



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,
AMBIENTAL Y DE LOS MATERIALES**

TESIS DOCTORAL

**HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN DE
RESIDUOS DE TALLOS DE GIRASOL**

**PRESENTADA POR:
ENCARNACIÓN RUIZ RAMOS**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. SEBASTIÁN SÁNCHEZ VILLASCLARAS
DR. D. EULOGIO CASTRO GALIANO**

JAÉN, 2 DE ABRIL DE 2004

ISBN 84-8439-260-0

Nombre y apellidos de la autora

ENCARNACIÓN RUIZ RAMOS

Título de la Tesis Doctoral

HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN DE RESIDUOS DE TALLOS DE GIRASOL

I.S.B.N.

84-8439-260-0

Fecha de Lectura

2 DE ABRIL DE 2004

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales

Composición del Tribunal/Dirección de la Tesis

Dirección de la Tesis Dr. D. Sebastián Sánchez Villasclaras
Dr. D. Eulogio Castro Galiano

Presidente del Tribunal	Dr. D. Vicente Bravo Rodríguez
Vocales	Dr. D. Enrique Martínez de la Ossa Fernández Dr. D. Leopoldo Martínez Nieto Dr. D. Ildefonso Sánchez Parra
Suplentes	Dr. D. Emilio Molina Grima Dr. D. Alberto J. Moya López
Secretario	Dr. D. Manuel Moya Vilar

Calificación Obtenida

SOBRESALIENTE CUM LAUDE



UNIVERSIDAD DE JAÉN

tesis doctoral

Abstract

The work described in this Memory is part of the research on lignocellulose residues carried out at the Department of Chemical, Environmental and Material Engineering in the University of Jaén. The acid hydrolysis of sunflower stalks and later fermentation using the yeast *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 and the fungus *Fusarium oxysporum* VTT D 80134 are studied.

Firstly, following a preparation step of the residue which includes grinding and size grading, the raw material is hydrolysed with sulphuric and hydrochloric acids in a range of concentrations and temperatures. Besides these variables, the influence of particle size, the two parts of the residue (pith and stalk) and the operation time in the hydrolysis with sulphuric acid is studied.

The concentrations of total reducing sugars and D-glucose with time are determined in the course of each hydrolysis experiment. As a result, the corresponding yields and the kinetics of the process are evaluated. The final solid residue is characterized by means of its contents in moisture, hemicellulose, cellulose, lignin and ash; from this values conversions in both cellulose and hemicellulose reached at the end of each hydrolysis are calculated.

A previous study with *Pachysolen tannophilus* and synthetic substrates, including among them acetic acid, has been carried out in order to determine the influence of this compound as fermentation inhibitor.

The sugar solutions obtained as a product in the hydrolysis experiments have been used as a substrate for *Pachysolen tannophilus* and the influence of the hydrolysis variables on the fermentation has been established. Also, in the previous step of hydrolysate conditioning which includes basically the neutralisation and concentration, different neutralising agents have been assayed and the order of these two operations have been also modified.

As far as *Fusarium oxysporum* is concerned, the fermentation with synthetic sugars (D-xylose, D-glucose, D-arabinose and D-xylose/D-glucose mixtures in different ratios) has been first studied using two different culture media. Afterwards, fermentations of hydrolysates from 1 N sulphuric acid and 0.5 N hydrochloric acid have been performed.

The concentrations with time of biomass, total reducing sugars, D-glucose, ethanol, xylitol and, in some cases, acetic acid have been determined in all fermentation experiments with both microorganisms. From these data the biomass ($Y_{x/s}^G$), ethanol ($Y_{E/s}^G$) and xylitol ($Y_{Xi/s}^G$) global yields, the biomass productivity (b) and

the growth (μ_m), substrate uptake (q_s) and product formation (q_E) specific rates have been calculated.

With regard to the hydrolysis process, an increase in the sugar yield values is detected under all the experimental conditions assayed (process time, temperature and acid concentration), with a greater attack by the hydrochloric acid than that observed by sulphuric acid. At 90°C the hemicellulose fraction is almost completely hydrolysed with a 1 N sulphuric acid concentration and 0.5 N hydrochloric acid concentration; on the other hand, cellulose conversions are much smaller, reaching a highest value of 22.4% with 2 N hydrochloric acid at the same temperature. No significant influence of the particle size on sugar yield is detected. Finally, when the two parts of the stalks are separately hydrolysed slower yields are obtained with pith and a greater liquid to solid ratio is to be employed.

Regarding the fermentation process the inhibitory effect due to acetic acid is clearly shown when this compound is added to other synthetic substrates and fermented by *Pachysolen tannophilus*: 5 g/dm³ of acetic acid are simultaneously assimilated with sugars, and a decrease in the cell growth, substrate consumption and product formation is detected. If a 10 g/dm³ acetic acid concentration is employed total growth inhibition appears.

In the fermentation of hydrolysates from hydrochloric acid with *Pachysolen tannophilus* a bigger inhibition effect is detected, resulting in no fermentable broths above 0.5 N acid concentration. Global ethanol yields are always greater than xylitol ones, with the greatest values for $Y_{E/S}^G$ (0.21 g/g) corresponding to hydrolysate obtained with 2 N sulphuric acid and for $Y_{Xi/S}^G$ (0.12 g/g) with 0.5 N hydrochloric acid. The most suitable sulphuric hydrolysate conditioning procedure includes KOH neutralization followed by vacuum concentration; in such conditions, the highest specific ethanol production rates and bioproduct yields are obtained.

Fermenting synthetic substrates with *Fusarium oxysporum* leads to μ_m values in the range 0.059-0.11 h⁻¹. D-arabinose is not assimilated, while D-xylose/ D-glucose mixtures are sequentially consumed with global biomass yields and specific substrate consumption rates much greater when D-glucose is used. Global ethanol yields, in the range 0.20-0.38 g/g with the highest value for D-glucose alone, are much bigger than global xylitol yields. Specific ethanol production rates rise concomitantly with D-glucose/D-xylose ratio. Finally, regarding the two culture media assayed, best results are obtained when using a typical yeast medium, with smaller global biomass yield and higher specific ethanol formation rates and ethanol yields.

In the hydrolysate fermentation with *F. oxysporum* global ethanol yields (0.25 g/g) are close to those obtained with synthetic substrates, although cell growth has only been observed in the experiments with low initial sugar concentrations in which the inhibitor concentrations are also smaller.

A worse tolerance to inhibitory compounds by *F. oxysporum* has been detected comparing to *P. tannophilus*; nevertheless the best fermentation results by the yeast are reached from hydrolysates obtained with medium acid concentrations (0.5 N for hydrochloric acid, 1 N for sulphuric acid, both at 90°C) and fermentation results are not improved as a consequence of higher sugar level released by a more severe hydrolysis.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN DE RESIDUOS DE TALLOS DE GIRASOL

ENCARNACIÓN RUIZ RAMOS

tesis doctoral

A los Drs. D. Sebastián Sánchez Villasclaras y D. Eulogio Castro Galiano, directores de la presente Tesis, por todo el tiempo dedicado a este estudio y por haberme dado la oportunidad de trabajar en su equipo.

A mis compañeros Dra. D^a Inmaculada Romero Pulido y Dr. D. Alberto J. Moya López por sus aportaciones a este trabajo y sobre todo por su amistad y valiosos consejos.

A todos mis compañeros del Departamento, en especial al Dr. D. Manuel Moya Vilar, D^a M^a Dolores La Rubia García, D. Gassan Hodaifa y D^a M^a Dolores de la Casa que, de distintas formas, me han prestado su apoyo y ayuda para la elaboración de este trabajo.

A mi familia y amigos, que me han animado en todo momento.

Mi más sincero agradecimiento

Indice

I RESUMEN	7
2 INTRODUCCIÓN	11
2.1 MATERIAS PRIMAS	12
2.1.1 Residuos lignocelulósicos	13
2.1.2 Composición de los residuos lignocelulósicos	14
2.1.3 Posibilidades de aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos ...	17
2.1.3.1 Procesos químicos. Tratamientos hidrolíticos	19
2.1.3.2 Aprovechamiento por vía termoquímica	20
2.1.3.3 Aprovechamiento bioquímico	21
2.1.4 Residuos del cultivo de girasol	22
2.1.4.1 Producción	23
2.1.4.2 Vías de aprovechamiento	24
2.2 PRETRATAMIENTOS	27
2.2.1 P. físicos	29
2.2.2 P. físico-químicos	29
2.2.3 P. químicos	32
2.2.4 P. biológicos	34
2.3 HIDRÓLISIS	35
2.3.1 Hidrólisis ácida	36
2.3.2 Modelos cinéticos de hidrólisis ácida	39
2.3.2.1 H. de celulosa	39
2.3.2.2 H. de hemicelulosas	41
2.3.3 Procesos industriales de hidrólisis ácida	43
2.3.4 Hidrólisis enzimática	46
2.4 ACONDICIONAMIENTO DE HIDROLIZADOS	49
2.4.1 Métodos biológicos	52
2.4.2 Métodos físicos	53
2.4.3 Métodos químicos	53

2.5 FERMENTACIÓN	55
2.5.1 Microorganismos utilizados	56
2.5.2 Vías metabólicas	58
2.5.3 Fermentación etanólica	62
2.5.3.1 Fermentación etanólica en medio sintético	63
2.5.3.2 Fermentación etanólica de hidrolizados de residuos lignocelulósicos	67
2.5.3.3 Tipos de procesos en fermentación etanólica	70
2.5.3.4 Producción y aplicaciones del etanol	73
2.5.4 Fermentación con producción de xilitol	73
2.5.4.1 Por levaduras	74
2.5.4.2 A partir de azúcares puros	75
2.5.4.3 A partir de hidrolizados lignocelulósicos	81
2.5.5 Sacarificación y fermentación simultáneas	83
2.6 OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN	86
3 TÉCNICA EXPERIMENTAL	89
3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PRODUCTOS UTILIZADOS	90
3.1.1 Reactivos químicos	91
3.1.2 Otros compuestos	92
3.2 INSTALACIONES EXPERIMENTALES	94
3.2.1 Equipo de hidrólisis	95
3.2.2 Instalación de fermentación	96
3.3 PROCEDIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS	98
3.3.1 Características y preparación de los tallos de girasol	99
3.3.2 Proceso de hidrólisis	100
3.3.3 Acondicionamiento de los hidrolizados	100
3.3.4 Proceso de fermentación	102
3.3.4.1 Microorganismos utilizados	102
3.3.4.2 Precultivo en medio sólido	102
3.3.4.3 Medios de cultivo	103
3.3.4.4 Preparación y desarrollo del bioproceso	104
3.4 VARIABLES DE OPERACIÓN	105
3.4.1 Hidrólisis	106
3.4.2 Fermentación	106
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	108
3.5.1 Caracterización del residuo	109
3.5.1.1 Humedad	109
3.5.1.2 Cenizas	109

3.5.1.3 Celulosa, hemicelulosa y lignina	110
3.5.1.4 Extractos	111
3.5.2 Crecimiento celular	111
3.5.3 Azúcares reductores totales	112
3.5.4 D-glucosa	112
3.5.5 Etanol	114
3.5.6 Xilitol	116
3.5.7 Ácido acético	117
4 RESULTADOS EXPERIMENTALES	119
4.1 HIDRÓLISIS	121
4.1.1 Tamaño de partícula	123
4.1.2 Separación de médula y cubierta.....	125
4.1.3 Tiempo de proceso	126
4.1.4 Naturaleza y concentración del ácido	128
4.1.5 Temperatura de hidrólisis	132
4.2 FERMENTACIÓN	136
4.2.1 En medio sintético	137
4.2.1.1 <i>Pachysolen tannophilus</i>	137
4.2.1.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	147
4.2.2 Influencia del acondicionamiento de los hidrolizados	157
4.2.3 Fermentación de hidrolizados	177
4.2.3.1 <i>Pachysolen tannophilus</i>	177
A) Tamaño de partícula	177
B) Separación de médula y cubierta	190
C) Naturaleza y concentración del ácido	195
D) Temperatura de hidrólisis	215
4.2.3.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	222
5 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	232
5.1 HIDRÓLISIS	233
5.1.1 Influencia del tamaño de partícula	234
5.1.2 Separación de médula y cubierta.....	238
5.1.3 Influencia del tiempo en el proceso de hidrólisis	241
5.1.4 Influencia de la naturaleza y concentración de ácido	244
5.1.4.1 Ácido sulfúrico	244
5.1.4.2 Ácido clorhídrico	248
5.1.5 Efecto de la temperatura de hidrólisis	252
5.1.5.1 Ácido sulfúrico	252
5.1.5.2 Ácido clorhídrico	256
5.2 FERMENTACIÓN CON <i>Pachysolen tannophilus</i>	260
5.2.1 En medio sintético. Influencia de la concentración de ácido acético	261
5.2.2 Fermentación de hidrolizados	278

5.2.2.1 Influencia del acondicionamiento	278
5.2.2.2 Efecto del tamaño de partícula	287
5.2.2.3 Separación de médula y cubierta	294
5.2.2.4 Influencia de la naturaleza y concentración de ácido	299
5.2.2.5 Efecto de la temperatura de hidrólisis	315
5.3 FERMENTACIÓN CON <i>Fusarium oxysporum</i>	322
5.3.1 En medio sintético	323
5.3.2 Fermentación de hidrolizados	332
6 CONCLUSIONES	339
7 NOMENCLATURA	348
8 BIBLIOGRAFÍA	352

I. Resumen

El trabajo que se describe en esta Memoria forma parte de la línea de investigación aplicada sobre aprovechamiento de residuos lignocelulósicos del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén. Se ha estudiado la hidrólisis ácida de tallos de girasol y su posterior fermentación con la levadura *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 y el hongo *Fusarium oxysporum* VTT-D-80134.

En primer lugar, tras una preparación del residuo consistente en su trituración y tamizado, se ha hidrolizado con los ácidos sulfúrico y clorhídrico a distintas concentraciones y temperaturas. Además de estas variables, se ha estudiado la influencia del tamaño de partícula del residuo, la separación en sus dos partes (médula y cubierta) y el tiempo de operación en las hidrólisis con ácido sulfúrico.

Se han determinado las concentraciones de azúcares reductores totales y D-glucosa en el transcurso de cada hidrólisis, con las que se han calculado los correspondientes rendimientos y se ha estudiado la cinética del proceso. El residuo sólido final se ha caracterizado mediante la determinación de su contenido en humedad, hemicelulosa, celulosa, lignina y cenizas, con lo que se han calculado las conversiones en hemicelulosa y celulosa alcanzadas al final de cada hidrólisis.

Con *Pachysolen tannophilus* se ha realizado un estudio previo con sustratos sintéticos (D-glucosa y D-xilosa) entre los que se ha incluido el ácido acético, para analizar el efecto de este inhibidor sobre la fermentación. Las disoluciones de azúcares obtenidas de los distintos experimentos de hidrólisis se han empleado como sustrato para esta levadura, con lo que se ha estudiado la influencia de las variables analizadas en el proceso hidrolítico sobre la posterior fermentación. Asimismo, en la etapa previa de acondicionamiento de los hidrolizados consistente básicamente en su neutralización y concentración, se han ensayado diferentes agentes neutralizantes y modificado el orden de estas dos operaciones en hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico.

Con *Fusarium oxysporum* se han fermentado en primer lugar azúcares sintéticos (D-xilosa, D-glucosa, D-arabinosa y mezclas D-xilosa/D-glucosa en distintas proporciones) y se han ensayado dos medios de cultivo diferentes. También se ha realizado la fermentación de hidrolizados de ácido sulfúrico 1 N y ácido clorhídrico 0,5 N.

En todos los experimentos de fermentación con ambos microorganismos se han determinado a lo largo del tiempo las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, D-glucosa, etanol, xilitol y ácido acético en algunos casos. A

partir de estos valores, se han calculado los rendimientos globales en biomasa ($Y_{x/s}^G$), etanol ($Y_{E/s}^G$) y xilitol ($Y_{Xi/s}^G$), las productividades en biomasa (b), y las velocidades específicas de crecimiento (μ_m), consumo de sustrato (q_s) y formación de etanol (q_E).

Con respecto a la hidrólisis, en todas las condiciones ensayadas, se produce un aumento de los rendimientos en azúcares con el tiempo de proceso, la temperatura y la concentración de ácido, produciéndose un mayor ataque hidrolítico con el ácido clorhídrico que con el sulfúrico. La fracción hemicelulósica es hidrolizada casi por completo con ácido sulfúrico a partir de una concentración 1 N y con clorhídrico a partir de 0,5 N a 90 °C, mientras que las conversiones en celulosa son muy inferiores, alcanzándose el mayor valor (22,4 %) con ácido clorhídrico 2 N a 90 °C. No se ha encontrado una influencia apreciable del tamaño de partícula sobre los rendimientos en azúcares. En la hidrólisis por separado de las dos partes del residuo se obtienen rendimientos inferiores con la médula, que además obliga a operar con relaciones líquido/sólido elevadas.

Al fermentar sustratos sintéticos con *P. tannophilus* en presencia de ácido acético, se pone claramente de manifiesto el carácter inhibitorio de este compuesto que, en una concentración de 5 g/dm³, es asimilado de forma simultánea a los azúcares, produciéndose una ralentización en el crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de bioproductos; mientras que a 10 g/dm³ inhibe completamente el crecimiento.

En la fermentación de hidrolizados con *P. tannophilus* se ha detectado una mayor inhibición en el caso de los hidrolizados obtenidos con ácido clorhídrico, que no han sido fermentables en concentraciones superiores a 0,5 N. Los rendimientos globales en etanol obtenidos son siempre superiores a los de xilitol, obteniéndose el mayor valor de $Y_{E/s}^G$ para el hidrolizado de ácido sulfúrico 2 N (0,21 g/g) y de $Y_{Xi/s}^G$ para el de ácido clorhídrico 0,5 N (0,12 g/g). De los procedimientos de acondicionamiento ensayados, el más aconsejable para hidrolizados de ácido sulfúrico consiste en realizar la neutralización con KOH seguida de concentración en rotavapor con el que se obtienen las mayores velocidades específicas de producción de etanol y rendimientos en bioproductos. De los hidrolizados con ácido clorhídrico, el mayor valor de q_E se alcanza en el experimento de concentración 0,5 N, en el que se obtiene también el valor más elevado de la suma de rendimientos en bioproductos ($Y_{E/s}^G=0,17$ g/g, $Y_{Xi/s}^G=0,12$ g/g). En el caso del sulfúrico se alcanza la mayor suma de estos rendimientos en el experimento de concentración 1 N a 90 °C ($Y_{E/s}^G=0,17$ g/g, $Y_{Xi/s}^G=0,11$ g/g), no consiguiéndose mejora en estos resultados, ni en la velocidad específica de formación de etanol a otras concentraciones y temperaturas.

En la fermentación de sustratos sintéticos con *F. oxysporum* se obtienen valores de μ_m comprendidos entre 0,059 y 0,11 h⁻¹. El hongo no es capaz de asimilar D-arabinosa, mientras que con mezclas D-glucosa/D-xilosa se produce un consumo secuencial de estos azúcares, con rendimientos globales en biomasa y velocidades específicas de consumo de sustrato muy superiores cuando se está consumiendo

D-glucosa que con D-xilosa. Los rendimientos globales en xilitol son muy inferiores a los de etanol, que oscilan en el intervalo 0,20 y 0,38 g/g, siendo el valor más elevado el del cultivo sobre D-glucosa pura. Las velocidades específicas de producción de etanol son más elevadas cuanto mayor es la proporción de D-glucosa en las mezclas. En cuanto a la comparación de los dos medios de cultivo ensayados, se obtienen mejores resultados con un medio típico de levaduras que con uno específico para este hongo, con el que se obtienen mayores $Y_{x/s}^G$, pero valores inferiores de q_E y de rendimientos en etanol.

En relación a la fermentación de hidrolizados con *F. oxysporum*, se observa que los mayores rendimientos globales en etanol (0,25 g/g) son próximos a los determinados para medios sintéticos, aunque en concentraciones inferiores a los 0,5 g/dm³, ya que sólo se ha conseguido el crecimiento del hongo en hidrolizados con bajos contenidos iniciales de azúcares, en los que la concentración de inhibidores es menor.

Así, se ha observado una peor tolerancia a los compuestos inhibidores por parte de *F. oxysporum* que con la levadura *P. tannophilus*, con la que, no obstante, se obtienen los mejores resultados a concentraciones de ácido intermedias (0,5 N de clorhídrico y 1 N de sulfúrico a una temperatura de 90 °C), sin que los mayores niveles de azúcares que se consiguen en condiciones más severas de hidrólisis se traduzcan en una mejora en los correspondientes procesos de fermentación. Los mayores valores de q_E cuando se utiliza *F. oxysporum* son menores que los obtenidos cuando la fermentación del mismo hidrolizado se realiza con *P. tannophilus*.

II. Introducción

2.1. Materias Primas

2.1 MATERIAS PRIMAS

2.1.1 RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Los residuos lignocelulósicos están formados por residuos agrícolas, forestales y del procesamiento de frutas y verduras y constituyen el mayor conjunto de compuestos orgánicos en la biosfera, representando aproximadamente el 50 % de la biomasa mundial. Estos residuos se acumulan cada año en grandes cantidades, causando un deterioro en el medio ambiente así como el desaprovechamiento de una fuente energética de primera magnitud.

Sobre este tipo de biomasa cabe realizar las siguientes consideraciones:

- En muchas ocasiones, está constituida por compuestos potencialmente contaminantes, bien por su propia naturaleza, bien porque puedan servir como material de propagación de plagas.
- La disponibilidad real de la biomasa residual limita su aprovechamiento, estando condicionada por la dispersión, dificultad de acceso, etc, lo que influye sobre los costes de recogida y transporte.
- Su producción no suele ser regular a lo largo del tiempo.
- La utilización energética de la biomasa no debe provocar un detrimento de la producción de alimentos. El coste de la energía producida no debe ser competitivo.
- Existen otros usos alternativos actuales de este tipo de biomasa que hay que tener en cuenta. Por ejemplo, algunos residuos son necesarios en la agricultura como aporte de nutrientes, tanto orgánicos como inorgánicos.
- La obtención a escala industrial de compuestos de interés a partir de estas materias se ve limitada por la estrecha asociación existente entre los tres componentes principales de las paredes celulares, celulosa, hemicelulosa y lignina, así como por la baja eficiencia de los procesos de conversión, Emmel *et al.* (2003).
- Entre los residuos lignocelulósicos, merecen especial atención los agrícolas. Se estima que anualmente se producen en España unos 16 millones de toneladas de residuos agrícolas, Jiménez *et al.* (2000), entre los que destacan por su mayor producción los derivados de los cultivos del olivo,

cereal y girasol y que, hasta el momento, carecen de aplicaciones de utilidad; además, representan un problema adicional debido a la necesidad de su eliminación de los campos de cultivo (que actualmente se realiza mediante quemadas incontroladas que son origen de numerosos incendios forestales), con el consiguiente coste.

Al contrario de lo que ocurre en el caso de los residuos agrícolas leñosos, para los herbáceos existe un cierto mercado, básicamente en el sector ganadero (caso de la paja de cereales), lo que da origen a que el agricultor pueda esperar un cierto ingreso por la venta de un subproducto cuyo precio se puede situar en el entorno de unas dos pta/kg, IDAE (1999), lo que incidiría en el aprovechamiento económico por vías alternativas.

2.1.2 COMPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

La materia vegetal está constituida, en más de un 90 % en base seca, por sustancias orgánicas, producto del proceso de fotosíntesis, que se agrupan bajo el nombre de lignocelulosa. Este término engloba los tres constituyentes principales (celulosa, hemicelulosas y lignina) de las paredes celulares. En la Tabla 2.1 se muestra la composición típica de distintos residuos lignocelulósicos.

TABLA 2.1
COMPOSICIÓN DE DIVERSOS RESIDUOS
LIGNOCELULÓSICOS (% EN BASE SECA)

Residuo	Hemicelulosas	Celulosa	Lignina	Referencia
Madera dura	24-40	40-55	18-25	McGinnis (1983)
Madera blanda	25-35	45-50	25-35	McGinnis (1983)
Bagazo de caña	24	40	25	Saha (2003)
Mazorca de maíz	35,8	39,4	7,3	Sánchez (1990)
Paja de arroz	25	35	12	Saha (2003)
Paja de trigo	28,8	32,6	14,4	Hoebler <i>et al.</i> (1989)
Pulpa de remolacha	24,5	20,7	2,0	Hoebler <i>et al.</i> (1989)
Ramón de olivo	23,6	48,1	22,6	Sánchez <i>et al.</i> (1996)
Sorgo	29,6	33,5	9,1	Sánchez (1990)
Tallo de girasol	17,3	36,8	21,2	Hoebler <i>et al.</i> (1989)

Además forman parte minoritaria en la composición de los residuos lignocelulósicos otros compuestos, en proporción variable, como ceras, pectinas y sales minerales.

La formulación exacta depende del tipo de residuo, tanto en su composición química como en sus proporciones; incluso, dentro del mismo tipo se encuentran variaciones notables en función de la edad, estado de crecimiento u otros factores.

Celulosa

De todos los compuestos naturales del carbono, la celulosa es el más abundante. Es el primer componente de la pared celular de todos los materiales lignocelulósicos en general, constituyendo hasta el 45 % del peso seco. Se encuentra en forma fibrosa, posee una alta resistencia mecánica y es muy insoluble en agua, tanto fría como caliente. Es también insoluble en disolventes orgánicos tales como etanol, benceno, éter, cloroformo y tetracloruro de carbono y muy poco soluble en disoluciones diluidas de ácidos y álcalis. Por otra parte, es muy soluble en ácido sulfúrico del 72 % y en ácido clorhídrico del 44 %. Su degradación, aunque importante, es menos notoria en ácido fosfórico del 85 %.

La celulosa es un polímero homogéneo lineal, de elevado peso molecular, con cadenas largas de D-glucosa en forma piranosa unidas por enlace β 1,4 glucosídico, siendo la celobiosa la unidad que se repite (Figura 2.1). Las fibras de celulosa están constituidas por unidades estructurales primarias llamadas microfibrillas de aproximadamente 300 Å de largas y 150 Å de sección transversal; cada microfibrilla contiene varias fibrillas elementales de alrededor de 30 Å de sección transversal, estando éstas formadas por grupos de moléculas lineales de celulosa. Cada molécula está enlazada con la adyacente por puentes de hidrógeno, hasta dos por unidad de D-glucosa anhidra. Sin embargo, la forma en que las moléculas de celulosa se ordenan no es bien conocida, habiéndose postulado diferentes modelos que coinciden en diferenciar entre una zona cristalina de gran ordenación y una zona amorfa. La celulosa cristalina está constituida por una celda monoclinica unidad que contiene cuatro unidades de D-glucosa anhidra.

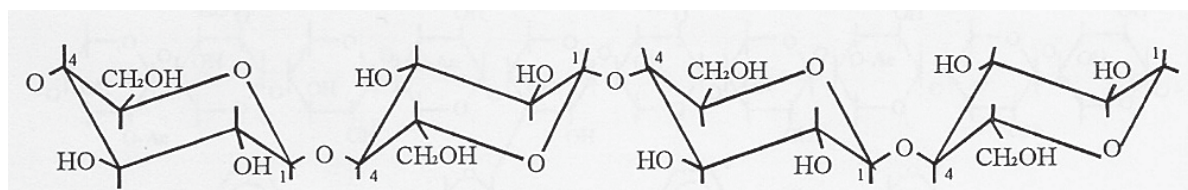


Figura 2.1 Estructura de la celulosa

Considerados individualmente, los puentes de hidrógeno son enlaces débiles, pero la gran cantidad que hay entre las cadenas de D-glucosa que componen la fibra proporcionan una unión muy fuerte, siendo los responsables primarios de la rigidez de la pared celular.

Tanto el hombre como otros animales carnívoros son incapaces de utilizar la celulosa como alimento, pues carecen de los fermentos necesarios para efectuar su hidrólisis. Por el contrario, muchos microorganismos y ciertos protozoos son capaces de

hidrolizar la celulosa. La celulosa pura o casi pura sólo existe en las partes jóvenes de las plantas. En estados más avanzados las membranas celulósicas se encuentran entremezcladas con sustancias pépticas y con la lignina.

Hemicelulosas

Las hemicelulosas son polisacáridos homogéneos o heterogéneos que presentan una gran diversidad en cuanto a su composición y estructura, en función de su origen. Están constituidas por cadenas cortas y ramificadas, formadas por pentosas (D-xilosa, D-arabinosa, D-xilulosa...), hexosas (D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-fructosa...), junto a ácidos urónicos, principalmente ácido glucurónico y galacturónico. Se pueden identificar tres grandes grupos: xilanos, mananos y galactomananos, en función del azúcar dominante, Kuhad y Singh (1993).

Los xilanos son los polisacáridos no celulósicos más abundantes. En la mayoría de las angiospermas, los xilanos pueden representar hasta un 30 % del peso seco y son igualmente mayoritarios en el caso de las plantas anuales. Los xilanos están formados por una cadena principal de unidades de D-xilosa unidas mediante enlaces β -1,4, en la cual pueden encontrarse ramificaciones de otros azúcares como la D-arabinosa, la D-galactosa, el ácido glucurónico, etc. En la Figura 2.2 se muestra un esquema de un arabinoxilano típico de cereales, Bhat y Hazlewood (2001).

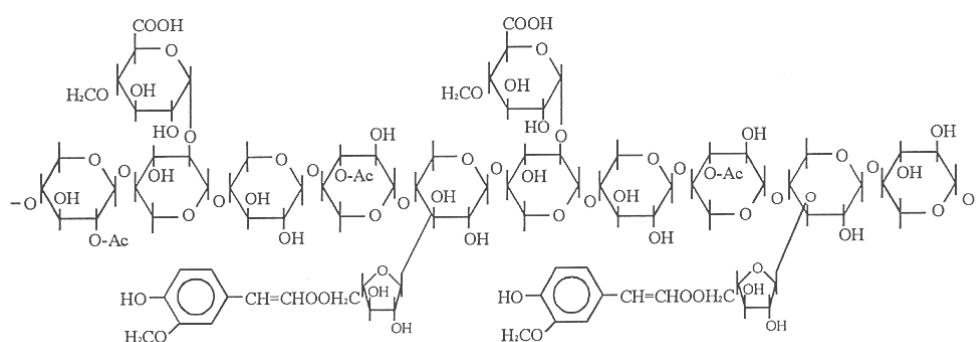


Figura 2.2 Esquema de un arabinoxilano típico de cereales

Las hemicelulosas son más solubles que la celulosa, se descomponen con mayor facilidad y pueden ser extraídas con álcalis diluidos y precipitadas con ácidos diluidos. Aunque pueden estar formadas por azúcares distintos, presentan dos características estructurales comunes:

- Poseen una especie de columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos casi siempre por enlaces β 1,4-glucosídicos de la que pueden salir ramificaciones muy cortas, generalmente de un sólo azúcar de longitud.
- Poseen alguna característica estructural que les impide formar agregados como las cadenas de celulosa, aunque sí pueden cristalizar con las cadenas de celulosa, formando seguramente puentes de hidrógeno entre los grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ de las cadenas de celulosa y los oxígenos glucosídicos de las hemicelulosas.

Lignina

El tercer constituyente fundamental de la estructura de los materiales lignocelulósicos es la lignina. Se trata de un material polimérico que actúa como material de unión entre la celulosa y las otras fibras de polisacáridos y formar la estructura de ésta, pero esencialmente es un polímero tridimensional de fenilpropano con grupos fenólicos. La proporción en peso de lignina en la madera oscila entre el 20 y el 30 %, siendo sus propiedades más comunes:

- Es insoluble en todos los disolventes usuales.
- Por fusión alcalina produce un 10 % de ácido 3,4 dihidroxibenzoico.
- La lignina desmetilada es soluble en los álcalis y sus disoluciones alcalinas se precipitan con anhídrido carbónico.
- Su índice de refracción es aproximadamente 1,6, lo que indica la presencia de grupos aromáticos.

2.1.3 POSIBILIDADES DE APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

En los países desarrollados, el alto grado de dependencia energética del exterior, unido a otros factores como las limitadas reservas de combustibles fósiles, su encarecimiento progresivo, consideraciones medioambientales y las incertidumbres políticas y económicas a las que se encuentran sometidos los países productores, ha hecho que el interés sobre las fuentes de energías renovables sea cada vez mayor.

En España, el nivel de dependencia energética se encuentra entre los mayores de los países de la Unión Europea; así, mientras que el peso de las importaciones fue del 72 % en 1998, los niveles medios de la Unión Europea se sitúan en torno al 50 %. En el mismo año, la contribución de las energías renovables al balance energético nacional supuso un 6,3 % del consumo energético total, como se muestra en la Tabla 2.2, IDAE (1999).

TABLA 2.2
CONSUMO DE ENERGÍA PRIMARIA EN ESPAÑA EN 1998

Fuente	ktep*	%
Petróleo	61670	54,1
Carbón	17659	15,5
Nuclear	15376	13,5
Gas	11816	10,4
Energías renovables	7173	6,3
Saldo eléctrico	292	0,2
TOTAL	113986	100,0

* 1 ktep=10¹⁰ kcal

Entre los distintos tipos de energías renovables suelen considerarse las energías geotérmica, solar térmica, hidráulica, eólica y la procedente de la biomasa y los residuos sólidos urbanos (R.S.U.). La producción energética total de estas energías en 1995 en la Unión Europea fue de 72,9 millones de tep, lo cual representa el 5,3 % del consumo interior bruto y el 9,9 % de la producción interna propia, en términos de energía primaria, IDAE (1997). La mayor aportación a este balance procede de la biomasa y R.S.U. con 44,8 millones de tep, lo que representa un 61,5 % del total.

Si bien la tecnología necesaria para la sustitución o disminución de la dependencia actual de los combustibles fósiles está disponible hace tiempo, es cierto que el coste de tal conversión sigue siendo muy superior, a los precios actuales, al de las fuentes de energía tradicionales. El desarrollo de esta tecnología podría aportar, entre otras, las siguientes ventajas, Ingram y Doran (1995):

- Disminución de las importaciones de crudo
- Creación de empleo y mejora de las rentas agrarias
- Mejora de la calidad ambiental
- Solución parcial al problema de residuos que, por su naturaleza, han de ser eliminados

Por otra parte, la evolución de la agricultura, especialmente en los países tecnológicamente más avanzados, ha conducido a la aparición de excedentes y, por tanto, a un desequilibrio entre la oferta y la demanda que se ha reflejado en limitaciones impuestas por la Política Agraria Comunitaria en lo referente a retirada de tierras de cultivo. La obtención de productos de alto valor añadido permitiría rentabilizar los cultivos aprovechando unos residuos que, hasta el momento, carecen de aplicación y cuya eliminación representa un coste suplementario. Se estima que, en conjunto, los residuos agrícolas (tanto leñosos como herbáceos) pueden aportar al balance energético nacional al final del periodo 1999-2010 del orden de 1,5 millones de tep/año, IDAE (1999).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el aprovechamiento de la biomasa se perfila como una de las opciones más interesantes, dado su carácter renovable, por una parte, y su gran disponibilidad a precios relativamente bajos, por la otra.

Se pueden distinguir tres vías fundamentales para el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos, en función de la naturaleza del proceso utilizado: procedimientos químicos (tratamientos hidrolíticos), vía termoquímica y vía bioquímica, Figura 2.3, Rodríguez *et al.* (1990). Desde el punto de vista del objetivo primario perseguido, el aprovechamiento de los residuos puede ser con fines energéticos o como materia prima químico-industrial.

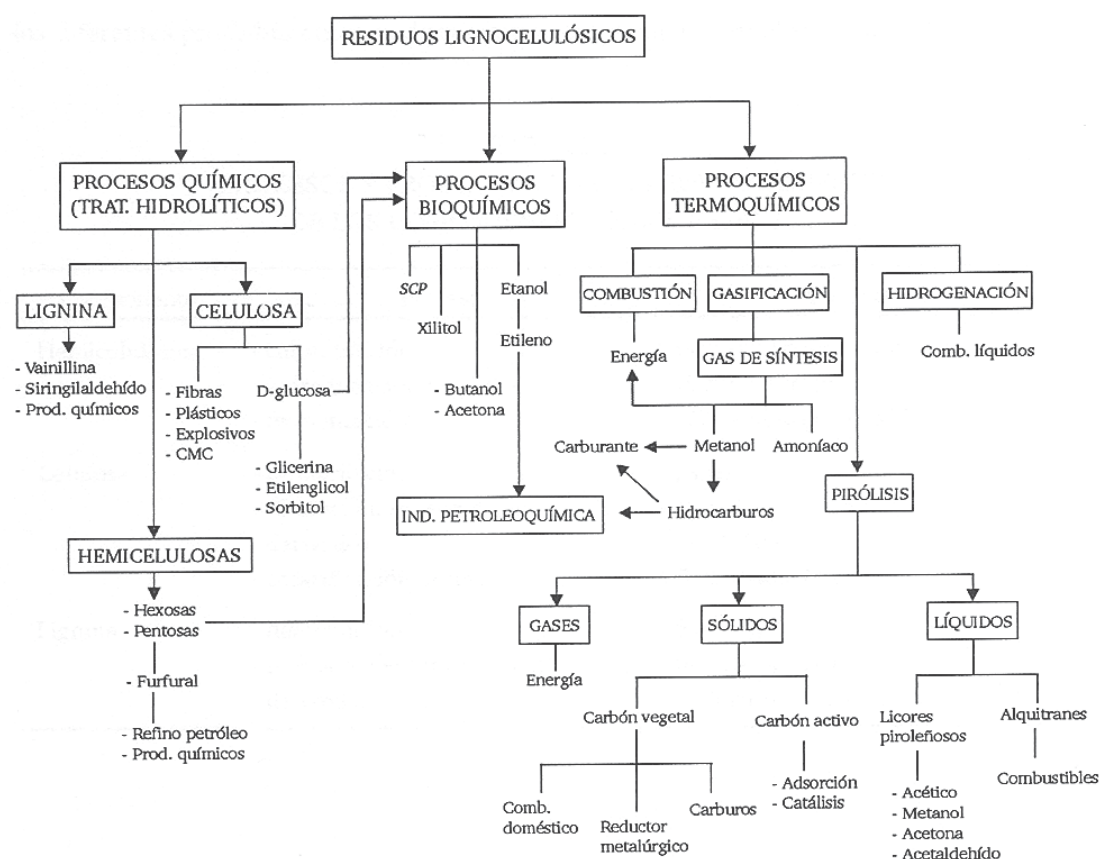


Figura 2.3 Posibilidad de aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos

2.1.3.1 Procesos químicos. Tratamientos hidrolíticos

Este tipo de procedimientos persiguen, en general, el fraccionamiento de la biomasa en sus componentes principales (celulosa, hemicelulosas y lignina) y el aprovechamiento de cada uno de ellos separadamente; algunos de los principales procesos y los productos obtenidos a partir de cada fracción se muestran en la Tabla 2.3.

Una de las estrategias de fraccionamiento posibles consiste en la utilización de agentes que disuelven la lignina, que es el procedimiento utilizado en la industria pastero-papelera para la obtención de pastas químicas (α -celulosa de alta pureza), mientras que la lignina presenta, a su vez, interesantes posibilidades de aprovechamiento como materia prima químico-industrial.

Otra posibilidad consiste en la solubilización, total o parcial en función de las condiciones de operación, de las fracciones celulósica y hemicelulósica por hidrólisis ácida; los diferentes procedimientos se discuten más ampliamente en el apartado 2.3.

TABLA 2.3
PROCESOS Y PRODUCTOS EN EL APROVECHAMIENTO
DE LOS COMPONENTES DE LOS RESIDUOS

Componente	Proceso	Productos
Hemicelulosas	- calor, presión	- furfural, resinas furánicas
	- hidrogenación catalítica	- xilitol, polialcoholes
	- fermentación	- SCP, aminoácidos, xilitol, etanol
Celulosa	- desfibrilación	- papel
	- disolución, regeneración	- viscosa
	- derivados	- CMC, ésteres y éteres
	- sacarificación, fermentación	- D-glucosa, etanol
Lignina	- <i>hidrocracking</i>	- fenol, fuel
	- reacción con formaldehído	- resinas tipo fenólicas
	- derivados	- polímeros, surfactantes

2.1.3.2 Aprovechamiento por vía termoquímica

Dentro de esta vía cabe distinguir entre combustión, por una parte, y gasificación y pirólisis, por otra. Las principales ventajas de este tipo de aprovechamiento radican en presentar una muy superior velocidad de transformación, lo que posibilita la instalación de plantas de mayor capacidad, y el adaptarse a las variaciones de composición de las materias primas empleadas, aspecto de gran interés debido a los distintos tipos de residuos utilizables.

Combustión

La combustión constituye el sistema más empleado para el aprovechamiento de residuos leñosos. Un aspecto importante, en cuanto a las posibilidades de aprovechamiento por esta vía, reside en el bajo poder calorífico de los materiales lignocelulósicos frente a los combustibles tradicionales, lo que, unido a su baja densidad, obliga a procesar una gran cantidad de materia prima, lo que limita la viabilidad técnico-económica del proceso.

Se ha estimado que la biomasa anualmente producida a nivel mundial por reducción fotosintética del carbono asciende aproximadamente a la cantidad de $2 \cdot 10^{11}$ toneladas, lo que representa unas treinta veces el consumo energético de la Humanidad, Hess (1975).

En un contexto energético, la biomasa lignocelulósica, representada típicamente por la madera y los residuos forestales y agrícolas, continúa siendo la principal fuente de energía primaria para más de 2.000 millones de personas, principalmente en países en desarrollo, que la utilizan por combustión directa para la producción

de calor. En conjunto, la biomasa lignocelulósica aporta alrededor del 16 % de la energía consumida en el mundo, Carrasco *et al.* (1992).

Gasificación y pirólisis

Existe la posibilidad de someter a la biomasa a diversas transformaciones en determinadas condiciones de presión y temperatura, con el fin de obtener productos sólidos, líquidos o gaseosos que sean adecuados al tipo de aplicación que se desee.

Dependiendo de las condiciones empleadas (fundamentalmente la temperatura, la relación oxígeno a fuel y el tiempo de residencia), la biomasa puede alterarse ligeramente o ser cambiada por completo. Estas tres variables definen las condiciones para pirólisis, gasificación y combustión, aunque a menudo existe poca distinción entre estos procesos. La diferencia entre gasificación y pirólisis se establece frecuentemente en función del objetivo primario pretendido. En este sentido, la gasificación persigue un elevado rendimiento en gases, fundamentalmente CO, H₂ y CH₄, mientras que la pirólisis se enfoca hacia la obtención preferente de un producto sólido (carbón o semicoque vegetal).

Tradicionalmente, la pirólisis se ha identificado con la carbonización, obteniéndose como producto principal un carbón. Si los materiales leñosos se someten a temperaturas de 500/600 °C en ausencia de oxígeno, los elementos constituyentes de la madera se transforman en una fracción sólida, compuesta principalmente de carbono, una fracción líquida y una fracción gaseosa también combustible. Actualmente, el término pirólisis se usa para designar en general cualquier proceso en el que los productos de interés son aceites líquidos, Soltes (1988).

Adicionalmente, puede obtenerse una variada gama de productos químicos derivados de los procesos de pirólisis, que encuentran aplicaciones en la industria de los fertilizantes y en la fabricación de aromatizantes para la industria alimentaria; la principal ventaja reside en que estos productos representan un mayor valor añadido comparado con los combustibles obtenidos en el mismo proceso, Bridgwater (2001).

2.1.3.3 Aprovechamiento bioquímico

El aprovechamiento de la biomasa por vía bioquímica está basado en la utilización de las fracciones de los residuos ricas en azúcares. Entre los métodos bioquímicos de aprovechamiento de la biomasa residual son de especial interés los que conducen a la obtención de bioetanol y a la producción de biomasa rica en proteínas (SCP), Camacho *et al.* (1986). En la Figura 2.4 se muestra un esquema de aprovechamiento bioquímico de los residuos lignocelulósicos, Riera *et al.* (1988).

En estos procesos cabe destacar las siguientes ventajas:

- Se reduce el consumo energético y se incrementa la seguridad, debido a

que generalmente se opera en condiciones de presión y temperatura próximas a las ambientales.

- Disminuye el riesgo de contaminación, a la vez que se utilizan residuos que, por su naturaleza, es necesario eliminar.
- Se aumenta la productividad y el aprovechamiento de la materia prima, si se comparan los tiempos de duplicación de los microorganismos con los de las plantas y animales superiores, y la selectividad de una reacción enzimática con la de una reacción química no biológica.

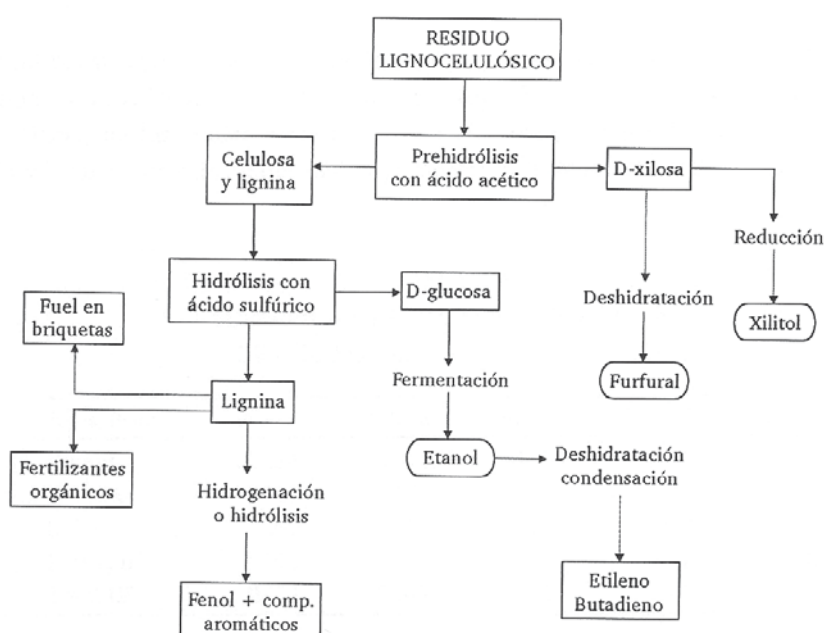


Figura 2.4 Aprovechamiento bioquímico de los residuos lignocelulósicos

2.1.4 RESIDUOS DEL CULTIVO DE GIRASOL

En el estado de maduración, la planta de girasol (*Helianthus annuus*) está constituida por dos partes principalmente:

- el tallo (y las hojas), que puede sobrepasar los dos metros de altura y de tres a seis centímetros de espesor, dependiendo de diversos factores como la variedad y las condiciones de cultivo
- el capítulo o flor, de unos 25 cm de diámetro, en el que se sitúan las semillas a partir de las cuales se obtiene el aceite de girasol y que constituyen, por tanto, el principal producto del cultivo.

