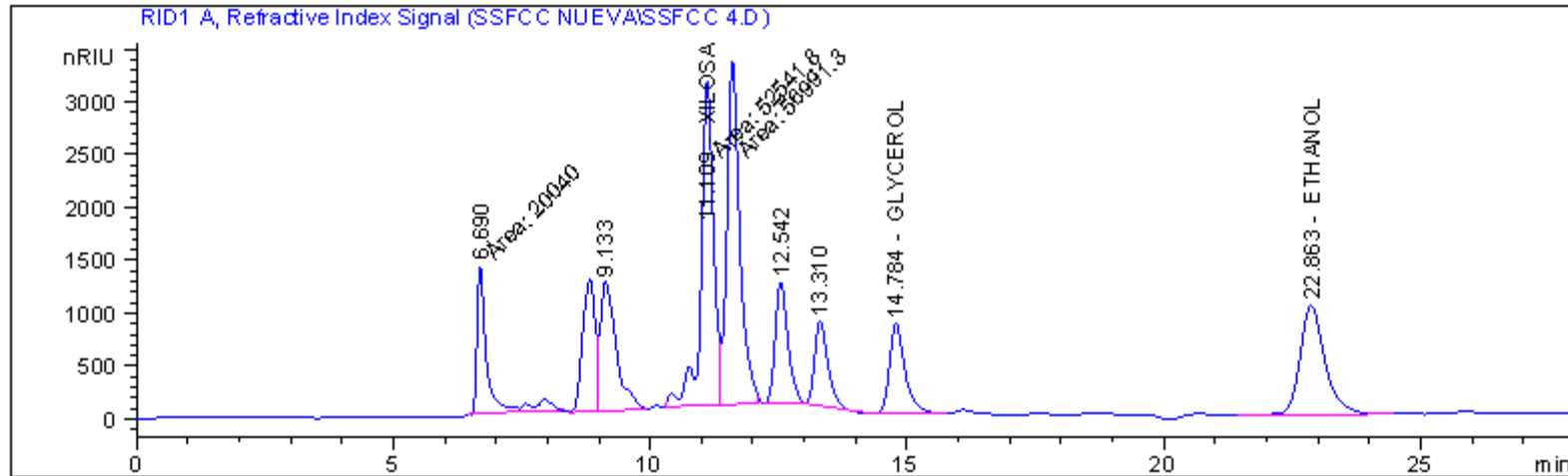
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.823	VV	3.32039e4	6.75013e-3	224.13093		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.150	MM	8.01189e4	5.72177e-3	458.42161		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.832	BB	2.54763e4	7.86204e-3	200.29567		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
22.937	BB	4.58491e4	1.51736e-2	695.69744		ETHANOL
Totals :				1578.54566		

Día 3 R3 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



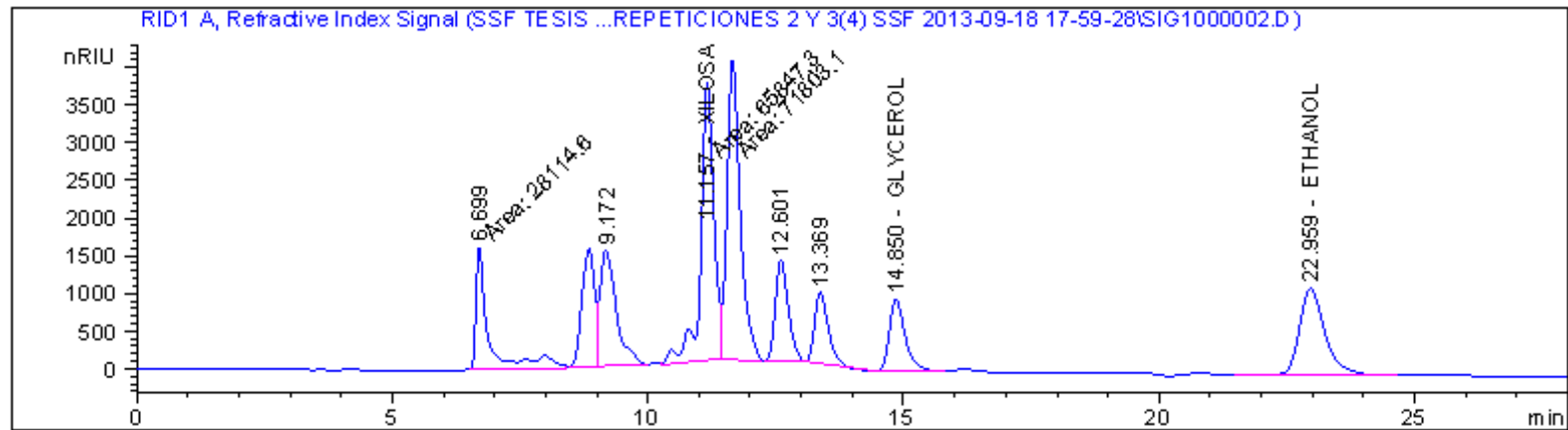
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.842	VV	2.37341e4	6.75013e-3	160.20845	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.154	MM	4.94001e4	5.72177e-3	282.65603	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.845	BB	1.93056e4	7.86204e-3	151.78137	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.951	BB	3.47912e4	1.51736e-2	527.90919	-	ETHANOL
Totals :				1122.55503		

Día 4 R1 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.822	VV	2.11189e4	6.75013e-3	142.55523		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.109	MM	5.25418e4	5.72177e-3	300.63200		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.784	BB	1.80331e4	7.86204e-3	141.77714		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
22.863	BB	3.53788e4	1.51736e-2	536.82530		ETHANOL
Totals :				1121.78966		

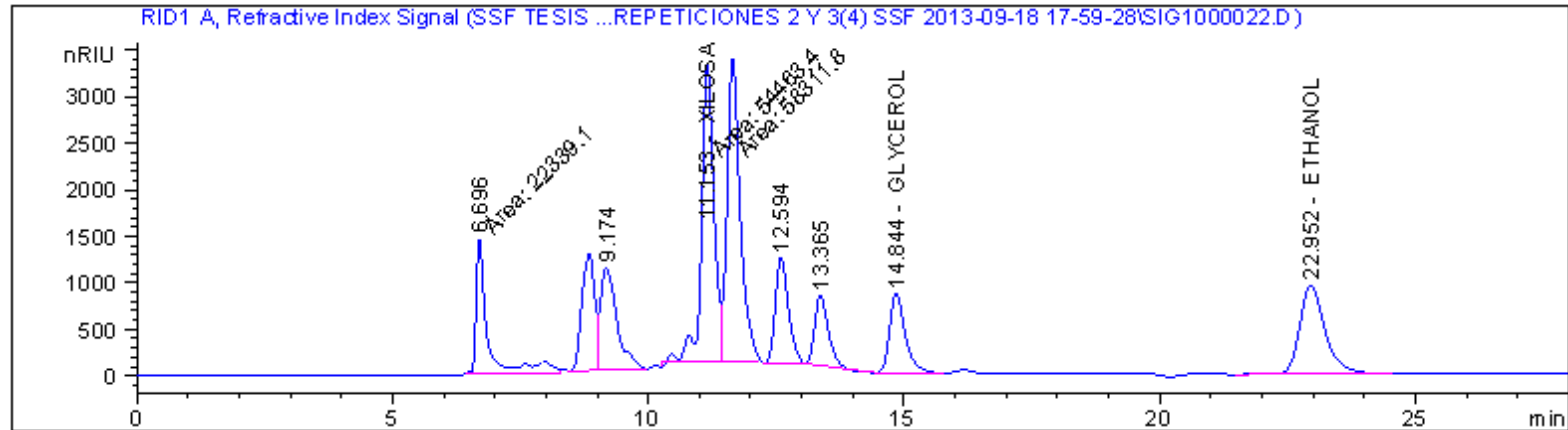
Día 4 R2 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.845	VV	2.67848e4	6.75013e-3	180.80089	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.157	MM	6.58473e4	5.72177e-3	376.76255	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.850	BB	2.05896e4	7.86204e-3	161.87591	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.959	BB	4.01791e4	1.51736e-2	609.66318	-	ETHANOL