En el momento de la recolección, los tallos son cortados unos centímetros por debajo de los capítulos, los cuales son agitados para liberar las semillas, que se recogen separadamente, mientras que tallos y capítulos se abandonan en el propio campo hasta su posterior eliminación, que suele consistir en la trituración y esparcimiento o incineración.

2.1.4.1 Producción

El girasol constituye la cuarta fuente de aceites y grasas en cuanto a producción mundial y se estima en unos 50 millones de hectáreas la superficie dedicada a este cultivo, Marechal y Rigal (1999), de las cuales unos dos millones corresponden a la Unión Europea, siendo España y Francia los principales países productores, Tablas 2.4 y 2.5, Eurostat (2003).

TABLA 2.4
SUPERFICIES DE CULTIVO (MILES DE ha)
DE GIRASOL EN LA UNIÓN EUROPEA

Años/Países	96/97	97/98	98/99	99/2000	2000/01
España	1124	1054	1110	1000	858
Francia	911	875	812	817	707
Italia	269	318	350	217	261
Portugal	106	61	65	61	40
Total UE	2494	2388	2425	2167	1913

A partir de la superficie cultivada o de la producción de semillas de girasol puede realizarse una estimación del volumen de residuos; si se tiene en cuenta que la razón de residuo aéreo (exceptuando hojas) a semillas oscila entre 1,6 y 3,0, Martín *et. al* (1987), según los datos de la Tabla 2.5 puede deducirse que existe una disponibilidad en España de unos 2,3 millones de toneladas de residuos generados anualmente, lo que convierte a este tipo de biomasa en una de las más abundantes.

TABLA 2.5
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS DE GIRASOL
(MILES DE t) EN LA UNIÓN EUROPEA

Años/Países	96/97	97/98	98/99	99/2000	2000/01
España	1235	1366	1440	500	871
Francia	1995	2008	1863	1910	1621
Italia	638	641	701	390	521
Portugal	84	48	51	41	24
Total UE	4124	4223	4230	3011	3151

Además, la superficie de girasol cultivada en Andalucía, con unas 300 mil hectáreas, Junta de Andalucía (2003), representa algo más de la tercera parte del total nacional, lo que da idea del considerable volumen de residuos disponibles en una localización relativamente próxima y justifica su estudio y posible utilización.

2.1.4.2 Vías de aprovechamiento

Debido al volumen de producción, los residuos del cultivo de girasol han sido objeto de investigación con vistas a su aprovechamiento; sin embargo, al momento actual, no se han encontrado aplicaciones que permitan su utilización a escala industrial.

La utilización de estos residuos como fuente de energía proporciona una potencia calorífica análoga a la de otras biomásas residuales y presenta la ventaja de un bajo contenido en azufre (0,14 %), aunque, por contra, la proporción de cenizas es elevada (6,6 %), Tabla 2.6, Martín *et al.* (1987).

El empleo de los tallos de girasol como materia prima para la obtención de furfural también ha sido sugerida por Martín *et al.* (1987), debido a su alto contenido en hemicelulosa, concordante a su vez con una relativamente baja proporción de α -celulosa (30 % en base seca).

TABLA 2.6
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA
DE LOS TALLOS DE GIRASOL

% sobre base seca		
Análisis elemental	Carbono	40,99
	Hidrógeno	5,41
	Nitrógeno	0,57
	Azufre	0,14
Componentes	Extraíbles	8,4
	Lignina	14,0
	Holocelulosa	71,0
	Cenizas	6,6
Otros	α -celulosa	30,0
	Índice de furfural	32,0
	Humedad	11,1

Otra de las vías de aprovechamiento estudiada ha sido la fabricación de pasta de papel. En un análisis de las características de la pasta de papel obtenida a partir diferentes residuos agrícolas por tratamiento alcalino, Jiménez *et al.* (1991)

concluyen que la calidad de la pasta de residuos del girasol es menor que la de paja de cereal, si bien presenta algunas características interesantes y de posible aplicación en la fabricación de cartón ondulado.

Se ha investigado también la aplicación en decoloración, gracias a la estructura porosa de la médula del tallo que le confiere interesantes propiedades como adsorbente, Van den Bossche (1998).

En la Figura 2.5 se muestra un esquema de aprovechamiento integral de la planta de girasol, Bazus (1991), Marechal y Rigal (1999). Los capítulos presentan un considerable contenido en pectinas (22 %), a partir de las cuales se pueden obtener compuestos de interés en la industria alimentaria, como gelificantes; además, puede extraerse un aceite esencial (en un contenido de un 0,2 % en peso del capítulo) con aplicaciones en perfumería. Por su parte, los tallos pueden emplearse en la industria pastero-papelera y, a partir de la médula esponjosa del tallo, obtener diversos materiales biodegradables de baja densidad.

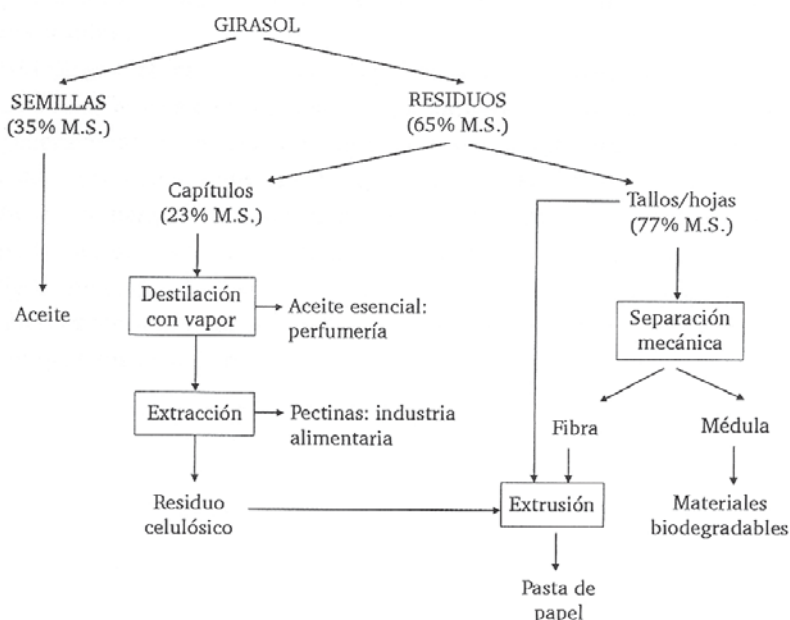


Figura 2.5 Alternativa para un aprovechamiento integral del girasol

Finalmente, el aprovechamiento de la parte lignocelulósica de los residuos puede dirigirse a la obtención de otros productos, mediante diferentes procesos de hidrólisis y fermentación, lo que constituye el objetivo del presente trabajo. Este aprovechamiento bioquímico está basado principalmente en la utilización o transformación de los azúcares que contienen las fracciones celulósica y hemicelulósica de los residuos.

Sharma *et al.* (2002a) realizan una hidrólisis enzimática de tallos de girasol previamente tratados por explosión con vapor, utilizando celulasas procedentes de *Trichoderma reesei*, logrando una sacarificación del 57,8 % en las mejores condiciones. La posterior fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* proporciona rendimientos en etanol de 0,44 g/g, Sharma *et al.* (2002b).

Desde el punto de vista económico y en relación a los precios actuales de la energía de origen fósil, parece claro que será preciso aprovechar las tres fracciones principales constituyentes de los residuos lignocelulósicos.

Las principales etapas en este aprovechamiento son:

- 1^a Pretratamiento del residuo, con el objetivo de mejorar la etapa de hidrólisis posterior, facilitando el acceso de los agentes hidrolíticos a la estructura interna del residuo.
- 2^a Hidrólisis del residuo. Esta etapa tiene como objeto romper las estructuras tridimensionales de los polímeros que integran la biomasa y liberar los azúcares, generalmente en forma de monómeros, que los constituyen. Este proceso se lleva a cabo por la acción de agentes químicos o de enzimas.
- 3^a Acondicionamiento de los hidrolizados, de forma que queden preparados para poder ser utilizados como medio de crecimiento de las levaduras.
- 4^a Fermentación de la disolución resultante, empleando uno o varios microorganismos capaces de transformar íntegramente los azúcares en otros compuestos de interés.

2.2. Pretratamientos

2.2 PRETRATAMIENTOS

En muchas ocasiones, resulta conveniente someter al residuo a una serie de tratamientos previos, con el objetivo de mejorar el rendimiento de las etapas posteriores. Esta mejora se puede conseguir por varios procedimientos: aumentando la superficie de contacto con los agentes hidrolíticos, reduciendo el grado de cristalinidad de la celulosa, eliminando la lignina o disolviendo las hemicelulosas. Para que un pretratamiento pueda considerarse efectivo debe cumplir una serie de requerimientos, Sung y Cheng (2002):

- Mejorar la formación de azúcares o facilitar su formación en etapas posteriores de hidrólisis ácida o enzimática
- Evitar la pérdida o degradación de azúcares
- Evitar la formación de productos inhibidores en los procesos posteriores de hidrólisis o fermentación
- Resultar económicamente viable

Los pretratamientos pueden ser de naturaleza física, química, biológica o una combinación de ellos, dependiendo de la naturaleza y condiciones del residuo, Tabla 2.7. Como combinación de pretratamientos se ha utilizado la extrusión. Este proceso, que consiste en una acción térmica, mecánica y química sobre el residuo, permite una hidrólisis completa de la fracción hemicelulósica mientras que la celulosa prácticamente no se ve afectada, Lawford y Rousseau (1991).

TABLA 2.7
PRETRATAMIENTOS DE MATERIALES
LIGNOCELULÓSICOS

Modo de acción	Métodos
Físico	Molienda Irradiación
Físico-químico	Autohidrólisis
	Explosión con vapor
	Oxidación húmeda
	Congelamiento explosivo

Químico	Ácidos
	Álcalis
	Gases
	Oxidantes (ozono)
	Extracción con disolventes orgánicos
Biológico	Delignificación bacteriana y fúngica

2.2.1 PRETRATAMIENTOS FÍSICOS

Los pretratamientos físicos pueden ser mecánicos, térmicos o radiativos.

Con carácter general, el residuo se somete a una molienda de manera que se pueda disponer del mismo en forma de partículas de tamaño adecuado, Fanta *et al.* (1984), Dadach y Kaliaguine (1993), haciendo que la celulosa sea más susceptible a la hidrólisis. Además, este tratamiento reduce la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa. La energía necesaria en cada caso dependerá del tamaño de partícula final y de las características del residuo.

La pirólisis se ha utilizado también como pretratamiento físico; la hidrólisis ácida en condiciones suaves sobre el residuo de pirólisis proporciona un 85 % de conversión de celulosa en azúcares reductores, con más de un 50 % de D-glucosa, Fan *et al.* (1987).

La exposición intermitente a ultrasonidos en condiciones determinadas ha sido investigada como pretratamiento en papel reciclado. Wood *et al.* (1997) encuentran un aumento del 20 % en la producción de etanol cuando el residuo era sometido con posterioridad a una hidrólisis enzimática. En ausencia de este pretratamiento, se necesitó doble cantidad de enzima para alcanzar iguales resultados.

2.2.2 PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS

Los pretratamientos de este tipo consideran el uso del agua, en estado líquido o vapor, con o sin el concurso de agentes químicos.

Autohidrólisis

Recibe este nombre el pretratamiento consistente en la hidrólisis de los residuos por acción de agua a alta temperatura. El empleo de agua exclusivamente representa una interesante alternativa en el tratamiento de los materiales lignocelulósicos en comparación con los procedimientos que utilizan compuestos químicos, debido a las siguientes ventajas, Garrote *et al.* (1999):

- las hemicelulosas pueden convertirse en azúcares con buenos rendimientos, minimizando a la vez la generación de subproductos
- no existen los problemas de corrosión en equipos que se presentan en el caso de hidrólisis ácida
- el proceso resulta simplificado por la inexistencia de etapas de recuperación de ácidos
- la alteración físico-química que se provoca en la lignina y la celulosa facilita el procesamiento y separación posterior de estas fracciones
- se trata de un proceso respetuoso con el medio ambiente, al no utilizar agentes químicos
- económicamente, resulta una alternativa favorable

Este tipo de pretratamiento está basado en la utilización de temperaturas entre 150 y 230 °C; en estas condiciones, los materiales lignocelulósicos sufren reacciones hidrolíticas debido a la presencia de iones hidronio, generados por la autoionización del agua, que actúan como catalizadores. Los enlaces éter de las hemicelulosas son los más susceptibles a este tipo de reacciones, lo que conduce a la generación de oligosacáridos y a la liberación de grupos acetilo. Posteriormente, los iones hidronio generados a partir de la autoionización del ácido acético actúan igualmente como catalizadores de la degradación de los polisacáridos, Garrote *et al.* (2001a).

Laser *et al.* (2002) realizan una comparación entre los pretratamientos con vapor y con agua líquida a alta temperatura, concluyendo que el segundo permite una mejor recuperación de la fracción de pentosas; bajo condiciones de operación óptimas, este pretratamiento produce resultados comparables a la hidrólisis ácida diluida convencional, sin la necesidad de utilizar ácido.

Explosión con vapor (*steam explosion*)

Consiste en someter al residuo a una corriente de vapor saturado a alta temperatura y posteriormente reducir bruscamente la presión, lo que provoca la ruptura de las fibras del residuo, la degradación de la fracción hemicelulósica y la transformación de la lignina. Además, el tratamiento a altas temperaturas provoca la escisión de enlaces de grupos acetilo y produce ácidos orgánicos, resultando un pH ácido (2-4), lo que origina a su vez una hidrólisis ácida diluida, Baugh y McCarty (1988). Los factores que afectan al proceso son la temperatura (entre 160 y 260 °C), el tiempo de residencia (de varios segundos a pocos minutos), el tamaño de las partículas y el contenido en humedad.

Shimizu *et al.* (1998) proponen un proceso integrado para el aprovechamiento total de los componentes de la madera basado en el pretratamiento con explosión al vapor. Según se muestra en la Figura 2.6, la parte fibrosa del residuo puede utilizarse en alimentación animal, mientras que los polímeros principales (lignina, hemicelulosas y celulosa) se utilizan para la obtención de diversos productos, como adhesivos, combustibles, xilitol, etanol y proteínas.

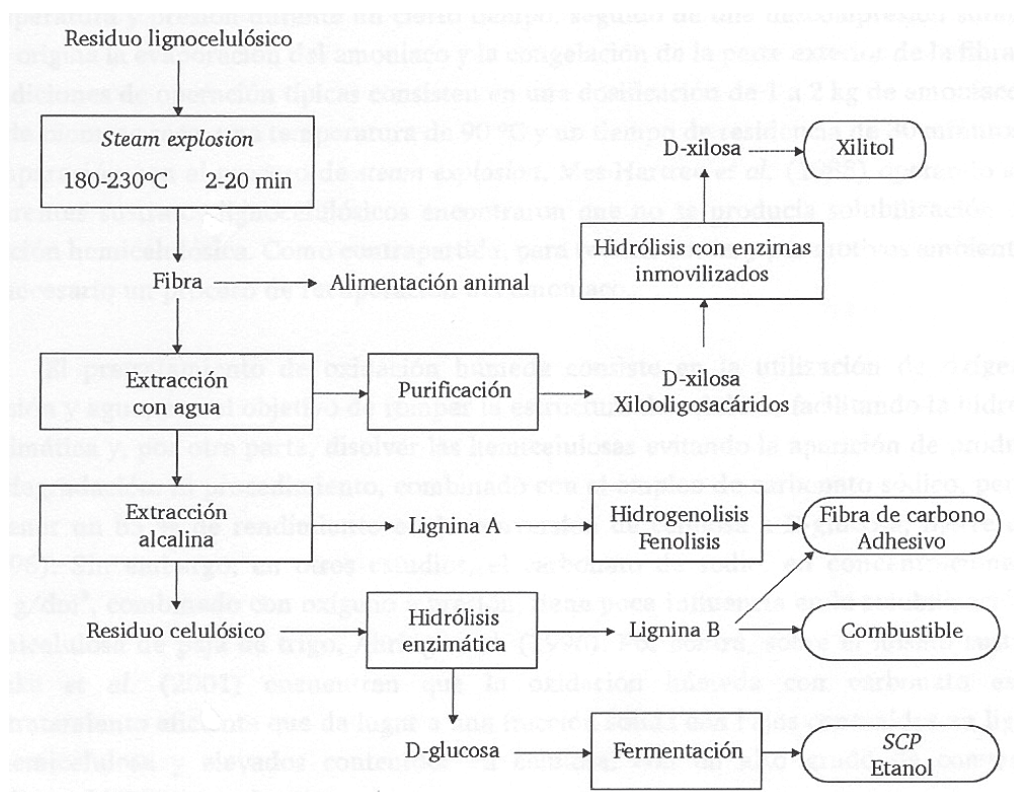


Figura 2.6 Aprovechamiento integral de residuos lignocelulósicos

Las ventajas del proceso de *steam explosion* son su menor coste energético, en comparación con los pretratamientos físicos de reducción de tamaño, así como la ausencia de costes medioambientales o de reciclaje de reactivos. Por contra, se pueden generar compuestos inhibidores para el crecimiento celular en la etapa de fermentación, producir pérdidas de azúcares y la destrucción de la matriz lignina-carbohidrato puede resultar incompleta.

Explosión con vapor y agentes químicos

El proceso de *steam explosion* puede combinarse con la acción de agentes químicos, como el SO_2 , Stenberg *et al.* (1998), mejorándose significativamente la sacarificación enzimática de las maderas blandas utilizadas en el estudio. Nguyen *et al.* (1999) y Fernández-Bolaños *et al.* (2001) utilizan la explosión con vapor sobre residuos forestales y sobre hueso de aceituna, respectivamente, previamente impregnados con ácido sulfúrico diluido, en un proceso en dos etapas dirigidas a la hidrólisis de las hemicelulosas y de la celulosa.

El proceso AFEX (*ammonia fiber explosion*) es similar al de explosión con vapor; el material lignocelulósico se pone en contacto con una disolución de amoníaco a alta temperatura y presión durante un cierto tiempo, seguido de una descompresión súbita, lo que origina la evaporación del amoníaco y la congelación de la parte exterior de la fibra. Las condiciones de operación típicas consisten en una dosificación de 1 a 2 kg de amoníaco por kg de biomasa seca, una temperatura de 90 °C y un

tiempo de residencia de 30 minutos. En comparación con el proceso de *steam explosion*, Mes-Hartree *et al.* (1988) operando sobre diferentes sustratos lignocelulósicos encontraron que no se producía solubilización de la fracción hemicelulósica. Como contrapartida, para reducir costes y por motivos ambientales, es necesario un proceso de recuperación del amoníaco.

El pretratamiento de oxidación húmeda consiste en la utilización de oxígeno a presión y agua, con el objetivo de romper la estructura de celulosa, facilitando la hidrólisis enzimática y, por otra parte, disolver las hemicelulosas evitando la aparición de productos de degradación. El procedimiento, combinado con el empleo de carbonato sódico, permite obtener un 85 % de rendimiento en la conversión de celulosa a D-glucosa, Bjerre *et al.* (1996). Sin embargo, en otros estudios, el carbonato de sodio, en concentraciones de 6,5 g/dm³, combinado con oxígeno a presión, tiene poca influencia en la solubilización de hemicelulosa de paja de trigo, Ahring *et al.* (1996). Por contra, sobre el mismo sustrato, Klinke *et al.* (2001) encuentran que la oxidación húmeda con carbonato es un pretratamiento eficiente que da lugar a una fracción sólida con bajos contenidos en lignina y hemicelulosa y elevados contenidos en celulosa, con un alto grado de conversión mediante hidrólisis enzimática.

2.2.3 PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS

Ozonolisis

El ozono puede utilizarse para la degradación de la lignina de muy diversos residuos lignocelulósicos. La ozonolisis presenta varias ventajas, entre las cuales se pueden citar la eliminación efectiva de la lignina, la ausencia de productos tóxicos y las condiciones de operación a temperatura y presión ambiente. Como inconveniente, se necesita una considerable cantidad de ozono, lo que hace costoso el tratamiento.

Hidrólisis ácida

El pretratamiento de naturaleza química más utilizado es la hidrólisis ácida. Aunque pueden emplearse ácidos concentrados, se necesitarían reactores resistentes a la corrosión, el proceso resulta más peligroso y es imprescindible, desde el punto de vista económico y medioambiental, la recuperación del ácido. Por estos motivos, la hidrólisis ácida diluida, llamada a veces prehidrólisis, constituye el pretratamiento más común.

Por otra parte, la utilización directa de un proceso de hidrólisis ácida que garantice la obtención de los azúcares de las dos fracciones (celulósica y hemicelulósica) requeriría unas condiciones severas en cuanto a concentración de ácido y temperatura, debido a la estructura cristalina de la celulosa y a los enlaces con la lignina, lo que provocaría la degradación de los azúcares. De esta forma, una hidrólisis suave puede permitir la liberación de los azúcares de las hemicelulosas,

más accesibles gracias a su estructura de menor grado de polimerización, quedando un residuo constituido fundamentalmente por la fracción celulósica y la lignina, que podrá ser sometido a posteriores procesos de hidrólisis ácida o enzimática.

Los procesos de hidrólisis ácida en dos etapas emplean generalmente una concentración de ácido menor y a temperatura ambiente, para la hidrólisis de las hemicelulosas, y una temperatura superior (hasta 240 °C) para la hidrólisis de la celulosa, Choi y Mathews (1996).

Lee *et al.* (1997) comparan dos pretratamientos consistentes en altas temperaturas (140-170 °C) y bajas concentraciones (0,5-2 %) de ácido sulfúrico, por una parte, y bajas temperaturas (100-120 °C) con concentraciones de ácido entre 0,5 y 5 % en un proceso en dos etapas, por la otra. Aunque los mejores resultados en la hidrólisis enzimática posterior se obtienen en el primer pretratamiento, la cantidad de azúcares que se degradan hacia furfural e hidroximetilfurfural es mínima en el segundo.

Desde el punto de vista económico, la utilización de la fracción hemicelulósica es imprescindible, puesto que puede representar hasta un 35 % del peso total del residuo. Así, el empleo de una etapa de prehidrólisis mejoraría de diversas formas la utilización eficiente de cualquier residuo lignocelulósico, al presentar, entre otras, las siguientes ventajas, Parajó *et al.* (1993):

- aumenta la eficiencia de la utilización del residuo
- limita la aparición de productos de degradación
- facilita la hidrólisis, ácida o enzimática, en etapas posteriores
- reduce el consumo de energía
- aumenta la concentración de azúcares en las disoluciones obtenidas

Aunque los resultados en cuanto a la hidrólisis de la celulosa son mejores, el coste de estos tratamientos es normalmente superior al de otros como el proceso AFEX o la explosión con vapor. Además, resulta imprescindible la neutralización de los hidrolizados con vistas a las etapas posteriores de hidrólisis enzimática o fermentación.

Hidrólisis alcalina

Algunas bases pueden utilizarse también como pretratamiento de materiales lignocelulósicos. Su efecto depende del contenido en lignina del residuo. Por ejemplo, las disoluciones diluidas de NaOH producen un aumento del área superficial, un descenso del grado de polimerización y de la cristalinidad, la ruptura de enlaces entre la lignina y los carbohidratos y la descomposición de la estructura de la lignina, Fan *et al.* (1987), Curreli *et al.* (2002). La eliminación de extractos y la disminución de la concentración de ácido acético en los hidrolizados se consigue mediante tratamiento con NaOH al 1 % de astillas de *Eucalyptus globulus*, Parajó *et al.* (1996a).

También se han utilizado disoluciones de hidróxido amónico. En este sentido, Domínguez *et al.* (1997), analizando la producción de xilitol con levaduras, observan que no se fermentan hidrolizados de residuo de maíz no sometidos previamente a tratamiento con hidróxido amónico, al menos en las condiciones de operación ensayadas.

Organosolvólisis

En este pretratamiento se emplea una mezcla de un disolvente orgánico con un ácido inorgánico (clorhídrico o sulfúrico) para romper la estructura interna de la lignina y las hemicelulosas. Los disolventes orgánicos más empleados son metanol, etanol, acetona, etilenglicol y trietilenglicol, Chum *et al.* (1988).

Zacchi *et al.* (1988) utilizan fenol (40 %) y ácido clorhídrico (1,85 %) para tratar paja de trigo, obteniendo una reducción en los contenidos de hemicelulosa y lignina del 27,3 al 8,3 % y del 19,6 al 3,3 % respectivamente.

Rubio *et al.* (1998) realizan la solubilización total de la hemicelulosa de tallos de maíz, tratados con disolventes orgánicos, a 220 °C, aunque con una cierta pérdida de lignina, mientras que la celulosa permanece prácticamente inalterada.

La eliminación de los disolventes orgánicos tras el proceso es una etapa obligada, debido a la posible inhibición en el crecimiento de los microorganismos en la fermentación.

2.2.4 PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

Consisten en la utilización de microorganismos (generalmente hongos) para la degradación de la lignina y las hemicelulosas, Sawada *et al.* (1995), Adaskaveg *et al.* (1995). Este tipo de pretratamientos presenta la ventaja de requerir condiciones suaves de operación y un reducido coste energético. Como desventaja, la velocidad de hidrólisis de los procesos biológicos es muy lenta.

La biodegradación de la lignina puede ser catalizada por la enzima peroxidasa en presencia de H₂O₂ (delignificación oxidativa). La principal ventaja de este tratamiento radica en facilitar la posterior hidrólisis enzimática de la celulosa, Lee (1997).

2.3. Hidrólisis

2.3 HIDRÓLISIS

La hidrólisis consiste en la escisión de un compuesto por la acción del agua, lo que origina, al menos, dos productos. Por extensión, recibe este nombre todo proceso en el que se rompen enlaces químicos por acción del agua o de disoluciones ácidas o básicas.

Aplicado a la biomasa, la hidrólisis designa el fraccionamiento de los polímeros vegetales. Dependiendo de las condiciones de operación, se obtienen celulosa, hemicelulosas y lignina, o bien la descomposición puede producir la aparición de los oligómeros o monómeros que los constituyen. Este proceso puede ser catalizado por agentes bioquímicos (hidrólisis enzimática) o químicos (hidrólisis ácida o básica).

Las enzimas son compuestos biológicos que producen la ruptura de enlaces químicos específicos, a la vez que limitan la obtención de productos de degradación de los compuestos hidrolizados. La hidrólisis enzimática se consigue por adición directa del enzima específico o bien mediante el cultivo de algún microorganismo que la pueda producir sobre el propio sustrato a utilizar.

En cuanto a la utilización de agentes químicos, la formación de los monosacáridos lignocelulósicos puede realizarse por dos procedimientos: tratar directamente el vegetal mediante un ácido o bien extraer las hemicelulosas por la acción de una base, purificarlas y posteriormente hidrolizarlas mediante un ácido o un microorganismo. Por esta razón, la hidrólisis básica puede considerarse un pretratamiento de los residuos lignocelulósicos. El fraccionamiento de la lignocelulosa mediante una base debe ser lo más completo posible y comportar un mínimo de degradación.

La acción de los ácidos provoca la ruptura de las uniones entre los monómeros de las hemicelulosas en condiciones más suaves que las requeridas para la hidrólisis de la celulosa.

2.3.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA

La hidrólisis ácida de las fracciones celulósica y hemicelulósica de los residuos vegetales constituye una reacción heterogénea en la que los reactivos se encuentran en fase sólida y el agente hidrolítico (H^+) en fase acuosa. La ruptura de los enlaces

glucosídicos que provoca la liberación de los azúcares, implica las siguientes etapas, Abatzoglou *et al.* (1990):

- 1^a Difusión de H⁺ a través de la fase sólida húmeda.
- 2^a Protonación del oxígeno del enlace glucosídico.
- 3^a Ruptura del enlace glucosídico y formación del ion carbonio y de un polímero menor, de un oligómero o de un azúcar sencillo, dependiendo de la posición del enlace que reacciona.
- 4^a Reacción del ion carbonio con una molécula de agua, lo que conduce a la regeneración de H⁺ y la formación de un sacárido, cuyo grado de polimerización depende igualmente de la posición del enlace glucosídico.
- 5^a Difusión de los productos en la fase acuosa si su forma y tamaño lo permiten; en caso contrario, las etapas 2^a, 3^a y 4^a se repiten en posiciones glucosídicas adyacentes.

Una vez que los azúcares se han formado y solubilizado en la fase acuosa, se producen reacciones de degradación que conducen a compuestos como furfural, hidroximetilfurfural, ácidos u otros, Saeman (1945).

El proceso de hidrólisis está altamente condicionado por la naturaleza de la fracción del residuo que se desee hidrolizar, es decir, por su estructura. En este sentido, la fracción hemicelulósica, constituida por diversos polímeros de monosacáridos, fundamentalmente, presenta una estructura no cristalina que facilita el acceso a los enlaces de los ácidos, por lo que resulta relativamente fácil de hidrolizar. Los oligómeros, producidos durante el ataque del ácido, son solubles en agua y se hidrolizan con facilidad dando los monómeros correspondientes. Esto explica el hecho de que la hemicelulosa puede solubilizarse a alta temperatura, incluso sin el concurso de ácidos.

Sin embargo, la fracción celulósica presenta un alto grado de cristalinidad; en realidad, los enlaces glucosídicos β 1-4 favorecen la disposición lineal de las moléculas de celulosa y la aparición de enlaces inter e intramoleculares por puentes de hidrógeno. Esta estructura cristalina confiere una gran estabilidad a las cadenas de celulosa y dificulta el acceso a los enlaces del ácido, haciendo que esta fracción sea comparativamente mucho más difícil de hidrolizar.

En cuanto al proceso de hidrólisis en sí, una de las principales decisiones consiste en la elección del ácido a utilizar. Se debe considerar, por un lado, la eficacia del agente hidrolítico, que dependerá de la naturaleza del residuo a tratar, y por otro, su coste.

Así, Fanta *et al.* (1984) han encontrado que el ácido trifluoroacético proporciona mejores resultados que el clorhídrico en la hidrólisis de la paja de trigo; adicionalmente, la posterior fermentación del hidrolizado con *P. tannophilus* rinde

concentraciones de etanol similares a las obtenidas cuando se fermenta D-xilosa pura, lo que indica que los productos de degradación hidrolíticos se obtienen en bajas concentraciones.

En el aspecto económico, el ácido sulfúrico presenta el menor coste por mol de protones. Este hecho resulta especialmente importante si se tiene en cuenta que, en cualquier operación a escala industrial, será imperativo realizar una recuperación del ácido. El ácido clorhídrico, también relativamente barato, aunque menos que el sulfúrico, puede resultar más corrosivo para los equipos, especialmente a altas temperaturas.

La concentración del ácido y la temperatura del proceso son dos de las principales variables de operación. En general, cuanto mayor es la concentración, menor puede ser la temperatura para alcanzar el mismo grado de hidrólisis. Por motivos económicos, habitualmente se prefiere realizar el proceso con ácidos diluidos, Saeman (1945).

Debido a las diferencias en la accesibilidad a las distintas fracciones, algunos procedimientos de hidrólisis realizan el proceso en dos etapas, de manera que en condiciones suaves se retiran las hemicelulosas y, sobre el residuo lignocelulósico resultante, se lleva a cabo una hidrólisis de la fracción celulósica actuando con mayores concentraciones de ácido o mayor temperatura. Esta forma de proceder tiene como objetivo, además de obtener en disolución los azúcares, minimizar la aparición de compuestos de degradación que se producirían en mayor medida si las condiciones más severas necesarias para la hidrólisis de la celulosa se aplicaran al residuo en su conjunto.

De esta forma, Bienkowski *et al.* (1984) proponen la eliminación de las hemicelulosas del residuo de maíz mediante tratamiento con ácido sulfúrico al 10 % y 98 °C y sobre el residuo resultante se emplea el ácido concentrado (72-85 %) bajo acción mecánica.

Delgenes *et al.* (1990) hidrolizan la fracción hemicelulósica de la paja de trigo con ácido sulfúrico al 2 % y 91,5 °C, en tanto que la hidrólisis completa se realiza con este ácido al 72 %.

Otra variable importante en el proceso de hidrólisis es el tiempo de residencia. Overend y Chornet (1987) han combinado el tiempo y la temperatura de hidrólisis en una nueva ordenada de reacción, que recibe el nombre de factor de severidad, según la ecuación:

$$Ro = t \exp \frac{T_H - T_b}{14,75} \quad [2.1]$$

siendo t el tiempo de residencia (min), T_H la temperatura de la reacción (°C) y T_b una temperatura de referencia (100 °C). Inicialmente esta ecuación se aplica a hidrólisis realizadas solo mediante tratamiento hidrotérmico. Chum *et al.* (1990) introdujeron un tercer parámetro, el pH del medio, y definieron el concepto de

severidad combinada CS según:

$$CS = \log R_o - pH \quad [2.2]$$

donde el pH se calcula a partir de la cantidad de ácido sulfúrico utilizada en la hidrólisis.

2.3.2 MODELOS CINÉTICOS DE HIDRÓLISIS ÁCIDA

El desarrollo de modelos cinéticos que describan la hidrólisis de los residuos lignocelulósicos está basado, principalmente, en el diferente comportamiento de las fracciones celulósica y hemicelulósica.

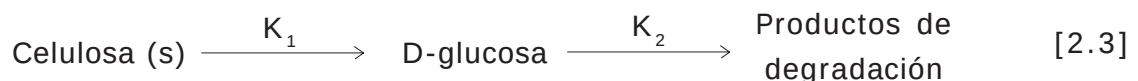
Para optimizar el pretratamiento termoquímico de los residuos lignocelulósicos se necesita un conocimiento más profundo de las reacciones químicas que tienen lugar en estos procesos, lo que implica:

- la determinación de los factores que afectan a la descomposición de los monosacáridos y las velocidades de formación y desaparición de los productos resultantes
- el desarrollo y aplicación de modelos para describir el pretratamiento de hidrólisis de los residuos

La mayoría de los modelos cinéticos de hidrólisis que se encuentran en la literatura se refieren a condiciones de ácido diluido y altas temperaturas.

2.3.2.1 Hidrólisis de celulosa

Para el caso de la celulosa, los primeros estudios se deben a Saeman (1945), que propone el siguiente modelo, Bhandari *et al.* (1984):



Se admite que las reacciones son irreversibles de primer orden. La ecuación diferencial del modelo es, por tanto:

$$\frac{dC_s}{dt} = K_1 C_s - K_2 g \quad [2.4]$$

donde C_s y g son, respectivamente, las concentraciones de celulosa y D-glucosa.

La forma integrada de la ecuación anterior, para temperatura y concentración de ácido constantes, conduce a:

$$g = C_{so} \frac{K_1}{K_1 - K_2} (\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)) + C_{Go} \exp(-k_2 t) \quad [2.5]$$

siendo C_{so} la fracción de celulosa en el residuo original y C_{Go} la fracción de celulosa amorfa que se hidroliza de inmediato a D-glucosa y se degrada seguidamente.

Las constantes cinéticas k_1 y k_2 pueden relacionarse con la temperatura mediante una ecuación de tipo Arrhenius:

$$k_i = A_i \exp(-E_{ai}/RT), \quad i = 1, 2 \quad [2.6]$$

donde E_{ai} es la energía de activación aparente y A_i el factor preexponencial, que depende de la concentración de ácido (C_a):

$$A_i = A_{oi} C_a^{p_i}, \quad i = 1, 2 \quad [2.7]$$

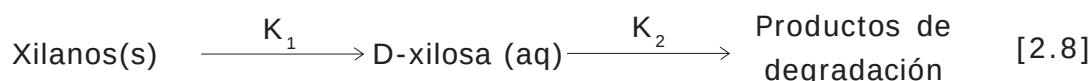
El factor preexponencial, A_i , la energía de activación aparente, E_{ai} , y el exponente p_i se determinan empíricamente. Los valores de estos parámetros obtenidos por diversos autores se muestran en la Tabla 2.8, en la que pueden constatar las diferencias en función del tipo de sustrato.

TABLA 2.8
PARÁMETROS CINÉTICOS DE HIDRÓLISIS DE CELULOSA
PARA DISTINTOS RESIDUOS

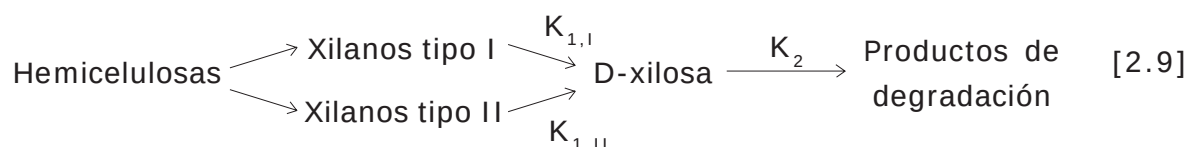
Residuo	Madera de abeto	Bagazo de maíz	Paja de trigo
A_{01}, h^{-1}	$1,04 \cdot 10^{21}$	$1,60 \cdot 10^{21}$	$4,13 \cdot 10^{16}$
p_1	1,34	2,74	1,16
$E_{a1}, kJ/mol$	179,50	189,50	138,00
A_{02}, h^{-1}	$1,43 \cdot 10^{16}$	$1,21 \cdot 10^{16}$	$2,57 \cdot 10^{11}$
p_2	1,02	1,86	0,60
$E_{a2}, kJ/mol$	137,50	137,20	87,90
Referencia	Saeman (1945)	Bhandari <i>et al.</i> (1984)	Ranganathan <i>et al.</i> (1985)

2.3.2.2 Hidrólisis de hemicelulosas

El modelo más simple, análogo al de hidrólisis de celulosa, incluye una serie de reacciones irreversibles a partir de los xilanos sólidos para dar D-xilosa y seguidamente productos de degradación, Lavarack *et al.* (2000):



Sin embargo este esquema se ha estimado insuficiente, puesto que las reacciones de descomposición de los xilanos no pueden considerarse un proceso de una etapa sencilla. Antes bien, la cadena de xilano se descompone primeramente en xilooligosacáridos para dar seguidamente D-xilosa, que, a su vez, se descompone en furfural y otros productos de degradación. Con el propósito de permitir realizar cálculos, la descomposición de los xilanos se ha considerado como la suma de dos reacciones paralelas de primer orden, Esteghlalian *et al.* (1997), Eken-Saracoglu *et al.* (1998), Lavarack *et al.* (2000). Ranganathan *et al.* (1985) proponen un modelo basado en el siguiente esquema de reacciones:



Según estos autores, en la biomasa existen dos tipos de xilanos, los que se hidrolizan fácil o rápidamente y los que lo hacen lentamente (xilanos tipo I y II). Conviene destacar que estas fracciones se han definido por conveniencia para efectuar los cálculos de velocidades de hidrólisis, pero no se han ligado a características físicas o químicas de la materia prima.

En condiciones de reacción isoterma, la concentración de D-xilosa presente en disolución acuosa (C_x) para los dos modelos propuestos puede calcularse, Lavarack *et al.* (2000), mediante las ecuaciones:

$$C_x = C_{x0} \frac{K_1}{\phi K_2 - K_1} (\text{Exp}(-k_1 t) - \text{exp}(-\phi k_2 t)) \quad [2.10]$$

$$C_x = C_{x0} \frac{\gamma K_{1,I}}{\phi K_2 - K_{1,I}} (\text{exp}(-k_{1,I} t) - \text{exp}(-\phi k_2 t)) + \frac{(1-\gamma) K_{1,II}}{\phi K_2 - K_{1,II}} (\text{exp}(-k_{1,II} t) - \text{exp}(-\phi k_2 t)) \quad [2.11]$$

donde C_{x_0} es la concentración de D-xilosa si todo el xilano presente en el sustrato se convirtiera, k_i representa las distintas constantes cinéticas (sujetas, como en el caso de la celulosa, a dependencias tipo Arrhenius con la temperatura y con factores preexponenciales en función de la concentración de ácido), ϕ es la razón de material sólido a líquido y γ la fracción de xilano fácil de hidrolizar. En la Tabla 2.9 se recogen los valores experimentales determinados para los distintos parámetros cinéticos por diversos autores y referidos a diferentes residuos.

Téllez-Luis *et al.* (2002) proponen un modelo cinético para la hidrólisis ácida de paja de trigo considerando el modelo simplificado para la degradación de hemicelulosa, y obtienen expresiones que permiten predecir las concentraciones de D-xilosa y D-glucosa, así como de inhibidores (ácido acético y furfural) en función de la concentración de ácido sulfúrico empleada. Para el mismo sustrato, Lis *et al.* (2000) utilizan los modelos de primer orden y de núcleo sin reaccionar para partículas de tamaño constante.

Garrote *et al.* (2001b) proponen un modelo cinético para la autohidrólisis de mazorca de maíz, según el cual los xilanos de este material están formados por dos fracciones, una de las cuales no reacciona en las condiciones ensayadas (145-190 °C, 0-12,3 h), mientras que la otra es susceptible de rendir xilooligosacáridos, primeramente de alto grado de polimerización y, posteriormente, de bajo grado de polimerización. A medida que continúa la acción hidrolítica, se obtiene D-xilosa, que se transforma en furfural y este a su vez en otros productos de degradación.

TABLA 2.9
PARÁMETROS CINÉTICOS DE HIDRÓLISIS DE HEMICELULOSAS
PARA DISTINTOS RESIDUOS

Sustrato	Parámetro			Referencia
	$A_{oi}, \text{ min}^{-1}$	p_i	$E_{ai} \text{ (kJ/mol)}$	
Paja de trigo				
$k_{1,I}$	nd	nd	50,2	Grohmann et al.(1985)
$k_{1,II}$	nd	nd	104,6	
Madera de álamo				
$k_{1,I}$	nd	nd	117,2	Grohmann et al.(1985)
$k_{1,II}$	nd	nd	154,8	
Madera de álamo				
$k_{1,I}$	$3,3 \cdot 10^{21}$	0,4	176,7	Esteghlalian et al. 1997
$k_{1,II}$	$3,3 \cdot 10^{22}$	1,5	192,0	
k_2	$8,5 \cdot 10^{10}$	0,55	102,0	
Madera de roble				
$k_{1,I}$	$1,04 \cdot 10^{14}$	1,54	120,1	Kim y Lee (1987)
$k_{1,II}$	$6,00 \cdot 10^{12}$	1,19	118,0	
Madera de abedul				
$k_{1,I}$	$2,67 \cdot 10^{16}$	1	126,6	Maloney et al. (1985)
$k_{1,II}$	$16 \cdot 10^{19}$	1	156,5	

Residuo de maíz

$k_{1,I}$	$6,7 \cdot 10^{16}$	1,5	129,8	Esteghlalian et al. (1997)
$k_{1,II}$	$6,9 \cdot 10^{19}$	1,6	167,6	
k_2	$3,7 \cdot 10^{10}$	0,50	98,4	

Bagazo de caña

$k_{1,I}$	$7,8 \cdot 10^8$	nd	102,0	Lavarack et al. (2000)
$k_{1,II}$	0	nd	-	
k_2	$1,3 \cdot 10^{13}$	nd	120,3	

nd: no determinado

2.3.3 PROCESOS INDUSTRIALES DE HIDRÓLISIS ÁCIDA

Para la realización de un proceso de hidrólisis ácida de residuos lignocelulósicos de forma eficiente deben alcanzarse los siguientes objetivos, Abatzoglou *et al.* (1990):

- capacidad de manejar suspensiones (del 10 al 15 % en sólidos) mediante bombas comerciales
- impregnación del material minimizando la exposición del reactor a los ácidos, para limitar los problemas de corrosión
- eficiente transferencia de calor que permita el aumento rápido de la temperatura de la suspensión
- tiempos de residencia cortos
- rápida y efectiva separación entre componentes volátiles y vapor, por un lado, y la suspensión, por el otro
- mínimo consumo de vapor

Teniendo en cuenta estas condiciones, se han desarrollado diferentes tipos de procesos de hidrólisis ácida, los más significativos de los cuales se describen brevemente a continuación.

Un diagrama simplificado de un proceso típico de hidrólisis ácida de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol se presenta en la Figura 2.7, Ferrari y Burastero (1994).

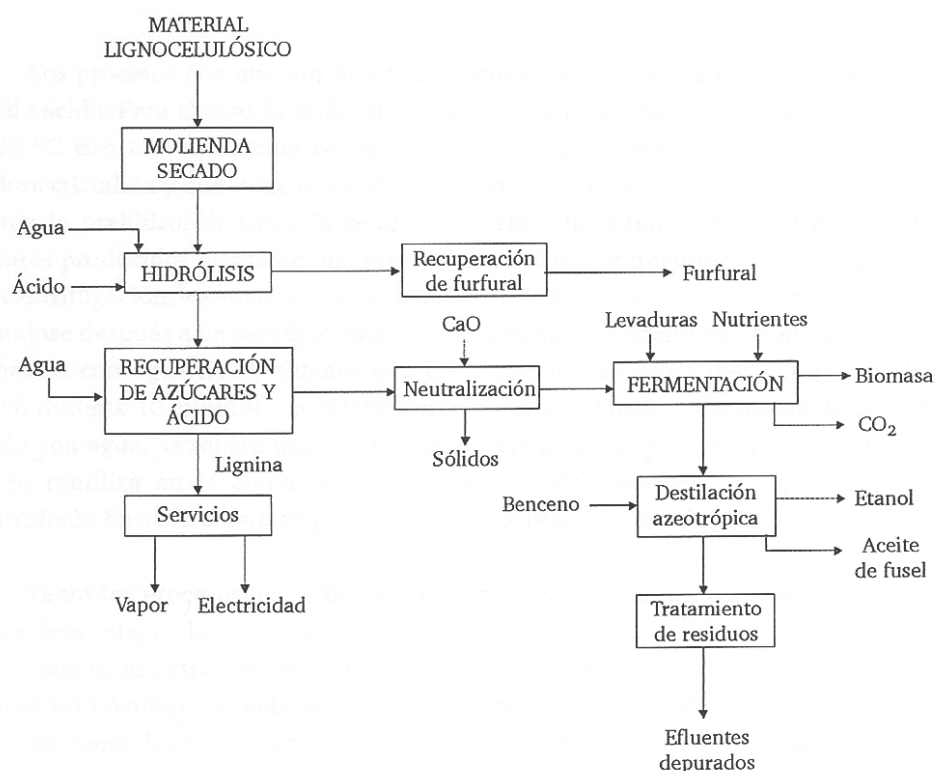


Figura 2.7 Diagrama de flujo simplificado de un proceso de producción de etanol por hidrólisis ácida

Los procesos de hidrólisis ácida pueden dividirse en dos grandes categorías: los que utilizan alta temperatura con ácido sulfúrico diluido y los que emplean bajas temperaturas con ácido concentrado.

Dentro del primer grupo, se ha utilizado un reactor de percolación, en el que la hidrólisis se efectúa a 180-190 °C y con una concentración de ácido de 0,5 %. Para estas condiciones, los tiempos de residencia varían entre 170 y 200 minutos para la fase sólida y 50 y 70 minutos para la fase líquida. Con diferentes variaciones, este proceso fue comercialmente explotado en Rusia, donde existen cerca de 40 plantas instaladas. También se han ensayado baterías de reactores de percolación en serie.

Otro esquema de esta categoría, desarrollado a escala de planta piloto, emplea un reactor flujo de pistón, a temperaturas y concentración de ácido superiores (240-265 °C y 1 %); aunque no existe separación de los azúcares de las hemicelulosas, el rendimiento en etanol es elevado.

Los procesos que utilizan baja temperatura y ácido concentrado se diferencian en el tipo de ácido. Para el caso de ácido sulfúrico, el material es tratado previamente durante 2 h a 100 °C con una disolución recirculada de azúcares proveniente de la hidrólisis de la celulosa cristalina y que tiene una concentración de ácido residual del 7 %. De este modo se efectúa la prehidrólisis sobre la celulosa amorfa y las hemicelulosas, recuperándose los azúcares producidos mediante una serie de lavados en contracorriente. El sólido, escurrido por centrifugación, se somete a

una disolución de ácido al 10-30 % durante 1 a 2 horas, pasándose después a un secadero rotatorio bajo vacío. Seguidamente, el material pretratado se mezcla con agua hasta obtener una concentración de ácido del 8 % y se hidroliza a 140 °C durante 10 minutos o a 100 °C durante 2 horas. Finalmente, mediante centrifugas y lavado con agua, se separa una disolución que contiene los productos de hidrólisis y ácido que se reutiliza en la etapa de prehidrólisis descrita previamente. El proceso ha sido desarrollado hasta la escala de planta piloto en Japón y en Estados Unidos.

Tanto los procesos que utilizan ácido sulfúrico diluido como concentrado presentan ciertas desventajas. La hidrólisis con ácido diluido tiende a generar un mayor número de subproductos, mientras que el empleo de ácido concentrado requiere una reutilización por motivos económicos; además, se presentan problemas de corrosión y de manipulación del ácido, así como degradación de azúcares, lo que conduce finalmente a una reducción en el rendimiento en etanol.

Un nuevo sistema, desarrollado por el National Renewable Energy Laboratory (NREL) de Estados Unidos, consiste en la hidrólisis en contracorriente, que se realiza en un proceso en dos etapas. En la primera, el material lignocelulósico se introduce en un reactor horizontal junto con vapor para alcanzar una temperatura de unos 160 °C; tras un tiempo de residencia de 8 minutos, durante el cual se hidroliza el 60 % de las hemicelulosas, se pasa a un reactor vertical que opera a 225 °C. En esta segunda etapa se añade ácido sulfúrico muy diluido lográndose la hidrólisis de las hemicelulosas restantes y, en función del tiempo de residencia, la hidrólisis del 60 % del total de la fracción celulósica. Este proceso de hidrólisis en contracorriente ofrece mayor potencial de reducción de costes que el proceso clásico que utiliza ácido sulfúrico diluido, aumentando además el rendimiento en D-glucosa y en etanol tras la fermentación. Se ha estimado una reducción de costes global del orden de 33 centavos de dólar por galón, DiPardo (2001).

En cuanto a la utilización de ácido clorhídrico, se emplea una alta concentración (41 %) a temperatura ambiente, obteniéndose rendimientos cercanos al 100 % en la hidrólisis de la celulosa. El proceso conocido como Bergius-Rheinau fue llevado a cabo comercialmente en una planta construida en Alemania hasta el fin de la Segunda Guerra Mundial. Posteriormente, se introdujeron una serie de mejoras y etapas de pre y posthidrólisis, dando lugar al llamado proceso Udic-Rheinau, cuyas principales mejoras consisten en abaratar el coste de recuperación del catalizador mediante el uso de ácido en estado gaseoso, el empleo de disolventes y tecnologías de membranas. El resultado es un alto rendimiento de hidrólisis, la preservación de la D-xilosa y la formación de lignina de alta calidad que puede considerarse un subproducto valioso.

En la Tabla 2.10, se muestra una comparación de los costes del etanol para los procesos reseñados, Ferrari y Burastero (1994). Conviene indicar que estos costes pueden verse sensiblemente reducidos en el caso de que se aproveche la D-xilosa para la producción de etanol. Esto es posible si se diseña el proceso de forma que la hidrólisis de las hemicelulosas se efectúe en una etapa independiente y los azúcares

se retiren del reactor antes de que el material ingrese en la zona de hidrólisis, siendo fermentados separadamente por un microorganismo que produzca etanol a partir de D-xilosa.

Otro factor que puede repercutir favorablemente en los costes totales es la venta de subproductos. En el proceso de obtención de etanol se generan distintas cantidades de anhídrido carbónico (750 kg/m³ de etanol), biomasa microbiana (levadura, 150 kg/m³ de etanol), aceite de fusel (mezcla de alcoholes superiores y ésteres, 3 kg/m³ de etanol), electricidad, furfural y lignina. Considerando que sólo se venden el furfural y la electricidad y que se aprovecha la D-xilosa, pueden lograrse descensos del orden del 40 % en los costes mencionados en la Tabla 2.10.

TABLA 2.10

COSTES DEL ETANOL (CENTAVOS DE \$US/dm³) PARA DISTINTOS PROCESOS

Proceso	Baja concentración de ácido sulfúrico			Alta concentración de ácido	
	R.Percolación	R.Flujo pistón	R. en serie	H ₂ SO ₄	HCl
Costes directos					
Materias primas					
Madera	17,7	19,7	14,6	12,9	13,2
Ácido	4,7	4,6	4,7	12,5	6,7
Cal	0,9	0,9	0,9	2,5	0,4
Otros	1,7	0,7	0,7	0,6	0,6
-Servicios					
Agua	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
Vapor	-	-	-	-	4,0
-Mano de obra	1,5	2,0	1,7	2,1	2,0
Otros costes	7,9	9,4	7,9	9,9	9,7
Costes de capital	15,5	14,4	13,9	16,1	19,9
Coste total	50,1	52,0	44,6	57,0	56,9

2.3.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática de la celulosa se basa en la capacidad de algunos microorganismos, fundamentalmente hongos y bacterias, de producir un conjunto de enzimas extracelulares capaces de liberar, a partir de las cadenas celulósicas, las moléculas de D-glucosa que las constituyen. Estas moléculas pueden ser posteriormente utilizadas como tales o como sustratos para la producción, por microorganismos específicos, de diferentes compuestos orgánicos como acetona, butanol, etanol, etc., o bien para la obtención de las proteínas constitutivas de dichos microorganismos (SCP).

Las principales dificultades para hidrolizar por vía enzimática los materiales lignocelulósicos están relacionadas, por un lado, con la baja actividad específica de las enzimas de las que se dispone en la actualidad y por tanto con la necesidad de un elevado consumo de las mismas durante el proceso, y por otro, con la propia estructura de los sustratos lignocelulósicos nativos. A pesar de ello, la hidrólisis enzimática de residuos celulósicos parece ser uno de los caminos más prometedores. En la Tabla 2.11 se muestran los resultados de la hidrólisis enzimática sobre diferentes sustratos, seguida de la fermentación con distintas levaduras.

El proceso de hidrólisis por utilización de enzimas se lleva a cabo mediante un complejo enzimático formado principalmente por:

- Endoglucanasas. 1,4- β -D glucan glucanohidrolasas, EC 3.2.1.4, que actúan hidrolizando uniones internas de la molécula de celulosa.
- Exoglucanasas. En general 1,4- β -D glucan celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91, que actúan presumiblemente sobre los extremos de la cadena de celulosa, liberando moléculas de celobiosa y D-glucosa.
- β -glucosidasas, EC 3.2.1.21 (o celobiasas cuando actúan sobre la celobiosa). Muestran gran actividad sobre oligómeros solubles de bajo peso molecular.

Dada la naturaleza insoluble del sustrato, la hidrólisis es una reacción heterogénea consistente en el desplazamiento de las glucanasas desde el seno de la fase acuosa hasta la superficie del sustrato, adsorción en ella y posterior reacción, produciendo cadenas más cortas de celulosa y celobiosa. Esta última pasará a la disolución y aquí es hidrolizada por la β -1,4-glucosidasa. En consecuencia, los factores a considerar en cualquier estudio cinético de la hidrólisis enzimática incluyen: la naturaleza y producción de las celulasas, la naturaleza del sustrato, las interacciones enzima-sustrato y el efecto de inhibición que podría existir por parte de los productos, del sustrato o de las sustancias extrañas presentes en el medio.

Dado que la celulosa es un sustrato insoluble, las etapas necesarias para su hidrólisis, como en cualquier reacción heterogénea, son:

- Transferencia de las moléculas de enzima desde el seno de la fase acuosa hasta la superficie de las partículas de celulosa.
- Formación del complejo enzima-sustrato (ES) por adsorción de las moléculas de enzima.
- Adsorción del agua sobre los centros activos del complejo ES y reacción superficial entre H_2O y la celulosa.
- Transferencia de los productos de reacción solubles (D-glucosa y celobiosa) hasta el seno de la fase acuosa.
- Hidrólisis en fase homogénea de la celobiosa a D-glucosa por acción de la β 1,4-glucosidasa.

Por tanto, la descripción cuantitativa del proceso de solubilización es complicada, especialmente porque todas las enzimas actúan conjuntamente y existe un sinergismo entre las endo y las exoglucanasas.

TABLA 2.11
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE DISTINTOS SUSTRATOS Y FERMENTACIÓN ETANÓLICA

SUSTRATO	CONDICIONES	AZÚCAR, g/dm ³		LEVADURA	ETANOL		REFERENCIA
		D-glucosa	D-xilosa		Máx, g/dm ³	Y _E , g/g	
Madera de álamo	NH ₄ OH, Extracción Acetato etilo	2,7	20,5	<i>Pichia stipitis</i>	11,0	0,47	Wilson <i>et al.</i> (1989)
	SO ₂ /enzimas, desabsorción, Carbón activo/Ca(OH) ₂	92,0		<i>Pichia stipitis</i>	29,0	0,41	Parekh <i>et al.</i> (1986)
				<i>Candida shehatae</i>	25,0	0,39	
	Vapor	64	28	<i>Pichia stipitis</i>	41,0	0,45	Parekh <i>et al.</i> (1986)
Ramón de olivo	Pret. vapor/enzimas Tampón acetato	23,6		<i>P. tannophilus</i>	6,1	0,39	Romero (2003)
Tallos de girasol	steam explosion, celulasas de <i>T.reesei</i>	40		<i>S. cerevisiae</i>	-	0,44	Sharma <i>et al.</i> (2002b)
Cebada		126	54	<i>Candida shehatae</i>	84	0,47	Wayman y Parekh (1985)
Licor de sulfito	Complejo enzimático que incluye xilosa-isomerasa, Neutralización KOH, Tampón fosfato			<i>S. cerevisiae</i>	14,1	0,38	
		6,0	10,5	<i>P. tannophilus</i>	5,0	0,12	Lindén y Hahn-Hägerdal (1989)
				<i>Schizosacch. pombe</i>	10,3	0,30	

2.4 Acondicionamiento de Hidrolizados

2.4 ACONDICIONAMIENTO DE HIDROLIZADOS

La etapa de hidrólisis de los residuos lignocelulósicos origina una disolución de pH ácido (especialmente si se ha utilizado una hidrólisis ácida) que resulta inviable para su empleo directo como medio de cultivo en la fermentación. Además, el pretratamiento efectuado así como la propia hidrólisis, generan una serie de compuestos derivados de los componentes del residuo que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos y dificultar la transformación de los azúcares en otros productos. Esto obliga a realizar operaciones de acondicionamiento de los hidrolizados, con el objetivo de aumentar su fermentabilidad.

Los compuestos inhibidores se dividen en tres grupos básicos, en función de su origen, Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000): ácidos débiles, derivados furánicos y compuestos fenólicos, Figura 2.8.

Cuando las hemicelulosas se degradan, se liberan fundamentalmente D-xilosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa y ácido acético. A alta temperatura y presión, la D-xilosa se degrada para formar furfural; análogamente, el 5-hidroximetilfurfural (HMF) se obtiene por degradación de las hexosas. La ruptura de furfural y HMF origina ácido fórmico, mientras que el ácido levulínico se forma a partir de la degradación de HMF y los compuestos fenólicos a partir de la lignina, Baugh y McCarty (1988).

Además de los anteriores, se han identificado también vainillina, siringilaldehído y ácido acético como inhibidores del crecimiento de los microorganismos, Clark y Mackie (1984), Ando *et al.* (1986), Tran y Chambers (1986), Nishikawa *et al.* (1988), Sánchez y Bautista (1988).

Los productos de la fermentación, etanol y ácidos orgánicos, son también inhibidores para los microorganismos, Maiorella *et al.* (1984).

Finalmente, también los metales o minerales, contenidos en los materiales lignocelulósicos o resultantes de la corrosión de los equipos, pueden causar inhibición en el proceso de fermentación, Parajó *et al.* (1998c).

La concentración máxima admisible de cada inhibidor no puede establecerse con carácter general, pues depende de diversos factores como el microorganismo utilizado y su grado de adaptación, el proceso de fermentación utilizado y la presencia simultánea de varios inhibidores.

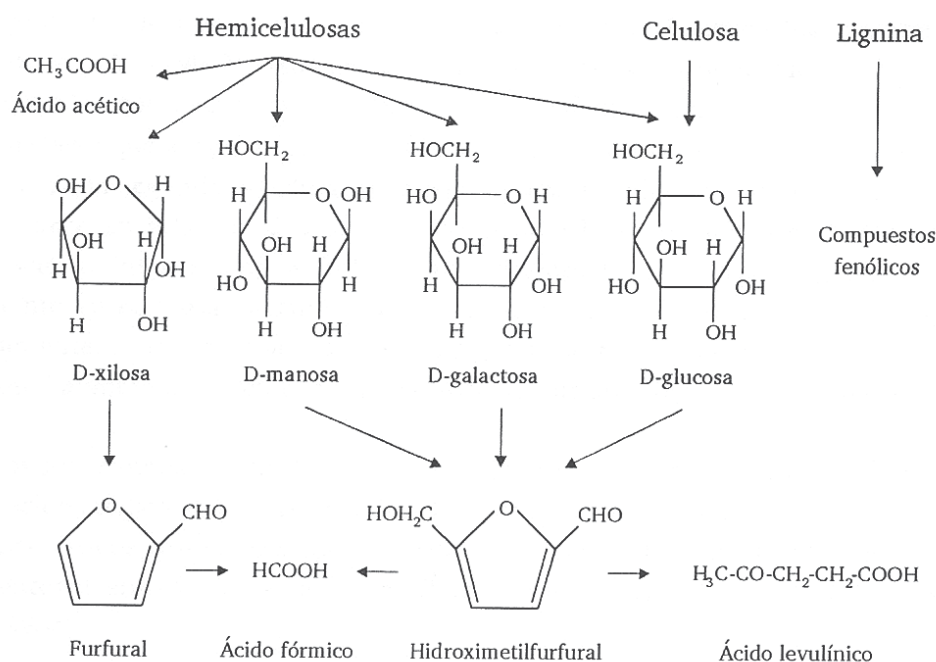


Figura 2.8 Compuestos potencialmente inhibidores

Los ácidos débiles inhiben el crecimiento celular, por lo que se usan como conservantes en alimentación. Puesto que estos ácidos débiles son muy sensibles a las variaciones de pH, ésta es una variable primordial en la fermentación. El ácido fórmico resulta ser, entre los ácidos débiles, el que ejerce un mayor poder inhibitorio, seguidos de los ácidos acético y levulínico, Larsson *et al.* (1999). El furfural reduce la velocidad específica de crecimiento así como las productividades volumétrica y específica en etanol, Palmqvist y Hahn Hägerdal (2000).

Algunos inhibidores presentan efectos contrapuestos o sinérgicos, dependiendo de que se encuentren presentes con otros compuestos en los hidrolizados. En este sentido, Palmqvist *et al.* (1999) estudian los efectos sobre la productividad en etanol en fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida shehatae*. Como conclusiones se puede destacar que el ácido acético no afecta a los cultivos de *S. cerevisiae*, mientras que sí inhibe los de la segunda levadura; para cultivos con levadura de panadería (*S. cerevisiae*, más tolerante en relación al ácido acético, lo que la hace interesante para su uso en fermentaciones industriales), el furfural, en concentraciones de hasta 2 g/dm^3 estimula el rendimiento en biomasa, disminuyendo este parámetro para concentraciones superiores. Análogamente, concentraciones de hasta 10 g/dm^3 de ácido acético provocan un aumento en el rendimiento en etanol, pero en presencia de furfural tiene lugar una disminución.

Los procedimientos de eliminación o reducción de los compuestos inhibidores de la fermentación reciben el nombre genérico de detoxificación y pueden clasificarse en métodos biológicos, físicos o químicos. En la Tabla 2.12 se muestran los resultados de algunos tratamientos destinados a aumentar la eficacia de la fermentación de hidrolizados, Parajó *et al.* (1998c).

2.4.1 MÉTODOS BIOLÓGICOS

El tratamiento con las enzimas peroxidasa y lacasa, obtenidas a partir del hongo ligninolítico *Trametes versicolor*, aumenta de dos a tres veces la productividad máxima en etanol de un hidrolizado hemicelulósico de sauce, por eliminación prácticamente completa de compuestos fenólicos, Jönsson *et al.* (1998).

Otros compuestos inhibidores como ácido acético, furfural y derivados del ácido benzoico, presentes en un hidrolizado de sauce pretratado con *steam explosion*, se eliminan por tratamiento con el hongo *Trichoderma reesei*, Palmqvist *et al.* (1997), con un aumento en la productividad máxima en etanol y del rendimiento en etanol de tres y cuatro veces, respectivamente.

TABLA 2.12
PROCESOS DE ACONDICIONAMIENTO DE HIDROLIZADOS HEMICELULÓSICOS

Tecnología	Agente	Compuesto	Conc. (g/dm ³)		Referencia
			Antes	Después	
Int. iónico	AG-501-X8	D-xilosa	36,8	32,5	Tran y Chambers (1985)
		Ác. acético	12,1	8	
		Furfural	1,3	0,7	
Int. iónico (aniónico)	Amberlite IRA-45	D-xilosa	50	49,5	Van Zyl <i>et al.</i> (1991)
		Ác. acético	10	1,6	
Int. iónico (aniónico)	Dowex 50W	D-xilosa	50	47,5	Van Zyl <i>et al.</i> (1991)
		Ác. acético	10	6,3	
Int. iónico (aniónico) + catiónico)	Amberlite IRA-45 +Dowex	D-xilosa	50	49,3	Van Zyl <i>et al.</i> (1991)
		Ác. acético	10	2,7	
Adsorción (tamiz molecular)	S-115	D-xilosa	36,8	31,3	Tran y Chambers (1985)
		Ác. acético	12,1	6,1	
		Furfural	1,3	0,3	
Evaporación		D-xilosa	23,7	21,8	Wilson <i>et al.</i> (1989)
		Ác. acético	6,1	2,8	
		Furfural	0,28	0	
Extracción	Tricloroetileno	Ác. acético	11,0	8,0	Wilson <i>et al.</i> (1989)
		Furfural	1,2	0,9	
Extracción	Acetato etilo	D-xilosa	23,7	19,3	Wilson <i>et al.</i> (1989)
		Ác. acético	6,1	2,7	
		Furfural	0,28	0	
Adsorción	Carbón activo	D-xilosa	17	16,1	Parajó <i>et al.</i> (1996c)
		Ác. acético	4,5	4,4	
Neutr. + precipitación	CaCO ₃	D-xilosa	36,8	36,8	Tran y Chambers (1985)
		Ác. acético	12,1	11,9	
		Furfural	1,3	1,2	
Neutr. + precipitación	Ca(OH) ₂	Ác. acético	11,0	11,0	Frazer y McCaskey (1989)
		Furfural	1,2	1,2	
Precipitación + <i>overliming</i> + int. iónico	Ca(OH) ₂ , NaOH, Amberlite, Dowex	D-xilosa	40,5	33,6	Watson <i>et al.</i> (1984)
		Ác. acético	10,4	5,5	
		Furfural	3,6	nd	
Extracción y conc. a vacío	Éter	D-xilosa	11,0	10,1	Delgenes <i>et al.</i> (1990)
		Ác. acético	2,4	2,1	
		Furfural	0,01	0	

2.4.2 MÉTODOS FÍSICOS

Se ha utilizado la concentración del hidrolizado por evaporación a vacío en rotavapor, con lo que se produciría también una disminución de la concentración de los inhibidores volátiles. Ácido acético y furfural son ejemplos de inhibidores volátiles presentes en los hidrolizados. Sin embargo, la evaporación provoca un aumento en la concentración de los inhibidores no volátiles. Este es el caso de los productos de descomposición de la lignina. Por esta razón, es necesario realizar un tratamiento posterior de detoxificación. La detoxificación de los hidrolizados por adsorción sobre carbón es un procedimiento bastante efectivo para mejorar la fermentación, Tran y Chambers (1985). Leathers y Dien (2000) utilizan resinas para desionizar los hidrolizados de maíz, con lo que se mejoran los rendimientos de xilitol con *Pichia guilliermondii*.

2.4.3 MÉTODOS QUÍMICOS

El tratamiento de los hidrolizados con álcalis es uno de los métodos más ampliamente utilizados. Además de acondicionar el pH del hidrolizado, pueden retirarse por precipitación compuestos tóxicos, dependiendo del agente neutralizador y del ácido utilizado en la hidrólisis. Así, el empleo de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hasta pH 9-10 (*overliming*) y posterior reajuste con ácido sulfúrico hasta pH 5, mejora los rendimientos en etanol, Leathers y Dien (2000). El efecto detoxificante, superior al obtenido con NaOH se debe tanto a la precipitación de compuestos tóxicos como a la inestabilidad de compuestos inhibidores a pH elevados.

Ranatunga *et al.* (2000) estudian el efecto del acondicionamiento por *overliming* en hidrolizados de álamo, obtenidos con ácido sulfúrico (0,32 %) a 200 °C y 4,6 minutos de tiempo de residencia, posteriormente fermentados con *Zymomonas*. Como conclusiones, destacan que la utilización del hidróxido o carbonato de calcio mejora la fermentabilidad de los hidrolizados; además, la presencia de sulfatos provoca una escasa toxicidad.

Los efectos del tiempo, pH y temperatura en el proceso de *overliming* han sido estudiados por Millati *et al.* (2002) en hidrolizados obtenidos con ácido diluido, fermentados posteriormente con *S. cerevisiae*, encontrando que la detoxificación a pH 12 durante más de una hora era la forma más efectiva. El efecto más significativo de este procedimiento de acondicionamiento consiste en una reducción considerable de las concentraciones de furfural y de hidroximetilfurfural, mientras que la concentración de ácido acético permanece inalterada. Por otra parte, la disminución de la concentración de azúcares representa un serio problema, puesto que se produce la degradación de hasta el 70 % de los azúcares a pH 12 y temperatura elevada.

Para ajustar el pH se han utilizado una gran variedad de bases (NH_4OH , NaOH , CaO , CaCO_3 , Ca(OH)_2 , MgCO_3 y KOH), bien solas, bien en combinación entre ellas y con otros tratamientos, Silva *et al.* (1998). Domínguez *et al.* (1997) utilizan CaCO_3 para ajustar el pH, seguido la eliminación por centrifugación de los sólidos formados.

Otros métodos de acondicionamiento de naturaleza química implican la utilización de un agente reductor, como el ion sulfito. Este tratamiento, en combinación con el empleo de Ca(OH)_2 resultó ser el más apropiado para la detoxificación de hidrolizados hemicelulósicos de sauce como paso previo a la fermentación con una especie recombinante de *Escherichia coli*, Olsson *et al.* (1995). Para el caso de hidrolizados de bagazo de caña fermentados con *P. stipitis*, el mejor método consiste en ajustar el pH a 10 con KOH , reajustar a pH 6,5 con HCl y adición de 1 % de sulfito de sodio, Van Zyl *et al.* (1988).

Domínguez *et al.* (1996) realizan una comparación de la producción de xilitol a partir de hidrolizados de bagazo de caña a los que se somete a varios procesos de acondicionamiento: neutralización con carbonato cálcico; carbón activo más neutralización con óxido de calcio y posterior concentración en rotavapor; y finalmente tratamiento en resinas de intercambio iónico seguido por neutralización con óxido y carbonato de calcio. Como conclusión, el hidrolizado que sólo fue neutralizado proporciona los menores rendimientos en xilitol, mientras que los mejores resultados se obtienen en la fermentación del hidrolizado tratado con resinas.

Otro método consiste en la extracción con disolventes del hidrolizado. Wilson *et al.* (1989) encuentran un aumento en el rendimiento en etanol por extracción con acetato de etilo, debido a la eliminación de ácido acético en un 56 % y eliminación completa de furfural, vainillina y ácido 4-hidroxibenzoico.

2.5 Fermentación

2.5 FERMENTACIÓN

Se denomina fermentación a la transformación de un compuesto orgánico o inorgánico (sustrato) por la acción de enzimas, bien se encuentren éstas en las células (in vivo) o aisladas de las células que las produjeron, Camacho *et al.* (1986). Para el primer tipo de fermentación, los microorganismos requieren un medio de cultivo adecuado, en el cual crecen, se reproducen, consumen los sustratos del medio y producen, como consecuencia de su metabolismo, otros productos bioquímicos.

Cuando se cultivan microorganismos sobre azúcares en presencia de oxígeno, éstos obtienen material celular y energía por oxidación de dichos compuestos orgánicos. Los electrones en exceso procedentes de esta oxidación son cedidos a un sistema transportador hasta el oxígeno, aceptor final, y se forma agua. Ciertos microorganismos tienen la capacidad de crecer en ausencia de oxígeno. Durante este crecimiento anaerobio, los azúcares son oxidados y los electrones excedentes cedidos a un sistema transportador que tiene como aceptor final un compuesto orgánico, en lugar de oxígeno, y se forma etanol, xilitol u otros compuestos, en lugar de agua.

2.5.1 MICROORGANISMOS UTILIZADOS

En los procesos fermentativos se utilizan levaduras, bacterias u hongos. Según Hahn-Hägerdal *et al.* (1994a), las características que debe reunir un microorganismo para la producción de etanol por fermentación (que son extrapolables al caso de obtención de otros productos) mediante un proceso económicamente atractivo son las siguientes:

- utilización eficiente del sustrato
- elevada concentración final de etanol (lo que minimiza los costes de destilación o del proceso empleado para la separación del producto)
- elevada velocidad de producción de etanol
- Adicionalmente, es deseable que no se requieran etapas complejas de detoxificación ni la utilización de costosos compuestos químicos como nutrientes.

Las levaduras empleadas en fermentación han sido tradicionalmente de los géneros *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*, que fermentan una amplia gama de

hexosas, aunque no pentosas. Considerando que la D-xilosa es la principal pentosa presente en la fracción hemicelulósica, que supone entre un 15 y un 35 % de los residuos lignocelulósicos, el aprovechamiento integral de los mismos debe realizarse empleando microorganismos capaces de transformar también las pentosas.

En este sentido, el descubrimiento a principios de los 80, Schneider *et al.* (1981), Jeffries (1982), Slininger *et al.* (1982), de levaduras capaces de fermentar pentosas a etanol aumentó el interés por el aprovechamiento de los residuos agrícolas como fuente renovable de energía. Las levaduras *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus* han sido consideradas como las más prometedoras, Olsson *et al.* (1995). *P. tannophilus* fue la primera levadura identificada capaz de fermentar D-xilosa a etanol, Kavanagh y Whittaker (1994). También es capaz de transformar D-glucosa en etanol, Slininger *et al.* (1982), así como otros monosacáridos: D-manosa y D-galactosa e incluso celobiosa y L arabinosa, Neirinck *et al.* (1982). Igualmente, Schneider *et al.* (1981) y Jeffries (1982) comprobaron que esta transformación puede realizarse también en determinadas condiciones aerobias. Jeffries y Kurtzman (1994), basándose en una revisión bibliográfica, concluyen que la selección de microorganismos debe seguir siendo objeto de estudio para alcanzar un proceso económicamente eficiente.

Lee *et al.* (1986) han investigado la capacidad de fermentar xilanos, con vistas a la formación de etanol, con lo cual se eliminarían los problemas que originan algunos productos de degradación hidrolítica (en el caso de que se opte por una hidrólisis ácida) o el empleo de microorganismos muy diferentes de los que realizan la posterior fermentación de la D-xilosa (en el caso de hidrólisis enzimática). Como conclusión de este trabajo sólo 19 especies de un total de 250 capaces de crecer sobre D-xilosa dieron un resultado positivo.

Dentro del grupo de levaduras capaces de fermentar D-xilosa, Fein *et al.* (1984) han estudiado cuáles de ellas fermentan un hidrolizado hemicelulósico, encontrando que sólo 7 de un grupo de 37 especies producían etanol, siendo *Candida tropicalis* la levadura con mayor potencial para la producción etanólica.

La velocidad de formación de etanol por levaduras que fermentan D-xilosa es aproximadamente la mitad que cuando el sustrato es D-glucosa, Hahn-Hägerdal *et al.* (1994b). Teniendo en cuenta que el proceso de fermentación etanólica de D-glucosa, realizado con levaduras del género *Saccharomyces* fundamentalmente, es más eficiente que la fermentación de D-xilosa, algunos autores proponen la utilización de cultivos mixtos de levaduras, Abate *et al.* (1996). Así, Laplace *et al.* (1992), han estudiado la compatibilidad en la fermentación simultánea de D-glucosa y D-xilosa por distintas especies de *Saccharomyces* y de *Pichia stipitis* y han propuesto parejas de microorganismos para dicho proceso, aunque otros autores han descrito un fenómeno de represión en la utilización de D-xilosa cuando en el medio a fermentar está presente también D-glucosa, Panchal *et al.* (1988).

A la búsqueda de mejores rendimientos se une también el hecho de que ciertas levaduras aplicadas en la fermentación de D-xilosa no están aceptadas como seguras para la producción de compuestos destinados al consumo humano, como

el xilitol, mientras que otras, tradicionalmente utilizadas en la fermentación de D-glucosa, sí lo son, caso de *S. cerevisiae*, Hahn-Hägerdal *et al.* (1994a).

La existencia de levaduras capaces de fermentar D-glucosa a mayores velocidades y con mejores rendimientos que otras que fermentan D-xilosa ha motivado que algunas investigaciones se dirijan al desarrollo y utilización de levaduras modificadas genéticamente, en el sentido de incorporar las enzimas que permiten metabolizar D-xilosa. En general, la modificación genética consiste en incorporar a las levaduras fermentadoras de D-glucosa los genes responsables de la producción de enzimas (fundamentalmente xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa), necesarias para el metabolismo de la D-xilosa, Metzger y Hollenberg (1994). En este sentido, Ingram y Doran (1995) describen un microorganismo modificado genéticamente, *Escherichia coli*, que incluye los genes responsables de la ruta etanólica procedentes de *Zymomonas mobilis*, capaz de convertir tanto hexosas como pentosas.

Además de las levaduras, otros microorganismos presentan también la capacidad de fermentar azúcares, como bacterias y hongos. En general la utilización de bacterias en lugar de levaduras es menos ventajosa, ya que, con algunas excepciones como la fermentación de ácido láctico, se obtiene una amplia mezcla de productos metabólicos, a la vez que presentan una menor tolerancia al etanol. Adicionalmente, los cultivos de levaduras son menos susceptibles a contaminación por virus o bacterias, Jeffries y Jin (2000) .

En cuanto al empleo de hongos, a veces se utilizan en la producción de enzimas para la sacarificación del hidrolizado y posteriormente las levaduras en la fermentación del mismo, Deshpande *et al.* (1983), Zayed y Meyer (1996). Así, en la fermentación de hidrolizados hemicelulósicos de mazorcas de maíz, Hahn-Hägerdal *et al.* (1994a) han identificado una especie recombinante de *E. coli* como el mejor microorganismo capaz de fermentar D-xilosa. El hongo *Fusarium oxysporum* es capaz de fermentar hasta 20 fuentes de carbono, incluido xilitol, así como convertir D-xilosa en etanol, CO₂ y ácido acético, Suihko *et al.* (1991).

2.5.2 VÍAS METABÓLICAS

En general, la fermentación etanólica de D-glucosa discurre por la vía de la fructosa bisfosfato (FBP), también denominada ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). La degradación de D glucosa transcurre en las células fermentativas y en aquéllas que utilizan este monosacárido hasta CO₂, de forma común hasta el ácido pirúvico, Figura 2.9. La decarboxilación del ácido pirúvico a acetaldehído y la reducción de éste hasta etanol (fermentación etanólica) es, sin embargo, exclusiva de las levaduras y de algunos hongos actinomicetos, Figura 2.10. El ácido pirúvico se activa uniéndose a la tiaminapirófospato (TPP), se transforma en acetaldehído por acción de la enzima piruvato descarboxilasa con liberación de CO₂. Posteriormente, por acción de la alcohol deshidrogenasa se forma etanol como producto final energético.

Además de esta transformación, las levaduras pueden degradar el ácido pirúvico para obtener energía metabólicamente utilizable, CO_2 y H_2O a través del ciclo del ácido acético activado (acetil-CoA) y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC), Jagnow y Dawid (1991).

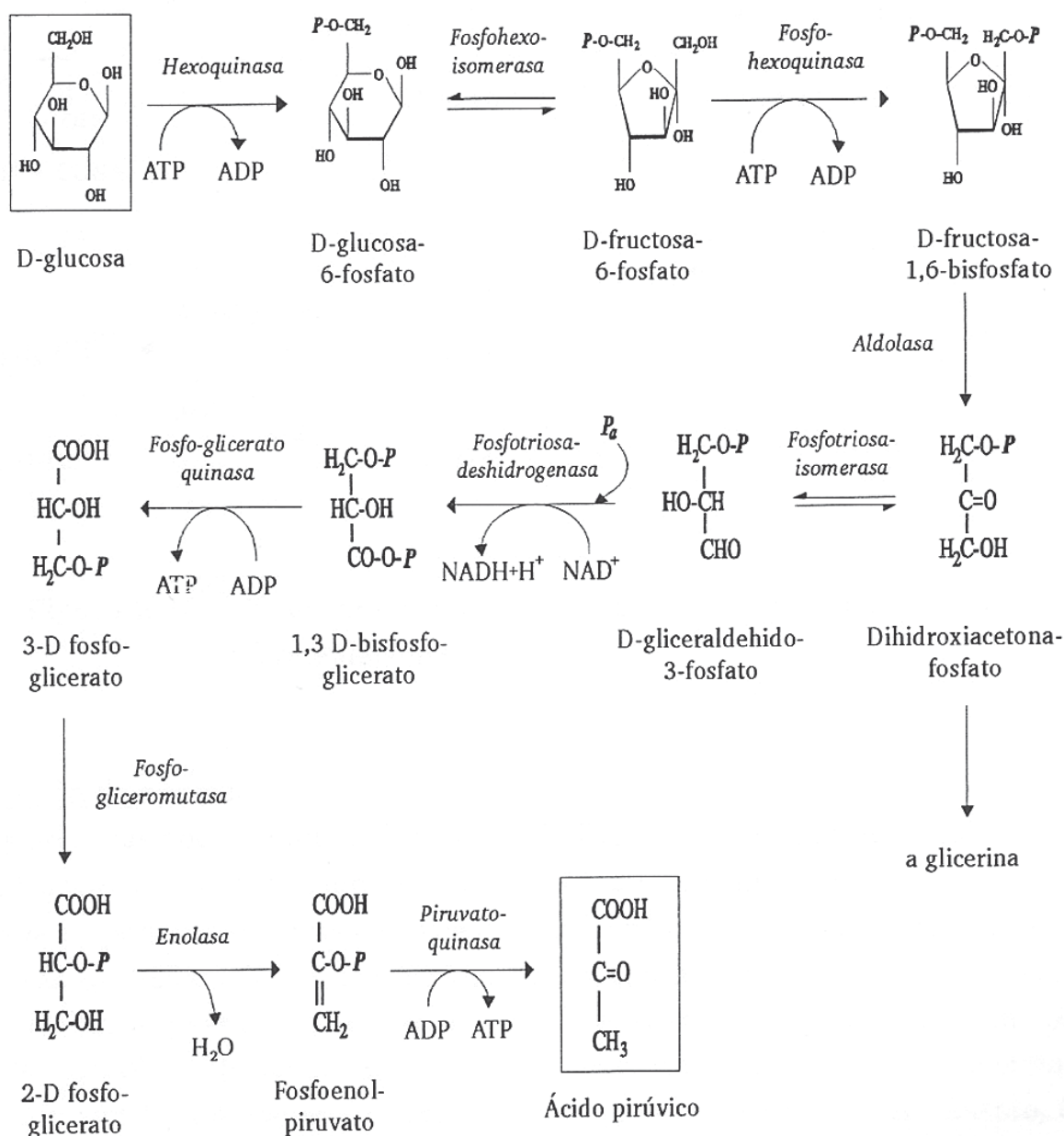


Figura 2.9 Vía de Embden-Meyerhorf-Parnas degradativa de D-glucosa a ácido pirúvico

La oxidación de los restos acetilo lleva consigo la realización del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Los enzimas que catalizan las reacciones del ciclo ATC se han encontrado en los extractos de una amplia gama de microorganismos, y parece haber pocas dudas de que el ciclo representa el principal sistema de respiración terminal en las levaduras.

Fermentación de pentosas

Entre las primeras aportaciones sobre el metabolismo de la fermentación de pentosas cabe destacar las realizadas por Chiang y Knight (1960), que encontraron que el hongo *Penicillium chisogenum* disponía de una secuencia de enzimas, en los primeros pasos del metabolismo de las pentosas, que difería de lo que sucedía en las bacterias, donde para el caso de la D-xilosa únicamente tenía lugar la isomerización de este azúcar. El hongo producía un compuesto intermedio, xilitol, y este hecho indujo a los autores a pensar que la D-xilosa se metabolizaba vía las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, Figura 2.11. Así mismo, Chiang y Knight encontraron que estas enzimas eran comunes a levaduras y hongos filamentosos.

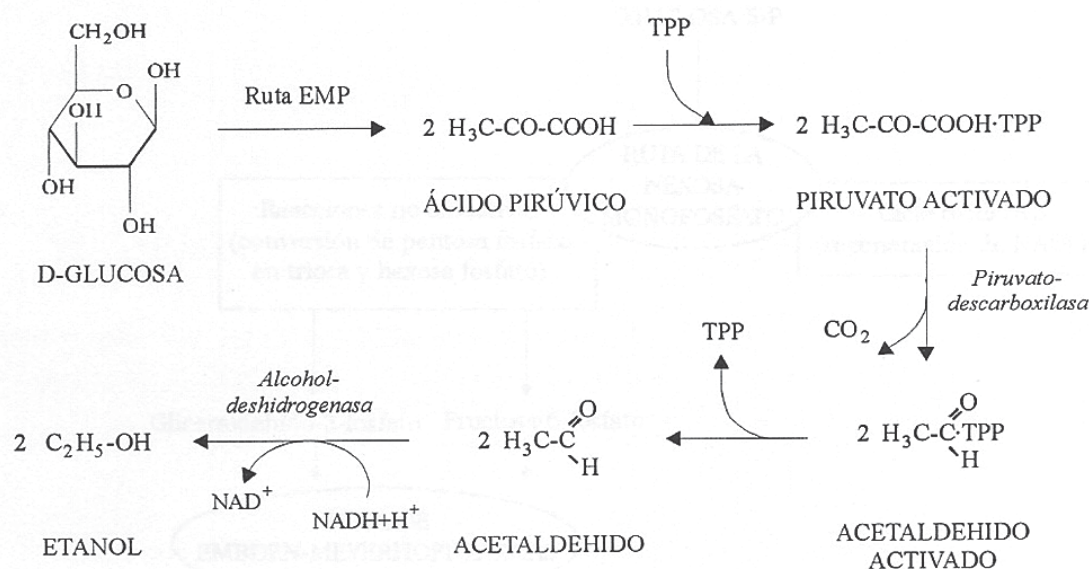


Figura 2.10 Transformación del ácido pirúvico a etanol durante la fermentación etanólica

Se acepta generalmente que las primeras etapas de la conversión de D-xilosa en etanol incluyen la reducción a xilitol y posterior oxidación de éste a xilulosa. La enzima xilulosa quinasa cataliza entonces la formación de xilulosa-5-fosfato, que sufre varias transformaciones hasta hexosa fosfato. Finalmente, la hexosa fosfato se transforma en etanol a través de la ruta glucolítica, Xu y Taylor (1993).

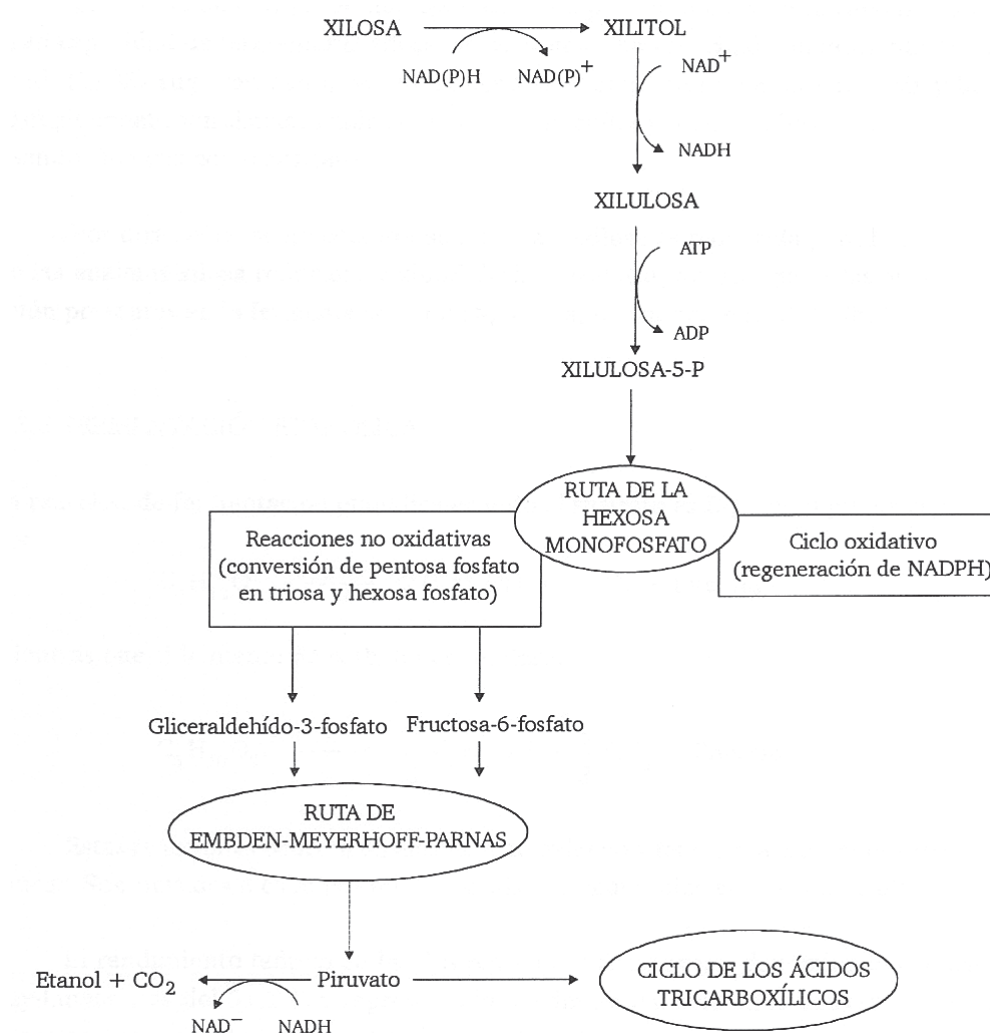


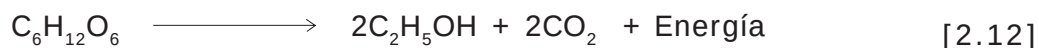
Figura 2.11 Esquema simplificado del metabolismo de D-xilosa en levaduras

En el caso de *Pachysolen tannophilus*, quizá por ser una levadura caracterizada por su gran capacidad de fermentar D-xilosa, estos estudios han suscitado un gran interés. Dellweg *et al.* (1982) sugieren que la vía de la pentosa fosfato, junto con la glucólisis y la vía del fosfogluconato son sistemas utilizados en *P. tannophilus* para la producción de etanol y xilitol usando D-xilosa como sustrato.