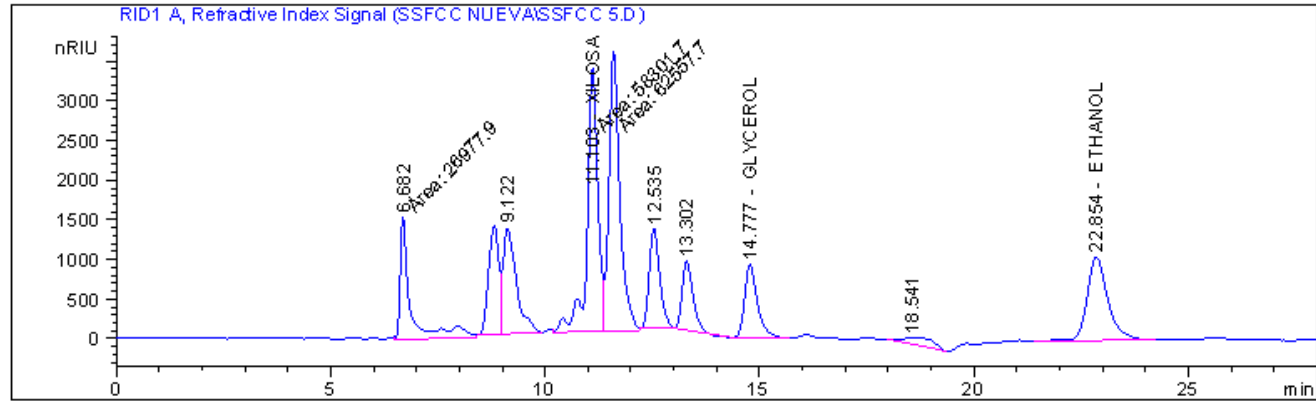
Totals : 1329.10253

Día 4 R3 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



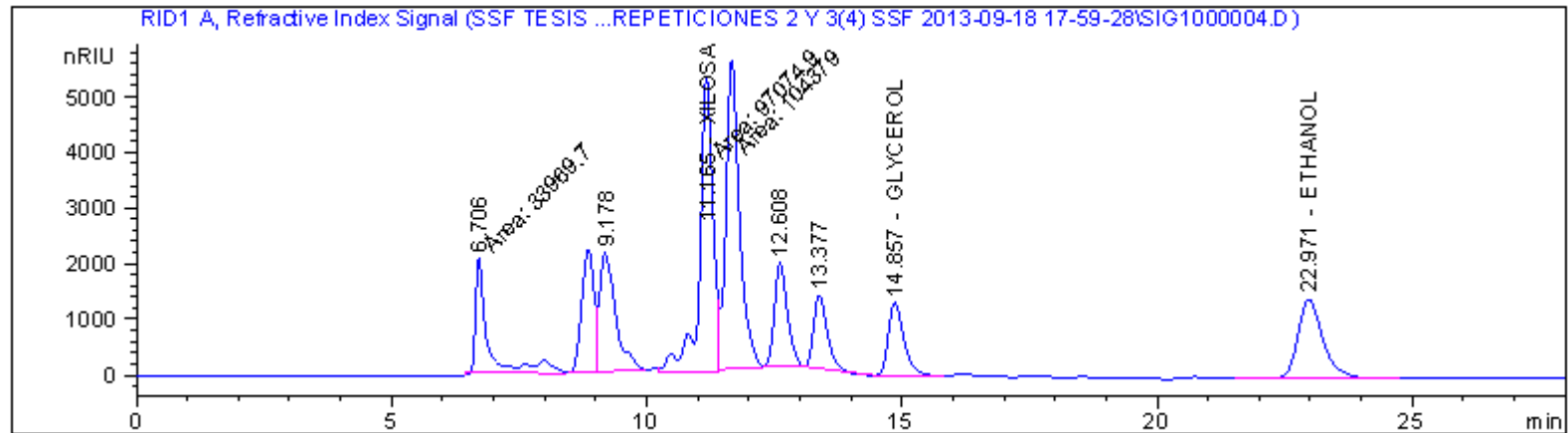
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.840	VV	2.19204e4	6.75013e-3	147.96560	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.153	MM	5.44634e4	5.72177e-3	311.62684	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.844	BB	1.83432e4	7.86204e-3	144.21503	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.952	BB	3.31724e4	1.51736e-2	503.34639	-	ETHANOL
Totals :				1107.15387		

Día 5 R1 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



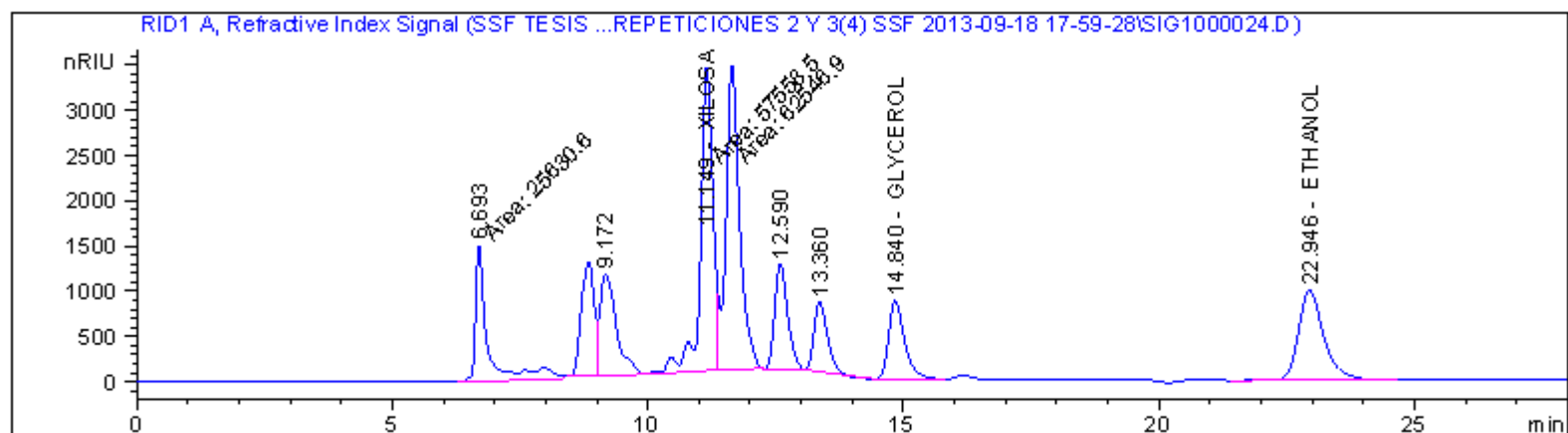
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.813	VV	2.27326e4	6.75013e-3	153.44833	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.103	MM	5.83017e4	5.72177e-3	333.58874	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.777	BB	1.89710e4	7.86204e-3	149.15113	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.854	BB	3.55090e4	1.51736e-2	538.80000	-	ETHANOL
Totals :				1174.98821		