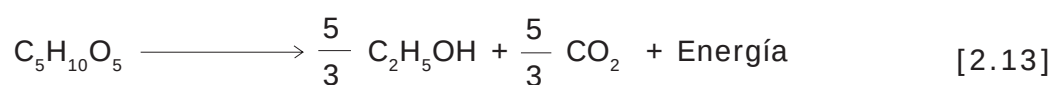
Por otra parte, se ha comprobado que la D-xilosa es requerida para la propia síntesis de las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, puesto que estas enzimas casi no están presentes en la fermentación con D-glucosa, Bruinenberg *et al.* (1983).

2.5.3 FERMENTACIÓN ETANÓLICA

La reacción de fermentación etanólica cuando el sustrato es D glucosa puede representarse por:



mientras que si la fuente de carbono es D-xilosa:



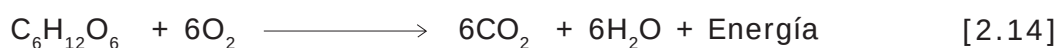
Estas reacciones ocurren en ausencia de oxígeno y también a altas concentraciones de azúcar. Son llevadas a cabo por microorganismos anaerobios estrictos o facultativos.

El rendimiento teórico en las dos reacciones anteriores, (denominado coeficiente de Gay Lussac), es del 51,1 % y representa la máxima eficiencia en la conversión. Este valor nunca se alcanza en la práctica, debido a que los microorganismos emplean al menos un 5 % de azúcar para producir material celular y productos minoritarios como xilitol, glicerol, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, 2,3 butanodiol y algunos alcoholes superiores, Amin *et al.* (1983). En la práctica industrial, cuando se utilizan sustratos no ideales, se mantienen conversiones próximas al 90 % del rendimiento teórico durante un razonable periodo de tiempo.

En el transcurso de la fermentación pueden producirse alteraciones que suelen ser debidas a la acción sobre los microorganismos de diversos factores, que pueden provocar la inhibición del proceso. Los principales tipos de inhibición son:

- a) Por sustrato: originada por efecto de la presión osmótica, que hace que las células sufran plasmólisis a concentraciones de azúcares superiores al 20 %.
- b) Por no disponibilidad adecuada de oxígeno: en ausencia de oxígeno, las células ven limitada su capacidad de crecimiento, ya que este elemento es indispensable en la producción de ácidos grasos poliinsaturados que desempeñan un importante papel en la síntesis celular.

Por otra parte, un aporte excesivo de oxígeno desvía la ruta metabólica hacia la respiración, con producción de dióxido de carbono y agua. Las reacciones en el caso de la oxidación completa de los sustratos, D-glucosa y D-xilosa respectivamente, son las siguientes, Woehrer y Roehr (1981):



- c) Por producto: se debe a que el etanol producido es tóxico para las levaduras, fundamentalmente a altas concentraciones, influyendo en la viabilidad y en las velocidades de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de producto.

Existen otras sustancias que ejercen influencia en la fermentación, como el dióxido de carbono que se desprende en el transcurso de la misma, aunque su mecanismo de actuación sobre los sistemas enzimáticos y la membrana celular no se conoce con precisión, Lidén *et al.* (1993), Kuriyama *et al.* (1993).

2.5.3.1 Fermentación etanólica en medio sintético

Los estudios sobre fermentación parten, en general, del conocimiento del comportamiento de los microorganismos utilizados sobre un medio sintético (sustratos puros) para, posteriormente, abordar el proceso a partir de sustratos naturales, tales como los residuos lignocelulósicos.

En la investigación de la fermentación sobre medio sintético se determina la influencia de las variables de operación, de la composición de los medios de cultivo y de los productos obtenidos. A continuación se realiza una revisión bibliográfica de estos aspectos, con especial atención en los resultados obtenidos con la levadura *P. tannophilus*.

Influencia de las variables de operación

Entre las variables de operación que más pueden influir en un proceso de fermentación discontinua con levaduras se encuentran la temperatura, el pH del medio de cultivo y el nivel de aeración.

La temperatura afecta a la naturaleza y mecanismos de regulación del metabolismo, a la permeabilidad celular y a las necesidades nutritivas y va a incidir de forma importante en las velocidades de las reacciones celulares. A diferencia de otros parámetros, como el pH, la temperatura de las células y del medio de cultivo coinciden.

La aeración en una fermentación aporta el oxígeno necesario para que la levadura realice su actividad metabólica. Al mismo tiempo, la aeración, junto con la agitación mecánica, mantiene una distribución uniforme de células en el biorreactor. En ausencia de agitación mecánica, la aeración podría desempeñar ambas funciones. Fundamentalmente, el oxígeno es requerido por la levadura para la biosíntesis de grasas poliinsaturadas. El contenido normal de oxígeno en el medio de cultivo debe ser equivalente a una presión de 0,05-0,10 mm de Hg, Kosaric *et al.* (1983). Presiones superiores pueden favorecer la formación de biomasa a costa de disminuir la productividad en etanol, fenómeno conocido como efecto Pasteur.

Para cualquier microorganismo existe un rango amplio de pH en el que la velocidad de crecimiento varía muy poco. Para las levaduras, este rango suele estar centrado en torno a pH 3-6, intervalo en el que se encontrará el pH óptimo, Quintero (1981).

Las condiciones de aeración son de gran importancia cuando se fermentan azúcares con *P. tannophilus*. La influencia de este parámetro sobre el crecimiento y la producción de etanol es objeto de estudio por algunos grupos de investigación, Schneider *et al.* (1981), Delgenes *et al.* (1986), Slininger *et al.* (1987). Se observa que un caudal elevado de aire (condiciones plenamente aerobias) desplaza el crecimiento hacia la formación de biomasa, en detrimento de la formación de etanol. Sin embargo, es necesario un nivel mínimo de aeración para una conversión eficiente de sustrato en etanol.

Bravo *et al.* (1995a), en fermentaciones de D-xilosa con *P. tannophilus* determinan, en cuanto al nivel de aeración, que no es preciso el aporte externo de oxígeno, obteniéndose los mejores resultados con el aire incorporado a través del vórtice de agitación. Ligthelm *et al.* (1988) investigan la fermentación etanólica de D-xilosa y D-glucosa con *P. stipitis*, *C. shehatae* y *P. tannophilus* (Tabla 2.13) encontrando que, si bien el oxígeno no es necesario, estimula la velocidad de formación de etanol con ambos azúcares. Bajo condiciones de limitación de oxígeno, el mayor rendimiento en etanol lo proporciona *P. stipitis*, mientras que con *C. shehatae* se logra la mayor productividad específica. Por su parte, la mayor cantidad de xilitol se obtiene en los cultivos de *P. tannophilus*. Como puede observarse en la tabla, la cantidad de etanol y xilitol formada en cultivos con limitación de oxígeno por *P. tannophilus* es casi equivalente; también son muy semejantes los rendimientos en etanol y xilitol que se obtienen en condiciones anaerobias y con limitación de oxígeno, mientras que para condiciones aerobias se produce más biomasa, a expensas de los productos. También se detecta una mayor represión de la respiración a partir de D-glucosa y se forma más etanol y menos biomasa bajo condiciones aerobias que cuando se utiliza D-xilosa; además, la ausencia de xilitol como coproducto contribuye a un rendimiento en etanol mayor.

TABLA 2.13
RENDIMIENTOS EN ETANOL ($Y_{E/s}$), XILITOL ($Y_{Xl/s}$) Y BIOMASA ($Y_{x/s}$)
EN LA FERMENTACIÓN DE AZÚCARES CON LEVADURAS

Levadura	Fuente de carbono (g/dm ³)	Condiciones de aeración	$Y_{E/s}$, g/g	$Y_{Xl/s}$, g/g	$Y_{x/s}$, g/g
<i>Pichia stipitis</i> CBS 7126	D-xilosa (40)	Aerobias	0,18	0	0,39
		Microaerobias	0,47	0,06	0,05
		Anaerobias	0,40	0	0,03
	D-glucosa (40)	Aerobias	0,26		0,23
		Microaerobias	0,38		0,14
		Anaerobias	0,33		0,10
<i>Candida shehatae</i> CBS 2779	D-xilosa (40)	Aerobias	0,22	0,04	0,33
		Microaerobias	0,37	0,13	0,01
		Anaerobias	0,41	0,18	0,01
	D-glucosa (40)	Aerobias	0,33		0,21
		Microaerobias	0,42		0,03
		Anaerobias	0,44		0,02
<i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y2460	D-xilosa (40)	Aerobias	0,10	0,17	0,25
		Microaerobias	0,28	0,30	0,01
		Anaerobias	0,26	0,30	0,01
	D-glucosa (40)	Aerobias	0,31		0,14
		Microaerobias	0,43		0,06
		Anaerobias	0,42		0,04

Para el caso de *P. tannophilus*, el rango de temperaturas que se ha utilizado por diversos grupos de investigadores varía entre 24 y 35 °C, siendo entre 28 y 30 °C los valores más frecuentes, Roebuck *et al.* (1995). En cuanto al pH y para la misma levadura, la disparidad es aún más acusada; Skoog y Hahn-Hägerdal (1988) encuentran que el pH óptimo varía ampliamente entre 2,5 y 5,5, mientras que Debus *et al.* (1983) lo sitúan entre 4,0 y 5,0.

En un trabajo anterior, Castro (1987), con *P. tannophilus* y D-glucosa como fuente de carbono, se determinaron las condiciones de temperatura, pH y caudal de aire más adecuadas de crecimiento del microorganismo para la producción de etanol. En cuanto a la temperatura como variable de operación, los mayores valores con respecto a las velocidades específicas máximas se encuentran entre 30 y 35°C para el crecimiento, en 25°C para el consumo de sustrato y en 30°C para la producción de etanol, mientras que los rendimientos en biomasa y en etanol son prácticamente constantes. La aeración exclusiva por el vórtice de agitación, sin aporte externo de oxígeno, proporciona el valor más elevado en cuanto a velocidad máxima de producción de etanol. Con respecto al pH inicial, se comprobó que los valores entre 1,5 y 3,5 son los más adecuados, atendiendo a la velocidad máxima de producción de etanol.

Para el caso de D-xilosa como fuente de carbono y el mismo microorganismo, Bravo *et al.* (1993) determinan un pH inicial óptimo de 4,5, valor para el que se alcanza un rendimiento global en etanol de 0,32 g/g D-xilosa.

Influencia de la composición del medio de cultivo

Los microorganismos empleados en un proceso de fermentación crecen en un medio de cultivo que contiene los elementos necesarios para el desarrollo de los mismos y que permite la transformación de los sustratos en productos. En el caso de fermentaciones sobre azúcares puros, los medios de cultivo consisten en una disolución acuosa en la que están presentes sales minerales, fuentes de nitrógeno y fuentes de carbono (el propio azúcar puro), además de otros componentes cuya naturaleza y composición es variable, dependiendo del microorganismo empleado y de las condiciones de operación. Cuando la fermentación se realiza sobre un hidrolizado, éste constituye el medio de cultivo, una vez sometido a las operaciones precisas de acondicionamiento, siendo necesario, en algunos casos, la suplementación del hidrolizado con algunos componentes.

Como fuente de carbono, los sustratos más utilizados en fermentaciones sobre medio sintético son D-xilosa y D-glucosa, por separado o en mezclas, en un rango de concentraciones de 0 a 300 g/dm³. La presencia simultánea de ambos azúcares provoca diferentes efectos en el proceso de fermentación; así, Lee (1992) describe la inhibición que D-glucosa ejerce sobre la fermentación de D-xilosa por *P. tannophilus*, al parecer debido a la inactivación de diversos sistemas enzimáticos. Sin embargo, Jeffries *et al.* (1985) constatan un incremento en el rendimiento en etanol desde 0,28 a 0,41 g/g D-xilosa cuando se realizan adiciones periódicas de D-glucosa a la fermentación aerobia de D-xilosa por *P. tannophilus*.

La presencia de D-fructosa en el medio de cultivo también origina un uso preferente de esta hexosa en detrimento de D-xilosa, que ha sido asociado a la capacidad de inhibición de las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, Bicho *et al.* (1989).

Delgenes *et al.* (1988) describen una reducción en los valores de la productividad volumétrica en etanol por encima de 150 g/dm³ de una mezcla al 75, 20 y 5 % de D-xilosa, D-glucosa y L-arabinosa, respectivamente. En condiciones óptimas, a partir de una mezcla de 110 g/dm³ de azúcares, se obtiene una productividad volumétrica en etanol de 0,2 g/(dm³ h), valor que aumenta hasta 1,1 g/(dm³ h) y un rendimiento en etanol de 0,42 g/g para una concentración de sustrato de 20 g/dm³, empleando *P. stipitis*.

Las fuentes de nitrógeno empleadas son muy distintas, siendo la más frecuente urea, Slininger *et al.* (1982) y sulfato amónico, Jeffries (1982). Las fuentes de carbono y nitrógeno van a influir de forma importante en la actividad de las enzimas de la vía de la pentosa fosfato y consecuentemente en los rendimientos en biomasa y en etanol obtenidos.

Una característica común en la formulación de medios de cultivo es la presencia de extracto de levadura. Este componente suministra las vitaminas necesarias (tiamina y biotina, fundamentalmente) para el crecimiento de las levaduras, Neirinck *et al.* (1982). Bravo *et al.* (1995b) detectan un aumento en el rendimiento global en etanol a medida que se incrementa la concentración de extracto de levadura en la fermentación de disoluciones de D-xilosa por *P. tannophilus*, obteniendo un valor de 0,34 g/g para 25 g/dm³ de D-xilosa y 4 g/dm³ de extracto de levadura.

La inclusión de biotina y tiamina como componentes de los medios de cultivo produce diferentes efectos, variando de un microorganismo a otro, du Preez (1994). Así, la fermentación de D-xilosa por *C. shehatae* es prácticamente despreciable en ausencia de estas vitaminas, du Preez *et al.* (1985); *P. tannophilus* también requiere ambas vitaminas; *P. stipitis* no tiene necesidad de ellas, pero su presencia en el medio de cultivo aumenta considerablemente el rendimiento y la productividad en etanol.

En algunos casos, con el objetivo de mejorar los resultados de la fermentación, se añaden algunos componentes a los medios de cultivo o a los hidrolizados. Dekker (1986) constata un aumento en la producción de etanol por *P. tannophilus* a partir de D-xilosa, cuando en el medio de cultivo se adicionan lípidos. Éstos se incorporan a las membranas celulares, ejerciendo un efecto de protección, de forma que las células son más resistentes a la inhibición causada por el etanol. Stanley *et al.* (1993) comprueban que bajas concentraciones de acetaldehído reducen la fase *lag* y aumentan la velocidad específica de crecimiento en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*.

Influencia de los productos de la fermentación

El etanol ejerce un efecto tóxico importante cuando en el medio se alcanzan determinadas concentraciones. Normalmente las fermentaciones industriales se

realizan a concentraciones relativamente bajas de carbohidratos, mientras que, para reducir los costes de destilación, es deseable obtener una alta concentración de etanol durante la fermentación, Bertolini *et al.* (1991), por lo que resulta de interés la investigación sobre levaduras con gran capacidad de tolerancia al etanol, a la vez que proporcionan altas concentraciones de este. Slininger *et al.* (1982) observaron que la velocidad específica de crecimiento disminuía de 0,31 a 0,08 h⁻¹ cuando la concentración en etanol aumentaba de 0 a 34 g/dm³, indicando que a partir de 20 g/dm³ de etanol se afectan las velocidades específicas de producción de etanol y de consumo de D-xilosa, Slininger *et al.* (1987).

La adición de etanol en concentraciones de 25 a 50 g/dm³ a cultivos de *C. shehatae* en condiciones fermentativas (limitación de oxígeno) inhiben completamente el crecimiento y la fermentación de D-xilosa, Kastner *et al.* (1992), frente a un rendimiento en etanol de 0,3 g/g en ausencia de etanol añadido.

Chamy *et al.* (1994) detectan una menor tolerancia de las células de *P. stipitis* al etanol cuando se encuentran inmovilizadas en un gel de carragenato, en comparación con las células libres; por otro lado, no se observan efectos de inhibición por sustrato para concentraciones de hasta 200 g de D-xilosa/dm³. Thatipamala *et al.* (1992), estudiando fermentaciones discontinuas con *S. cerevisiae*, detectan una disminución en el rendimiento instantáneo en biomasa de 0,156 a 0,026 g/g cuando la concentración de etanol varía de 0 a 107 g/dm³; se presenta inhibición por sustrato por encima de 150 g/dm³, produciéndose una disminución en el rendimiento en etanol de 0,45 a 0,30 g/g a medida que la concentración de sustrato aumenta desde 150 a 280 g/dm³, mientras que no se observa efecto de inhibición por producto en el rendimiento en etanol.

Una de las mayores contrapartidas frente a las ventajas indicadas en la fermentación etanólica con *P. tannophilus* es el hecho de que, paralelamente a la producción de etanol, se forma xilitol en concentraciones que pueden variar dependiendo de las condiciones de operación y de la composición del medio de cultivo.

Delgenes *et al.* (1991) estudian el crecimiento anaerobio de *P. stipitis* sobre D-xilosa, con concentraciones de etanol añadidas que varían desde 0 hasta 40 g/dm³, encontrando que el rendimiento en xilitol decrece linealmente a medida que aumenta la concentración inicial de etanol. La formación de etanol se ve afectada por diversas variables de operación; así, Kastner *et al.* (1996) describen un aumento del rendimiento en etanol (de 0,25 a 0,37 g/g) y una disminución del rendimiento en xilitol (de 0,33 a 0,1 g/g) cuando el pH de los cultivos de *C. shehatae* se incrementa desde 2,5 a 6,0.

2.5.3.2 Fermentación etanólica de hidrolizados de residuos lignocelulósicos

La principal característica de la fermentación de hidrolizados de residuos lignocelulósicos es que, junto a los azúcares obtenidos, se encuentran también diversos productos procedentes de la hidrólisis que pueden inhibir el crecimiento de

los microorganismos y por tanto el desarrollo de la fermentación (apartado 2.4). Tal como se indicó anteriormente, entre estos componentes destacan el furfural, el 2-hidroximetil-5-furaldehído, el ácido acético y diferentes compuestos fenólicos. A pesar de los tratamientos de acondicionamiento a que se someten los hidrolizados con el objetivo de reducir la influencia de tales compuestos inhibidores, el resultado general suele ser una disminución en los rendimientos y en las velocidades de la fermentación, en comparación con los de procesos sobre medio sintético.

En la Tabla 2.14 se muestran algunos resultados de la hidrólisis ácida y fermentación etanólica de diversos residuos lignocelulósicos. También Galbe y Zacchi (2002) han realizado una revisión bibliográfica de la producción de etanol a partir de maderas blandas.

Fanta *et al.* (1984) hidrolizan paja de trigo con ácido trifluoroacético 1 N, obteniendo un 80 % de rendimiento en D-xilosa. El hidrolizado, tras ser sometido a destilación a vacío para eliminar el ácido, se fermenta con *P. tannophilus* con resultados comparables a la fermentación de D-xilosa comercial, lo que indica que el proceso de hidrólisis no produce inhibidores en concentración suficiente como para afectar al crecimiento celular.

Zayed y Meyer (1996) describen un proceso para la producción de etanol a partir de paja de trigo empleando el hongo *Trichoderma viride* y la levadura *P. tannophilus*. El hongo produce la sacarificación del residuo (27 g de azúcares reductores a partir de 50 g de paja de trigo delignificada), mientras que la levadura fermenta los azúcares para obtener 11,8 g de etanol, equivalentes a un 16,9 % en peso del residuo original.

En la fermentación de hidrolizados de madera de roble con *P. stipitis*, Tran y Chambers (1986) determinan una concentración máxima de etanol de 9,9 g/dm³ a partir de un hidrolizado de 21,7 g de D-xilosa/dm³, que se somete a tratamientos con tamices moleculares y recirculación de levaduras para reducir el efecto de los inhibidores.

Ferrari *et al.* (1992) utilizan *P. stipitis* para la fermentación de un hidrolizado hemicelulósico de eucalipto, encontrando una concentración máxima de etanol de 12,6 g/dm³, un consumo de azúcares del 99 %, un rendimiento en etanol de 0,35 g/g y una productividad volumétrica en etanol de 4 g/(dm³ día), a partir de un hidrolizado con 30 g/dm³ de D-xilosa, cantidades menores de otros azúcares y 10 g/dm³ de ácido acético, 1,5 g/dm³ de ácido glucurónico y 1 g/dm³ de ácido galacturónico.

TABLA 2.14
 HIDRÓLISIS ÁCIDA DE DISTINTOS SUSTRATOS Y FERMENTACIÓN ETANÓLICA

SUSTRATO	ÁCIDO	CONDICIONES	AZÚCAR, g/dm ³		MICROORGANISMO	ETANOL		REFERENCIA
			D-glucosa	D-xilosa		Máx, g/dm ³	Y _{e/s} , g/g	
Madera álamo	SO ₂	Ca(OH) ₂ /H ₂ SO ₄ centrifugación	43		<i>E. coli</i> recomb.	17,0	0,40	Lawford y Rousseau (1991)
		<i>Steam explosion</i>	22,3		<i>Zymomonas mobilis</i>	11,0	0,50	Park <i>et al.</i> (1993)
Madera roble	H ₂ SO ₄	Tamiz molecular	21,7		<i>Pichia stipitis</i>	8,0	0,40	Tran y Chambers (1986)
Residuo maíz	H ₂ SO ₄	Ca(OH) ₂ y adaptación	6,2	32,6	<i>Pichia stipitis</i>	13,3	0,31	Hahn-Hägerdal <i>et al.</i> (1994a)
Paja de trigo	TFA		45		<i>P. tannophilus</i>	13,5	0,30	Fanta <i>et al.</i> (1984)
	H ₂ SO ₄		2	9	<i>F. oxysporum</i>	3,2	0,29	Kumar <i>et al.</i> (1991)
	H ₂ SO ₄	Ca(OH) ₂	49		<i>Pichia stipitis</i>		0,31	Van Zyl <i>et al.</i> (1988)
	H ₂ SO ₄	Ca(OH) ₂ /adap.	6,4	45	<i>Pichia stipitis</i>	12,9	0,36	Nigam (2001)
	H ₂ SO ₄	CaO/NaOH/centr. Extracción eter etílico	1,2	10,1	<i>Pichia stipitis</i>		0,27	Delgenes <i>et al.</i> (1990)
Papel periódico	SO ₂		45,7		<i>E. coli</i> recomb.	14,6	0,38	Lawford y Rousseau (1993)
Mezclas de maderas duras y blandas	n.e.	NaOH hasta pH 5,5	45		<i>Candida shehatae</i>	21,2	0,51	Sreenath y Jeffries (2000)
Eucalipto		Resina iónica	1,5	30	<i>Pichia stipitis</i>	12,6	0,36	Ferrari <i>et al.</i> (1992)

2.5.3.3 Tipos de procesos en fermentación etanólica

La fase clave en todo proceso de fermentación es el diseño del biorreactor en el que se producirá la transformación de los sustratos (azúcares) en productos (principalmente etanol). La forma tradicional de operación de los equipos de fermentación es la discontinua, utilizando células libres. Este tipo de equipos presenta una serie de problemas, entre los que se pueden citar los siguientes, Lema y Núñez (1994):

- la pérdida de eficacia que suponen los periodos de puesta en marcha y parada
- la mayor repercusión de los costes fijos del equipo, debido a la baja productividad alcanzada
- la no homogeneidad del producto obtenido en operaciones en cargas consecutivas
- la separación del producto del medio de reacción se produce una vez finalizada la fermentación, dificultando esquemas de integración energética
- los largos periodos de tiempo requeridos para completar la fermentación

La menor productividad de las fermentaciones en discontinuo (del orden de 1 a 2,5 g/(dm³ h) se debe, en parte, a que se opera con una baja densidad celular, especialmente en los periodos iniciales, y a la imposibilidad de alimentar elevadas concentraciones de sustrato para evitar la ralentización del proceso por fenómenos de inhibición de sustrato o de producto. Además, en las operaciones discontinuas la fermentación tarda en completarse, ya que en el periodo final la concentración de producto es máxima y mínima la de sustrato, por lo que la velocidad del proceso disminuye notablemente.

Como objetivos comunes a los procesos de fermentación etanólica se pueden destacar:

- a) elevado rendimiento en etanol, tratando de convertir la casi totalidad de los azúcares a partir de materiales de bajo coste, ya que las materias primas constituyen uno de los mayores porcentajes del coste final del etanol
- b) recuperación del etanol mediante procesos energéticamente competitivos, mediante técnicas como destilación u otras alternativas, debido al alto coste de ésta, tales como ultrafiltración, ósmosis inversa, adsorción o extracción y fermentación a vacío
- c) operar a altas concentraciones iniciales de sustrato que proporcionen elevadas concentraciones de etanol, ya que los costes disminuyen a medida que se alcanza un producto final con mayor contenido en alcohol

- d) alcanzar una alta productividad, lo que incidiría en un menor coste del fermentador. Los dos principales factores que limitan el valor de este parámetro son la pérdida de eficacia debida a la inhibición por producto y la dificultad de retener altas concentraciones de microorganismos en el reactor, existiendo algunas soluciones técnicamente posibles para resolver la baja productividad, Tabla 2.15, Lema y Núñez (1994).

TABLA 2.15
SOLUCIONES PARA AUMENTAR LA PRODUCTIVIDAD EN ETANOL

Limitación de la inhibición	Aumento de la concentración celular
Aproximación a reactor flujo de pistón	Reciclado de células
- Fermentador en lecho fijo	- Decantación/centrifugación
- Cascadas de RCTA	- Floculación en torre
- Lecho agitado por fluidos	- Membranas
Eliminación de etanol	Inmovilización
- Fermentación a vacío y <i>flash</i>	- Atrapamiento
- Fermentación extractiva	- Adsorción
- Fermentación con membrana	- Membrana

Estos problemas se reducen parcialmente utilizando una operación continua. Además los equipos en continuo son más fáciles de controlar, con lo que se garantiza una calidad de producto más homogénea y se reducen los costes de mano de obra. Por otra parte, la separación del producto puede integrarse en el proceso global, con una disminución significativa de costes energéticos.

En la Tabla 2.16, Lema y Núñez (1994), se recogen algunos resultados de la eficacia de la fermentación etanólica lograda utilizando *S. cerevisiae* mediante diversos sistemas de operación en continuo.

Maioresella *et al.* (1984) realizan una evaluación económica de once procesos distintos de producción de etanol a partir de melazas y de hidrolizados celulósicos, incluyendo procesos en discontinuo, continuos, con recirculación o inmovilización celular y distintos sistemas de recuperación de etanol. Las características más importantes se resumen en la Tabla 2.17.

TABLA 2.16
PRODUCCIÓN DE ETANOL CON *S. Cerevisiae* EN DIVERSOS SISTEMAS

Sistema	s_o g/dm ³	Conv. %	D h ⁻¹	x g/dm ³	E g/dm ³	Q_E g/(dm ³ h)
Recirculación de células						
- RCTA	100	-	0,17	12	-	7
- RCTA+recirc.	140	99	1,33	166	65	84
- RCTA membrana	100	99	2,0	100	50	100
- Torre	112,5	99	0,43	105	51,4	26,5
Células inmovilizadas (alginato)						
- Lecho fijo	196	94	0,4		93,5	36,5
- Flujo cruzado	103	95	-		48,0	37,1
- Tambor rotatorio	125	96	0,2		59,5	11,9
Eliminación continua de etanol						
- Vacío	334	99				40
- Disolvente (dodecanol)	409	99				1,0
- Borboteo de gas	300	-				4,6
- Disolvente (tri-n-but-fosfato)	506	99				48

TABLA 2.17
COMPARACIÓN DE SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Sistema	s_o % peso	E g/dm ³	Q_E g/(dm ³ h)	Coste de producto excluida separación, cent. \$/dm ³
RDTA	16,7	inicial	8,6	53,05
		final	85,6	
RCTA	15,6		79,1	51,29
RCTA+recirc.	16,7		85,6	49,06
RC Tubular	16,7	entrada	17,1	49,11
		salida	85,6	
Separación por membrana	12,9		50,0	47,26
Extracción	38,4		80,0	43,94
Destilación <i>flash</i>	38,7		50,0	44,46

2.5.3.4 Producción y aplicaciones del etanol

La producción mundial de etanol ha sido estimada en 33300 millones de litros en 1998, de los que aproximadamente un 9 % se produce sintéticamente por reacción de etileno con vapor de agua; el 91 % restante se obtiene mediante fermentación, Taherzadeh (1999). Brasil es el principal país productor de etanol (unos 16000 millones de litros en 1998), donde se utiliza anhidro como aditivo de la gasolina en una composición del 22 %. En Estados Unidos, la capacidad de producción de etanol en 1994 se estimó en 6500 millones de litros, el 88 % de los cuales se obtienen por vía fermentativa.

Las principales aplicaciones del etanol se encuentran en la industria alimentaria (11 % del consumo), usos industriales (21 %) y como combustible (68 %). En Estados Unidos, el consumo de etanol como aditivo, hasta un 10 % en volumen de la gasolina, alcanza anualmente unos 4500 millones de litros, Sun y Cheng (2002), lo que representa cerca del 80 % del etanol producido.

El interés del empleo del etanol como combustible para vehículos se debe a varios factores. En primer lugar, se trata de un combustible que funciona bien en los motores, tanto puro como en mezclas con gasolina. En segundo lugar, la disminución de emisiones de CO₂ prevista en el Protocolo de Kyoto sobre cambio climático, hacen que la utilización del etanol como combustible ayude a cumplir los compromisos adquiridos por los países desarrollados; en este sentido, se ha estimado que las emisiones de un vehículo propulsado por etanol pueden representar el 7 % de las correspondientes a un vehículo utilizando gasolina tradicional. Finalmente, el previsible aumento de la demanda energética mundial en los próximos años sobrepasa, según las estimaciones, la capacidad de producción global de combustibles tradicionales, fundamentalmente petróleo.

2.5.4 FERMENTACIÓN CON PRODUCCIÓN DE XILITOL

El xilitol es un polialcohol (CH₂OH-CHOH-CHOH-CHOH-CH₂OH) que se encuentra naturalmente en frutas y verduras. También aparece como intermedio en el metabolismo de los carbohidratos en mamíferos. Una de las principales aplicaciones del xilitol se basa en sus usos potenciales como edulcorante en la industria alimentaria. Se disuelve rápidamente en agua, tiene un poder edulcorante similar al de la sacarosa y proporciona una agradable sensación fresca debido a su calor de disolución negativo, Winkelhausen y Kuzmanova (1998). Sin embargo, la característica más importante del xilitol es el hecho de no ser utilizado por las bacterias cariogénicas bucales, por lo que su empleo, incluso en pequeñas dosis, reduce significativamente la aparición de caries dentales, Rolla *et al.* (1987).

A pesar de su amplio campo de aplicaciones, el uso del xilitol como edulcorante es limitado, debido a sus comparativos altos costes de producción (unas diez veces

superiores a los de la sacarosa o el sorbitol), Parajó *et al.* (1998b). Este hecho ha suscitado un creciente interés en la investigación de tecnologías que permitan la reducción de costes, dentro de las cuales los procesos fermentativos, partiendo de disoluciones de D-xilosa, ofrecen importantes expectativas.

Aunque el xilitol está presente de forma natural en frutas y verduras, su extracción directa resulta en general inviable económicamente, debido al alto coste y al relativamente pequeño contenido en xilitol. A gran escala, se produce por hidrogenación química de D-xilosa, obtenida principalmente a partir de hidrolizados de sustratos lignocelulósicos. El proceso convencional de producción de xilitol incluye cuatro etapas principales: hidrólisis ácida del sustrato, purificación del hidrolizado para obtener una disolución de D-xilosa pura o D-xilosa cristalina, hidrogenación y cristalización del xilitol. La etapa crítica es la purificación de la D-xilosa. Debido a que la obtención mediante fermentación con microorganismos no precisa elevada pureza, es un procedimiento alternativo muy atractivo. En la Figura 2.12 se resumen las distintas tecnologías para la producción de xilitol, Parajó *et al.* (1998b).

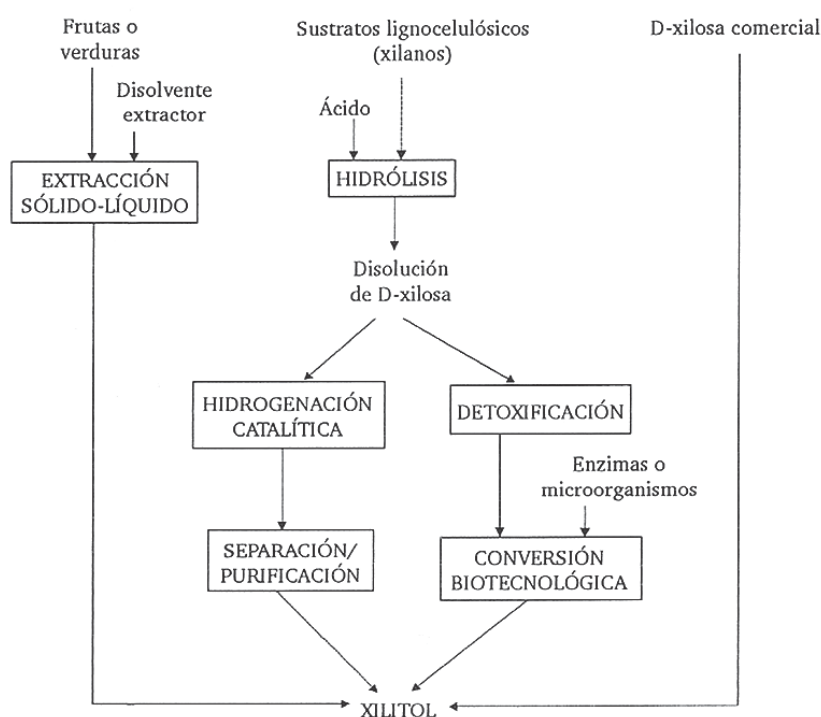


Figura 2.12 Tecnología para la producción de xilitol

2.5.4.1 Producción de xilitol por levaduras

Stankovic y Kovacovska (1991) realizan un estudio con el objeto de identificar levaduras capaces de producir alditoles (alcoholes con mayor número de átomos de carbono) a partir de D-xilosa; a partir de 193 especies de levaduras, divididas en grupos dependiendo de los alditoles producidos, el mayor grupo está constituido por levaduras que producen alcoholes de cinco átomos de carbono. Varias cepas de levaduras son capaces de transformar D-xilosa en xilulosa a través de una ruta

óxido-reductiva consistente en dos reacciones secuenciales. En la primera reacción, la enzima xilosa reductasa, en presencia de NADH o NADPH, transforma D-xilosa en xilitol. El xilitol, a través de la segunda reacción, se transforma en xilulosa con el concurso de la enzima xilitol deshidrogenasa unida a NAD⁺ o a NADP⁺ (Figura 2.11).

Existe una estrecha relación entre la reducción de D-xilosa a xilitol, el cofactor unido a la enzima xilosa reductasa y los productos del metabolismo de D-xilosa. Así, en condiciones anaerobias o de limitación de oxígeno, las levaduras con xilosa reductasa unidas a NADH o NADPH, como *Pichia stipitis*, pueden regenerar el NAD⁺ consumido en la segunda etapa del metabolismo. En este caso, el principal producto de reacción es el etanol y no se produce acumulación de xilitol. Por el contrario, las levaduras que utilizan D-xilosa mediante la xilosa reductasa unida a NADPH (sin la presencia de xilosa reductasa unida a NADH) en la primera etapa metabólica, acumulan xilitol; este es el caso, por ejemplo, de *Debaromyces hansenii*.

Los valores altos de actividad de xilosa reductasa o bajos de xilitol deshidrogenasa se han utilizado como criterios para seleccionar microorganismos productores de xilitol. Comparando diez especies de levaduras, *Candida tropicalis* es la mejor productora de xilitol sin aparición de etanol como coproducto; otras especies aptas son *Candida guilliermondii*, *Debaromyces hansenii* y *Candida parapsilosis*, Parajó *et al.* (1998a, 1998b). *C. shehatae* y *P. tannophilus* producen xilitol y etanol.

En condiciones anaerobias estrictas, la D-xilosa se fermenta a xilitol, etanol y CO₂. El balance de materia proporciona la siguiente ecuación, Thonart *et al.* (1987):



2.5.4.2 Producción de xilitol a partir de azúcares puros

En la Tabla 2.18 se muestran algunos valores obtenidos para los parámetros de producción de xilitol a partir de D-xilosa pura o de mezclas de azúcares comerciales, Parajó *et al.* (1998c).

TABLA 2.18
PRODUCCIÓN DE XILITOL POR MICROORGANISMOS A PARTIR DE AZÚCARES PUROS

Microorganismo	S_0 g/dm ³	Q_s g/(dm ³ h)	% s consumido	X_i (máx.) g/dm ³	Q_{x_i} g/(dm ³ h)	$Y_{x/s}$ g/g	Referencia
<i>P. tannophilus</i> ATCC 32691	50	0,43	100	3-0	0,03-0,26	0,16-0,61	Furlan <i>et al.</i> (1994)
<i>P. tannophilus</i> IfGB 0101	25-27	0,66-0,75	100	22,9-35,5	0,46-0,56	0,61-0,85	Debus <i>et al.</i> (1983)
<i>C. shehatae</i> ATCC 22984	75	0,63	100	4,8	0,04	0,64	Palnitkar y Lachke (1992)
<i>C. shehatae</i> ATCC 22984	50	0,05-0,4	14-96	8,5-1,4	0,01-0,07	0,18-0,21	Hinfray <i>et al.</i> (1995)
<i>C. guilliermondii</i> NRC 5578	300	0,74	100	221	0,54	0,75	Meyrial <i>et al.</i> (1991)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	19-21	0,28-0,34	100	4-9	0,07-0,16	0,20-0,47	Lee <i>et al.</i> (1996)
<i>C. tropicalis</i> DSM 7524	155-300	0,34-0,50	91,5-100	95-220	0,28-1,35	0,50-0,74	Da Silva y Afschar (1994)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22874	10	0,28	44,2	1,37	0,087	0,31	Furlan <i>et al.</i> (1991)
<i>Candida</i> sp. B-22	250	1,49	100	210	1,25	0,84	Chen y Gong (1985)
<i>D. hansenii</i> NRRL Y-7426	27	5,81	100	221	4,60	0,79	Domínguez <i>et al.</i> (1997)

La bioconversión de pentosas en polialcoholes es un proceso complejo en el que influyen numerosos factores, como la cepa utilizada, la historia de las células, las condiciones de cultivo y el medio de fermentación (sintético u obtenido a partir de un hidrolizado, en cuyo caso el proceso puede verse afectado por la presencia de otros azúcares y de compuestos inhibidores). La influencia de los principales factores que afectan al proceso se describe seguidamente:

Edad del inóculo

Afecta a la actividad metabólica y a la viabilidad de las células.

Concentración inicial de células

Se ha detectado un aumento de la productividad y del rendimiento en xilitol a medida que se incrementa la concentración celular inicial.

Influencia del pH

Los rangos de pH óptimos descritos en la literatura varían, dependiendo del microorganismo, entre 4 y 6. Cuando no se controla, se suele producir un decrecimiento en los valores del pH a lo largo de la fermentación.

Efecto de la temperatura

Las levaduras producen xilitol entre 24 y 45 °C, si bien el rango óptimo se encuentra entre 28 y 30 °C. Un incremento de temperatura de 30 a 37 °C provoca la reducción de la producción de xilitol por *P. tannophilus*, Barbosa *et al.* (1990), que se ha relacionado con la acumulación de acetaldehído, un potencial inhibidor de las funciones celulares.

Influencia de la composición del medio de cultivo

La naturaleza y concentración de las fuentes de nitrógeno son factores importantes en la producción de xilitol por fermentación y su efecto depende de la especie de levadura. En general, las fuentes nitrogenadas orgánicas conducen a unos valores superiores de productividad y rendimiento en xilitol. Para algunas levaduras, el extracto de levadura es un nutriente importante en la producción de xilitol, si bien en otras este componente habitual de los medios de cultivo no ejerce un efecto significativo en la formación de xilitol, Winkelhausen y Kuzmanova (1998). Sin embargo, Lu *et al.* (1995) obtienen la máxima producción de xilitol empleando urea como fuente de nitrógeno, a partir de una disolución de 114 g/dm³ de D-xilosa con *Candida sp.* L-102, lo que representa un rendimiento del 87,7 %. Por otra parte, la adición de biotina mejora la producción de xilitol por *P. tannophilus*, mientras que otros nutrientes como Mg²⁺ dirigen la fermentación de D-xilosa hacia xilitol en *P. stipitis*.

Azuma *et al.* (2000), en un estudio con *C. tropicalis*, encuentran que la adición de diferentes sales como NaCl, KCl y $MgCl_2$, aumentan la producción de xilitol, incluso en presencia de D-glucosa; este hecho parece estar relacionado con el aumento de la producción de la enzima xilosa reductasa dependiente de NADPH.

Efecto de la concentración inicial de sustrato

La velocidad de producción y el rendimiento en xilitol aumentan a medida que se incrementa la concentración inicial de D-xilosa en el rango 50 a 200 g/dm³, Ikeuchi *et al.* (1999). El crecimiento celular resulta inhibido a altas concentraciones de sustrato, del orden de 150 a 200 g D-xilosa/dm³, dependiendo del microorganismo. Por contra, bajas concentraciones de sustrato producen disminuciones de los rendimientos, ya que parte de la fuente de carbono se invierte en el crecimiento celular, sin producción de xilitol, Roberto *et al.* (1994).

Meyrial *et al.* (1991) estudian la fermentación de D-xilosa a xilitol con *C. guilliermondii*. El aumento en la concentración inicial de azúcar de 10 a 300 g/dm³ provoca la activación de la producción de xilitol, cuyo rendimiento aumenta gradualmente con el incremento de la concentración inicial de sustrato, alcanzándose un 82,6 % del rendimiento teórico. Sin embargo, se detecta una inhibición en cuanto al crecimiento de la biomasa a medida que se aumenta la concentración inicial de sustrato.

Efecto del oxígeno disuelto

Está estrechamente ligado a la concentración inicial de sustrato. Además, el comportamiento depende de que las levaduras estén inmovilizadas o libres; así, una velocidad de transferencia de oxígeno correspondiente a microaeración con células libres puede corresponder a condiciones anaerobias con células inmovilizadas, debido a problemas difusionales.

Kim *et al.* (1997) realizan cultivos de *C. parapsilosis* para la producción de xilitol, encontrando que la concentración celular y la actividad de la enzima xilitol deshidrogenasa aumentan a medida que lo hace la concentración de oxígeno disuelto; a valores altos de actividad de esta enzima, el xilitol se convierte en xilulosa, que se metaboliza para dar material celular.

Por tanto, la concentración de oxígeno disuelto es un parámetro que debe ser cuidadosamente controlado; así, para valores en el rango 0,8 a 1,2 % de concentración de oxígeno disuelto, se alcanza una concentración final de xilitol de 210 g/dm³ a partir de 300 g/dm³ de D-xilosa, lo que corresponde a un rendimiento en xilitol del 70 %.

Según Horitsu *et al.* (1992), para la producción efectiva de xilitol el primer objetivo a conseguir es la acumulación rápida de células en el medio de cultivo, lo que puede lograrse manteniendo altos niveles de oxígeno disuelto, aunque sólo en la primera fase de los cultivos, puesto que de lo contrario se obtendría la formación de xilulosa por deshidratación del xilitol.

En el caso de *P. tannophilus*, la enzima responsable de la reducción de D-xilosa a xilitol, xilosa reductasa, puede actuar con NADH o NADPH como cofactores y el metabolismo puede orientarse hacia la formación de etanol o de xilitol en función de las condiciones de operación y del acondicionamiento del hidrolizado. En concreto, dependiendo de las disponibilidades de oxígeno, son posibles tres rutas metabólicas:

- Condiciones aerobias: el crecimiento celular se ve favorecido, mientras que decrecen tanto la producción de etanol como de xilitol, que requieren un ambiente reductor.
- Condiciones anaerobias: pueden conseguirse mediante la sustitución del oxígeno por nitrógeno. La formación de xilitol se ve favorecida; en realidad, el NAD⁺ (o NADP⁺) formado por la acción de la xilosa reductasa se reduce a NADH (o NADPH), con lo que no está disponible para las sucesivas reacciones catalizadas por la xilitol deshidrogenasa, que son necesarias para el crecimiento según la vía de la pentosa fosfato. Por este motivo, es posible acelerar la formación de xilitol utilizando elevados niveles iniciales de biomasa, Horitsu *et al.* (1992).
- Condiciones de microaeración: parecen ser las más adecuadas para la formación de xilitol, especialmente a bajas concentraciones de células, ya que el escaso oxígeno disponible se consume completamente en el crecimiento, aumentando así la productividad, Converti *et al.* (1999). Una conclusión similar proponen Aranda-Barradas *et al.* (2000), según los cuales *C. parapsilosis* produce xilitol sólo en condiciones de limitación de oxígeno.

Efecto de la presencia de D-glucosa u otros compuestos

Se han observado efectos contrapuestos cuando se utiliza D-glucosa como cosustrato en la fermentación de D-xilosa hacia xilitol, encontrándose que pequeñas adiciones mejoran el proceso global, pero concentraciones superiores disminuyen la productividad en xilitol, debido a la formación de otros productos como glicerol y ribitol.

Walther *et al.* (2001), en fermentaciones con *C. tropicalis* detectan una disminución en la utilización de D-xilosa en presencia de D-glucosa, así como un consumo secuencial de ambos azúcares; cuando se emplea un medio de fermentación complejo, se observa que se consume en primer lugar D-glucosa, seguido por el consumo simultáneo de D-xilosa, D-manosa y D-galactosa, mientras que la D-arabinosa no es utilizada por este microorganismo.

El consumo secuencial de los azúcares, D-glucosa y D-xilosa, presenta ventajas, según Preziosi-Belloy *et al.* (1997), puesto que la acumulación de etanol es menor; además, cuando se consume toda la D-glucosa, la D-xilosa está disponible para la producción de xilitol (una pequeña parte se invierte en el crecimiento y mantenimiento celular que, en gran medida, ya se ha conseguido a través del

consumo de D-glucosa). Estos autores proponen una estrategia de fermentación en dos etapas, en la primera se debe operar sin limitación de oxígeno para favorecer la acumulación de biomasa y la asimilación de D-glucosa, y, en la segunda, bajo condiciones limitadas de oxígeno, se conseguiría la producción óptima de xilitol.

En un estudio con *S. cerevisiae* que porta el gen XYL1 de *P. stipitis* y que permite la utilización por el primer microorganismo de D-xilosa, Hallborn *et al.* (1994) encuentran que en condiciones de aeración, el consumo de D-xilosa no empieza hasta que se ha consumido la D-glucosa; al bajar la aeración, la D-xilosa empieza a consumirse quedando aún D-glucosa; la conversión de D-xilosa a xilitol continúa mientras hay D-glucosa, etanol o ácido acético en el medio. A medida que se reduce la aeración, los cosustratos se consumen más lentamente, se produce más xilitol y menos biomasa. Con el mismo microorganismo modificado, Meinander y Hahn-Hägerdal (1997) no detectan consumo de D-xilosa a altas concentraciones de D-glucosa, ya que ambos azúcares utilizan el sistema de transporte de D-glucosa, por la que existe mayor afinidad.

Lee *et al.* (2000) también utilizan una cepa de *S. cerevisiae* modificada con un gen de *P. stipitis* y estudian la formación de xilitol a partir de D-xilosa en presencia de D-glucosa; como conclusión, la adición de D-glucosa provoca inhibición en el metabolismo de D-xilosa y la acumulación de etanol. Estos problemas se solucionan manteniendo una elevada proporción D-xilosa/D-glucosa en el medio de cultivo, mediante un esquema de fermentación tipo *fed-batch*, alcanzándose un rendimiento máximo en xilitol de 0,95 g/g, con una productividad de 1,69 g/(dm³ h).

Oh y Kim (1998) han detectado un aumento en el rendimiento en xilitol por *C. tropicalis*, con un valor máximo del 93 %, cuando se utiliza una relación de alimentación de D-glucosa/D-xilosa del 15 %. También se ha observado una mejora en la bioconversión de D-xilosa en xilitol cuando se emplea etanol como cosustrato, Meinander *et al.* (1994).

Converti *et al.* (2000a) estudian la formación de xilitol con *C. guilliermondii* en medio sintético formado por D-xilosa, al que se adicionan metanol, furfural y ácido acético, que son compuestos habitualmente presentes en los hidrolizados, encontrándose que el furfural presenta mayor grado de inhibición de los tres ensayados, seguido por el ácido acético.

Influencia de la concentración de xilitol

Kastner *et al.* (1996) describen inhibición de *C. shehatae* por xilitol a concentraciones extrínsecas de 50 g/dm³. Además, el producto es fermentado con dificultad por las levaduras, aunque se han descrito casos de asimilación de xilitol y etanol una vez que la D-xilosa ha sido consumida; *P. tannophilus* metaboliza xilitol en presencia de oxígeno, para dar CO₂ y otros productos sin identificar. Por el contrario, concentraciones de xilitol de hasta 70 g/dm³ no muestran inhibición cuando se utilizan células de *P. tannophilus* inmovilizadas, Thonart *et al.* (1987).

2.5.4.3 Producción de xilitol a partir de hidrolizados lignocelulósicos

En la Tabla 2.19 se muestran algunos datos de los valores de los parámetros más importantes del proceso de producción de xilitol a partir de hidrolizados de materiales lignocelulósicos. Debido a la gran variedad de sustratos, microorganismos y condiciones de operación, las comparaciones en cuanto a la eficacia de la fermentación son difíciles de realizar.

Las principales variables que afectan a la formación de xilitol a partir de hidrolizados son el pH, la concentración de sustrato, la composición del medio, la velocidad de transferencia de oxígeno y el nivel de inóculo, Silva y Roberto (1999). Sobre un hidrolizado de paja de arroz y utilizando *C. guilliermondii*, estos autores alcanzan un rendimiento en xilitol de 0,65 g/g con una velocidad específica de formación de producto de 0,66 g/(g h), detectando que la concentración inicial de D-xilosa presente en el hidrolizado es un factor determinante; así, para concentraciones superiores a 70 g/dm³, las velocidades de formación de producto disminuyen drásticamente. Este hecho puede estar motivado por efectos osmóticos o de inhibición por sustrato de las enzimas.

Felipe *et al.* (1997) estudian la influencia del pH en la producción de xilitol por *C. guilliermondii* a partir de hidrolizados de bagazo de caña, encontrando que para pH iniciales inferiores a 4,5 el consumo de azúcares y la producción de xilitol y biomasa resultan inhibidos, mientras que a pH superiores a 5,5 se obtiene un rendimiento en xilitol de 0,75 g/g e incluso la levadura es capaz de metabolizar el ácido acético presente. Estudiando esta misma variable, Converti *et al.* (1999) obtienen rendimientos de 0,79 g de xilitol/g de D-xilosa consumida en cultivos de *P. tannophilus* a pH 6, a partir de hidrolizados detoxificados.

En un estudio con *C. parapsilosis*, Furlan *et al.* (1991) concluyen que la formación de xilitol a partir de D-xilosa está directamente ligada a la producción de biomasa y, por tanto, fuertemente influida por el consumo de oxígeno, de forma que, a medida que se aumenta el nivel de aeración, la producción de xilitol es menor.

Leathers y Dien (2000) utilizan un proceso en dos etapas para la fermentación de hidrolizados hemicelulósicos de tallos de maíz con *Pichia guilliermondii*; al finalizar la primera etapa, en la que se produce el consumo de la D-glucosa presente en el hidrolizado, las levaduras se eliminan del medio por centrifugación y se sustituyen por otras que han sido precultivadas en un medio con D-xilosa, comenzando la asimilación de D-xilosa y arabinosa. Para obtener rendimientos aceptables de xilitol es preciso someter al hidrolizado a un tratamiento de intercambio iónico.

Silva *et al.* (1998) estudian la hidrólisis ácida de la fracción hemicelulósica de astillas de eucalipto, analizando mediante diseños de experiencias la influencia de la temperatura, concentración de ácido sulfúrico, tiempos de inmersión y residencia, con vistas a la producción de xilitol mediante *C. guilliermondii*. La mayor concentración de xilitol se obtiene a partir del hidrolizado a 140 °C, 0,5 % de ácido sulfúrico, 10 minutos de tiempo de residencia y 24 horas de inmersión en la disolución ácida. Además, el hidrolizado es acondicionado mediante CaO.

La utilización de un cultivo mixto de microorganismos para el aprovechamiento integral de hidrolizados celulósicos (con vistas a la producción de etanol) y hemicelulósicos (para la obtención de xilitol) es estudiada por Delgenes *et al.* (1998).

TABLA 2.19
PRODUCCIÓN DE XILITOL A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Microorganismo	Sustrato	Condiciones	s ₀ g/dm ³	Q _s g/(dm ³ h)	% s cons.	Xi g/dm ³	Q _x g/(dm ³ h)	Y _x g/g	Referencia
<i>Saccharomyces</i> 1400 (pLNH33)	Mazorca de maíz	Pret. NH ₄ OH	52	1,75	76,2	4,8	0,2	0,11	Cao <i>et al.</i> (1996)
<i>D. hansenii</i> NRRL Y-7426	Mad. eucalipto	Carbón	58	1,56	92	39	1,0	0,68	Parajó <i>et al.</i> (1996b)
<i>P. tannophilus</i> NRRL Y2460	Maderas duras	OverL + Sulfito	63			6,5	0,07		Perego <i>et al.</i> (1990)
<i>P. stipitis</i> Y7124	Mad. eucalipto		36,1	0,25	99	1,4	0,01	0,04	Ferrari <i>et al.</i> (1992)
<i>Candida</i> sp. B-22 (adap.)	Bagazo de caña		105,3	1,11	100	94,7	0,99	0,90	Chen y Gong (1985)
<i>Candida</i> sp. 11-2	Bagazo de caña	Carbón activo + int. iónico	51	0,90	84,3	28,9	0,60	0,67	Domínguez <i>et al.</i> (1996)
<i>Candida</i> sp. 11-2	Maz. de maíz	Pret. NH ₄ OH	130	3,54	96	70	1,77	0,50	Domínguez <i>et al.</i> (1997)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	Bagazo de caña	Neutr. Ca(OH) ₂	65	0,48	95	30	0,23	0,48	Roberto <i>et al.</i> (1991)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	Paja de arroz		45	0,81	86	27	0,56	0,69	Roberto <i>et al.</i> (1994)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	Bagazo de caña		54,5	0,91	91	35	0,64	0,70	Roberto <i>et al.</i> (1995a)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	Paja de arroz	(NH ₄) ₂ SO ₄	79,3	0,79	90	39,3	0,54	0,68	Roberto <i>et al.</i> (1995b)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	Mad. eucalipto		53	0,55	90	13,8	0,16	0,29	Felipe <i>et al.</i> (1996)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	Bagazo de caña	Conc. + fed batch	40			44	0,62	0,78	Rodrigues <i>et al.</i> (1998)
<i>C. guilliermondii</i> y <i>L. reuteri</i>	Paja de trigo	Cocultivo			98		0,29	0,55	Delgenes <i>et al.</i> (1998)
<i>C. guilliermondii</i> NRC 5578	Madera de álamo		50				0,6	0,8	Preziosi-Belloy <i>et al.</i> (2000)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	Paja de arroz	Neutr. NaOH	82			52	0,54	0,65	Silva y Roberto (2001)

El hidrolizado hemicelulósico de paja de trigo se fermenta a xilitol en un cultivo de *C. guilliermondii* asociada con *Lactobacillus reuterii*; por otra parte, un hidrolizado de álamo, conteniendo 41,1 g/dm³ de D-glucosa y 9 g/dm³ de D-xilosa, es tratado mediante un cocultivo de *S. cerevisiae* modificada genéticamente y *P. stipitis*.

En hidrolizados de eucalipto concentrados por evaporación a vacío, Parajó *et al.* (1996b) estudian la influencia de la concentración inicial de células de *D. hansenii*, encontrando que apenas existe consumo de D-xilosa con 16 g de células/dm³, mientras que se obtienen de 39 a 41 g de xilitol/dm³ con concentraciones iniciales de células del orden de 50 a 80 g/dm³. También Parajó *et al.* (1996c), utilizan la adsorción sobre carbón activo como medio para mejorar la eficiencia en la producción de xilitol a partir de hidrolizados del mismo residuo y con el mismo microorganismo; con este acondicionamiento, los productos derivados de la lignina, que son inhibidores de la fermentación, pueden ser eliminados selectivamente.

El acondicionamiento de hidrolizados de bagazo de caña con carbón activo, combinado con neutralización presenta los mejores valores de productividad en xilitol, comparado con otros métodos como sólo neutralización y el empleo de resinas de intercambio iónico, Domínguez *et al.* (1996). El mismo tratamiento de acondicionamiento de hidrolizado de paja de arroz, empleando *C. guilliermondii*, permite la eliminación parcial de los compuestos fenólicos y un rendimiento en xilitol de 0,72 g/g, Mussatto y Roberto (2001).

2.5.5 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS

El aprovechamiento bioquímico de cualquier material celulósico precisa dos etapas: la conversión de celulosa y hemicelulosa en D-glucosa, D-xilosa y otros azúcares (hidrólisis, ácida o enzimática); y la conversión microbiológica de estos en etanol u otros productos (fermentación). Como alternativa a estas dos etapas consecutivas, se ha propuesto la realización de todo el proceso en una única etapa, que recibe el nombre de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).

El diagrama de flujo simplificado que aparece en la Figura 2.13 consta de cinco etapas claves, So y Brown (1999):

- Pretratamiento, mediante ácido sulfúrico para liberar D-xilosa y hacer accesible la celulosa a la hidrólisis enzimática.
- Producción de celulasas mediante hongos.
- Proceso SSF, mediante el cual la celulosa se hidroliza a D-glucosa que, junto con la D-xilosa, son fermentadas a etanol por levaduras o bacterias.
- Recuperación del etanol, mediante destilación u otros procedimientos, del efluente de la fermentación.
- Digestión anaerobia para el tratamiento de los residuos líquidos y sólidos del proceso.

La hidrólisis enzimática de la celulosa es la etapa controlante en los procesos de SSF, influyendo decisivamente en la cinética de la conversión. Por tanto, el pretratamiento de la biomasa y la producción de enzimas son los aspectos cruciales en el desarrollo de este tipo de procesos, Philippidis y Hatzis (1997).

Este tipo de proceso presenta notables ventajas, tanto desde el punto de vista cinético como económico, como una reducida inhibición enzimática al separarse los productos solubles de la hidrólisis, escasas posibilidades de contaminación y simplificación general al poder utilizar un único reactor, Moritz y Duff (1996), con lo que se reducen los costes de inmovilizado. Como contrapartida, existen una serie

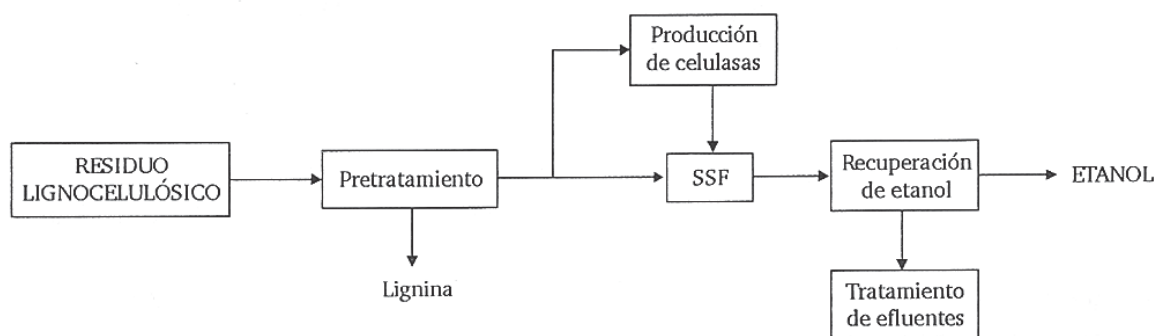


Figura 2.13 Proceso de sacarificación y fermentación simultáneas

de inconvenientes que se derivan de las diferentes condiciones necesarias para la hidrólisis enzimática y para la fermentación; la mayoría de las preparaciones enzimáticas tiene una temperatura óptima de actuación entre 45 y 50 °C, mientras que en la fermentación los rangos suelen encontrarse entre 30 y 35 °C. Además, se han descrito efectos de inhibición por etanol en las enzimas, Barron *et al.* (1995).

Se han identificado cuatro factores decisivos en la cinética del proceso de sacarificación y fermentación simultáneas, Philippidis *et al.* (1993):

- Las características estructurales del sustrato celulósico, que inciden sobre la susceptibilidad al ataque enzimático.
- La calidad del sistema enzimático (celulasas y β -glucosidasas, principalmente), que determina su capacidad para realizar la hidrólisis.
- La interacción entre el sustrato y la enzima, que regula la adsorción de la enzima en el sustrato y, por tanto, la velocidad de esta reacción heterogénea.
- La interacción entre la enzima y el microorganismo fermentativo, que afecta a la cinética del crecimiento celular y a la productividad en etanol, así como los efectos inhibidores de los productos de la hidrólisis (celobiosa y D-glucosa) y metabolitos (etanol) sobre las actividades enzimática y celular.

La identificación de microorganismos termotolerantes es una vía de resolución de los problemas mencionados. Así, Boyle *et al.* (1997) utilizan una levadura,

Kluyveromyces marxianus, capaz de crecer y producir etanol a partir de sustratos celulósicos, mediante un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas, entre 45 y 50 °C. El proceso SSF puede modificarse utilizando además una extracción del etanol generado mediante un disolvente selectivo, con lo que se mejora la productividad hasta en un 65 % comparada con el proceso convencional sin extracción, Moritz y Duff (1996).

Latif y Rajoka (2001) utilizan *S. cerevisiae* y *C. tropicalis* separadamente y en cocultivo, en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneo para la obtención de etanol y xilitol a partir de mazorcas de maíz, pretratadas con NaOH en autoclave. La sacarificación se realiza mediante hidrólisis enzimática con enzimas procedentes de *Chaetomium thermophile*. Como resultado, la fermentación con *S. cerevisiae* proporciona un mejor rendimiento en etanol (0,42 g/g) que *C. tropicalis* (0,36 g/g) y que el cocultivo (0,32 g/g), mientras que el mejor rendimiento en xilitol se consigue con *C. tropicalis* (0,71 g/g), seguido por el cocultivo de ambos microorganismos (0,69 g/g).

En ocasiones, la fase de hidrólisis es realizada por un microorganismo diferente al responsable de la fermentación, siendo también posible el empleo de un único microorganismo en todo el proceso. Lezinou *et al.* (1995) utilizan cultivos del hongo *Fusarium oxysporum*, solo o en combinación con *S. cerevisiae* para la bioconversión directa de tallos de sorgo en etanol, obteniéndose unos rendimientos de 24,4 y 33,5 g de etanol por 100 g de tallos secos, respectivamente. Con el mismo sustrato y un cultivo mixto de los dos microorganismos, Mamma *et al.* (1996) alcanzan rendimientos en etanol superiores al teórico basado en los azúcares solubles, debido a la bioconversión de polisacáridos.

2.6 Objeto de la Investigación

2.6 OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN

Esta Tesis Doctoral se enmarca en la Línea de Investigación sobre aprovechamiento de residuos agrícolas que se desarrolla en el Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén y pretende ser una contribución al estudio del aprovechamiento de los residuos del cultivo de girasol. La elección de este residuo agrícola está justificada, fundamentalmente, por dos razones:

- la disponibilidad en grandes cantidades del mismo en la zona de influencia del lugar en que se realiza el estudio y, además, en el resto del territorio nacional.
- la inexistencia actualmente de otro destino para los residuos distinto de la incineración en el propio campo de cultivo.

Los tres componentes principales de éste y otros residuos agrícolas son las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina. La solubilización, total o parcial en función de las condiciones de operación, por hidrólisis ácida de las dos primeras fracciones, proporciona una disolución de azúcares. La fermentación de estos hidrolizados, mediante microorganismos que sean capaces de fermentar tanto hexosas como pentosas, puede dar lugar a productos de interés industrial como etanol y xilitol.

Esta vía de aprovechamiento ha sido aplicada en trabajos previos dentro de la Línea de Investigación. En este sentido, Moya (1997) y Romero (2003), realizaron la fermentación de las disoluciones de azúcares resultantes de la hidrólisis de residuo de poda de olivo con la levadura *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691. En el presente trabajo se aplicará el mismo procedimiento al residuo de tallos de girasol, mediante hidrólisis ácida y posterior fermentación con *P. tannophilus* y el hongo *Fusarium oxysporum* VTT-D-80134.

Tras una preparación del residuo consistente básicamente en su molienda y tamizado, se procederá a su hidrólisis en un reactor tipo tanque agitado utilizando los ácidos sulfúrico y clorhídrico a distintas concentraciones y temperaturas. También se analizará, en hidrólisis con ácido sulfúrico, la influencia del tamaño de partícula del residuo, la separación en sus dos partes (médula y cubierta) y el tiempo de proceso. Para el estudio de esta etapa, se caracterizarán por un lado las muestras de hidrolizado que se irán obteniendo en el transcurso de los experimentos y por otro la composición de los residuos sólidos antes y después de la hidrólisis:

- en los hidrolizados se analizarán las concentraciones de azúcares reductores totales y D-glucosa a los distintos tiempos, lo que permitirá el cálculo de los correspondientes rendimientos y el estudio de la cinética del proceso
- los residuos se caracterizarán por su contenido en celulosa, hemicelulosa, lignina, cenizas y humedad, con lo que se determinarán las conversiones fraccionales en hemicelulosa y celulosa alcanzadas al final de cada experimento.

Las condiciones en las que se lleve a cabo la hidrólisis van a determinar el grado de solubilización de las distintas fracciones y por tanto las concentraciones de azúcares obtenidas, pero también la formación de otros compuestos que pueden actuar como inhibidores en el posterior proceso de fermentación. Por este motivo, se ha realizado la fermentación de todos los hidrolizados obtenidos en las distintas condiciones ensayadas con la levadura *P. tannophilus*, con el objetivo de estudiar ambos procesos de forma conjunta. Con esta levadura se ensayarán distintas modificaciones en la etapa de acondicionamiento de hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico, con el objeto de estudiar su influencia sobre la fermentación. Se efectuará también un estudio previo de fermentación de sustratos sintéticos, entre los que se incluirá el ácido acético para analizar el posible efecto inhibidor de este compuesto sobre el bioproceso.

Con el hongo *F. oxysporum* se fermentarán en primer lugar sustratos sintéticos (D-xilosa, D-glucosa, D-arabinosa y mezclas D-xilosa/D-glucosa en distintas proporciones) y se estudiará el medio de cultivo más apropiado. También se realizará la fermentación de hidrolizados ácidos con este microorganismo.

En los experimentos de fermentación se determinarán a lo largo del tiempo las concentraciones de biomasa, azúcares reductores totales, D-glucosa, etanol, xilitol y ácido acético. Se calcularán los rendimientos globales en biomasa, etanol y xilitol, las productividades en biomasa, y las velocidades específicas de crecimiento, consumo de sustrato y formación de etanol.

Los resultados obtenidos permitirán establecer las condiciones más favorables de hidrólisis y fermentación para el aprovechamiento de los residuos de tallos de girasol.

III. Técnica Experimental

3.1 Características de los productos utilizados

3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PRODUCTOS UTILIZADOS

A continuación se relacionan los reactivos químicos empleados y sus características, así como las de otros compuestos utilizados en el laboratorio.

3.1.1 REACTIVOS QUÍMICOS

1. Acetona, Q.P., (CH_3COCH_3), Panreac.
2. Ácido bórico, purísimo, (H_3BO_3), Merck.
3. Ácido clorhídrico, P.A., (HCl), 35 %, Panreac.
4. Ácido 3,5-dinitrosalicílico, ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$), Sigma.
5. Ácido etilendiaminotetracético, sal disódica dihidratada, P.A., ($\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Panreac.
6. Ácido sulfúrico, P.A., (H_2SO_4), 98 %, Panreac.
7. Agua ultrapura, resistividad 18,2 mΩ-cm.
8. Amonio sulfato, P.A., ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), Probus.
9. D-arabinosa, ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$), Sigma.
10. Benceno, purísimo, (C_6H_6), Panreac.
11. Calcio cloruro, ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Merck.
12. Calcio hidróxido, polvo purísimo, ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), Panreac.
13. N-cetil-N,N,N-trimetil amonio bromuro, P.A., ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBr}$), Panreac.
14. Cobalto (II) sulfato heptahidratado, P.A., ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Panreac.
15. Cobre (II) sulfato pentahidratado, puro, ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Carlo Erba.
16. Decahidronaftaleno (cis-trans), puro, ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}$), Fluka.
17. Etanol, P.A., ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), 96 %, Panreac.
18. Etilenglicol, P.A., ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$), Panreac.
19. Fenol, P.A., ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), Carlo Erba.
20. D-glucosa, anhidra, P.A., ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Panreac.

21. Hierro (II) sulfato, P.A., ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Merck.
22. Lauril sulfato sódico, 95 %, ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SNa}$), Sigma.
23. Magnesio sulfato heptahidratado, P.A., ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Carlo Erba.
24. Manganeso (II) sulfato monohidratado, puro, ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Carlo Erba.
25. Potasio di-hidrógeno fosfato, P.A., (KH_2PO_4), Panreac.
26. Potasio hidróxido, P.A., (KOH), Panreac.
27. Potasio yoduro, P.A., (KI), Panreac.
28. Reactivo enzimático para determinación de ácido acético, N° Cat. 148261, Boehringer Mannheim.
29. Reactivo enzimático para determinación de etanol, N° Cat. 176290, Boehringer Mannheim.
30. Reactivo enzimático para determinación de D-glucosa, Cod. 1001190, Spinreact.
31. Reactivo enzimático para determinación de D-glucosa/D-fructosa, N° Cat. 139106, Boehringer Mannheim.
32. Reactivo enzimático para determinación de D-sorbitol/xilitol, N° Cat. 670057, Boehringer Mannheim.
33. Sodio fosfato monoácido dodecahidratado, P.A., ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), Merck.
34. Sodio hidróxido, P.A., (NaOH), 98 %, Panreac.
35. Sodio nitrato, P.A., (NaNO_3), Panreac.
36. Sodio sulfito heptahidratado, P.A., ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Carlo Erba.
37. Sodio tetraborato decahidratado, purísimo, ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), Panreac.
38. Sodio y potasio tartrato tetrahidratado, ($\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), P.A., 99 %, Carlo Erba.
39. D-xilosa, anhidra, purísima, ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$), Panreac.
40. Zinc sulfato heptahidratado, purísimo, ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Merck.

3.1.2 OTROS COMPUESTOS

1. Agar-agar, purísimo, Panreac.
2. Algodón hidrófobo.
3. Carbón activo, granulado n° 1, puro, Panreac.
4. Disoluciones tampón, Crison pH 4,01 y 7,00.
5. Electrolito (KCl 3 M+ AgCl), Crison.

6. Extracto de levadura, BBL.
7. Extracto de malta, Merck.
8. Lana de vidrio lavada, pura, Panreac.
9. Peptona de caseína, Merck.

3.2 Instalaciones experimentales

3.2 INSTALACIONES EXPERIMENTALES

Seguidamente se describen las instalaciones experimentales empleadas para hidrólisis y fermentación. Todos los experimentos se han realizado en las dependencias del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales en la Universidad de Jaén.

3.2.1 EQUIPO DE HIDRÓLISIS

Los experimentos de hidrólisis se han efectuado en el reactor encamisado cuyo esquema se muestra en la Figura 3.1. Sus principales elementos son los siguientes:

1. Baño de aceite, Tectron 200, provisto de termostato, selector de temperatura y bomba de recirculación.
- 2a. Reactor, tipo tanque agitado, de vidrio Pyrex cilíndrico y de fondo redondo, provisto de una camisa de termostatación por la que circula el aceite calefactor y tapa con cinco bocas. Las características geométricas del reactor son: volumen útil, 1000 cm³; diámetro interno, 10 cm; diámetro externo, 12,5 cm; altura interior, 15 cm; altura exterior, 20,5 cm.
- 2b. Reactor, tipo tanque agitado, de vidrio Pyrex, de geometría esférica sin camisa de termostatación; la calefacción se realiza por inmersión directa en el baño de aceite. Tiene un volumen útil de 5000 cm³ y un diámetro interno de 21,2 cm.
3. Refrigerante de reflujo, tipo Dimroth encamisado.
4. Cierre de agitación, Quickfit ST20/4.
5. Varilla de agitación de teflón, con ánora fija y pala de 7,5 cm de diámetro.
6. Agitador Heidolph mod. RZR-2000, conectado a la varilla y provisto de cuentarrevoluciones.
7. Termómetro de mercurio, con escala de 0 a 150 °C.

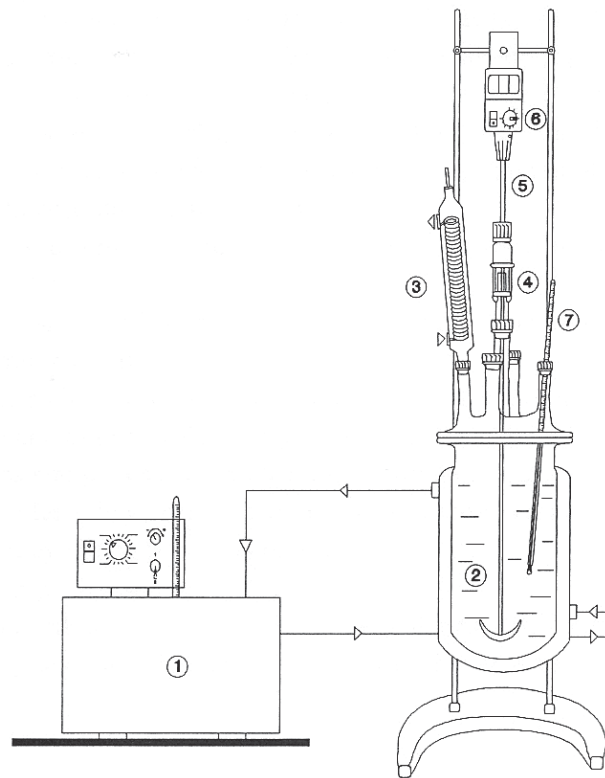


Figura 3.1 Instalación de hidrólisis

3.2.2 INSTALACIÓN DE FERMENTACIÓN

En la Figura 3.2 se esquematiza la instalación experimental diseñada para la realización de los experimentos de fermentación y cuyos elementos básicos se describen seguidamente:

1. Vasos de cultivo, encamisados, de forma cilíndrica, provistos de una tapa con cinco orificios, uno de los cuales permite la carga del medio de cultivo y la toma de muestras y otro la entrada de aire desde el exterior. Sus características geométricas son: diámetro externo, 13,5 cm; diámetro interno, 10,5 cm; altura, 25,0 cm; volumen útil, 2000 cm³.
2. Baño de agua, Selecta mod. Digiterm S-542, con termostato y bomba de recirculación que alimenta el agua de termostatación a la camisa del vaso de cultivo.
3. Equipo de agitación, compuesto por un agitador magnético Heidolph MR2000, y una varilla agitadora cilíndrica de teflón de 40 mm de longitud y 8 mm de diámetro. La velocidad de agitación se ha mantenido durante el transcurso de todos los experimentos en un valor próximo a 500 rpm, con la que se mantiene la homogeneidad en la suspensión. Por otra parte, gracias al vórtice de agitación, se consigue la entrada de aire en el cultivo.

4. Cuentarrevoluciones, Heidolph digital 2002, permite controlar la agitación en los vasos de cultivo.
5. Tubos de goma de silicona, a través de los cuales se extraen las muestras con ayuda de una jeringa estéril.
6. Bomba peristáltica, Millipore modelo XX80202 30, de caudal constante, con la cual se introduce el medio de cultivo en los vasos, a través de filtros esterilizados.
7. Portafiltros equipados con un filtro de nitrato de celulosa, de porosidad $0,2\ \mu\text{m}$, y un prefiltro de lana de vidrio. Se esterilizan y se hace pasar a través de ellos el medio de cultivo con ayuda de la bomba peristáltica.
8. Medidor de pH, Crison modelo 2001.
9. Electrodo combinado sensible a los hidrogeniones. Está constituido por un indicador de vidrio y otro de referencia, formado éste por una varilla de plata recubierta de AgCl.

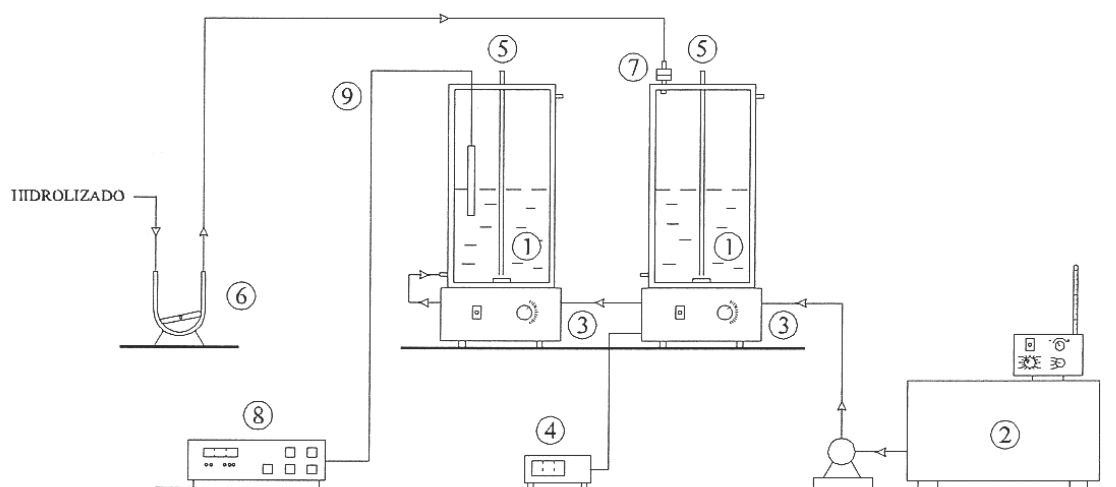


Figura 3.2 Instalación de fermentación

3.3 Procedimiento y Desarrollo de los Experimentos

3.3 PROCEDIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS

Los experimentos realizados constan básicamente de dos etapas: hidrólisis ácida y fermentación de los hidrolizados resultantes. Además de la preparación del residuo original es preciso acondicionar los hidrolizados para su fermentación.

3.3.1 CARACTERÍSTICAS Y PREPARACIÓN DE LOS TALLOS DE GIRASOL

Los tallos de girasol se han recogido cada año después de finalizada la recolección de las semillas y proceden de fincas situadas en el término municipal de Mengíbar, de la provincia de Jaén. Los residuos no contienen otros elementos de la planta distintos del tallo y tienen aproximadamente un metro de longitud y entre 1 y 2,5 cm de diámetro.

Los tallos están constituidos por dos partes bien diferenciadas:

1. En el interior, una médula blanca, de textura esponjosa y de baja densidad (aproximadamente 35 kg/m^3) y con gran capacidad de absorción de agua. Su peso representa entre un 10 y un 12 % del total del tallo, Van den Bossche (1998).
2. En la parte externa, una cubierta fibrosa, con una densidad aproximada de 400 kg/m^3 y que constituye cerca de un 90 % del peso total del tallo.

Una vez en el laboratorio, los tallos enteros son lavados con agua, para eliminar restos de tierra y polvo, secados al aire y molidos mediante un molino de cuchillas Retsch mod. SM11; finalmente, el residuo es clasificado empleando una tamizadora Retsch Vibro y almacenado en frascos cerrados de vidrio. Se ha utilizado la fracción correspondiente a un tamaño de partícula entre 0,60 y 0,425 mm, equivalente a 30-40 mallas, según normas de la ASTM, excepto para la serie de experimentos en la que se ha estudiado la influencia del tamaño de partícula en la hidrólisis y fermentación, donde se han empleado los tamaños descritos en el apartado de Variables de Operación, 3.4.1.

3.3.2 PROCESO DE HIDRÓLISIS

Los experimentos de hidrólisis se han realizado con los ácidos sulfúrico y clorhídrico en distintas concentraciones, a distintas temperaturas y a diferentes tiempos de proceso (apartado 4. Resultados Experimentales). Se ha empleado una relación líquido/sólido de 15:1 (v/p), valor que permite una adecuada homogeneización de la mezcla en agitación, a la vez que evita, si se hubieran seleccionado valores superiores para este parámetro, una dilución innecesaria de los azúcares solubilizados. Como excepción, y debido a las características de la parte central del tallo de girasol y de la parte externa o cubierta, en los experimentos en los que se han hidrolizado estas dos partes por separado se han utilizado valores distintos de la relación L/S.

El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

1. El reactor se carga con el volumen de disolución ácida correspondiente para mantener la relación L/S y de la concentración especificada en cada experimento.
2. Se comienza la calefacción de la disolución en agitación.
3. Una vez alcanzada la temperatura del experimento, se introduce la cantidad de tallos de girasol, preparados según se ha descrito en el apartado precedente. Por lo general, se han utilizado lotes de 60 g de materia vegetal (en base húmeda). En este momento se toma el origen de tiempos.
4. A lo largo de la hidrólisis se toman muestras con el objetivo de estudiar la evolución temporal de las concentraciones de azúcares reductores totales y de D-glucosa.
5. Transcurrido el tiempo de hidrólisis, se desconecta la calefacción y se introduce el reactor en un baño de hielo, con el objetivo de detener el proceso.
6. Se descarga y filtra el contenido del reactor, recuperándose, tras lavar con agua caliente, el hidrolizado, por una parte y el residuo sólido de hidrólisis, por otra.
7. El hidrolizado obtenido pasa a la etapa de acondicionamiento, mientras que el residuo sólido se seca y se caracteriza (apartado 3.5.1).

3.3.3 ACONDICIONAMIENTO DE LOS HIDROLIZADOS

Las características de los hidrolizados obtenidos, especialmente su acidez y la presencia en los mismos de productos de hidrólisis diferentes de los azúcares monoméricos, hacen que su utilización directa en el proceso fermentativo no sea posible, puesto que los microorganismos empleados no crecen en esas condiciones.

Por tanto, los hidrolizados deben someterse a una serie de operaciones que, en conjunto, reciben el nombre de acondicionamiento.

Las operaciones de acondicionamiento efectuadas en este estudio han sido las siguientes:

1. Filtración o centrifugación del hidrolizado: se realiza en primer lugar una filtración con el objetivo de eliminar los residuos sólidos.
2. Ajuste del pH: debido a que los hidrolizados se han obtenido por acción de ácidos a distintas concentraciones, el pH resultante, cercano o inferior a 1, es demasiado bajo para permitir el desarrollo de los microorganismos. Por tanto, es imprescindible aumentarlo hasta un valor, que depende del tipo y de la especie que se utilice en la fermentación, y que suele ser en torno a 3,5 ó 4. Para ello se han empleado disoluciones de hidróxido de sodio, hidróxido de calcio o hidróxido de potasio, de una concentración del orden de 5 N para evitar diluir excesivamente el hidrolizado. En algunos casos se ha utilizado un procedimiento consistente en añadir $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hasta pH 11, seguido de adición de H_2SO_4 para reducir hasta pH 3,5 (*overliming*).
3. Concentración del hidrolizado: por lo general, el contenido en azúcares del hidrolizado es relativamente bajo para llevar a cabo la fermentación en buenas condiciones. Además, este proceso permite eliminar o reducir la concentración de algunos compuestos inhibidores para el crecimiento de las levaduras que pueden haberse producido durante la hidrólisis, como el ácido acético. La concentración se realiza mediante evaporación a vacío en un rotavapor, Resona Technics mod. Labo-rotar C-311, a temperaturas inferiores a 60 °C, para evitar la posible caramelización de azúcares. El hidrolizado se concentra hasta unos 200 cm³ y después se diluye a un volumen cercano a los 500 cm³.
4. Centrifugación: la etapa de neutralización ocasiona la aparición de precipitados que se retiran mediante centrifugación a 3000 rpm, utilizando una centrífuga vertical Selecta, mod. Mixtasel.
5. Decoloración: para algunos experimentos se ha realizado un tratamiento de decoloración consistente en poner en contacto el hidrolizado con una cantidad de carbón activo de aproximadamente un 8 % en peso, manteniéndose en agitación durante una hora a temperaturas inferiores a 45 °C. Seguidamente se realiza una filtración en papel para separar el carbón y una segunda filtración en membrana de nitrato de celulosa de 0,45 μm de tamaño de poro, que completa la anterior.
6. Esterilización: la última operación de acondicionamiento de los hidrolizados, previa a la fermentación, consiste en la adición de los componentes que contiene el medio de cultivo (apartado 3.3.4.3) y la esterilización a través de membranas de nitrato de celulosa de 0,45 μm de tamaño de poro.

3.3.4 PROCESO DE FERMENTACIÓN

Los microorganismos empleados se mantienen en un medio sólido hasta su utilización, transfiriéndose entonces a un medio de cultivo líquido que, junto al hidrolizado acondicionado, constituye el medio de fermentación.

3.3.4.1 Microorganismos utilizados

Los experimentos de fermentación se han realizado utilizando la levadura *Pachysolen tannophilus* (32691), suministrada por la American Type Culture Collection, y el hongo *Fusarium oxysporum* D-80134, procedente de VTT Biotechnology Culture Collection.

3.3.4.2 Precultivo en medio sólido

Los microorganismos se mantienen en tubos de ensayo de 100 cm³ de capacidad sobre un medio sólido con la siguiente composición en g/dm³:

Extracto de levadura	3
Extracto de malta	3
Peptona	5
D-xilosa	10
Agar-agar	20

El medio sólido se prepara por disolución de todos los componentes, excepto el agar, en agua ultrapura y se ajusta el pH a 7 para favorecer el poder gelificante del agar.

A continuación, se disuelve el agar calentando la disolución hasta comienzo de ebullición y manteniéndola en agitación. Se traspasan unos 25 cm³ de esta suspensión a cada tubo de ensayo, se tapan con algodón graso, cubriendo la boca con papel de filtro, y se esterilizan en autoclave, Raype mod. AE-110, durante 30 minutos a una sobrepresión comprendida entre 58,8 y 78,5 kPa. Por último, los tubos se almacenan colocándolos de forma inclinada para conseguir una mayor superficie de inoculación.

El microorganismo se inocula sobre este medio en una cabina de flujo laminar, empleando un asa de platino y en condiciones estériles. Finalmente, los tubos inoculados se conservan en estufa de cultivo. Cada cierto tiempo, la levadura se transfiere a medio sólido fresco.

3.3.4.3 Medios de cultivo

Una vez acondicionados los hidrolizados, éstos se emplean como medio de cultivo en la fermentación. No obstante, para poder servir como un medio de crecimiento apropiado para un microorganismo, los hidrolizados deben ser suplementados con otros componentes.

En los cultivos con *P. tannophilus*, la naturaleza y concentración en g/dm³ de estos componentes se relaciona seguidamente:

Extracto de levadura	4,00
Peptona	3,60
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,00
Mg SO ₄ 7H ₂ O	2,05
KH ₂ PO ₄	2,00

Estos cinco componentes junto con D-glucosa constituyen el medio formulado por Lindegren *et al.* (1958).

En el estudio de la fermentación con *F. oxysporum* en medio sintético se ha empleado este medio de cultivo o el resultante de sustituir D-glucosa por D-xilosa o por mezclas de ambos azúcares. En la fermentación de hidrolizados con los dos microorganismos utilizados, el medio de cultivo es el mismo, a excepción de los azúcares, que son aportados por los hidrolizados. Adicionalmente, se ha estudiado el crecimiento de este microorganismo con un medio específico, Hahn-Hägerdal *et al.* (1994a), cuya composición es:

NaNO ₃	3,4 g/dm ³
KH ₂ PO ₄	2,0 g/dm ³
Extracto de levadura	1,0 g/dm ³
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,4 g/dm ³
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,3 g/dm ³
Disolución de elementos traza	5,0 cm ³ /dm ³

La disolución de elementos traza tiene la siguiente composición en g/dm³:

H ₃ BO ₃	2,0	Al ₂ (SO ₄) ₃	0,6
ZnSO ₄ 7H ₂ O	2,0	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,4
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,8	KI	0,2
MnSO ₄ H ₂ O	0,6	CoSO ₄ 7H ₂ O	0,2

3.3.4.4 Preparación y desarrollo del bioproceso

En primer lugar, entre 48 y 60 horas antes del comienzo del experimento, se inocula la levadura o el hongo sobre el medio de cultivo sólido descrito en el apartado 3.3.4.2 y se mantiene en estufa a 30 °C, con el objeto de obtener células en un mismo estado de crecimiento. Sobre este precultivo, se añaden unos 20 cm³ de medio de cultivo, a través de un filtro estéril, de tamaño de poro 0,45 µm. Se agita suavemente para resuspender los microorganismos y se transfiere a otro tubo esterilizado. Por último, se determina la concentración de biomasa en el inóculo, a través de la absorbancia de la suspensión celular (apartado 3.5.2) y se calcula el volumen de inóculo necesario para que la concentración inicial de biomasa sea, en general, próxima a 0,025 g/dm³.

Los vasos de cultivo, portafiltros, filtros y el resto del material se esterilizan en autoclave durante 30 minutos a una sobrepresión de 117,7 kPa.

Se prepara el medio de cultivo disolviendo los componentes del mismo en agua ultrapura o en los hidrolizados, previamente acondicionados, hasta un volumen de 500 cm³ y se ajusta el pH a 3,5, en el caso de *P. tannophilus* y a 4,5 en el caso de *F. oxysporum*.

Con ayuda de una bomba peristáltica y a través de filtros esterilizados, se transfiere el medio hasta los vasos de cultivo. Éstos se sitúan sobre los agitadores magnéticos (regulados a 500 rpm) y se adiciona a cada vaso el volumen de inóculo líquido calculado. En este momento se toma el origen de tiempos.

En el transcurso del experimento se van tomando muestras de los vasos de cultivo de 4 a 8 cm³ (dependiendo de las necesidades de análisis), mediante una jeringa estéril, a las que se realizan las determinaciones analíticas correspondientes. El experimento se considera completado cuando se produce la asimilación total del sustrato o bien se detiene su consumo.

3.4 Variables de Operación

3.4 VARIABLES DE OPERACIÓN

3.4.1 HIDRÓLISIS

Las variables de operación en el proceso de hidrólisis de tallos de girasol y los valores ensayados se muestran en la Tabla 3.1. Excepto para las hidrólisis de cubierta y médula por separado, en todos los casos se ha mantenido una relación L/S de 15:1 (v/p) y se han tomado muestras a lo largo de los experimentos, con el objetivo de determinar la cinética del proceso.