Día 5 R2 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



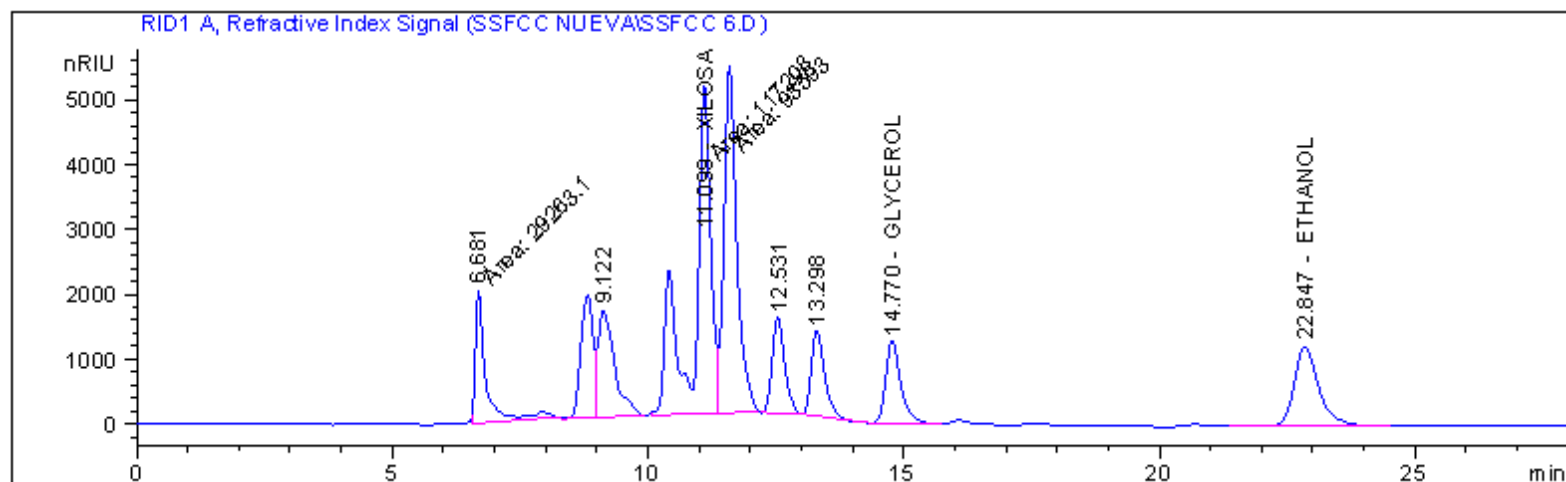
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.852	VV	3.66835e4	6.75013e-3	247.61860	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.165	MM	9.70749e4	5.72177e-3	555.43986	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.857	BB	2.82378e4	7.86204e-3	222.00649	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.971	BB	4.88593e4	1.51736e-2	741.37351	-	ETHANOL
Totals :				1766.43846		

Día 5 R3 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.838	VV	2.20422e4	6.75013e-3	148.78797	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.149	MM	5.75585e4	5.72177e-3	329.33627	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.840	BB	1.86778e4	7.86204e-3	146.84537	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.946	BB	3.44272e4	1.51736e-2	522.38640	-	ETHANOL
Totals :				1147.35601		

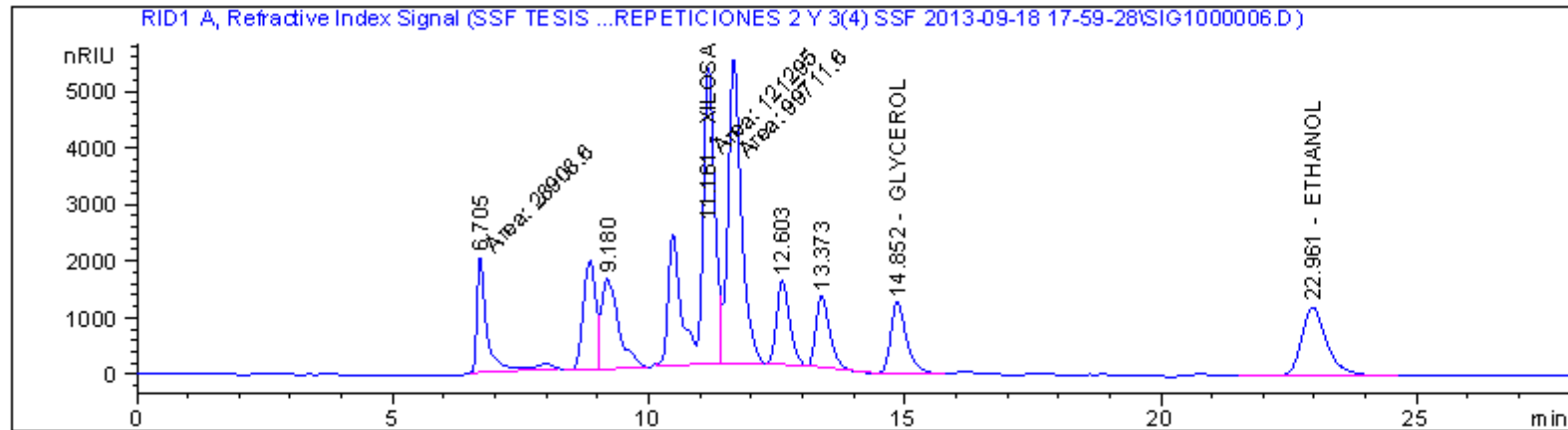
Día 6 R1 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.812	VV	3.16259e4	6.75013e-3	213.47897	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.099	MM	1.17208e5	5.72177e-3	670.63482	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.770	BB	2.62320e4	7.86204e-3	206.23730	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.847	BB	4.19790e4	1.51736e-2	636.97400	-	ETHANOL