TABLA 3.1
VARIABLES DE OPERACIÓN EN LOS EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISIS

VARIABLES	VALORES ENSAYADOS
Tamaño de partícula, mm	0,125-0,3; 0,3-0,425; 0,425-0,6; 0,6-0,85; 0,85-1,2; 1,2-1,6; 1,6-2
Naturaleza del residuo	residuo completo; cubierta; médula
Naturaleza del ácido	H ₂ SO ₄ ; HCl
Concentración del ácido, N	0,1; 0,3; 0,5; 0,75; 1; 2
Tiempo, min	0; 30; 60; 120; 180; 240
Temperatura, °C	70; 80; 90; 95; 100

3.4.2 FERMENTACIÓN

La fermentación de los hidrolizados se ha efectuado manteniendo constantes la temperatura (30 °C), la agitación (500 rpm), el volumen de hidrolizado (0,5 dm³) y sin aporte externo de oxígeno más que el incorporado por el vórtice de agitación. En cuanto al pH del cultivo también se ha mantenido constante para cada microorganismo: 3,5 en el caso de *Pachysolen tannophilus* y 4,5 para *Fusarium oxysporum*.

El estudio de la fermentación con *P. tannophilus* se ha dividido en tres etapas:

- Fermentación en medio sintético, con distintas concentraciones iniciales de azúcares (D-xilosa y D-glucosa) así como de ácido acético para estudiar el posible efecto inhibitorio de éste sobre los cultivos.
- Estudio de la influencia de los distintos procedimientos de acondicionamiento de los hidrolizados sobre la posterior fermentación.
- Fermentación de los hidrolizados obtenidos modificando las distintas variables de hidrólisis indicadas en el apartado anterior.

En la fermentación con *F. oxysporum* se han realizado las siguientes series de experimentos:

- Utilización de un medio de cultivo clásico en levaduras y comparación con un medio de cultivo específico para este microorganismo.
- Fermentación en medio sintético, realizándose cultivos con D-glucosa, D-xilosa y D-arabinosa, con una concentración inicial de 25 g/dm³. Además se han realizado experimentos con mezclas de D-xilosa y D-glucosa en las proporciones 24/1, 20/5 y 12,5/12,5.
- Fermentación de hidrolizados seleccionados, obtenidos con los ácidos clorhídrico y sulfúrico.

3.5 Métodos Analíticos

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

Antes y después de la hidrólisis se realizan una serie de determinaciones analíticas del residuo para comprobar el alcance del proceso (caracterización); durante el mismo, se toman muestras para estudiar la evolución temporal de las concentraciones de azúcares.

A lo largo del proceso de fermentación se realizan tomas de muestra para evaluar, en primer lugar, el crecimiento celular y el pH del medio de cultivo. Posteriormente, se centrifugan o se filtran las muestras para retirar la biomasa formada, conservando el sobrenadante, al que se realizan determinaciones de azúcares (reductores totales y D-glucosa), ácido acético y bioproductos (etanol y xilitol).

3.5.1 CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO

Para caracterizar el residuo, se analiza cómo se modifican los contenidos en celulosa, hemicelulosa y lignina antes y después de la hidrólisis. Asimismo, se determinan los contenidos en humedad, cenizas y extractos.

3.5.1.1 Humedad

La humedad se determina a partir de la pérdida de peso que experimenta una muestra de aproximadamente 2 g de residuo vegetal, cuando se somete a una temperatura de 105 °C durante el tiempo suficiente para que se alcance pesada constante. (TAPPI T 11 m 59).

3.5.1.2 Cenizas

Por cenizas se entiende el residuo que queda tras someter una muestra de unos 2 g de madera a una temperatura de 575°C el tiempo necesario para incinerarla, aproximadamente 3 horas. Las muestras se colocan en crisoles de porcelana y se llevan a un horno de mufla Thermolyne mod. 1300. (TAPPI T 15 os 58).

3.5.1.3 Celulosa, hemicelulosa y lignina

La determinación de los contenidos en celulosa, hemicelulosa y lignina presentes en los tallos de girasol se ha realizado utilizando métodos gravimétricos. En primer lugar, el método de la Fibra Neutro Detergente permite cuantificar el contenido total en los tres polímeros; a continuación, el análisis de Fibra Ácido Detergente determina el contenido en lignina más celulosa; y, por último, un análisis específico proporciona el porcentaje de lignina. Seguidamente se describen los tres métodos.

A) Fibra Neutro Detergente (FND)

Se ha seguido el procedimiento propuesto por Van Soest (1963, 1964); Van Soest y Wine (1967) y Van Es y Van der Meer (1980).

La FND es el resto insoluble, correspondiente a lignina, celulosa y hemicelulosas, que se obtiene tras someter una muestra a ebullición lenta con una disolución neutro detergente, preparada al disolver 18,61 g de $\text{Na}_2(\text{EDTA}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 6,81 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en agua ultrapura. Se añaden 30 g de lauril sulfato sódico y 10 cm³ de etilenglicol. Aparte se disuelven 4,56 g de fosfato monoácido de sodio que se unen a la primera disolución, enrasándose a 1 litro con agua ultrapura.

El procedimiento operatorio es como sigue: se pesa una muestra de 1 g, se le añaden 100 cm³ de disolución neutro detergente, 0,5 g de Na_2SO_3 y 5 gotas de decahidronaftaleno (decalina) que actúa como antiespumante; se somete a ebullición durante una hora. A continuación se filtra a vacío a través de una placa porosa de N° 1 previamente tarada y se lava varias veces con agua caliente y después con acetona, secando en estufa a 105 °C hasta pesada constante.

B) Fibra Ácido Detergente (FAD)

Se ha seguido el procedimiento propuesto por Van Soest (1963, 1964); Van Soest y Wine (1967) y Van Es y Van der Meer (1980).

La FAD corresponde al residuo formado por lignina y celulosa que se obtiene tras someter una muestra a ebullición con disolución ácido detergente, preparada por disolución de 20 g de bromuro de N-cetil-N,N,N,-trimetil amonio en ácido sulfúrico 1 N, enrasando a 1 litro.

El procedimiento operatorio es como sigue: se pesa una muestra de 1 g a la que se añaden 100 cm³ de disolución ácido detergente y 5 gotas de decalina, que actúa como antiespumante, y se somete a ebullición durante dos horas. A continuación se filtra a vacío a través de una placa porosa previamente tarada y se lava varias veces con agua caliente y después con acetona, secando en estufa a 105 °C hasta pesada constante.

La determinación de FAD permite calcular las hemicelulosas presentes en el material por diferencia con la FND, y la fracción celulósica por diferencia con la lignina.

C) Determinación del contenido en lignina.

Según el método aplicado, la lignina se define como el constituyente de la madera insoluble en H_2SO_4 del 72 %. El procedimiento consiste en pesar una muestra de aproximadamente 1 g de residuo, que se transfiere a un vaso de precipitado de 100 cm^3 de capacidad, adicionando 15 cm^3 de H_2SO_4 al 72 %. Durante la dispersión del material se mantiene el vaso, cubierto por un vidrio de reloj, a 20°C durante dos horas removiendo frecuentemente. Transcurrido este tiempo se vierte en un matraz donde se lleva a 575 cm^3 con agua ultrapura. A continuación se hierve la disolución durante 4 h manteniendo constante el volumen mediante un condensador de reflujo. Se deja que el material insoluble (lignina) deposite y se pasa a través de una placa filtrante provista de una mata de lana de vidrio, puesto que la lignina suele formar dispersiones coloidales que obstruyen los poros de la placa, lavándola con agua caliente. Por último se seca la lignina, junto con la placa, en una estufa a 105 °C hasta pesada constante. (TAPPI T 222 os 74).

3.5.1.4 Extractos

Por extractos se entienden aquellos materiales solubles en disolventes neutros, que no forman parte de la constitución de la madera, carbohidratos de bajo peso molecular, sales orgánicas, ceras, grasas, resinas y parafinas. (TAPPI T 12 m 59).

El procedimiento operatorio es el siguiente: se coloca una cantidad conocida de muestra en una cápsula de vidrio dentro de un extractor microsoxhlet y se realiza la extracción durante 4 h con una mezcla etanol benceno (1:2). Finalizada la misma, se transfiere la muestra a un filtro para separar el disolvente, lavándola con etanol. A continuación se vuelve a colocar en el soxhlet y se extrae con etanol del 95 % durante 4 horas, hasta observar que el etanol en el sifón no tenga color. Cuando se ha acabado la extracción, se extiende la muestra en una capa delgada para facilitar la evaporación del disolvente; una vez evaporado se extrae el material con agua hirviendo, se vuelve a filtrar y se deja secar al aire.

3.5.2 CRECIMIENTO CELULAR

La concentración celular se ha calculado a través de una curva de calibrado previamente obtenida, Castro (1993), que relaciona el peso seco y la absorbancia de la suspensión de células de *P. tannophilus*.

Las medidas se han realizado a una longitud de onda de 620 nm, utilizando un espectrofotómetro UNICAM mod. UV2. Cuando la absorbancia se encuentra por encima del rango de linealidad se realiza la dilución correspondiente con medio de cultivo de Lindegren *et al.* sin D-glucosa. La relación entre la absorbancia de la suspensión y el peso seco celular obtenida para *P. tannophilus*, empleando el método

de mínimos cuadrados, es la siguiente:

$$x, \text{ g/dm}^3 = 0,209 (A_{620}) + 2,04 \cdot 10^{-4}, \quad r^2 = 0,991 \quad [3.1]$$

En el caso de los cultivos con *F. oxysporum*, la determinación del crecimiento celular se realiza directamente por gravimetría. El procedimiento consiste en extraer una muestra del cultivo y filtrarla sobre una membrana de nitrato de celulosa, previamente tarada. A continuación, se lleva a pesada constante y se refiere el resultado al volumen de cultivo.

3.5.3 AZÚCARES REDUCTORES TOTALES

Este procedimiento está basado en la reacción entre el grupo reductor aldehído del azúcar y el reactivo dinitrosalicílico (DNS), que origina un compuesto coloreado (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) cuya concentración, y por tanto la del azúcar reductor presente, puede determinarse aplicando un método fotocolorimétrico, Miller (1959).

La composición del reactivo DNS es la siguiente: ácido 3,5-dinitrosalicílico, 10 g; fenol, 2 g; tartrato sódico-potásico, 200 g; sulfito sódico, 0,5 g; disolución de NaOH al 2 %, 0,5 dm³; enrasando hasta 1 litro con agua ultrapura.

El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

1. Se adicionan 3 cm³ del reactivo DNS a 2 cm³ de muestra.
2. Se calienta, en baño de agua, a unos 80-85 °C durante 10 minutos.
3. Se introduce durante 10 minutos en un baño de agua fría.
4. Se mide la absorbancia frente a un blanco a 640 nm.

La concentración de azúcares reductores totales se calcula a partir de una recta patrón realizada previamente con disoluciones de concentración conocida. Para reducir la dispersión en las determinaciones, el procedimiento seguido ha consistido en medir la absorbancia de cinco puntos de la recta patrón (los correspondientes a 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 g/dm³), cada vez que se realizaba una serie de medidas. Este método es válido para concentraciones de azúcares reductores totales comprendidas entre 0,05 y 0,50 g/dm³, por lo que para valores superiores es necesario realizar la dilución correspondiente.

3.5.4 D-GLUCOSA

A) Método enzimático de Bergmeyer *et al.* (1974). Está basado en las siguientes reacciones:



La D-glucosa es fosforilada a D-glucosa-6-fosfato (G-6-P) en presencia de la enzima hexoquinasa (HK) y de adenosin-5'-trifosfato (ATP), con la formación simultánea de ADP. En presencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), la G-6-P es oxidada por el NADP (nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato) hasta D-gluconato-6-fosfato con la formación de NADPH (forma reducida del nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato). La cantidad de NADPH formado es estequiométrica con la cantidad de D-glucosa. El NADPH se determina por medida de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm.

El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

1. Se introduce en una cubeta de 1 cm de paso de luz 1 cm³ de una disolución de reactivo (que contiene NADP, ATP y un tampón de trietanolamina de pH 7,6).
2. Se añaden 0,1 cm³ de muestra y 1,90 cm³ de agua ultrapura.
3. Transcurridos 3 minutos, se mide la absorbancia a 340 nm, A₁.
4. Se añaden 0,02 cm³ de la suspensión de enzimas (que contiene HK y G6P-DH).
5. Se completa la reacción durante 15 minutos y se mide la absorbancia, A₂.

El método es aplicable para concentraciones por debajo de 0,5 g/dm³; para valores superiores se efectúa la correspondiente dilución de la muestra. La concentración de D glucosa se calcula con la ecuación:

$$g = \frac{V_G \text{ PM}_G}{\epsilon_G \text{ D } v_G \text{ 1000}} \Delta A_G \text{ F} \quad [3.4]$$

g: concentración de D-glucosa (g/dm³)

F: factor de dilución

V_G: volumen final (cm³)

v_G: volumen de muestra (cm³)

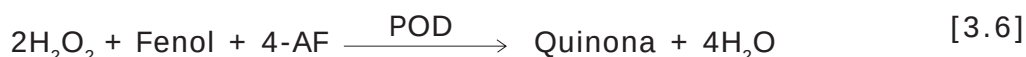
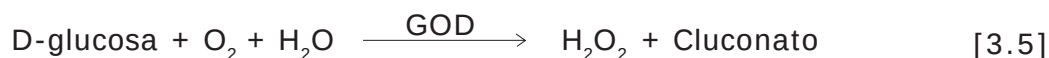
d: paso de luz (cm)

ε_G: coeficiente de absorción del NADPH a 340 nm, igual a 6,3 dm³/(mM cm)

PM_G: peso molecular de la D-glucosa (g/mol)

ΔA_G: (A₂ - A₁)_{muestra} - (A₂ - A₁)_{blanco}

B) Método enzimático de Trinder (1969). Se basa en las siguientes reacciones:



La D-glucosa es oxidada hasta gluconato por el enzima glucosa oxidasa (GOD), con la formación simultánea de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno reacciona con fenol y 4-aminofenazona (4-AF), en presencia del enzima peroxidasa (POD), formando quinona y agua. La concentración de quinona y, por tanto, la de D-glucosa presente, se determina a través de la absorbancia a una longitud de onda de 505 nm. El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

1. Se prepara la disolución de reactivo disolviendo los contenidos de dos disoluciones de partida; una primera que contiene fenol y tampón TRIS (pH=7,5) y la segunda que lleva las enzimas (GOD y POD) y 4-AF.
2. Se introducen 0,02 cm³ de muestra en una cubeta de 1 cm de paso de luz; mientras que en otra cubeta se disponen 0,02 cm³ de una disolución estándar de D-glucosa (concentración: 1 g/dm³).
3. Se añaden 2 cm³ de la disolución de reactivo.
4. Se deja completar la reacción durante 30 minutos, transcurridos los cuales se mide la absorbancia, frente a blanco del reactivo como referencia.

El método es lineal hasta concentraciones de 5 g/dm³, por lo que, para valores superiores, se realiza la dilución correspondiente. La concentración de D-glucosa se calcula mediante la ecuación:

$$g = \frac{A_m}{A_s} C_s \quad [3.7]$$

g: concentración de D-glucosa (g/dm³)

C_s: concentración del estándar (1 g/dm³)

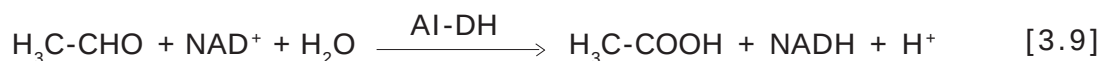
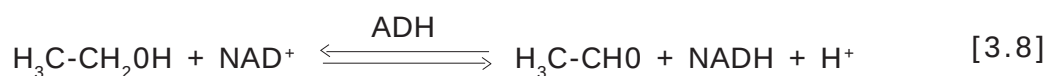
A_m: absorbancia de la muestra a 505 nm

A_s: absorbancia del estándar a 505 nm

3.5.5 ETANOL

El método enzimático empleado es el propuesto por Beutler y Michal (1977),

basado en las siguientes reacciones:



El etanol es oxidado a acetaldehído por el NAD (dinucleótido nicotinamida-adenina) mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). El equilibrio de esta reacción está desplazado hacia la derecha en condiciones alcalinas y por la retirada del acetaldehído que se forma. El acetaldehído se oxida cuantitativamente a ácido acético en presencia de la enzima acetaldehído deshidrogenasa (AI-DH). El NADH se determina por medidas de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm.

El procedimiento operatorio consta de las siguientes etapas:

1. En una cubeta de 1 cm de paso de luz se disponen 1,5 cm³ de la disolución que contiene NAD y AI-DH en un tampón de difosfato potásico de pH 9,0.
2. Se añaden 0,05 cm³ de muestra.
3. Se mide la absorbancia a 340 nm, A_1 .
4. Se añaden 0,025 cm³ de la suspensión que contiene la enzima ADH.
5. Se deja completar la reacción durante 10 minutos y se mide la absorbancia, A_2 .

El método es aplicable para concentraciones por debajo de 0,06 g/dm³; para valores superiores se realiza la correspondiente dilución de la muestra. La concentración de etanol, E en g/dm³, se calcula con la siguiente ecuación:

$$E = \frac{V_E \text{ PM}_E}{\epsilon_E d v_E 2 1000} \Delta A_E F \quad [3.10]$$

E: concentración de etanol (g/dm³)

F: factor de dilución

V_E : volumen final (cm³)

v_E : volumen de muestra (cm³)

d: paso de luz (cm)

ϵ_E : coeficiente de extinción del NADH a 340 nm, igual a 6,3 dm³/(mM cm)

PM_E : peso molecular del etanol (g/mol)

ΔA_E : $(A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$

Sustituyendo los valores de cada uno de los parámetros en la ecuación resulta:

$$E = 0,113 \Delta A_E F \quad [3.11]$$

3.5.6 XILITOL

El método enzimático empleado es el propuesto por Beutler y Becker (1977), que se basa en las siguientes reacciones:



El xilitol es oxidado a D-xilulosa por el NAD (dinucleótido nicotinamida-adenina) mediante la enzima sorbitol deshidrogenasa (SDH, también llamada polialcohol deshidrogenasa) con la formación de NADH (forma reducida del dinucleótido nicotinamida adenina). El equilibrio de esta reacción está favorecido hacia la izquierda en las condiciones de este ensayo, pero se puede desplazar hacia la formación de D-xilulosa por la retirada del NADH. El NADH reduce cuantitativamente al cloruro de iodotetrazolio (INT) ($\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{I}\text{Cl}\text{N}_5\text{O}_2$) hasta INT-Formazán ($\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{IN}_5\text{O}_2$) en presencia del enzima diaforasa. El INT-Formazán se determina por medidas de absorbancia a 492 nm.

El procedimiento consta de las siguientes etapas:

1. Se introduce en una cubeta de 1 cm de paso de luz una disolución-reactivo formada por 0,5 cm³ de un tampón fosfato potásico/trietanolamina (pH=8,6), 0,2 cm³ de una disolución de diaforasa y 0,2 cm³ de una disolución de INT.
2. Se añaden 0,1 cm³ de muestra y 1,9 cm³ de agua ultrapura.
3. Se mide la absorbancia, A_1 .
4. Se añaden 0,05 cm³ de una disolución de SDH.
5. Se deja completar la reacción durante 30 minutos y se mide la absorbancia, A_2 .

El método es lineal hasta concentraciones de 0,10 g/dm³, realizándose la dilución correspondiente para valores superiores. La concentración de xilitol se calcula con la siguiente ecuación:

$$X_i = \frac{V_{xi} \text{ PM}_{xi}}{\epsilon_{xi} d v_{xi}} \Delta A_{xi} F \quad [3.14]$$

X_i : concentración de xilitol (g/dm^3)

F : factor de dilución

V_{x_i} : volumen final (cm^3)

v_{x_i} : volumen de muestra (cm^3)

d : paso de luz (cm)

ϵ_{x_i} : coeficiente de extinción del INT-Formazán a 492 nm, igual a $19,9 \text{ dm}^3/(\text{mM cm})$

PM_{x_i} : peso molecular del xilitol (g/mol)

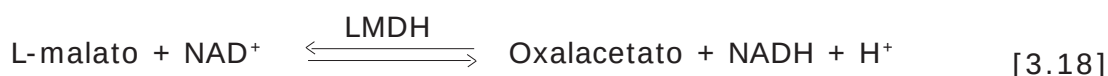
$\Delta A_{x_i} : (A_2 - A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$

Sustituyendo los valores de cada uno de los parámetros en la ecuación resulta:

$$X_i = 0,2332 \Delta A_{x_i} \quad [3.15]$$

3.5.7 ÁCIDO ACÉTICO

Su determinación se ha llevado a cabo mediante un método enzimático propuesto por Bergmeyer y Möllering (1974), basado en las siguientes reacciones:



El ácido acético pasa a acetil coenzima-A en presencia de adenosina-5'-trifosfato (ATP) y coenzima A (Co-A) mediante la enzima acetil coenzima-A sintetasa (ACS) también conocida como acetato tioquinasa, ecuación [3.16]. El acetil coenzima-A reacciona con oxalacetato en presencia de la enzima citrato sintetasa (CS) para producir citrato. El oxalato necesario en la reacción [3.17] se forma por oxidación del malato con el dinucleótido nicotinamida-adenina (NAD) que en presencia de la enzima malato deshidrogenasa (MDH) pasa a NADH. El NADH se determina por medidas de absorbancia a una longitud de onda de 340 nm.

El procedimiento es el siguiente:

1. Se introduce en una cubeta de 1 cm de paso de luz 1 cm^3 de tampón

- fosfato potásico/trietanolamina (pH=8,4) que contiene a su vez ácido málico.
2. Se adicionan 0,2 cm³ de una disolución de CoA, ATP y NAD, 1,90 cm³ de agua ultrapura y 0,10 cm³ de la muestra.
 3. Se mide la absorbancia, A₀.
 4. Se añaden 0,10 cm³ de una disolución de las enzimas MDH y CS, se agita y se dejan transcurrir 3 minutos.
 5. Se mide la absorbancia A₁.
 6. Se empieza la reacción mediante la adición de 0,02 cm³ de una disolución de ACS, se agita y se deja completar la reacción durante 15 minutos.
 7. Se mide la absorbancia A₂.

El cálculo de la concentración de ácido acético viene expresado por la ecuación:

$$Ac = \frac{V_{Ac} PM_{Ac}}{\epsilon_{Ac} d v_{Ac} 1000} \Delta A_{Ac} F \quad [3.19]$$

Ac: concentración de ácido acético (g/dm³)

F: factor de dilución

V_{Ac}: volumen final (cm³)

v_{Ac}: volumen de muestra (cm³)

d: paso de luz (cm)

ε_{Ac}: coeficiente de absorción del NADH a 340 nm, igual a 6,3 dm³/(mM cm)

PM_{Ac}: peso molecular del ácido acético (g/mol)

ΔA_{Ac} se determina mediante la expresión:

$$\Delta A_{Ac} = \left[(A_2 - A_0)_{muestra} - \frac{(A_1 - A_0)^2_{muestra}}{(A_2 - A_0)_{muestra}} \right] - \left[(A_2 - A_0)_{blanco} - \frac{(A_1 - A_0)^2_{blanco}}{(A_2 - A_0)_{blanco}} \right] \quad [3.20]$$

Sustituyendo los parámetros empleados en este caso, la ecuación [3.19] se reduce a:

$$Ac = 0,3079 \Delta A_{Ac} F \quad [3.21]$$

Este método es válido para concentraciones inferiores a 0,15 g/dm³; a concentraciones superiores es necesario realizar la dilución correspondiente.

IV. Resultados Experimentales

Los resultados experimentales obtenidos en la hidrólisis ácida de tallos de girasol y su posterior fermentación se muestran en las Tablas 4.1 a 4.64.

Todos los experimentos se han realizado con tallos de girasol procedentes de las mismas fincas, situadas en el término municipal de Mengíbar (Jaén). Los análisis efectuados a lotes de residuo recogidos en diferentes años muestran que no existe variación significativa en los contenidos de humedad, cenizas, celulosa, hemicelulosas y lignina, por lo que, a efectos comparativos, se emplea el valor medio de estos parámetros en las distintas tablas bajo el epígrafe Referencia (Ref.).

Los experimentos de hidrólisis han sido agrupados en series que se identifican con la inicial H seguida de otra correspondiente al ácido empleado (C para ácido clorhídrico, S para ácido sulfúrico); a continuación, separada por un guión, aparece otra inicial que denota la variable analizada en la serie en cuestión: P, para la serie en que se estudia la influencia del tamaño de partícula (mm); S, para el estudio de la separación del residuo en médula y cubierta; t, para el tiempo de hidrólisis (min); C, para la concentración del ácido (N); y finalmente T, para la temperatura (°C). Seguidamente aparece el número de orden del experimento dentro de cada serie.

Por lo que respecta a los experimentos de fermentación, la nomenclatura seguida es análoga. Tras la primera inicial F, la siguiente indica el microorganismo empleado (F para *Fusarium oxysporum*, P para *Pachysolen tannophilus*). A continuación, seguida por un guión, aparece la identificación del hidrolizado que se fermenta (con la misma nomenclatura utilizada en el apartado de hidrólisis) o bien, para el caso de fermentación de azúcares puros, un número característico.

4.1 Hidrólisis

4.1 HIDRÓLISIS

En las Tablas 4.1 a 4.18 se muestran los resultados correspondientes a los experimentos de hidrólisis ácida, clasificados atendiendo a la variable estudiada. En las series experimentales realizadas se ha analizado la influencia de diferentes parámetros en el proceso de hidrólisis:

- “ Tamaño de partícula. Los tallos de girasol se someten a un proceso de reducción de tamaño y posteriormente se clasifican mediante una vibradora provista de distintos tamices, con lo que se generan las fracciones de tamaño de partícula empleadas, variando éstas entre 0,125 y 2 mm.
- “ Separación de médula y cubierta. En una serie de experimentos se han hidrolizado separadamente las dos partes claramente diferenciadas que constituyen los tallos de girasol (apartado 3.3.1): la parte interna o médula y la parte exterior o cubierta.
- “ Tiempo de proceso. La influencia del tiempo de hidrólisis en la concentración de azúcares obtenida se ha estudiado realizando el proceso con duración variable entre 0 y 240 minutos.
- “ Naturaleza y concentración del ácido. Se han empleado los dos ácidos minerales de mayor utilización en los procesos hidrolíticos, el clorhídrico y el sulfúrico, a distintas concentraciones.
- “ Temperatura de hidrólisis. Para cada ácido, se han realizado hidrólisis entre 70 y 100 °C.

En las tablas correspondientes a los experimentos de hidrólisis figuran, para los distintos tiempos en los que se han tomado muestras, los valores de la concentración de azúcares reductores totales y de D-glucosa, s y g, respectivamente, en g/dm³, por lo que se refiere al hidrolizado. También se han realizado algunos análisis para determinar D-fructosa, sin que se hayan obtenido concentraciones apreciables.

En lo que respecta al residuo sólido de la hidrólisis, las tablas recogen los contenidos en humedad, cenizas, hemicelulosa, celulosa y lignina determinados según se describe en el apartado 3.5.1 de esta Memoria, y se comparan con los contenidos del residuo agrícola original (Ref.). El análisis de extractos sólo se ha realizado para el residuo de partida, resultando valores alrededor del 5 % sobre materia seca. En todos los casos, los resultados correspondientes de la caracterización del residuo sólido se han calculado como el valor medio de dos determinaciones.

4.1.1 TAMAÑO DE PARTÍCULA

En las Tablas 4.1 y 4.2 se muestran las concentraciones en función del tiempo de azúcares reductores totales y D-glucosa, respectivamente, obtenidas en la hidrólisis ácida de la serie en la que se estudia la influencia del tamaño de partícula. Los valores ensayados, que aparecen seguidamente junto a la clave empleada para designar los experimentos, corresponden a los de la luz de los tamices empleados en la clasificación del residuo después de ser sometido a un proceso de trituración en molino de cuchillas.

Expto.	Tamaño de partícula, mm
HS-P1	0,125-0,300
HS-P2	0,300-0,425
HS-P3	0,425-0,600
HS-P4	0,600-0,850
HS-P5	0,850-1,200
HS-P6	1,200-1,600
HS-P7	1,600-2,000

El resto de variables han sido fijadas en los siguientes valores: naturaleza del ácido (sulfúrico), concentración (1 N), temperatura de hidrólisis (90 °C), relación L/S (15), tiempo (240 min).

La concentración de azúcares reductores totales aumenta a medida que lo hace el tiempo de hidrólisis (Tabla 4.1), obteniéndose los valores más elevados para el experimento en que se emplean tamaños de partícula comprendidos entre 0,425 y 0,6 mm. Por su parte, la concentración de D-glucosa es prácticamente nula en todos los experimentos de la serie, si bien se detecta un ligero aumento con el tiempo (Tabla 4.2).

TABLA 4.1
HIDRÓLISIS ÁCIDA. TAMAÑO DE PARTÍCULA
Caracterización del hidrolizado
(H₂SO₄) = 1N T_H = 90 °C
Azúcares reductores totales (s, g/dm³)

t, min	HS-P1	HS-P2	HS-P3	HS-P4	HS-P5	HS-P6	HS-P7
0	0,630	0,654	0,622	0,349	0,392	0,277	0,194
5	0,964	0,899	0,891	0,470	0,621	0,359	0,250
15	1,89	1,46	1,40	1,63	1,56	1,37	
30	2,50	2,28	2,24	2,30	2,19	1,95	1,83
60	3,88	4,20	4,05	3,74	3,56	3,28	3,16
90	4,91	6,42	5,81	5,13	5,21	4,74	4,72
120	6,11		6,25	6,40	6,30	6,17	5,79
150	6,64	7,92	7,43	7,05	7,20	6,77	6,66
180	7,51	8,41	8,19	7,80	7,75	7,57	7,38
210	8,37	8,82	9,49	8,37	8,33	8,02	7,94
240	8,54	9,24	10,3	8,74	8,99	8,95	8,57

TABLA 4.2
HIDRÓLISIS ÁCIDA. TAMAÑO DE PARTÍCULA
Caracterización del hidrolizado
[H₂SO₄] = 1 N T_H = 90 °C
D-glucosa (g, g/dm³)

t, min	HS-P1	HS-P2	HS-P3	HS-P4	HS-P5	HS-P6	HS-P7
0	0,0	0,0	0,01	0,01	0,03	0,04	0,03
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,02	0,03	0,03
15	0,01	0,0	0,0	0,02	0,03	0,04	0,03
30	0,01	0,0	0,02	0,01	0,01	0,03	0,02
60	0,04	0,01	0,03	0,04	0,03	0,06	0,05
90	0,06	0,03	0,05	0,04	0,05	0,07	0,06
120	0,07	0,09	0,05	0,06	0,06	0,09	0,07
150	0,08	0,06	0,07	0,07	0,09	0,10	0,09
180	0,13	0,09	0,09	0,08	0,10	0,11	0,10
210	0,16	0,11	0,08	0,11	0,10	0,13	0,12
240	0,16	0,11	0,11	0,10	0,11	0,14	0,12

4.1.2 SEPARACIÓN DE MÉDULA Y CUBIERTA

En las Tablas 4.3 y 4.4 se recogen los resultados experimentales correspondientes a hidrólisis efectuadas con ácido sulfúrico en concentración 1 N, a 90 °C y durante 240 minutos sobre la parte externa del tallo de girasol (expto. HS-S1) y sobre la parte interna o médula (exptos. HS-S2 y HS-S3) separadamente.

Las capacidades de humectabilidad y absorción de agua de las dos partes del tallo de girasol son muy distintas, lo que motiva la utilización de una relación líquido/sólido diferente en estos experimentos. Así, la estructura fibrosa de la cubierta o parte exterior permite el empleo de una relación L/S de 10 (expto. HS-S1); este valor es suficiente para lograr una buena agitación y homogeneización de la mezcla residuo-disolución. Sin embargo, la médula tiene una gran capacidad de absorción de disolución acuosa, por lo que, para garantizar una buena operación en el reactor es necesario recurrir a elevadas relaciones L/S, habiéndose utilizado los valores de 75 (expto. HS-S2) y 50 (expto. HS-S3).

TABLA 4.3
HIDRÓLISIS ÁCIDA:
SEPARACIÓN DE MÉDULA Y CUBIERTA
Caracterización del hidrolizado
[H₂SO₄] = 1 N T_H = 90 °C
Azúcares reductores totales (s, g/dm³)

t, min	HS-S1	HS-S2	HS-S3
0	0,590	0,422	0,526
5	0,977		0,590
15	1,46	0,430	0,703
30	2,35	0,470	0,808
60	4,87	0,607	0,977
90	6,99	0,719	1,11
120	9,30	0,742	1,23
150	11,0	0,802	1,31
180	12,6	0,856	1,40
210	13,3	0,924	1,48
240	14,1	0,984	1,58

TABLA 4.4
HIDRÓLISIS ÁCIDA:
SEPARACIÓN DE MÉDULA Y CUBIERTA
Caracterización del hidrolizado
[H₂SO₄] = 1 N T_H = 90°C
D-glucosa (g,g/dm³)

t, min	HS-S1	HS-S2	HS-S3
0	0,04	0,05	0,03
5	0,02		
15	0,04	0,03	0,02
30	0,04		0,03
60	0,07	0,03	
90	0,07		
120	0,09	0,05	0,04
150	0,11		
180	0,13	0,05	0,05
210	0,14		0,06
240	0,15	0,06	0,06

A partir de los resultados obtenidos puede constatar, por una parte, que la parte fibrosa del tallo proporciona una concentración de azúcares reductores totales muy superior a la médula, incluso considerando los diferentes valores de la relación L/S empleados. Por otra parte, la cantidad de D-glucosa obtenida en ambas fracciones es muy pequeña. Finalmente, se detecta también, al igual que en la serie anterior, un aumento en las concentraciones en función del tiempo de hidrólisis.

4.1.3 TIEMPO DE PROCESO

Los resultados de la serie en la que se ha modificado el tiempo de hidrólisis se muestran en las Tablas 4.5 y 4.6. Las condiciones comunes a esta serie incluyen la utilización de ácido sulfúrico 1 N y una temperatura de 90 °C, así como una relación L/S de 15 y un tamaño de partícula comprendido entre 0,425 y 0,600 mm.

Los valores de tiempo de hidrólisis ensayados, junto a la nomenclatura de los experimentos, se muestran a continuación:

Expto.	Tiempo de proceso, min	Expto.	Tiempo de proceso, min
HS-t1	0	HS-t4	120
HS-t2	30	HS-t5	180
HS-t3	60		

En las tablas aparecen también los resultados obtenidos en el experimento HS-P3, realizado en idénticas condiciones a los restantes de esta serie, pero con un tiempo de proceso de 240 minutos.

La evolución temporal de la concentración de azúcares reductores totales presentes en el hidrolizado se muestra en la Tabla 4.5, encontrándose, como era de esperar, que dicha concentración aumenta a medida que lo hace el tiempo de hidrólisis. Incluso para el tiempo máximo ensayado (240 minutos) no se detecta estancamiento ni disminución en la generación de azúcares.

La Tabla 4.6 recoge la composición del residuo sólido, expresada en porcentaje referido a materia seca (MS), indicándose los valores de humedad (HUM), cenizas (CEN), hemicelulosas (HEM), celulosa (CEL) y lignina (LIG). Como puede observarse, no existe una variación significativa de los contenidos en humedad y cenizas en función del tiempo de hidrólisis; en comparación con la materia inicial, el residuo hidrolizado conserva aproximadamente la misma humedad (dependiente de las condiciones atmosféricas de la época del año), mientras que el contenido en cenizas es prácticamente nulo tras el proceso. En cuanto a la evolución de los polímeros fundamentales, se detecta una disminución progresiva del contenido en hemicelulosas a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis, lo que provoca una elevación de los porcentajes de celulosa y lignina.

TABLA 4.5
HIDRÓLISIS ÁCIDA: TIEMPO DE PROCESO

Caracterización del hidrolizado

$[H_2SO_4] = 1\text{ N}$ $T_H = 90\text{ }^\circ\text{C}$

Azúcares reductores totales (s, g/dm³)

t, min	HS-t1	HS-t2	HS-t3	HS-t4	HS-t5	HS-P3
0	0,655	0,750	0,870	0,955	0,587	0,622
5					0,979	0,891
15			1,54		1,32	1,40
30		1,93	1,98	2,16	1,85	2,24
60			3,23	3,02	2,73	4,05
90				4,36	4,02	5,81
120				5,81	5,49	6,25
150					6,43	7,43
180					7,45	8,19
210						9,49
240						10,3

TABLA 4.6
HIDRÓLISIS ÁCIDA: TIEMPO DE PROCESO
Caracterización del residuo (% MS)

	[H ₂ SO ₄] = 1 N		T _H = 90 °C		
t, min	HUM	CEN	HEM	CEL	LIG
Ref.	7,6	3,4	20,4	49,9	14,0
0	8,4	0,09	19,2	56,7	15,8
30	8,1	0,10	16,5	57,7	16,6
60	7,8	0,10	13,1	58,7	18,1
120	7,6	0,09	10,2	60,1	19,7
180	7,4	0,13	5,06	63,9	20,9
240	6,7	0,12	2,64	65,3	21,2

4.1.4 NATURALEZA Y CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO

En las Tablas 4.7 a 4.12 figuran los resultados obtenidos en los experimentos en los que se modificó el ácido empleado en la hidrólisis así como su concentración. Todos los experimentos se han realizado a 90 °C, con una duración del proceso de 240 minutos y empleando la fracción del residuo original de un tamaño de partícula comprendido entre 0,425 y 0,600 mm. Las equivalencias entre la nomenclatura de los experimentos y la naturaleza y concentración del ácido se muestran seguidamente:

ácido sulfúrico		ácido clorhídrico	
Expto.	C _A , N	Expto.	C _A , N
HS-C1	0,1	HC-C1	0,1
HS-C2	0,5	HC-C2	0,3
HS-P3	1,0	HC-C3	0,5
HS-C4	2,0	HC-C4	0,75
		HC-C5	1,0
		HC-C6	2,0

El experimento HS-P3 es común a la serie de tamaño de partícula, por lo que, para evitar repeticiones, adopta la nomenclatura propia de aquélla.

En cuanto a la naturaleza del ácido empleado en la hidrólisis, puede deducirse que el ácido clorhídrico proporciona en todos los casos una concentración superior de azúcares reductores totales para un mismo tiempo de proceso que cuando se

utiliza ácido sulfúrico. Con ambos ácidos, y al igual que en series anteriores, estas concentraciones aumentan a medida que avanza el proceso y la concentración del ácido. Este comportamiento se repite en relación a las concentraciones de D-glucosa, aunque estas son siempre mucho menores que las correspondientes de azúcares reductores totales.

Por lo que respecta al análisis del residuo sólido (Tablas 4.11 y 4.12), puede destacarse que el ataque del ácido clorhídrico es superior al del sulfúrico, como lo muestra el hecho de que la proporción de hemicelulosas residual se anula con el primer ácido para concentraciones iguales o superiores a 0,75 N, mientras que con ácido sulfúrico esto sólo sucede con la máxima concentración ensayada (2 N). Por su parte, los contenidos en cenizas se reducen significativamente en comparación con la materia original, siendo ligeramente superiores cuando se emplea ácido sulfúrico.

TABLA 4.7
HIDRÓLISIS CON H_2SO_4 : CONCENTRACIÓN

Caracterización del hidrolizado				
Azúcares reductores totales (s, g/dm ³)				
t, min	HS-C1	HS-C2	HS-P3	HS-C4
0	0,217	0,700	0,622	0,763
5	0,273	1,06	0,891	1,26
15	0,328	1,47	1,40	2,14
30	0,450	1,69	2,24	3,62
60	0,581	2,14	4,05	6,82
90	0,697	2,39	5,81	8,15
120	0,838	2,88	6,25	9,07
150	0,900	3,66	7,43	9,84
180	1,04	4,13	8,19	10,6
210	1,15	4,43	9,49	10,4
240		5,17	10,3	11,0

TABLA 4.8
HIDRÓLISIS CON H_2SO_4 : CONCENTRACIÓN
Caracterización del hidrolizado

D-glucosa (g, g/dm ³)				
t, min	HS-C1	HS-C2	HS-P3	HS-C4
0	0,02	0,07	0,01	0,05
5			0,0	0,05
15	0,02		0,0	0,06
30		0,06	0,02	0,07
60	0,03	0,08	0,03	0,10
90			0,05	0,13
120	0,02	0,07	0,05	0,13
150			0,07	0,15
180	0,03	0,10	0,09	0,17
210			0,08	0,19
240	0,02	0,11	0,11	0,20

TABLA 4.9
HIDRÓLISIS CON HCl: CONCENTRACIÓN
Caracterización del hidrolizado

Azúcares reductores totales (s, g/dm ³)						
t, min	HC-C1	HC-C2	HC-C3	HC-C4	HC-C5	HC-C6
0	0,242	0,468	0,519	0,595	0,888	2,00
5	0,341	0,773	1,03	1,02	1,57	4,92
15	0,528	0,985	1,54	2,38	4,33	8,67
30	0,770	1,51	2,97	4,66	7,41	10,8
60	0,938	2,58	4,97	7,93	9,43	12,4
90	1,20	4,02	6,80	9,42	10,9	13,4
120	1,50	5,11	8,23	10,5	11,7	14,4
150	1,52	6,28	9,21	11,1	12,7	15,1
180	1,82	7,05	9,52	11,6	13,4	16,0
210	2,15	7,97	9,86	12,2	13,8	16,0
240	2,39	8,84	11,2	12,6	14,5	16,2

TABLA 4.10
HIDRÓLISIS CON HCl: CONCENTRACIÓN
Caracterización del hidrolizado

D-glucosa (g, g/dm ³)						
t, min	HC-C1	HC-C2	HC-C3	HC-C4	HC-C5	HC-C6
0	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,03
30	0,02	0,03	0,02	0,06	0,07	0,12
60	0,03	0,04	0,04	0,08	0,11	0,19
120	0,02	0,04	0,06	0,11	0,18	0,27
180	0,02	0,06	0,08	0,14	0,19	0,27
240	0,03	0,07	0,09	0,17	0,23	0,35

TABLA 4.11
HIDRÓLISIS CON H₂SO₄: CONCENTRACIÓN
Caracterización del residuo (% MS)

C _A , N	HUM	CEN	HEM	CEL	LIG
Ref.	7,6	3,4	20,4	49,9	14,0
0,1	7,9	0,31	19,7	58,7	14,1
0,5	6,4	0,16	9,93	61,4	19,0
1,0	6,7	0,12	2,64	65,3	21,2
2,0	7,4	0,06	0,0	67,6	24,5

TABLA 4.12
HIDRÓLISIS CON HCl: CONCENTRACIÓN
Caracterización del residuo (% MS)

C _A , N	HUM	CEN	HEM	CEL	LIG
Ref.	7,6	3,4	20,4	49,9	14,0
0,1	6,2	0,06	14,6	59,4	16,4
0,3	5,9	0,06	5,06	64,6	21,0
0,5	5,7	0,11	1,54	67,2	22,2
0,75	6,6	0,05	0,0	68,3	23,9
1,0	4,6	0,14	0,0	69,3	24,4
2,0	5,5	0,11	0,0	70,8	25,6

4.1.5 TEMPERATURA DE HIDRÓLISIS

En esta serie experimental se han realizado hidrólisis con los ácidos clorhídrico (en concentración 0,5 N) y sulfúrico (en concentración 1 N). Las restantes variables de operación comunes se han mantenido en un tiempo de hidrólisis de 240 minutos, una relación L/S de 15 y la utilización de la fracción del residuo original con tamaño de partícula comprendido entre 0,425 y 0,600 mm. Los resultados se muestran en las Tablas 4.13 a 4.18. La equivalencia de nomenclatura de los experimentos se recoge a continuación:

ácido sulfúrico		ácido clorhídrico	
Expto.	T _H , °C	Expto.	T _H , °C
HS-T1	70	HC-T1	70
HS-T2	80	HC-T2	80
HS-P3	90	HC-C3	90
HS-T4	95	HC-T4	100
HS-T5	100		

De la comparación de los resultados mostrados en las Tablas 4.13 y 4.15 puede deducirse que la elevación de la temperatura provoca un aumento en la concentración de azúcares reductores totales, tanto para el ácido clorhídrico como para el sulfúrico, aunque el valor máximo se detecta cuando se utiliza el primero, incluso aunque la concentración empleada sea la mitad.

En cuanto a la evolución del contenido en hemicelulosa, Tablas 4.17 y 4.18, el ataque es más efectivo con ácido clorhídrico, excepto a temperaturas de 100 °C, a la que el ácido sulfúrico provoca la hidrólisis total de esta fracción, restando un valor prácticamente nulo para el caso del clorhídrico.