Totals : 1727.32509

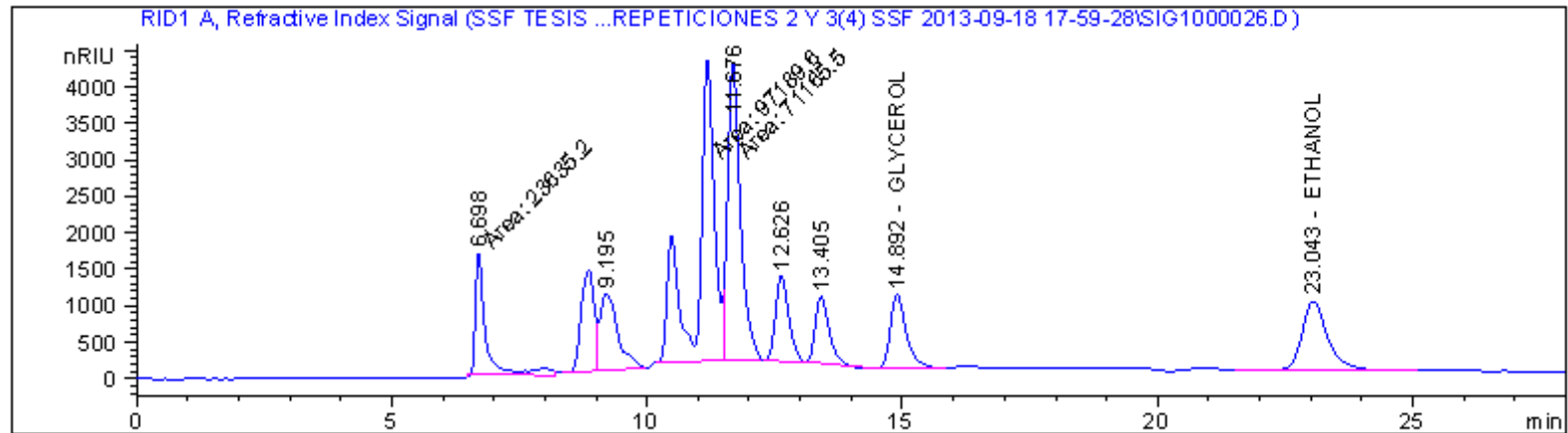
Día 6 R2 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.845	VV	3.32618e4	6.75013e-3	224.52143	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.161	MM	1.21295e5	5.72177e-3	694.02419	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.852	BB	2.69906e4	7.86204e-3	212.20134	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.961	BB	4.18278e4	1.51736e-2	634.67940	-	ETHANOL

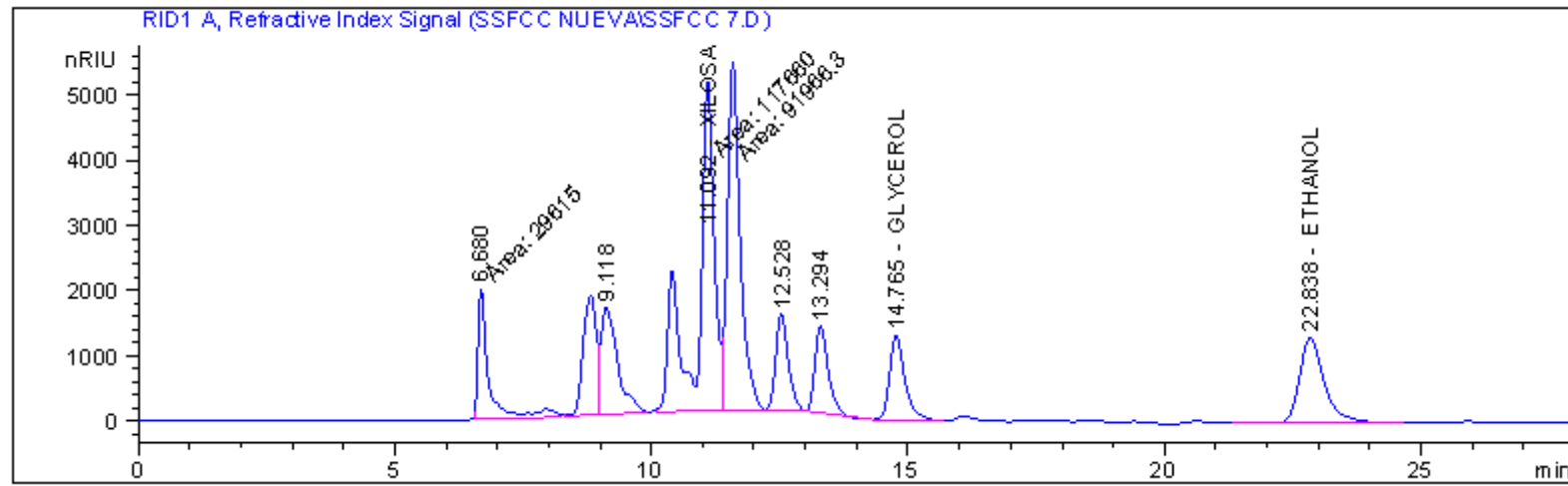
Totals : 1765.42636

Día 6 R3 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.849	VV	2.48352e4	6.75013e-3	167.64109		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.177	MM	9.71896e4	5.72177e-3	556.09581		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.892	BB	2.21132e4	7.86204e-3	173.85451		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
23.043	BB	3.36975e4	1.51736e-2	511.31332		ETHANOL
Totals :				1408.90472		

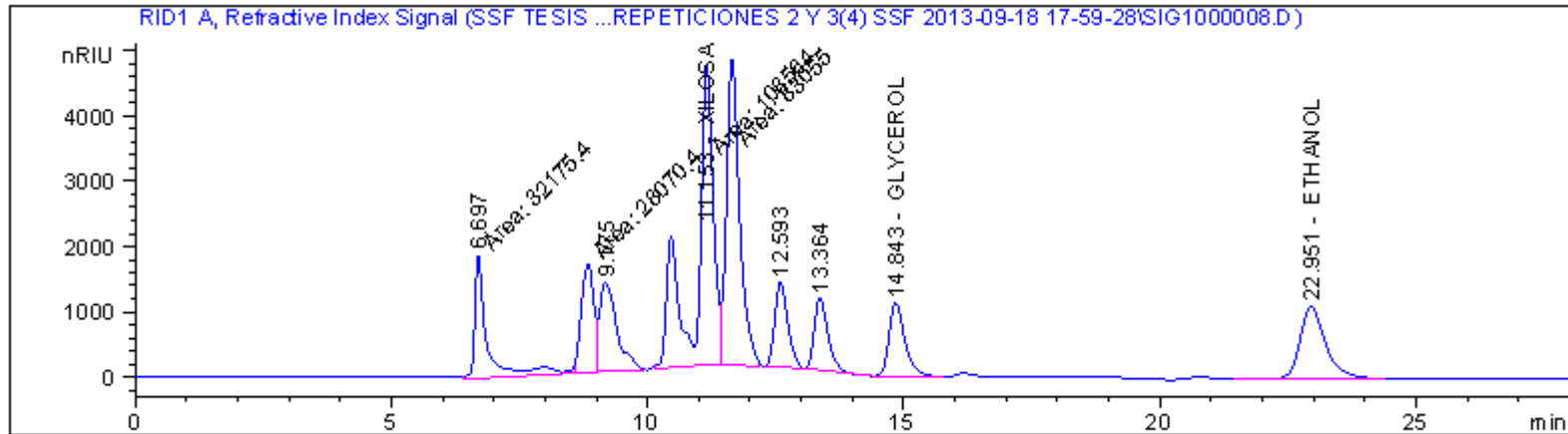
Día 7 R1 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.816	VV	3.24291e4	6.75013e-3	218.90089	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.092	MM	1.17660e5	5.72177e-3	673.22512	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.765	BB	2.68345e4	7.86204e-3	210.97403	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.838	BB	4.36535e4	1.51736e-2	662.38249	-	ETHANOL

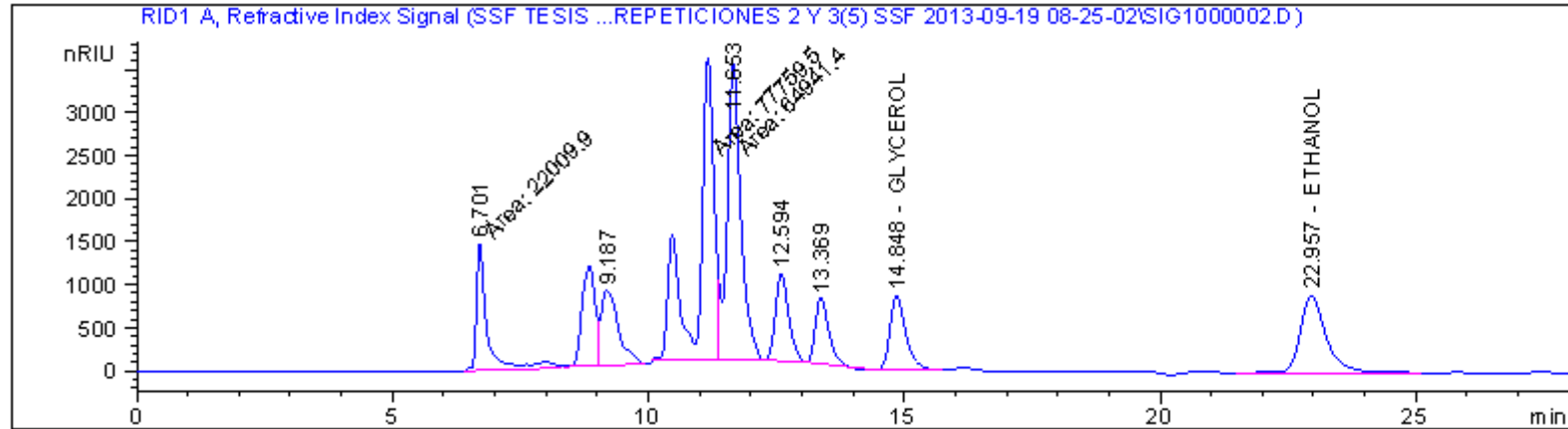
Totals : 1765.48253

Día 7 R2 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



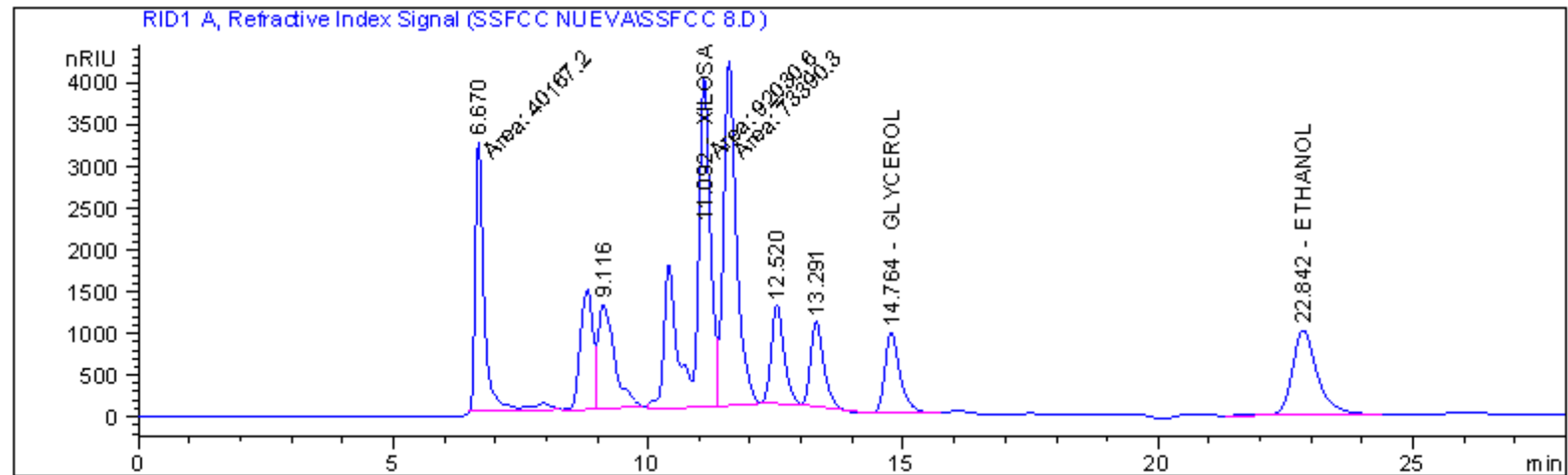
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.839	MM	2.80704e4	6.75013e-3	189.47925	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.153	MM	1.08564e5	5.72177e-3	621.17785	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.843	BB	2.40842e4	7.86204e-3	189.35078	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.951	BB	3.80925e4	1.51736e-2	578.00126	-	ETHANOL
Totals :				1578.00913		

Día 7 R3 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



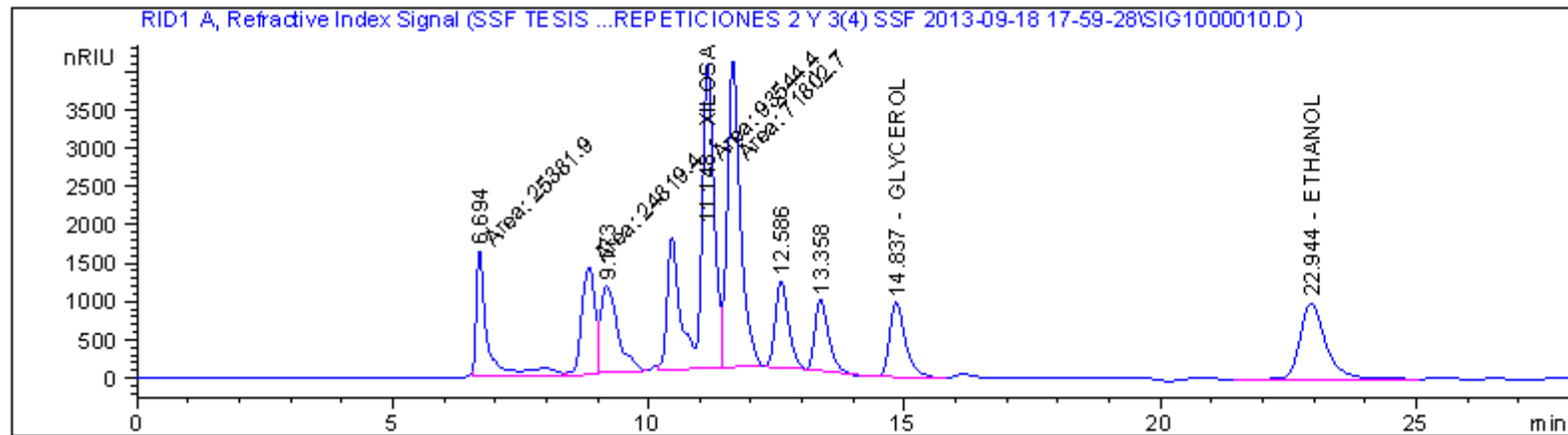
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.841	VV	2.08567e4	6.75013e-3	140.78549	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.158	MM	7.77595e4	5.72177e-3	444.92142	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.848	BB	1.87123e4	7.86204e-3	147.11697	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.957	BB	3.28172e4	1.51736e-2	497.95596	-	ETHANOL
Totals :				1230.77984		