TABLA 4.13
HIDRÓLISIS CON H_2SO_4 : TEMPERATURA DE PROCESO
Caracterización del hidrolizado

t, min	Azúcares reductores totales (s, g/dm ³)				
	HS-T1	HS-T2	HS-P3	HS-T4	HS-T5
0	0,443	0,552	0,622	0,501	0,590
5	0,536	0,680	0,891		1,45
15	0,615	0,887	1,40	1,63	2,53
30	0,786	1,19	2,24	2,88	4,84
60	0,861	1,48	4,05	5,59	7,98
90	1,03	1,78	5,81	7,58	9,81
120	1,09	2,18	6,25	8,98	10,5
150	1,13	2,46	7,43	10,2	11,7
180	1,25	3,01	8,19	10,5	12,2
210	1,38	3,58	9,49	11,2	12,9
240	1,52	3,81	10,3	12,1	13,4

TABLA 4.14
HIDRÓLISIS CON H_2SO_4 : TEMPERATURA DE PROCESO
Caracterización del hidrolizado

t, min	D-glucosa (g, g/dm ³)				
	HS-T1	HS-T2	HS-P3	HS-T4	HS-T5
0	0,03	0,03	0,01	0,01	
5			0,0		
15			0,0		
30	0,03	0,04	0,02	0,03	
60	0,04	0,04	0,03	0,05	0,08
90			0,05		
120	0,04	0,05	0,05	0,08	0,13
150			0,07		
180	0,05	0,06	0,09	0,13	0,18
210			0,08		
240	0,04	0,06	0,11	0,16	0,20

TABLA 4.15
HIDRÓLISIS CON HCl: TEMPERATURA DE PROCESO

Caracterización del hidrolizado				
Azúcares reductores totales (s, g/dm ³)				
t, min	HC-T1	HC-T2	HC-C3	HC-T4
0	0,229	0,384	0,519	1,03
5	0,290	0,408	1,03	1,97
15	0,360	0,578	1,54	3,68
30	0,471	0,752	2,97	6,23
60	0,674	1,24	4,97	8,76
90	0,850	2,09	6,80	11,2
120	1,09	2,75	8,23	12,4
150	1,28	3,43	9,21	13,4
180	1,50	4,16	9,52	14,1
210	1,76		9,86	14,7
240	2,02	5,58	11,2	15,2

TABLA 4.16
HIDRÓLISIS CON HCl: TEMPERATURA DE PROCESO

Caracterización del hidrolizado				
D-glucosa (g, g/dm ³)				
t, min	HC-T1	HC-T2	HC-C3	HC-T4
0	0,02	0,02	0,01	0,03
30	0,03	0,03	0,02	0,07
60	0,04	0,04	0,04	0,11
120	0,03	0,05	0,06	0,18
180	0,04	0,06	0,08	0,23
240	0,04	0,07	0,09	0,26

TABLA 4.17
HIDRÓLISIS CON H_2SO_4 : TEMPERATURA DE PROCESO
Caracterización del residuo (% MS)

C_A , N	HUM	CEN	HEM	CEL	LIG
Ref.	7,6	3,4	20,4	49,9	14,0
70	8,0	0,12	16,7	57,1	16,3
80	8,7	0,09	11,3	61,6	17,8
90	6,7	0,12	2,64	65,3	21,2
95	4,6	0,08	1,60	66,9	22,9
100	6,3	0,05	0,0	69,5	24,2

TABLA 4.18
HIDRÓLISIS CON HCl: TEMPERATURA DE PROCESO
Caracterización del residuo (% MS)

C_A , N	HUM	CEN	HEM	CEL	LIG
Ref.	7,6	3,4	20,4	49,9	14,0
70	7,0	0,10	12,1	60,9	16,0
80	7,5	0,08	6,96	62,9	18,6
90	5,7	0,11	1,54	67,2	22,2
100	4,8	0,11	0,619	68,8	24,8

4.2 Fermentación

4.2 FERMENTACIÓN

En las Tablas 4.19 a 4.64 se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de fermentación, clasificados en dos grupos que corresponden a fermentaciones sobre sustrato sintético y a fermentaciones de los hidrolizados descritos en el punto 4.1. En ambos grupos de experimentos se han utilizado los dos microorganismos, *Pachysolen tannophilus* y *Fusarium oxysporum*.

A lo largo de los cultivos y a diferentes tiempos, se han determinado las concentraciones en g/dm³ de biomasa, x, azúcares reductores totales, s, D-glucosa, g, etanol, E, xilitol, Xi, y ácido acético, Ac. Las correspondientes representaciones gráficas frente al tiempo se muestran en las Figuras 4.1 a 4.46. Igualmente, se ha medido la variación del pH de los cultivos con el tiempo. En los casos en que se ha producido desviación respecto del valor inicial, se ha controlado el pH mediante la adición periódica de disoluciones de HCl o NaOH.

4.2.1 FERMENTACIÓN EN MEDIO SINTÉTICO

4.2.1.1 *Pachysolen tannophilus*

Las Tablas 4.19 a 4.22 muestran los resultados experimentales obtenidos en la fermentación con *P. tannophilus* sobre medio sintético. Se han mantenido constantes el pH inicial (3,5), la temperatura (30 °C) y la agitación (500 rpm).

Se han realizado cuatro experimentos, en los que se ha modificado la concentración inicial de diferentes sustratos, introduciendo el ácido acético con el objetivo de estudiar el efecto inhibitorio sobre los cultivos.

Expto.	Concentración inicial de sustratos, g/dm ³
FP-1	D-xilosa, 25
FP-2	D-xilosa, 10; D-glucosa, 10; ácido acético, 5
FP-3	D-glucosa, 15; ácido acético, 10
FP-4	ácido acético, 10

En el experimento realizado con 5 g/dm³ de ácido acético (FP-2) puede observarse una ralentización tanto en el consumo de los sustratos como en la formación de bioproductos, en comparación con la fermentación en ausencia de este componente, resultando unos tiempos de experimento considerablemente mayores. Además, se produce también una asimilación de ácido acético, aunque sin llegar a su consumo total.

Al incrementar la concentración inicial de ácido acético (experimentos FP-3 y FP-4), no se produce consumo de sustrato ni formación de productos durante un largo periodo de tiempo (indicado en las tablas como 1ª Etapa), por lo que se optó por diluir con medio de cultivo fresco al doble del volumen restante (2ª Etapa). Finalmente, puesto que persistía la inutilización del sustrato y la formación de productos, se volvió a inocular el cultivo con células de *P. tannophilus* en la misma concentración inicial (0,025 g/dm³), momento a partir del cual se detectó el comienzo del crecimiento celular en ambos experimentos (3ª Etapa).

Cuando se empleó D-glucosa se observó también la asimilación de la misma con la consiguiente formación de etanol, así como el consumo del ácido acético. Para el experimento FP-4, donde sólo se utilizó ácido acético como sustrato, se produce su consumo, aunque en un tiempo mayor, y sin formación de etanol.

En cuanto al pH de los cultivos, se produce una ligera bajada con el tiempo en el experimento con D-xilosa pura, mientras que en los que se utilizó ácido acético se observa una leve subida. En ambos casos se ha corregido con disoluciones de HCl o NaOH cuando la desviación ha sido superior a 0,4 unidades.

TABLA 4.19

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL

Expto. FP-1			D-xilosa, 25 g/dm ³	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0149	25,0		
2	0,0182			
5	0,0360			
7	0,0602			
9	0,0897			
12	0,169	24,8	0,030	
20	0,318	23,6		
24	0,397	23,1	0,151	
28	0,462	22,3		
34	0,539	21,7	0,299	0,703
45	0,768	20,1	0,543	
50	0,832			
56	0,889	18,6	0,739	1,61
69	1,17	16,1	1,25	
73	1,22	15,2		
81	1,31	13,4	1,54	2,85
93	1,47	10,8	2,34	
105	1,63	7,39	2,77	4,12
121	1,84	3,07	4,37	4,38
144	2,06	0,254	4,86	4,43
165	2,14	0,233	3,88	4,33
191	2,21	0,262	4,56	

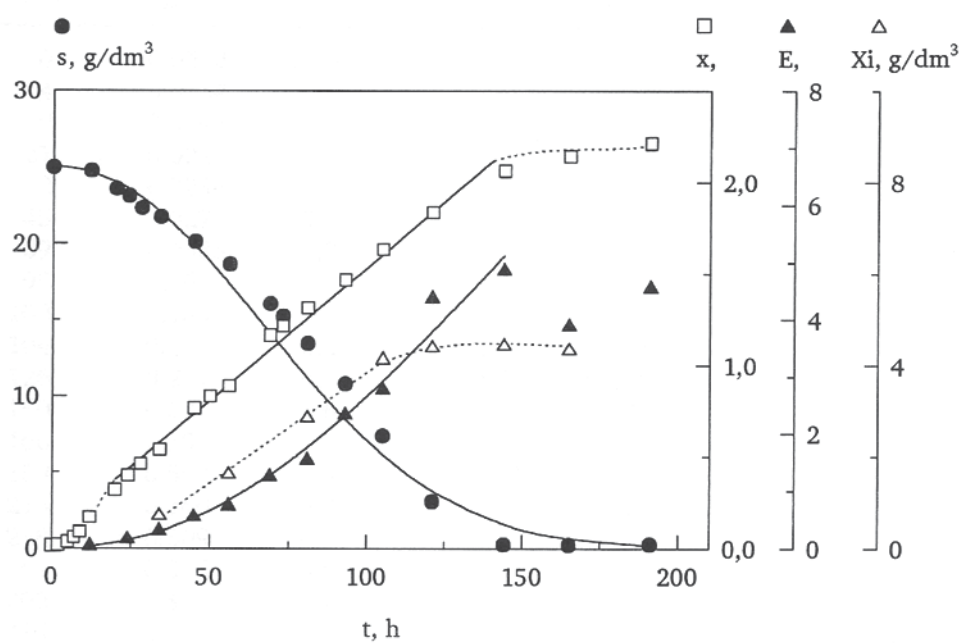


Figura 4.1 Expto. FP-1. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.20

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP-2		D-xilosa, 10 g/dm ³ ; D-glucosa, 10 g/dm ³ ; Ac, 5 g/dm ³				
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,0243	20,0	10,0			5,00
4	0,0234					
9	0,0244					
21	0,0247					4,51
32	0,0258					
45	0,0271	19,3	9,12			
69	0,0335	19,3	9,63			
95	0,104	19,0	8,99			4,28
100	0,133					
104	0,146	18,5	8,24	0,185		
126	0,212	18,0	7,67	0,486		4,30
150	0,370	15,6	5,35	1,62		
166	0,552	11,0	1,12	3,97		3,31
189	0,593	9,52	0,050	4,20		
214	0,560	9,44		4,49		2,90
238	0,509	8,93			0,083	
261	0,536	8,61		4,30	0,089	2,61
292	0,565	7,21				
334	0,615	7,11				1,85
359	0,643	6,29			0,118	
383	0,695	5,83		4,81		1,31
406	0,751	4,67			0,134	
429	0,891	4,43		5,29		1,12
462	0,928	3,54			0,124	
502	0,949	2,48				1,33
533	0,914	1,64			0,117	1,88
575	0,935	1,08				2,41
600	0,920	0,725			0,108	2,66
625	0,929	0,718				1,79

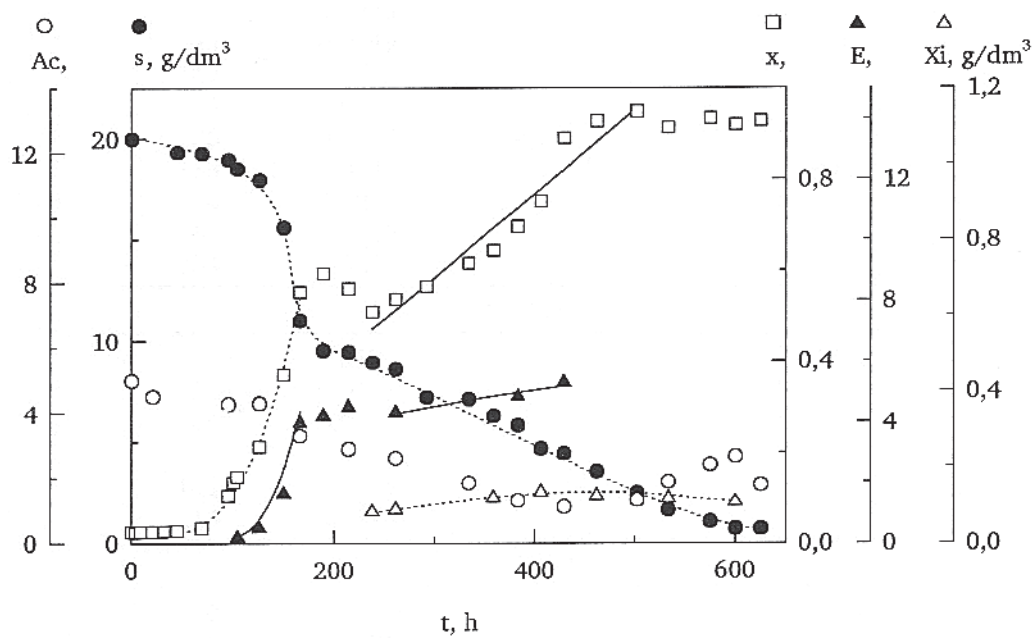


Figura 4.2 Expto. FP-2. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total y ácido acético.

TABLA 4.21

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP-3 (1ª ETAPA)		D-glucosa, 15 g/dm ³ ; Ac, 10 g/dm ³		
t, h	x, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,0239	15,0		9,51
4	0,0247			
9	0,0250			
21	0,0251			8,85
32	0,0248			
45	0,0249	13,7		9,61
69	0,0242			
95	0,0217			
126	0,0228	14,7		
166	0,0235	13,9		9,05
214	0,0214			
261	0,0226	14,2		8,38
334	0,0233			
(2ª ETAPA)				
0	0,0124	8,39		4,06
22	0,0117			
45	0,0124			
68	0,0123			
141	0,0115			
214	0,0126			
(3ª ETAPA)				
0	0,0325	8,39		4,18
20	0,0303			
45	0,0318			
89	0,108	7,34		
113	0,137	6,96		
137	0,185	6,64	0,359	
162	0,257	5,83	0,607	2,99
186	0,388	3,02	1,98	2,84
218	0,473	0,0	3,60	2,29
256	0,492	0,121	3,74	
306	0,544		2,53	1,70
355	0,518			1,13
426	0,675			0,262
473	1,22			0,0

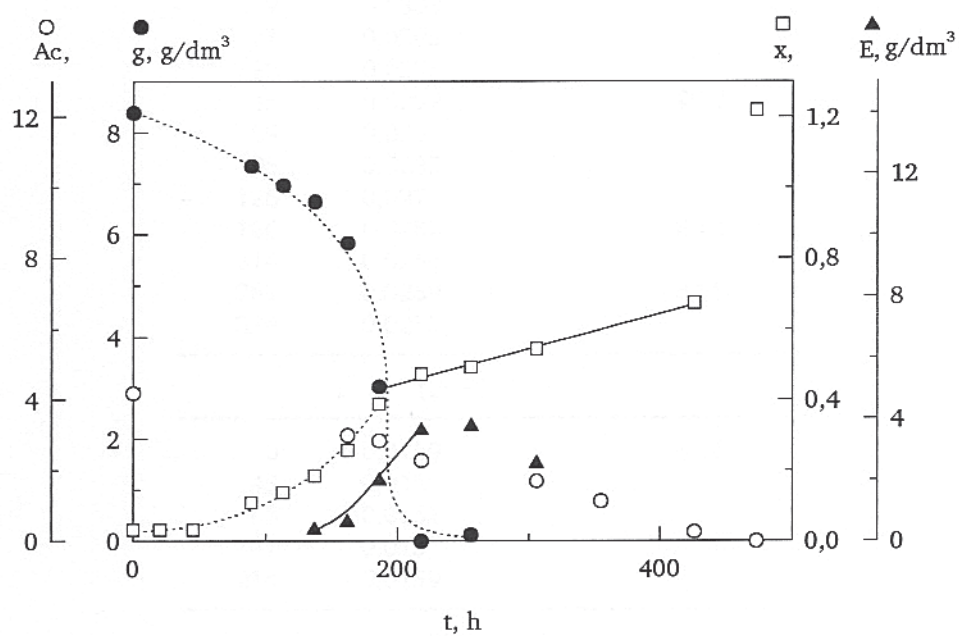


Figura 4.3 Expto. FP-3 (3ª ETAPA). Producción de biomasa y etanol. D-glucosa y ácido acético.

TABLA 4.22

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP-4 (1ª ETAPA)			Ac, 10 g/dm ³
t, h	x, g/dm ³	E, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,0300		9,48
4	0,0293		
9	0,0303		
21	0,0295		
32	0,0296		
45	0,0292		9,32
69	0,0285		
95	0,0285		
126	0,0277		
166	0,0282		8,44
214	0,0268		
261	0,0289		8,85
334	0,0283		
(2ª ETAPA)			
0	0,0139		4,16
45	0,0150		
68	0,0151		
141	0,0157		
214	0,0159		
(3ª ETAPA)			
0	0,0362		4,03
20	0,0360		
45	0,0368		
89	0,127		3,85
113	0,174		3,20
137	0,238		1,66
162	0,261		
186	0,281	0,023	1,05
218	0,313		
256	0,461		0,642
306	0,631		0,0

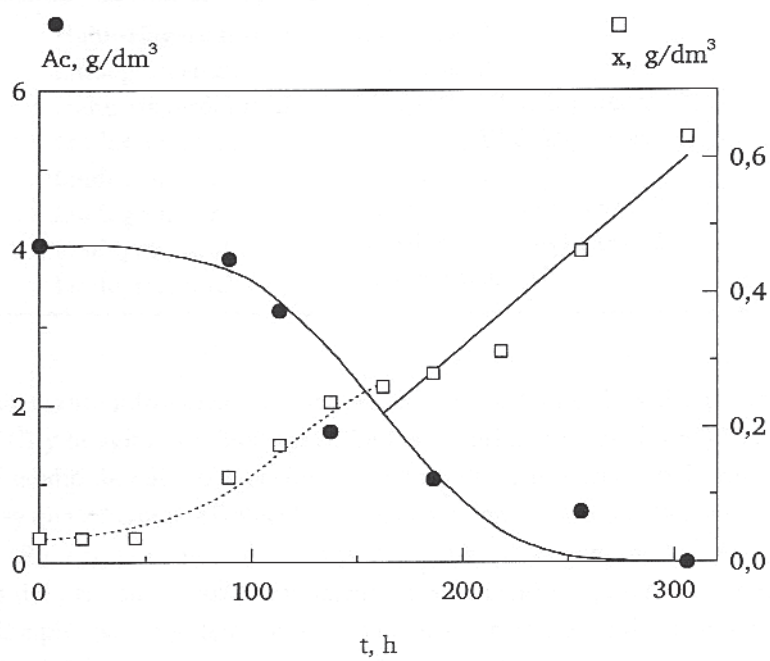


Figura 4.4 Expto. FP-4 (3ª ETAPA). Producción de biomasa. Ácido acético.

4.2.1.2 Fermentación con *Fusarium oxysporum*

Los experimentos de fermentación sobre medio sintético con *F. oxysporum*, cuyos resultados aparecen en las Tablas 4.23 a 4.30, se han realizado con dos medios de cultivo diferentes, descritos en el apartado 3.3.4.3 de esta Memoria. Uno de ellos es específico para este microorganismo, Hahn-Hägerdal *et al.* (1994a), y otro típico del cultivo de levaduras, propuesto por Lindegren *et al.* (1958). La nomenclatura y concentración inicial de sustratos de los experimentos han sido las siguientes:

Expto.	Medio de cultivo	Concentración inicial de sustratos, g/dm ³
FF-1	Hahn-Hägerdal <i>et al.</i>	D-xilosa, 25
FF-2	Lindegren <i>et al.</i>	D-xilosa, 25
FF-3	Hahn-Hägerdal <i>et al.</i>	D-xilosa, 12,5; D-glucosa, 12,5
FF-4	Lindegren <i>et al.</i>	D-xilosa, 12,5; D-glucosa, 12,5
FF-5	Lindegren <i>et al.</i>	D-glucosa, 25
FF-6	Lindegren <i>et al.</i>	D-xilosa, 20; D-glucosa, 5
FF-7	Lindegren <i>et al.</i>	D-xilosa, 24; D-glucosa, 1
FF-8	Lindegren <i>et al.</i>	D-arabinosa, 25

Se han mantenido constantes los valores del pH inicial (4,5), la temperatura del cultivo (30 °C) y la agitación (500 rpm). En los experimentos FF-1 y FF-3 en los que se ha utilizado un medio de cultivo específico, se va produciendo una subida rápida del pH, de forma que hay que adicionar disolución de HCl para controlarlo prácticamente en cada toma de muestra. En cambio, en los cultivos suplementados con medio de Lindegren, las desviaciones del pH son menos pronunciadas, produciéndose generalmente una bajada del mismo al principio, para mantenerse prácticamente constante o subir ligeramente a tiempos cercanos al final del experimento. Para mantener el pH cercano al inicial se han adicionado disoluciones de NaOH o HCl cuando la variación ha sido superior a 0,5 unidades.

En principio según se desprende de la comparación de los resultados, no existe una diferencia significativa en la utilización de uno u otro medio de cultivo, en cuanto al consumo de sustratos o formación de bioproductos. Sin embargo, la tendencia al aumento del pH detectada en los experimentos realizados con el medio de Hahn-Hägerdal, podría facilitar la contaminación de los mismos. Estos hechos, unidos a la mayor complejidad de este medio, hace que sea preferible el cultivo con el medio propuesto por Lindegren. Desde el punto de vista de su utilización industrial, también sería recomendable el uso del último medio de cultivo por su menor coste.

En cuanto a la asimilación de sustratos por parte de *F. oxysporum*, puede deducirse que la D-arabinosa no es fermentada (Tabla 4.30), por lo que no hay generación

de productos. Para el resto de experimentos, se detecta el consumo total de los sustratos, destacando la rapidez con que se produce en el caso de D-glucosa pura (Tabla 4.26).

Por lo que respecta a la generación de bioproductos, las concentraciones de etanol obtenidas son, en todos los casos, muy superiores a las de xilitol.

También se ha determinado la concentración de ácido acético a un tiempo en que la concentración de bioproductos es máxima o a la última muestra del experimento. No se ha detectado la presencia de este compuesto, excepto en FF-6 en que se obtuvieron unos 50 mg/dm³ a las 95 horas de cultivo.

TABLA 4.23
PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL

Expto. FF-1	D-xilosa, 25 g/dm ³ (medio específico)			
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,120	27,1		
7	0,160	26,7		
22	0,555	26,0		
30	1,07	23,9	0,526	
46	1,69	21,3	1,16	
56		16,9	1,63	
72	2,17	14,0	1,62	
96	1,44	5,49	2,52	0,035
118	1,75	0,366	5,72	
151	1,43	0,111	5,61	0,011
168	1,83	0,120	5,68	0,013

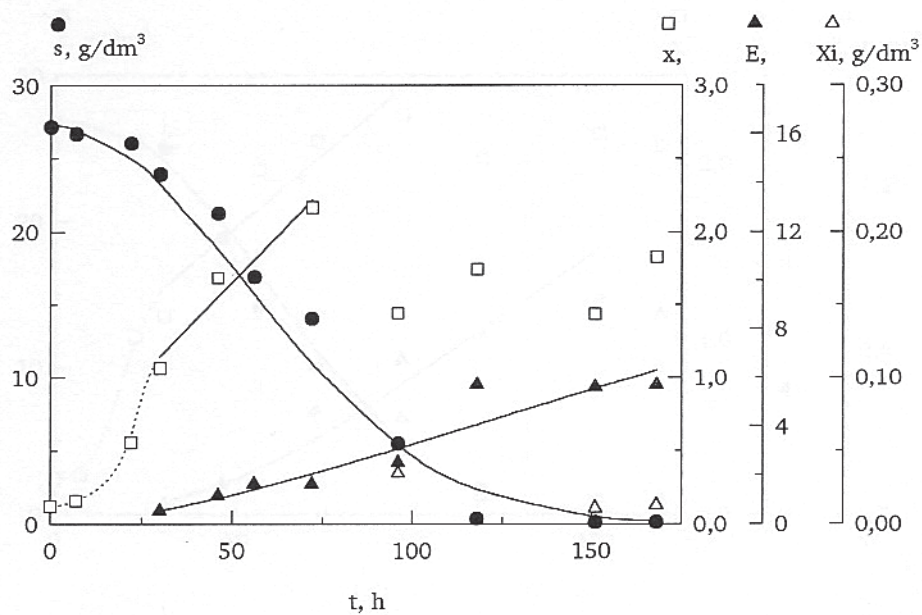


Figura 4.5 Expto. FF-1. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.24
PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL

Expto. FF-2		D-xilosa, 25 g/dm ³		
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,200	26,8		
7	0,219			
22	1,01	25,4		
30	1,13	25,0	0,307	
46		18,8	0,941	
56	1,96	14,3		
72	2,13	10,1	3,31	
96	2,28	4,38	4,92	0,347
118	2,03	1,93	5,75	0,067
151	2,17	0,144	6,90	0,056
168	2,10	0,129	6,39	0,051

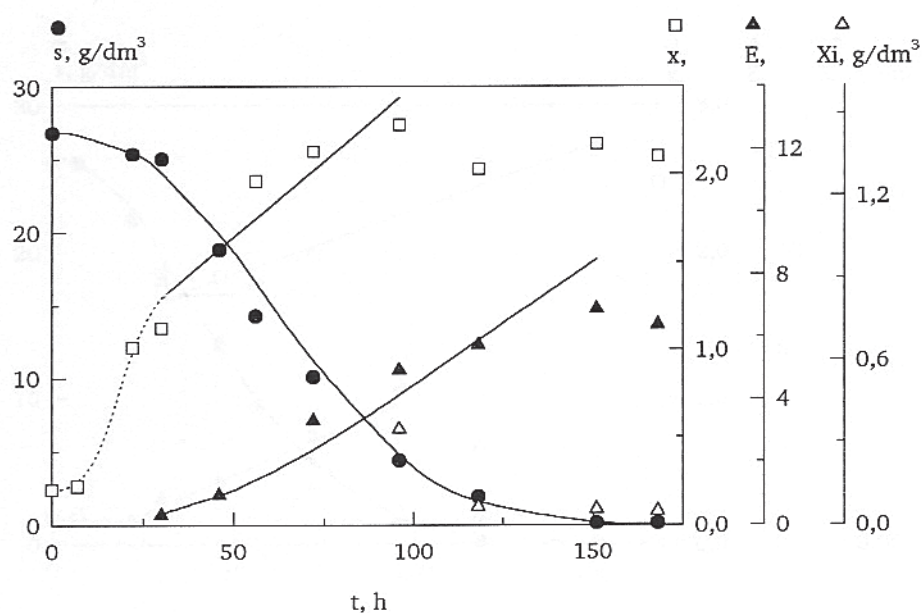


Figura 4.6 Expto. FF-2. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.25
PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FF-3	D-xilosa, 12,5 g/dm ³ ; D-glucosa, 12,5 g/dm ³ (medio específico)				
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,170	26,2	11,4		
7	0,170	26,0	11,4		
22	1,29	22,3	7,92	0,950	
30	1,74	18,5	3,36	1,87	
46	1,83	13,6	0,0	2,62	
56	1,77	9,36			
72	1,97	7,49		3,40	0,033
96		1,54		6,49	0,018
118	2,59	0,216		3,98	0,015
151	2,68	0,118		3,29	0,017
168	2,47	0,117			

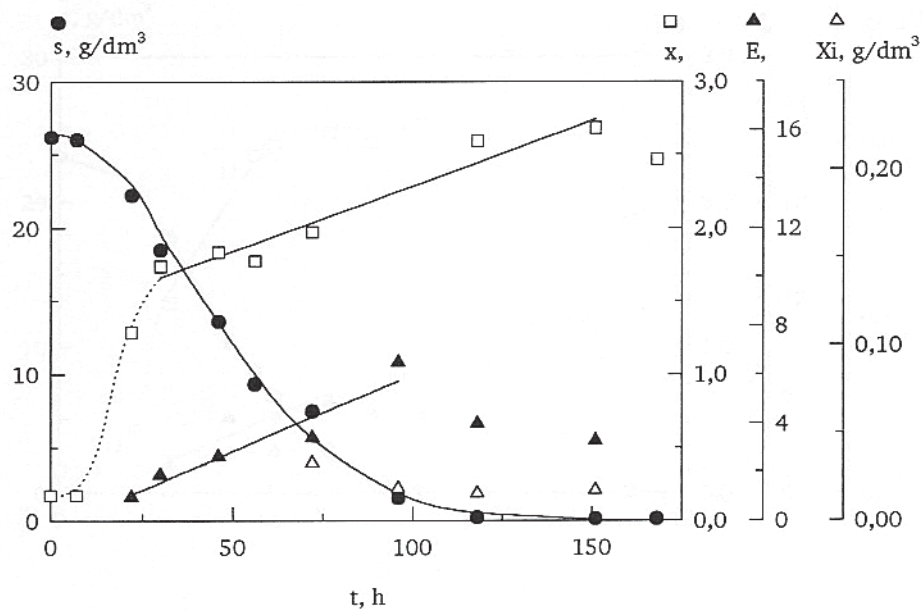


Figura 4.7 Expto. FF-3. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.26
 PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
 SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA

Expto. FF-4	D-xilosa, 12,5 g/dm ³ ; D-glucosa, 12,5 g/dm ³				
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,157	23,1	11,5		
13	0,327		11,9		
18	0,425		11,2		
26	1,30	17,6	7,30	1,73	0,004
40	2,20	10,4	0,06	4,58	
46	2,32	8,37	0,01		
51	2,38	6,56		4,74	0,093
64	2,47	2,95		5,64	0,034
74	2,41	1,00		4,97	
86	2,53	0,106		4,49	
136	1,87	0,095			

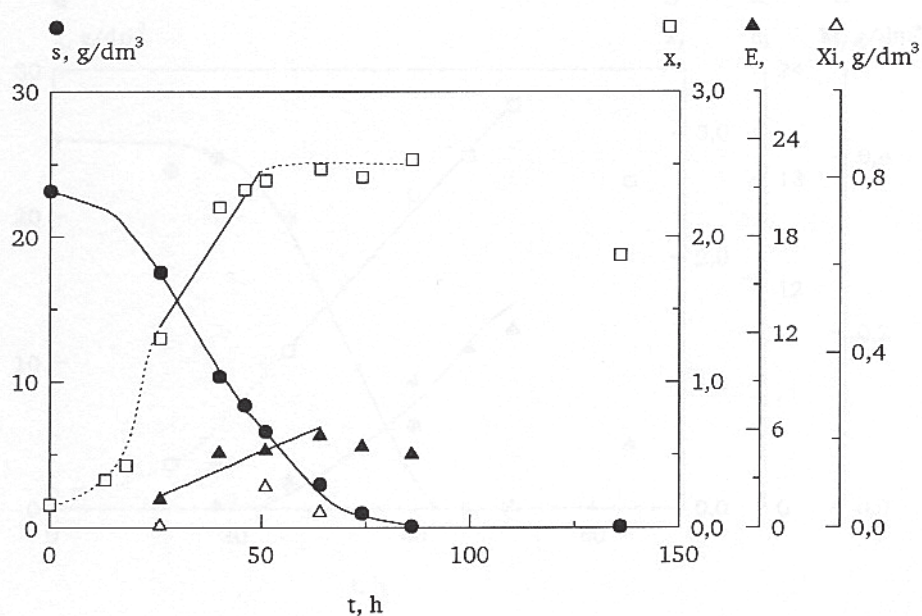


Figura 4.8 Expto. FF-4. Producción de biomasa,
 etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.27
PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
D-GLUCOSA

Expto. FF-5		D-glucosa, 25 g/dm ³		
t, h	x, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,114	25,2		
3	0,114			
13	0,355			
18	0,397	24,0	0,079	
26	1,26	19,8	1,45	
40	2,50	5,67	6,95	
46	2,81	0,01	8,76	
51	3,22		9,82	0,001
64	2,60		3,45	

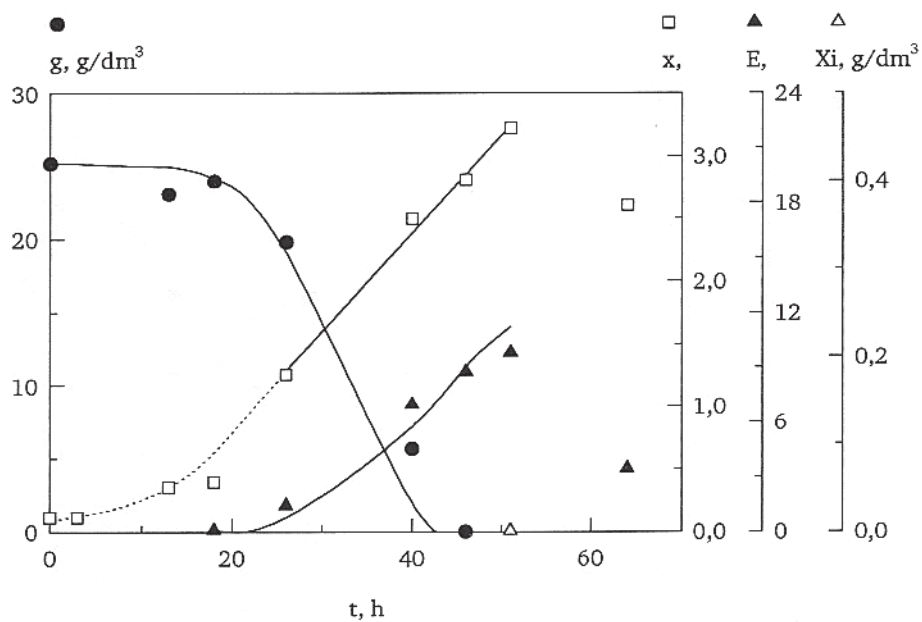


Figura 4.9 Expto. FF-5. Producción de biomasa, etanol y xilitol. D-glucosa.

TABLA 4.28
PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FF-6		D-xilosa, 20 g/dm ³ ; D-glucosa, 5 g/dm ³				
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,186	25,2	5,1			
4	0,214					
19	0,652	23,9	4,2			
24	1,00	22,6	2,4	0,646		
31	1,59	19,4	0,11	1,39	0,018	
44		15,0	0,07		0,287	
54	2,21	13,0		2,43	0,334	
68	2,23	9,80		2,84	0,222	
80	2,59	6,69		4,16	0,105	
95	2,63	3,45		4,55	0,051	0,046
127	3,02	0,156		2,69	0,024	
142	3,09	0,152				
165	3,10	0,146				

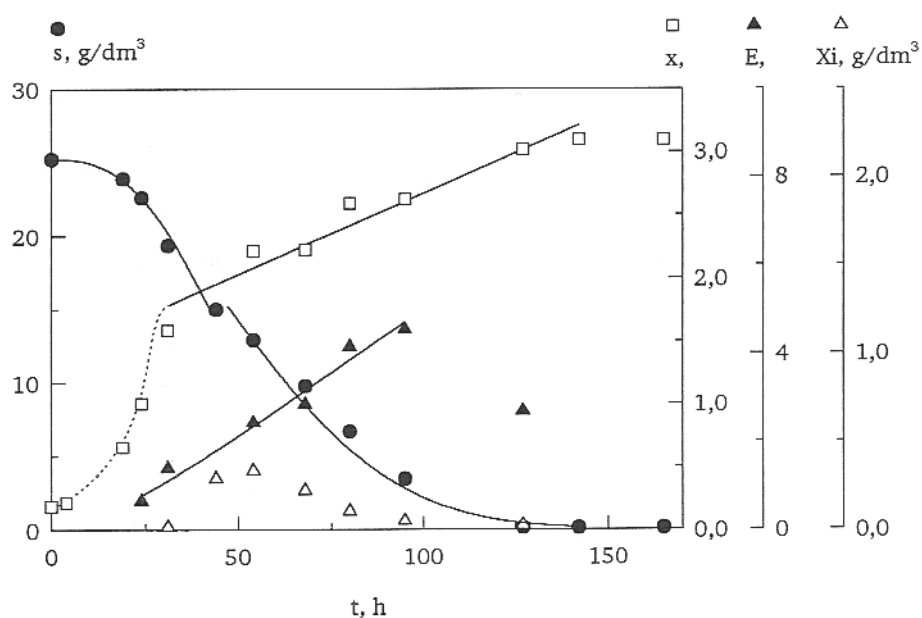


Figura 4.10 Expto. FF-6. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.29
 PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
 SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA

Expto. FF-7		D-xilosa, 24 g/dm ³ ; D-glucosa, 1 g/dm ³			
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,217	25,1	1,12		
4	0,242				
8			1,11		
19	0,524	24,6	0,66		
24	0,905	23,5	0,16	0,307	
31	1,14	22,1	0,10	0,811	0,116
44	1,93	18,7		1,49	
54	2,05	15,9		2,05	0,434
68	2,20	12,6			0,474
80	2,47	10,3		3,06	0,414
95	2,98	6,68		3,45	
127	3,04	1,76		3,82	0,031
142	2,80	0,293		5,15	0,033
165	3,14	0,126		7,27	0,020

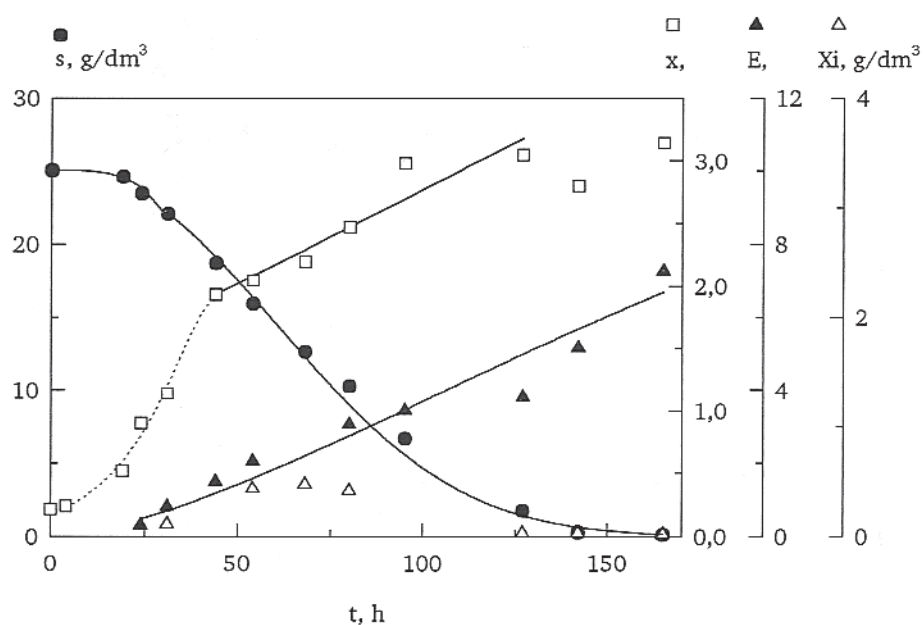


Figura 4.11 Expto. FF-7. Producción de biomasa,
 etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.30

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL

Expto. FF-8			D-arabinosa, 25 g/dm ³	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,107	25,0		
3	0,107			
13	0,242	26,4		
18	0,312	25,8		
26	0,706			
40	1,11	24,8		
64	1,36	25,8		
86	1,54	25,4		
136	1,78	24,3	0,0	0,002

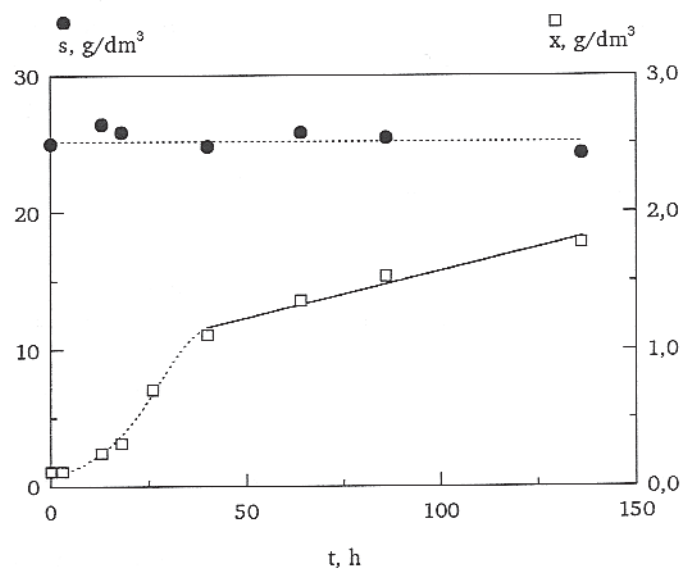


Figura 4.12 Expto. FF-8. Producción de biomasa.
Sustrato total.

4.2.2 INFLUENCIA DEL ACONDICIONAMIENTO DE LOS HIDROLIZADOS

Los resultados experimentales sobre la influencia de distintos tipos de acondicionamiento de los hidrolizados sobre la fermentación con *Pachysolen tannophilus* se muestran en las Tablas 4.31 a 4.39 y proceden de hidrólisis realizadas con ácido sulfúrico 1 N a temperaturas de 90 °C (HS-P3) y 95 °C (HS-T4). Se emplean subíndices en la nomenclatura tras FP para diferenciar los distintos acondicionamientos.

Los principales procedimientos de acondicionamiento han consistido en una neutralización hasta pH 3,5 y la concentración en rotavapor, modificándose en los diferentes experimentos el orden de las dos operaciones así como la naturaleza del agente neutralizante, tal como se indica seguidamente:

Hidrólisis con H ₂ SO ₄ , 1 N, 90 °C	
Expto.	Acondicionamiento
FP ₁ -HS-P3	Concentración + neutralización con NaOH
FP ₂ -HS-P3	Concentración + neutralización con KOH
FP ₃ -HS-P3	Neutralización con KOH + concentración
FP ₄ -HS-P3	Neutralización con KOH + concentración + decoloración
FP ₅ -HS-P3	Ca(OH) ₂ (<i>overliming</i>) + concentración
FP ₆ -HS-P3	Ca(OH) ₂ (<i>overliming</i>)
Hidrólisis con H ₂ SO ₄ , 1 N, 95 °C	
Expto.	Acondicionamiento
FP ₁ -HS-T4	Neutralización con Ca(OH) ₂ + concentración
FP ₂ -HS-T4	Neutralización con NaOH + concentración
FP ₃ -HS-T4	Concentración + neutralización con NaOH + decoloración

Se han ensayado diferentes agentes neutralizantes como NaOH, KOH y Ca(OH)₂ para situar el pH del hidrolizado en un valor cercano a 3,5, valor adecuado para la fermentación con *P. tannophilus*.

En los experimentos FP₅-HS-P3 y FP₆-HS-P3 se ha utilizado la técnica de *overliming* (apartado 3.3.3). En el experimento FP₅-HS-P3, en el que se utiliza esta técnica de acondicionamiento seguida de concentración en rotavapor, no se ha detectado consumo de sustrato ni formación de productos, siendo asimismo muy escaso el crecimiento microbiano (Tabla 4.35).

Con el objetivo de comparar los resultados, en el experimento FP₆-HS-P3 se empleó también *overliming* en un hidrolizado generado sobre dos lotes de residuo, utilizando el hidrolizado obtenido de una primera hidrólisis como disolución ácida para un segundo ataque sobre un nuevo lote de residuo. Esto permite obtener una disolución de azúcares de concentración comparable a la del experimento previo, con lo que

no se necesita el paso por el rotavapor. En estas condiciones, la fermentación presenta crecimiento celular, consumo de sustratos y formación de bioproductos, a pesar de la presencia en concentración considerable de ácido acético, que es también asimilado por el microorganismo (Tabla 4.36).

Como complemento al proceso de acondicionamiento, en dos hidrolizados se ha utilizado también una etapa de decoloración con carbón activo (Tablas 4.34 y 4.39).

El pH ha permanecido prácticamente constante en el transcurso de los experimentos, sin producirse desviaciones superiores a 0,3 unidades respecto del valor inicial.