Día 8 R1 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



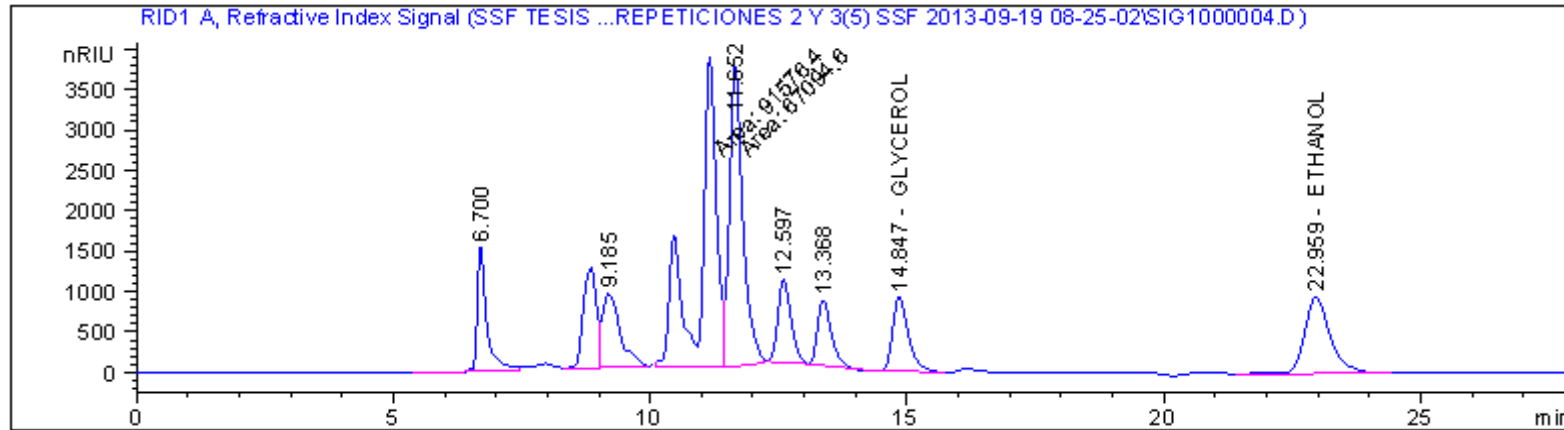
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.801	VV	2.46441e4	6.75013e-3	166.35070	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.092	MM	9.20306e4	5.72177e-3	526.57740	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.764	BB	2.00169e4	7.86204e-3	157.37378	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.842	BB	3.48530e4	1.51736e-2	528.84711	-	ETHANOL
Totals :				1379.14899		

Día 8 R2 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



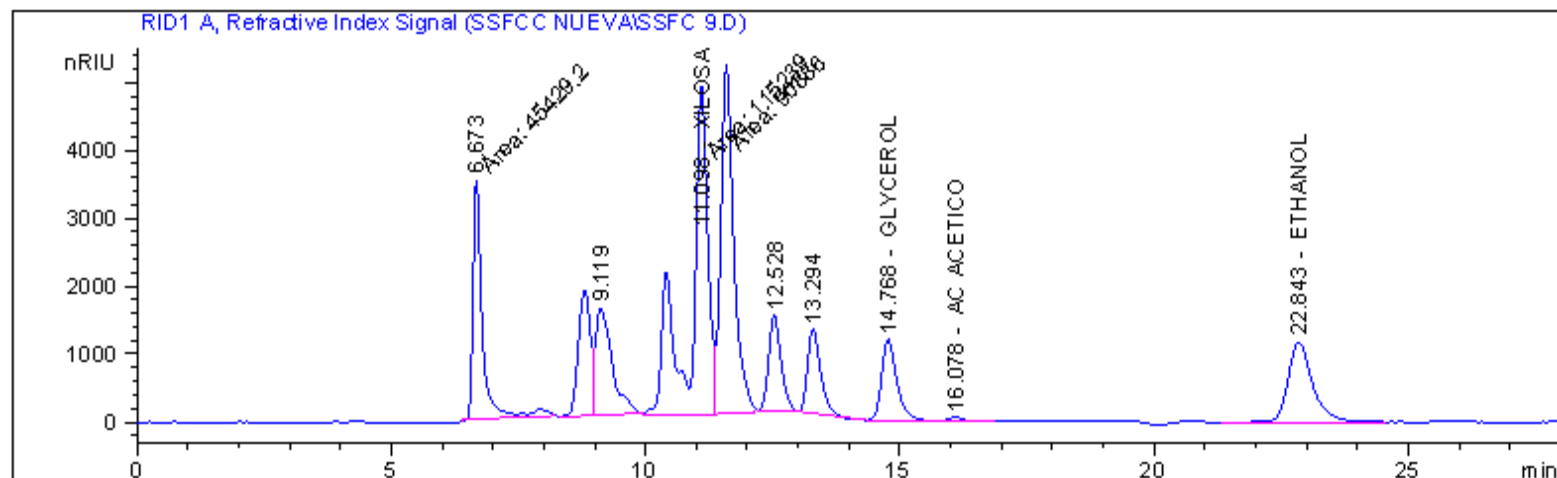
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.835	MM	2.48194e4	6.75013e-3	167.53402	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.148	MM	9.35444e4	5.72177e-3	535.23886	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.837	BB	2.09106e4	7.86204e-3	164.39999	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.944	BB	3.48481e4	1.51736e-2	528.77272	-	ETHANOL
Totals :				1395.94559		

Día 8 R3 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.839	VV	2.21700e4	6.75013e-3	149.65022	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.157	MM	9.15764e4	5.72177e-3	523.97883	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.847	BB	1.97462e4	7.86204e-3	155.24558	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.959	BB	3.30795e4	1.51736e-2	501.93637	-	ETHANOL
Totals :				1330.81100		

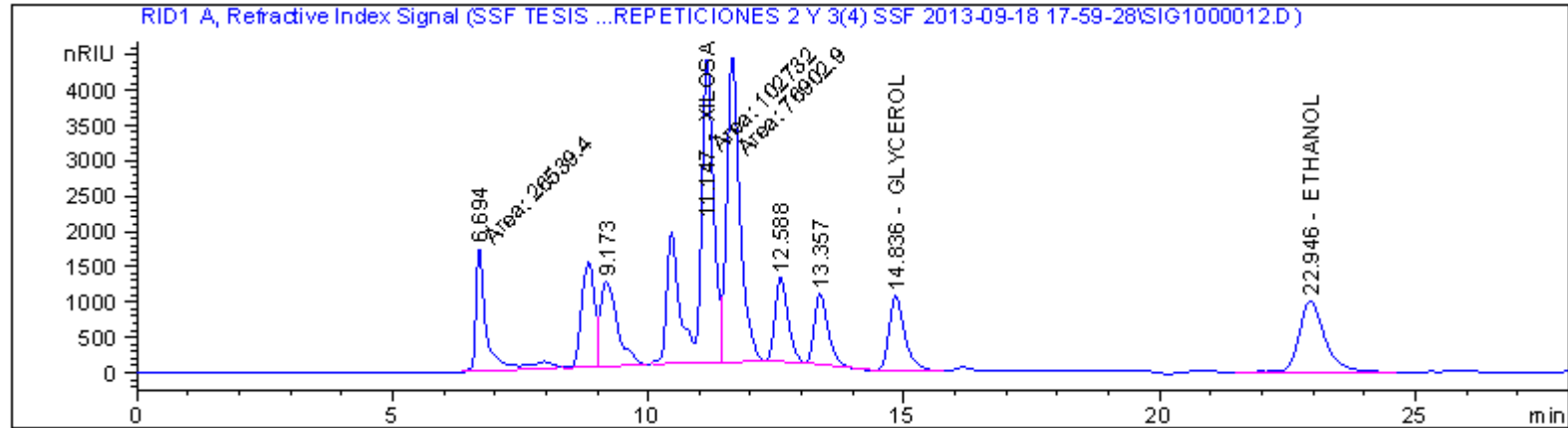
Día 9 R1 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.804	VV	3.07137e4	6.75013e-3	207.32174	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.098	MM	1.15239e5	5.72177e-3	659.36983	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.768	BB	2.48269e4	7.86204e-3	195.19025	-	GLYCEROL
16.078	BB	1329.32593	4.94623e-3	6.57515	-	AC ACETICO
22.843	BB	4.04826e4	1.51736e-2	614.26814	-	ETHANOL

Totals : 1682.72509

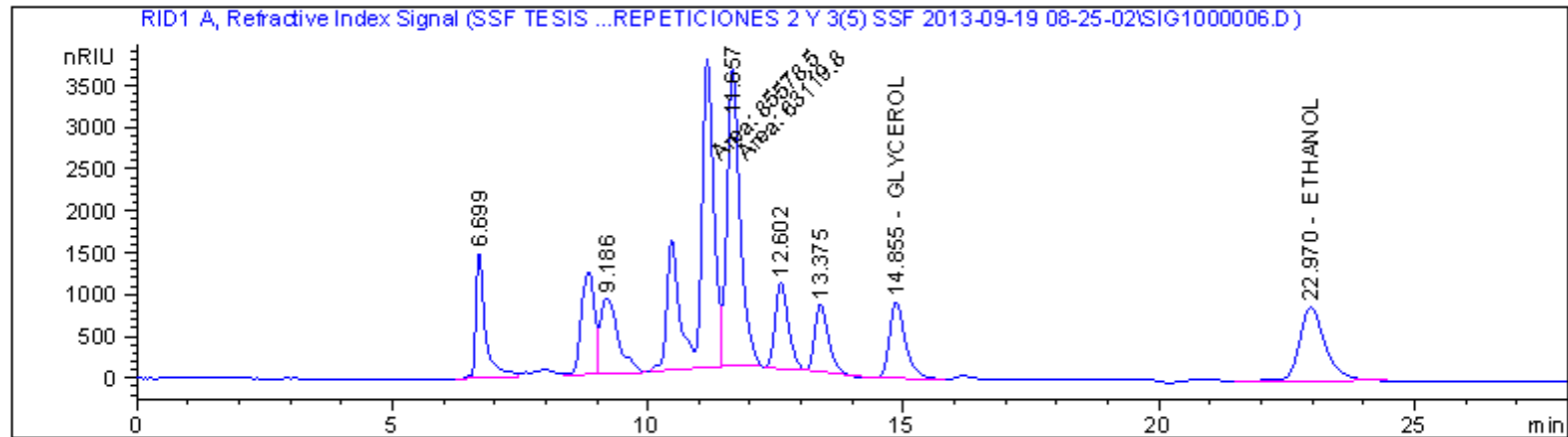
Día 9 R2 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.833	VV	2.63674e4	6.75013e-3	177.98382	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.147	MM	1.02732e5	5.72177e-3	587.80842	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.836	BB	2.23924e4	7.86204e-3	176.05006	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.946	BB	3.53442e4	1.51736e-2	536.30038	-	ETHANOL

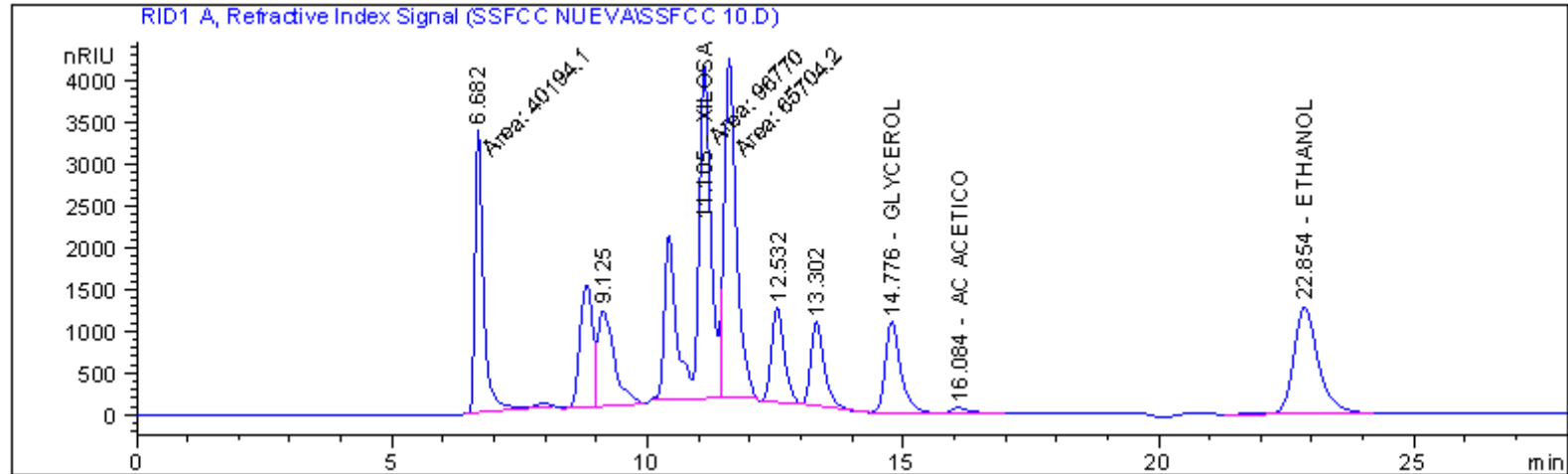
Totals : 1478.14269

Día 9 R3 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



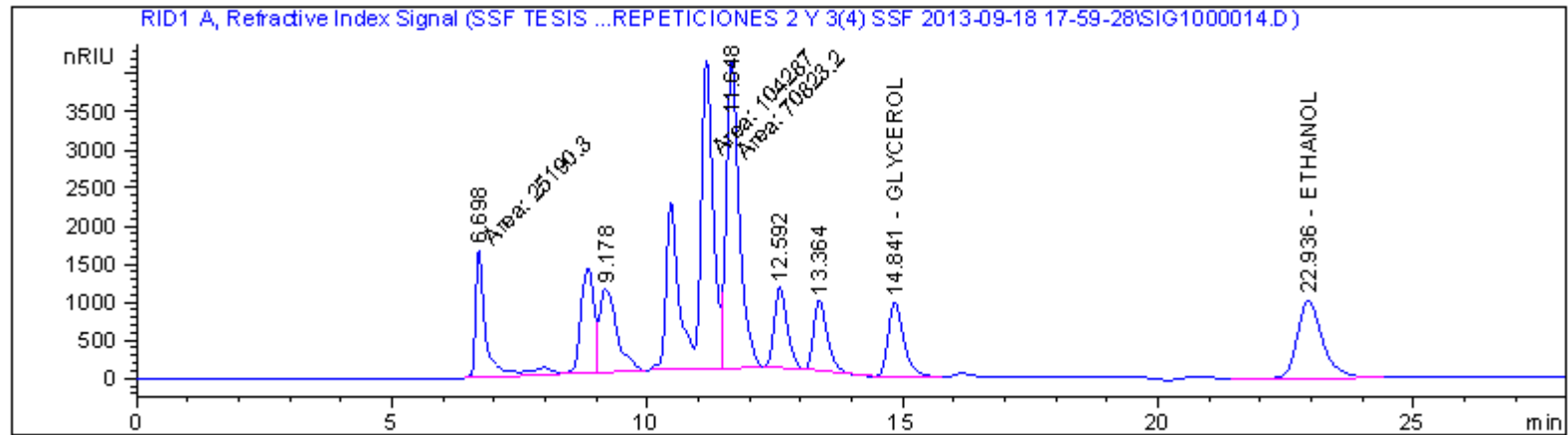
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.839	VV	2.20854e4	6.75013e-3	149.07923		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.161	MM	8.55785e4	5.72177e-3	489.66017		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.855	BB	1.97591e4	7.86204e-3	155.34700		GLYCEROL
16.049		-	-	-		AC ACETICO
22.970	BB	3.08054e4	1.51736e-2	467.42984		ETHANOL
Totals :				1261.51625		

Día 10 R1 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



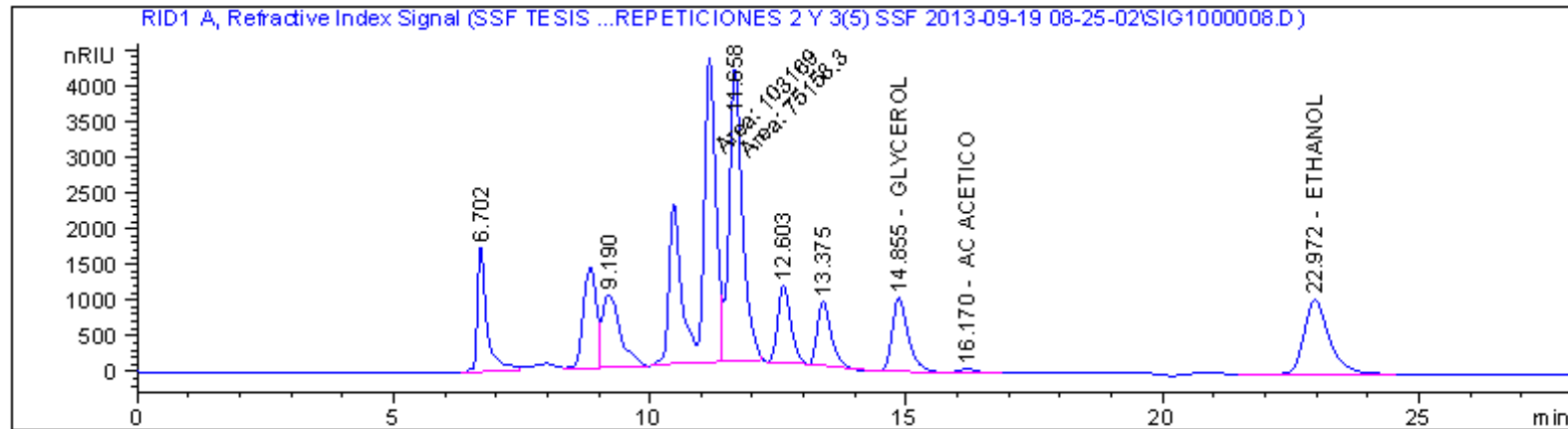
RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.807	VV	2.57398e4	6.75013e-3	173.74720	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.105	MM	9.67700e4	5.72177e-3	553.69548	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.776	BB	2.26274e4	7.86204e-3	177.89790	-	GLYCEROL
16.084	BB	1367.48389	4.94623e-3	6.76388	-	AC ACETICO
22.854	BB	4.33800e4	1.51736e-2	658.23226	-	ETHANOL
Totals :				1570.33673		

Día 10 R2 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Name
7.137	-	-	-	-	-	DEXTRINA
7.986	-	-	-	-	-	MALTOTRIOSIA
8.838	VV	2.49292e4	6.75013e-3	168.27548	-	MALTOSA
10.478	-	-	-	-	-	D-GLUCOSA
11.153	MM	1.04287e5	5.72177e-3	596.70774	-	XILOSA
13.849	-	-	-	-	-	AC LACTICO
14.841	BB	2.08580e4	7.86204e-3	163.98679	-	GLYCEROL
16.049	-	-	-	-	-	AC ACETICO
22.936	BB	3.55330e4	1.51736e-2	539.16476	-	ETHANOL
Totals :				1468.13476		

Día 10 R3 160°C 20' Palma 25 % de sólidos SSF por 10 días



RetTime [min]	Type	Area [nRIU*s]	Amt/Area	Amount [ug/mL]	Grp	Name
7.137		-	-	-		DEXTRINA
7.986		-	-	-		MALTOTRIOSIA
8.839	VV	2.53724e4	6.75013e-3	171.26716		MALTOSA
10.478		-	-	-		D-GLUCOSA
11.162	MM	1.03169e5	5.72177e-3	590.30723		XILOSA
13.849		-	-	-		AC LACTICO
14.855	BB	2.22687e4	7.86204e-3	175.07706		GLYCEROL
16.170	BB	1214.37268	4.94623e-3	6.00656		AC ACETICO
22.972	BB	3.60615e4	1.51736e-2	547.18326		ETHANOL

Totals : 1489.84126