TABLA 4.31

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP ₁ -HS-P3				Conc., NaOH	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0452	22,5	0,33		
1	0,0477				
2	0,0482				
3	0,0488				
6	0,0504		0,33		
14	0,0547		0,32		
18	0,0567		0,32		
22	0,0583				
26	0,0591				
39	0,0628		0,32		
49	0,0648				
63	0,0685				
73	0,0703		0,33		
94	0,0751				
113	0,0803				
122	0,0819	21,9	0,34		
135	0,0855				
160	0,0922	21,2			
185	0,102	21,3	0,33		
208	0,125	21,7			
232	0,183		0,25		
257	0,237	19,9	0,17	0,098	
305	0,391	18,6	0,09	0,281	0,030
328	0,507	18,0			
352	0,688	17,7	0,07	0,443	
383	0,843	15,4	0,06	0,702	0,320
407	0,999	14,1		0,835	
449	1,19	11,9		1,14	0,617
472	1,34	9,65		1,47	
503	1,66	7,24		1,60	1,06
527	1,76	6,00		1,59	
551	1,90	5,43		1,45	1,11
575	2,00	5,41		0,975	1,16

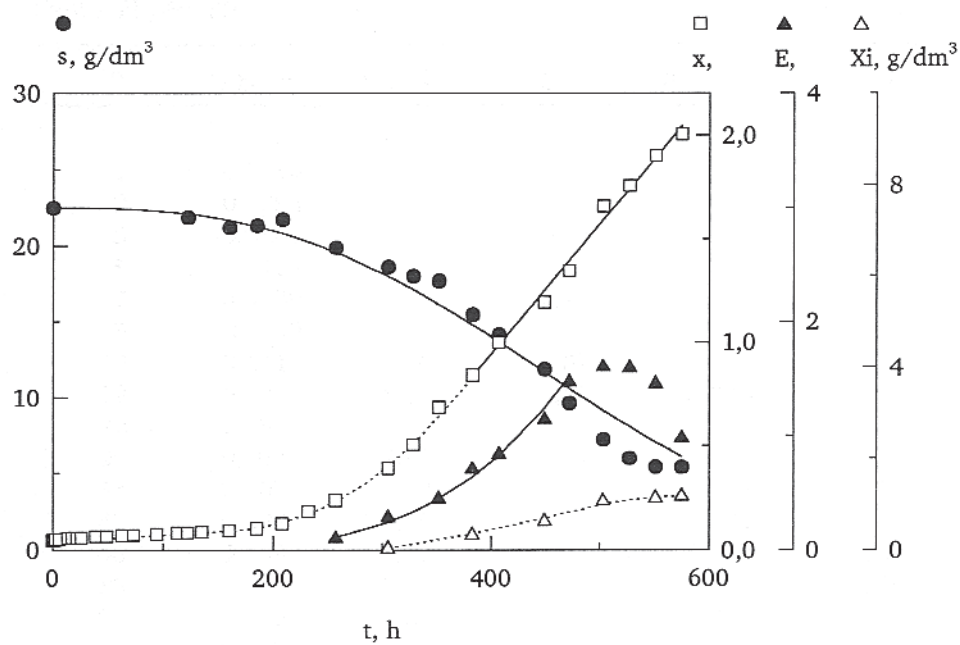


Figura 4.13 Expto. FP₁-HS-P3. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.32

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP ₂ -HS-P3				Conc., KOH	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0341	9,06	0,14		
1	0,0354				
2	0,0366				
3	0,0381		0,12		
5	0,0426				
7	0,0539		0,10		
9	0,0722				
12	0,111	8,70	0,07		
19	0,234	8,17	0,01	0,080	
22	0,291				
26	0,365	7,86	0,01		
33	0,508	7,32	0,0	0,155	
43	0,692	6,49		0,225	
48	0,709	6,28		0,167	0,233
55		5,66			0,216
67	0,833	5,21		0,283	
77	0,877	4,56		0,317	0,458
104	1,00	3,11		0,449	0,563
126	1,02	2,30		0,328	0,674
147	1,08	2,13		0,028	0,654
168	1,28	2,13			
189	1,30	2,14			
213	1,31	2,20			

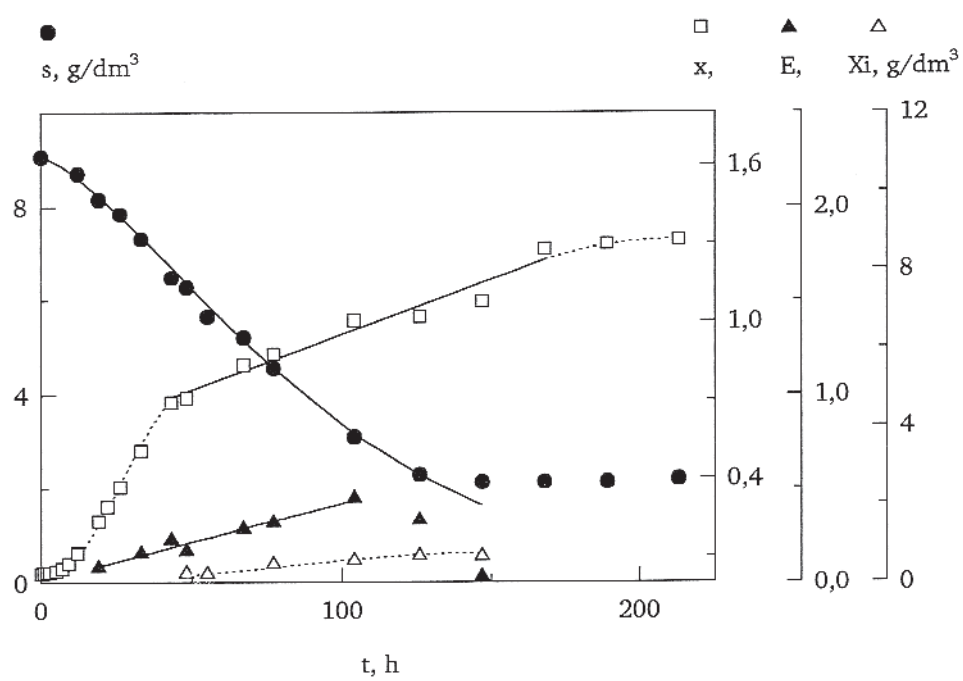


Figura 4.14 Expto. FP₂-HS-P3. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.33

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP ₃ -HS-P3						KOH, conc.
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,0304	21,7	0,25			1,85
2	0,0308					
4	0,0318					
6	0,0326					
8	0,0336					
21	0,0444		0,27			
25	0,0549					
32	0,104		0,25			
45	0,382	20,9	0,09			
49	0,415	20,3	0,07	0,133	0,088	
54	0,507	19,4				
70	0,836	18,7	0,04	0,442		
77	0,943	17,7		0,575	0,318	
120	2,01	7,96		2,60	0,847	
148	2,23	4,19		3,27	0,989	
172	2,78	3,90		2,29	0,850	
200	3,24	3,04		0,506		
223	3,11	3,21				
264	3,03	3,57				0,0
311	2,76					

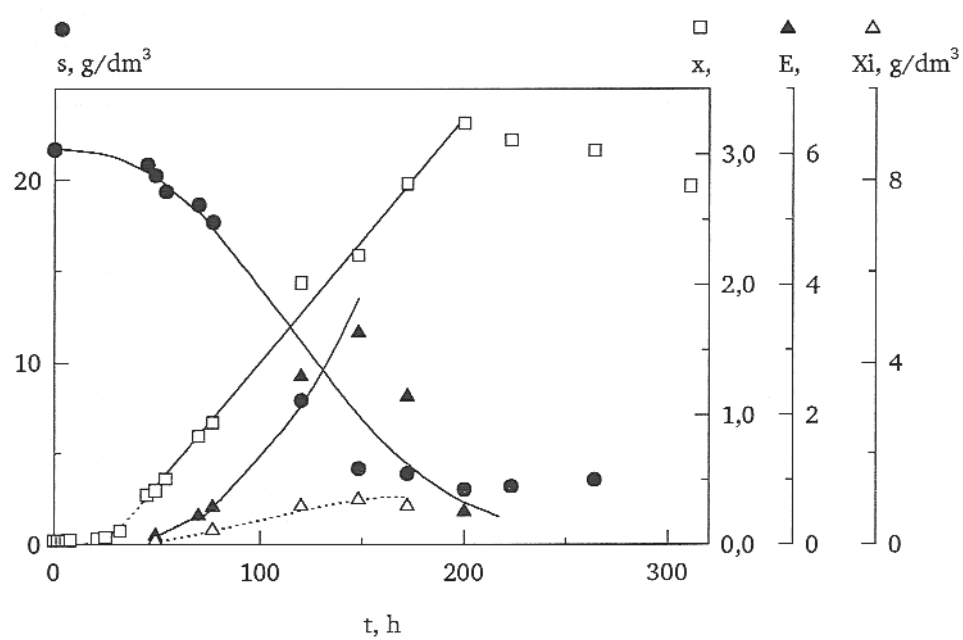


Figura 4.15 Expto. FP₃-HS-P3. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.34

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP ₄ -HS-P3				KOH, conc., decol.	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0243	17,3	0,32		
3	0,0249				
5	0,0261				
8	0,0334		0,24		
19	0,101		0,19		
24	0,162				
28	0,189				
31	0,202	16,5	0,06		
45	0,304	16,3	0,03		
55	0,333	15,9		0,200	0,080
69	0,406	15,5			
79	0,459	15,0		0,324	
101	0,630	13,9		0,493	0,298
142	0,845	10,9		0,978	
150	0,906	9,64		0,937	0,841
166	1,09	7,85		1,30	
174	1,07	6,68		1,50	1,18
188	1,13	5,14		1,83	
200	1,25	3,95		2,27	1,33
212	1,34	2,75		2,36	1,30
222	1,49	2,84		2,55	1,28
238	1,53	2,76		2,13	
248	1,59	2,70			
310	1,79	2,60			

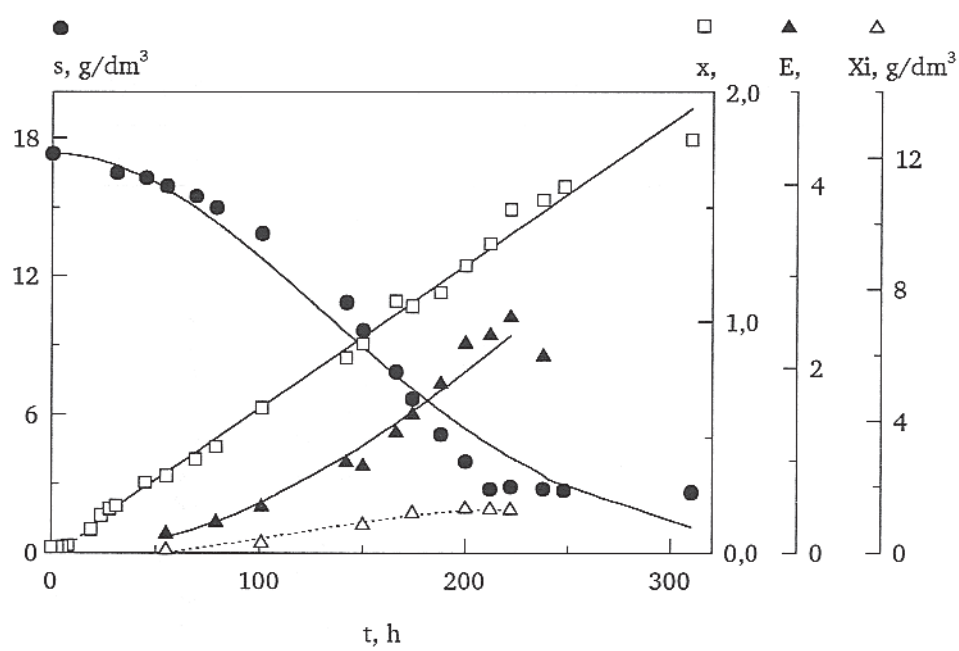


Figura 4.16 Expto. FP₄-HS-P3. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.35

PRODUCCIÓN DE BIOMASA.
SISTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP ₅ -HS-P3		Ca(OH) ₂ (<i>overliming</i>), conc.		
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,0329	20,8	0,16	4,11
2	0,0368			
4	0,0383			
6	0,0397	21,0		
8	0,0409	21,4		
21	0,0432		0,20	
25	0,0442			
32	0,0446			
45	0,0448			
54	0,0446			
77	0,0476			
120	0,0542			
148	0,0540	19,6	0,26	
172	0,0563	20,5		
200	0,0604			
264	0,0679			
311	0,0697		0,26	3,75

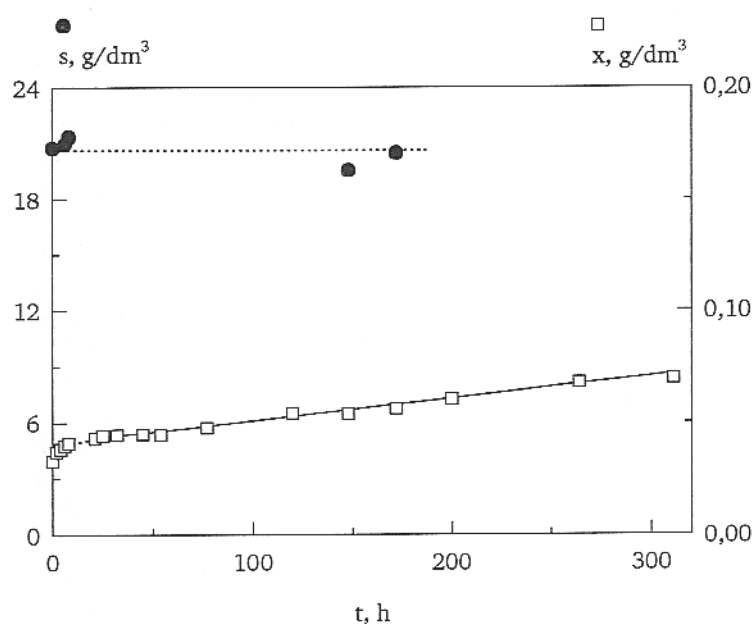


Figura 4.17 Expto. $\text{FP}_5\text{-HS-P3}$. Producción de biomasa.
Sustrato total.

TABLA 4.36

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SISTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP ₆ -HS-P3				Ca(OH) ₂ (<i>overliming</i>)		
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,0304	17,3	0,24			4,50
2	0,0324					
4	0,0337					
6	0,0345					
8	0,0342					
21	0,0380		0,24			
25	0,0394					
32	0,0397					
45	0,0394					
54	0,0405					
70	0,0429					
77	0,0435					
120	0,192		0,12	0,159		
148	0,285	16,0	0,05	0,196		
172	0,361	15,5	0,04	0,499	0,060	
200	0,533	14,0				
223	0,791	13,8		0,480	0,073	
264	1,30	11,5		0,920	0,380	
311	1,85	5,29		1,82	0,557	
337	1,87	3,39		2,19	0,247	
360	2,01	3,53		3,08	0,432	
382	2,05	3,28		2,20		0,447
408	2,21	3,00		1,48		

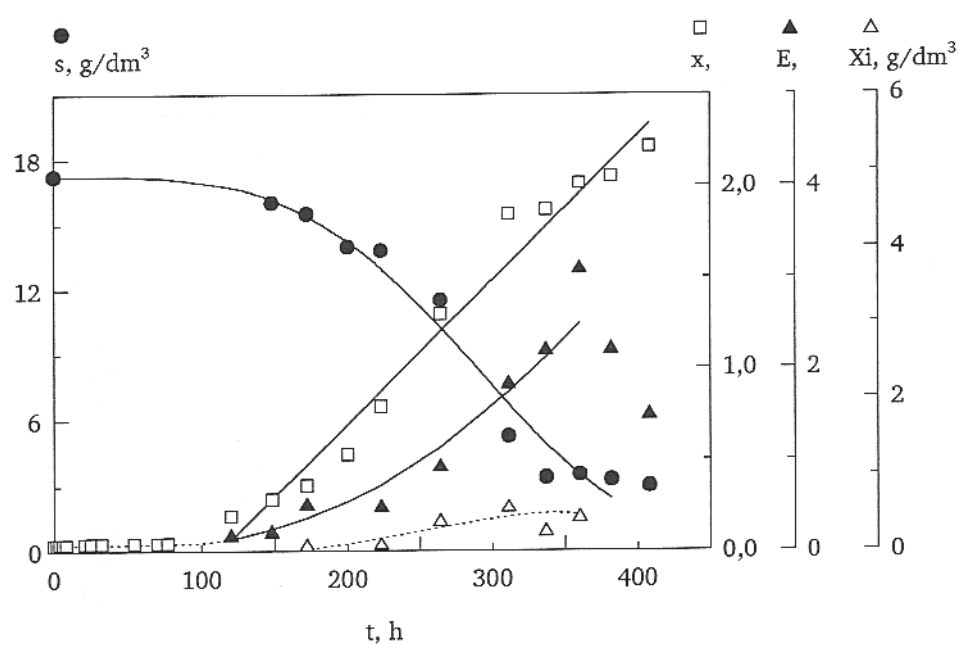


Figura 4.18 Expto. FP₆-HS-P3. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.37

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP ₁ -HS-T4				Ca(OH) ₂ , conc.	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0276	19,6	0,23		
2	0,0297				
4	0,0318				
6	0,0326	19,4			
8	0,0336				
10	0,0346				
18	0,0366	18,6			
22	0,0390	18,7	0,23		
27	0,0427				
31	0,0480	18,7			
44	0,0855		0,18		
54	0,105	18,2	0,14	0,080	
68	0,146	18,1	0,10		
94	0,161	16,8	0,05	0,274	
118	0,179	16,1			
164	0,287	15,1	0,05	0,531	0,042
212	0,448	13,9		0,725	
260	0,677	11,5		1,04	0,302
335	0,852	5,91		2,04	
380	0,971	4,01		2,74	0,458
427	1,01	2,90		2,66	
499	1,02	2,44		2,33	0,437
525	1,02	2,33			

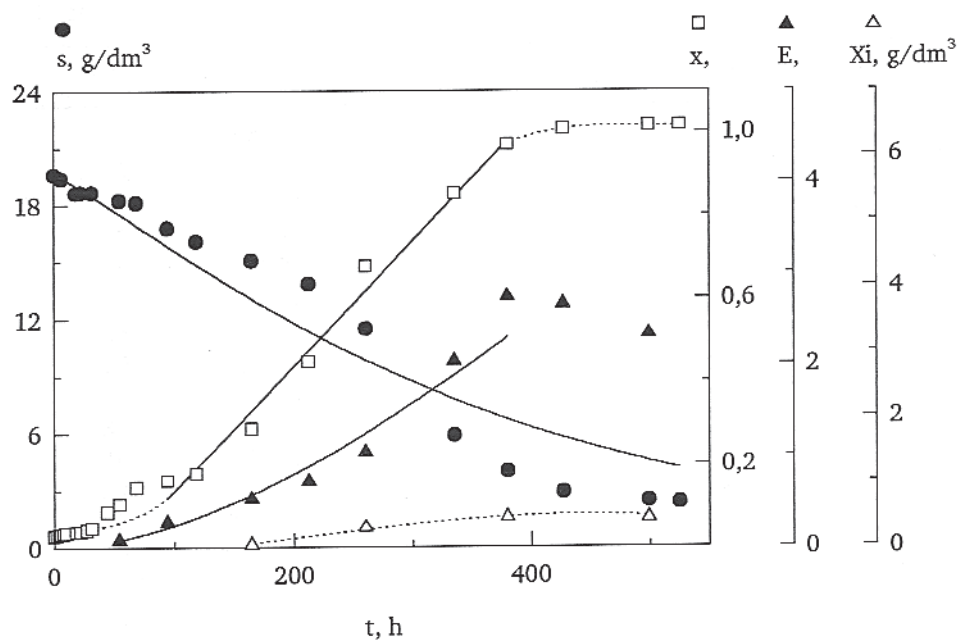


Figura 4.19 Expto. FP₁-HS-T4. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.38

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP ₂ -HS-T4				NaOH, conc.	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0281	15,6	0,20		
2	0,0289				
4	0,0291				
6	0,0295				
8	0,0305				
10	0,0307				
18	0,0322				
22	0,0338	15,0	0,22		
27	0,0381				
31	0,0442	15,0			
44	0,0927		0,16		
54	0,127	14,7	0,10	0,068	
68	0,209	14,7	0,06		
94	0,249	14,0	0,03	0,271	
118	0,272	14,0			
164	0,293	12,8	0,03	0,685	0,144
212	0,376	11,5		0,984	
260	0,538	9,97		1,14	0,277
335	0,922	5,32		1,97	
380	1,13	3,57		2,20	0,472
427	1,15	2,89		2,34	0,518
499	1,17	2,77		1,89	0,462
525	1,18	2,64			

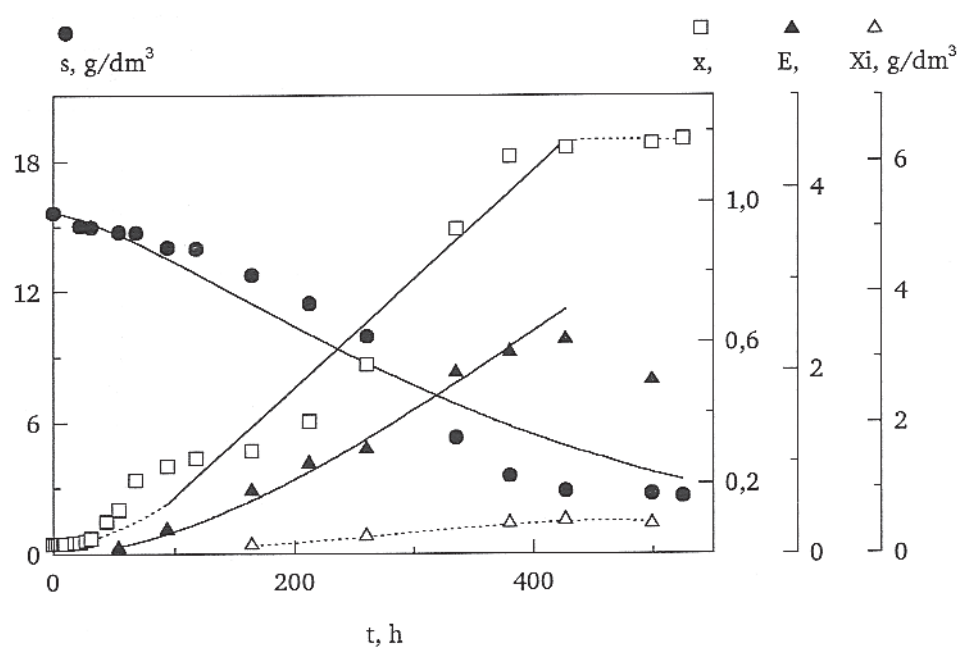


Figura 4.20 Expto. FP₂-HS-T4. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.39

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP ₃ -HS-T4				Conc., NaOH, decol.	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0253	13,7	0,34		
2	0,0257				
4	0,0268				
6	0,0290	13,6			
8	0,0326				
10	0,0386				
18	0,0630	13,4			
22	0,0770	12,8	0,24		
27	0,0926				
31	0,103	12,7			
44	0,137	12,9	0,10		
54	0,191	12,6	0,08	0,133	
68	0,251	12,6	0,08		
94	0,294	11,8	0,05	0,200	
118	0,345	11,9		0,242	0,164
164	0,400	11,0	0,07	0,396	
212	0,502	10,1			0,481
260	0,655	7,84		0,775	
335	0,814	3,72		1,46	
380	0,952	2,52		1,80	1,27
427	1,01	2,27		1,78	1,17
499	1,07	1,82		1,08	1,15
525	1,13	1,79			

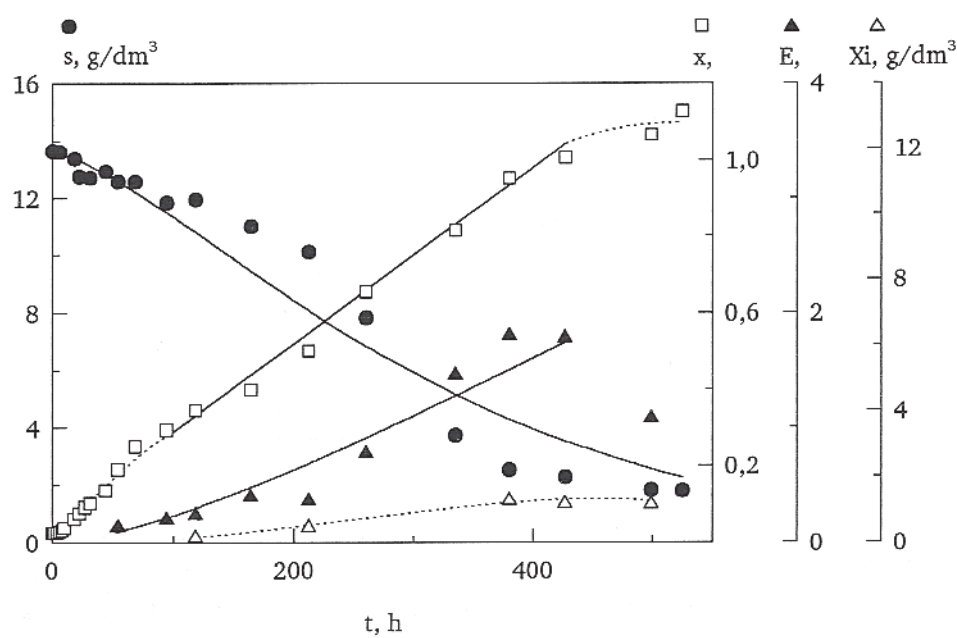


Figura 4.21 Expto. FP₃-HS-T4. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

4.2.3 FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS

4.2.3.1 Fermentación con *Pachysolen tannophilus*

A) Tamaño de partícula

En esta serie de experimentos se han fermentado los hidrolizados procedentes de la serie en la que se modificó el tamaño de partícula del residuo (apartado 4.1.1), realizados con ácido sulfúrico 1 N, a 90 °C durante 4 horas. La nomenclatura correspondiente se muestra a continuación:

Expto.	Tamaño de partícula, mm
FP-HS-P1	0,125-0,300
FP-HS-P2	0,300-0,425
FP ₄ -HS-P3	0,425-0,600
FP-HS-P4	0,600-0,850
FP-HS-P5	0,850-1,200
FP-HS-P6	1,200-1,600
FP-HS-P7	1,600- 2,000

Una vez obtenidos los hidrolizados, fueron sometidos a un acondicionamiento consistente en la concentración en rotavapor seguido por una neutralización con KOH. Los resultados de la fermentación se muestran en las Tablas 4.40 a 4.45. En el caso de FP₄-HS-P3, común con la serie de acondicionamiento, los resultados se recogen en la Tabla 4.34.

En general, se observa que se alcanzan concentraciones de biomasa que oscilan entre 1,0 y 1,8 g/dm³ y que el consumo de sustrato no llega a ser total en ningún caso, para los tiempos de fermentación utilizados. El pH ha permanecido prácticamente constante en el transcurso de los experimentos, sin producirse desviaciones superiores a 0,3 unidades respecto del valor inicial.

TABLA 4.40

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP-HS-P1					0,125-0,3 mm
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0325	7,83	0,19		
1	0,0339		0,19		
3	0,0368		0,17		
5	0,0416				
7	0,0510		0,18		
10	0,0824	7,70	0,15		
17	0,182	7,48	0,01	0,049	
20	0,233				
24	0,275	7,30	0,00		
31	0,332	6,95	0,01	0,176	
41	0,419	6,62		0,191	
46	0,420	6,54			
53	0,507	6,27		0,248	0,063
65	0,489	5,69		0,253	0,118
75	0,558	5,14			0,151
102	0,709	4,04		0,369	0,222
124	0,724	3,27		0,331	0,287
145		2,41		0,259	0,317
166	0,940	2,65			
187	1,00	2,40			

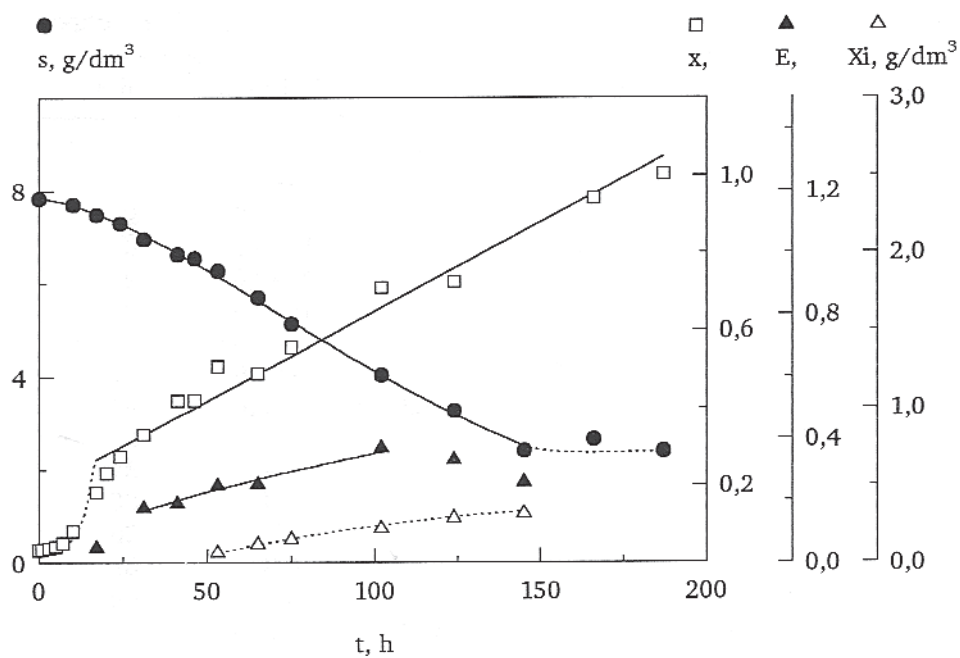


Figura 4.22 Expto. FP-HS-P1. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.41

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SISTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP-HS-P2				0,3-0,425 mm	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0339	10,9	0,16		
1	0,0345				
2	0,0356				
3	0,0374		0,19		
5	0,0414				
7	0,0501		0,15		
9	0,0670				
12	0,104		0,09		
19	0,225	10,5	0,0	0,082	
22	0,261				
26	0,305	10,1	0,01		
33	0,357	9,47		0,175	
43	0,435	9,39		0,256	
48	0,438	9,41			
55	0,530	8,90		0,278	
67	0,523	8,69		0,322	0,229
77	0,565	8,07			
104	0,709	6,63		0,552	0,386
126		5,39		0,635	0,456
147	1,01	2,55		0,876	0,537
168	1,31	2,56		0,659	0,505
189	1,43	2,52			
213	1,49	2,62			

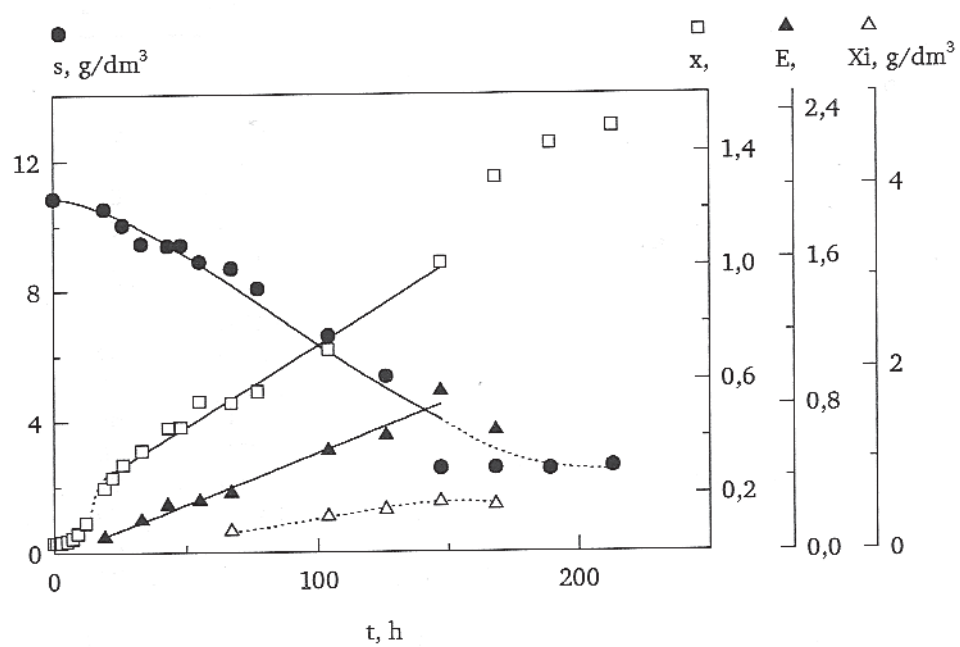


Figura 4.23 Expto. FP-HS-P2. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.42

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP-HS-P4					0,6-0,85 mm
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0362	10,8	0,20		
1	0,0364				
2	0,0375				
3	0,0383				
5	0,0424				
7	0,0491		0,19		
9	0,0609				
11	0,0751		0,17		
18	0,138		0,08		
20	0,159				
22	0,172	9,93			
26	0,209		0,06		
33	0,260	9,30	0,03		
43	0,318	9,37		0,088	
47	0,343	8,22			
55	0,369			0,086	
67	0,424	8,29		0,161	
77	0,490	7,33			0,104
100	0,567	6,26		0,282	
126	0,692	5,50		0,380	0,317
147	0,784	4,71		0,412	
167	0,941	3,86		0,574	0,415
171	0,960				
189	1,03	2,67		0,453	
213	1,09	2,38		0,459	0,491
238	1,15	2,57			0,448
310	1,35	1,79			

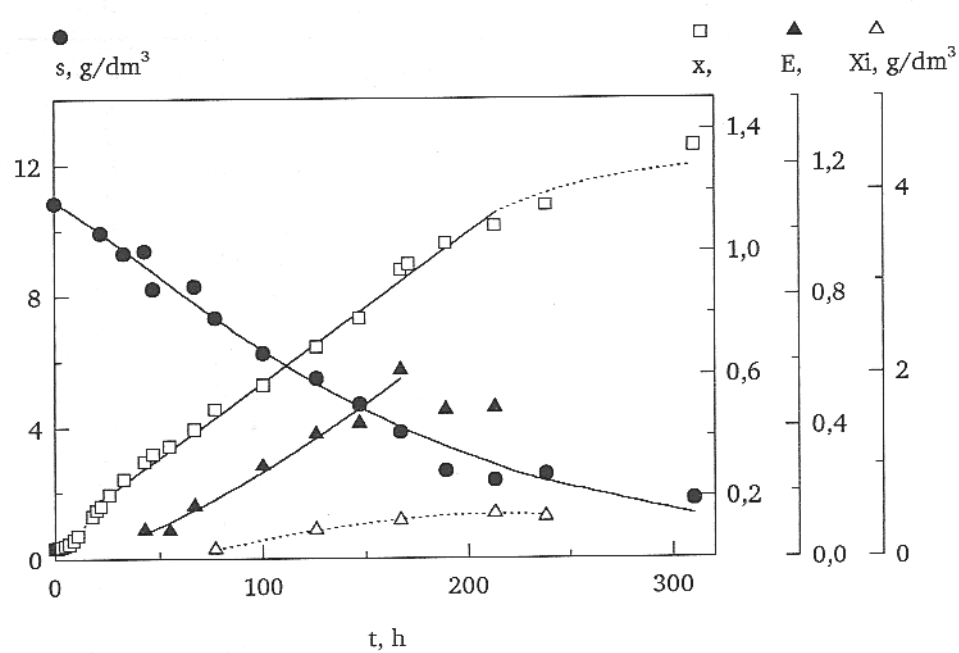


Figura 4.24 Expto. FP-HS-P4. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.43

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL,
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto, FP-HS-P5				0,85-1,2 mm	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0350	10,9	0,22		
1	0,0348				
2	0,0350				
3	0,0356		0,18		
5	0,0399				
7	0,0459		0,19		
9	0,0540	10,5			
11	0,0644	10,5	0,20		
18	0,118	10,4	0,09		
20	0,139				
22	0,156	9,81			
26	0,184		0,04	0,051	
33	0,226	9,73	0,02		
43	0,286	9,71		0,093	
47	0,298	9,01			
55	0,329			0,097	
67	0,381	8,35		0,131	
77	0,429	8,04		0,146	0,102
100	0,549	7,43		0,192	
126	0,659	7,00		0,328	0,306
147	0,757	4,90		0,483	
167	1,07	3,10		0,550	0,446
171	1,15				
189	1,33	2,24		0,587	
213	1,40	2,25		0,316	0,547
238	1,58	2,17			0,492
310	1,61	2,36			

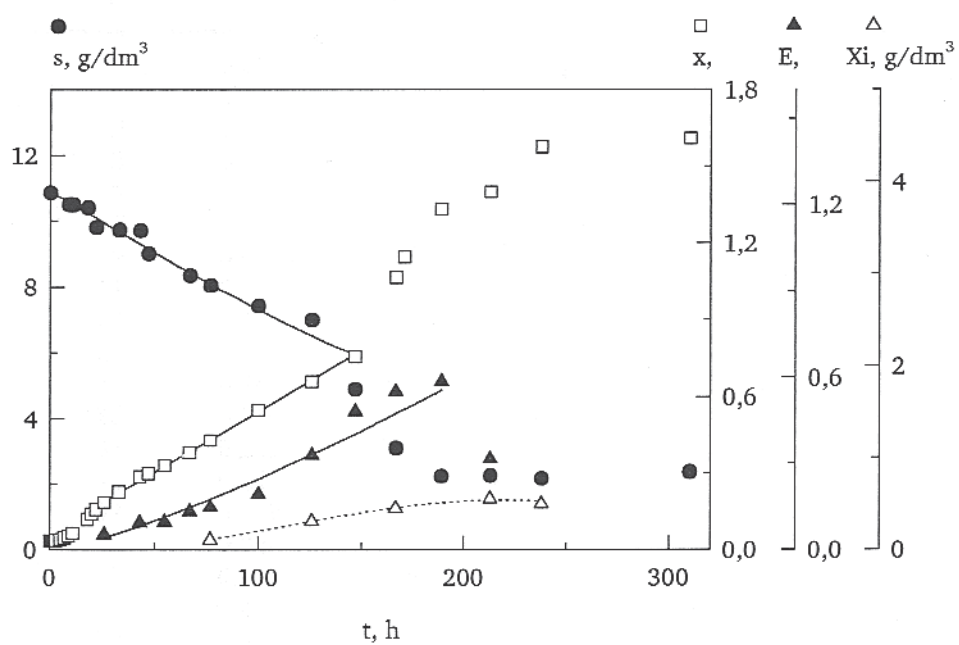


Figura 4.25 Expto. FP-HS-P5. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.44

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP-HS-P6					1,2-1,6 mm
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0327	10,7	0,19		
1	0,0333				
2	0,0343				
3	0,0354		0,17		
5	0,0393	10,5			
7	0,0468		0,16		
9	0,0591				
11	0,0715	10,1	0,19		
18	0,139		0,09		
20	0,154				
22	0,169	9,35			
26	0,206		0,06	0,057	
33	0,252	9,03	0,03		
43	0,295	9,06		0,097	
47	0,309	8,41			
55	0,344	8,82		0,116	
67	0,373	7,89		0,147	
77	0,417	8,13		0,137	0,100
100	0,511	6,99		0,266	
126	0,622	6,57		0,336	0,329
147	0,701	4,98		0,530	
167	0,837	3,93		0,578	0,420
171	0,884				
189	0,934	3,25		0,573	
213	1,07	2,42		0,538	0,540
238	1,18	2,31			0,435
310	1,29	2,10			

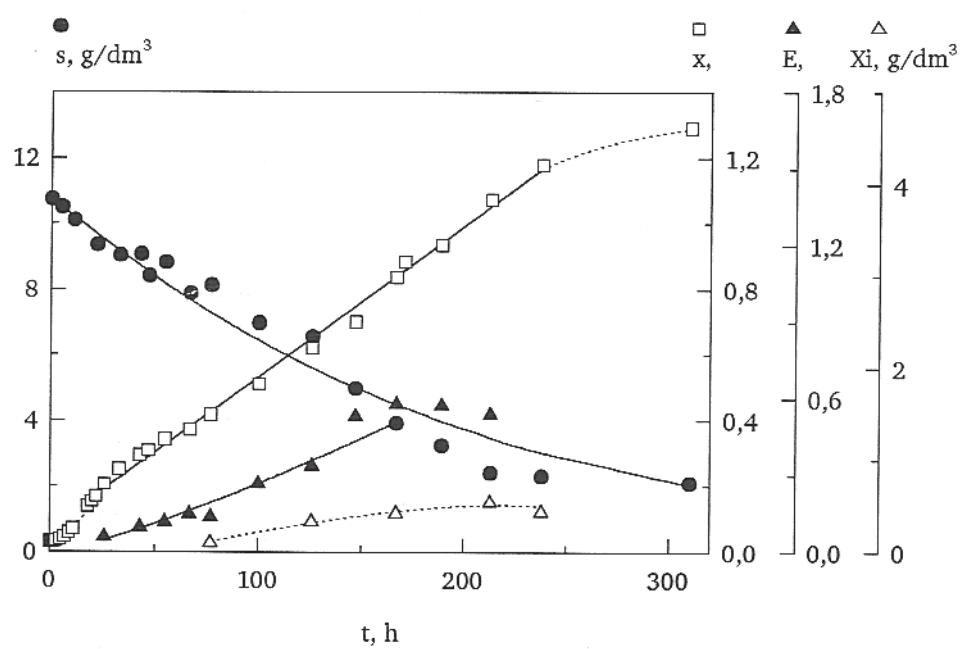


Figura 4.26 Expto. FP-HS-P6. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.45

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP-HS-P7					1,6-2 mm
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0310	10,7	0,20		
1	0,0318				
2	0,0314		0,20		
4	0,0335				
6	0,0374				
8	0,0447				
10	0,0569		0,11		
17	0,110	10,4	0,08		
19	0,126				
21	0,146				
25	0,167		0,05	0,040	
32	0,195		0,03		
42	0,234				
46	0,259	9,68			
54	0,262	9,60		0,081	
66	0,297	9,29			
76	0,330	8,94		0,104	0,086
99	0,399	8,35			
125	0,465	7,34		0,164	0,163
146	0,504	6,59			
166	0,557	6,02		0,404	0,350
170	0,597				
188	0,655	5,18		0,462	
212	0,671	4,15		0,559	0,397
237	0,785	3,32		0,676	0,365
309	1,04	1,95		0,271	

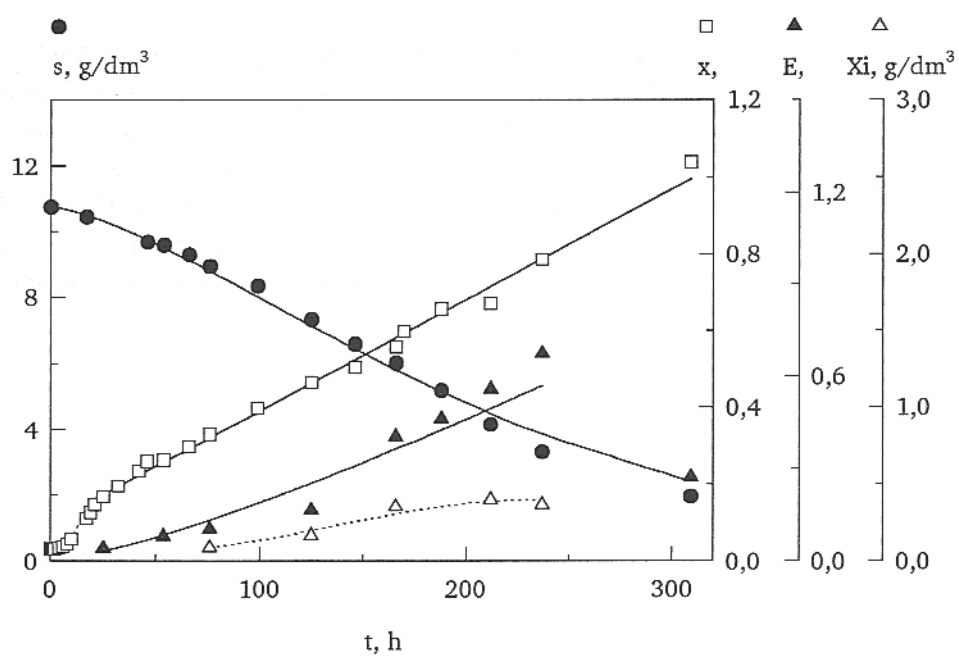


Figura 4.27 Expto. FP-HS-P7. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

B) Separación de médula y cubierta

En las Tablas 4.46 y 4.47 se muestran los resultados de la fermentación de los hidrolizados obtenidos a partir de lotes de residuo en los que se realizó la separación del mismo en sus dos partes diferenciadas, cubierta y médula, que corresponden a los experimentos de hidrólisis HS-S1, para la cubierta, y HS-S2 y HS-S3, para la médula. Estos dos últimos hidrolizados se han fermentado conjuntamente, debido a la baja concentración de azúcares que se obtiene en la hidrólisis (FP-HS-S2₃).

En los dos casos, el acondicionamiento ha consistido en la concentración en rotavapor seguida por la neutralización con NaOH.

Puede observarse que el crecimiento del microorganismo es relativamente reducido, alcanzándose una concentración de biomasa de solo 0,65 g/dm³ al final del experimento; el consumo de sustrato no es completo, concretamente en el caso de la cubierta la asimilación neta es solo del orden de 9 g/dm³, destacándose sin embargo un consumo prácticamente total de D-glucosa; por último, la formación de etanol y xilitol es también escasa. En cuanto al pH, a lo largo de los experimentos no se han producido oscilaciones superiores a 0,2 unidades respecto del valor inicial.

TABLA 4.46

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP-HS-S1					Cubierta
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0312	25,2	0,28		
2	0,0331	24,8			
4	0,0335				
7	0,0349				
9	0,0367				
15	0,0604	24,7	0,28		
20	0,0885				
25	0,121				
28	0,147	24,1			
40	0,239		0,31		
50	0,264	23,4			
65	0,296	23,3			
91	0,325	23,1			
115	0,348	23,3	0,29		
146	0,365				
185	0,390		0,29	0,007	
218	0,399	22,7			
281	0,424	22,6			
331		21,4	0,26		
379		20,8	0,24		
450	0,488	19,6	0,18	0,079	0,013
499	0,509	19,2			
546	0,565	17,8	0,07	0,167	0,028
619	0,588	16,3	0,04	0,121	0,059
666	0,652	16,8			0,080

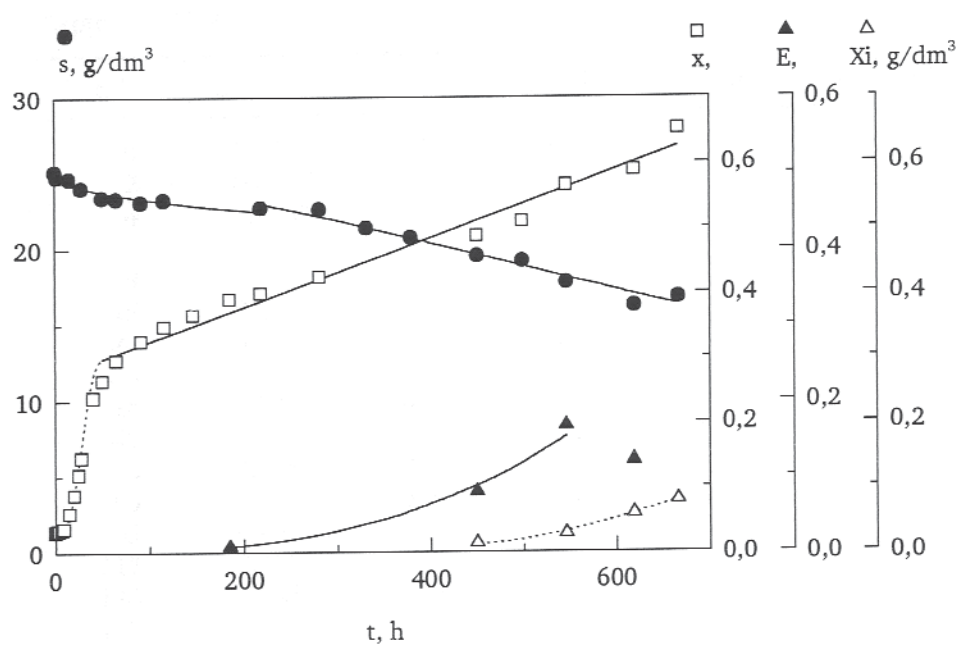


Figura 4.28 Expto. FP-HS-S1. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.47

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP-HS-S2 ₃					Médula
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0317	4,71	0,17		
2	0,0317				
4	0,0333				
7	0,0518				
9	0,0735				
15	0,154	4,51	0,16		
20	0,200	4,44	0,17		
25	0,210				
28	0,244	4,11	0,12		
40	0,305	3,99	0,06	0,042	
50	0,326	3,87	0,04		
65	0,367	3,61	0,02		
91	0,433	3,33		0,074	
115	0,452	3,06	0,0	0,075	0,021
146	0,525	2,80		0,062	
185	0,536	2,35		0,059	0,051
218	0,582	2,07		0,044	0,064
281	0,616	1,72		0,003	0,078
331	0,598	1,36			0,087
379	0,609	1,47			0,061
450	0,674	1,34			

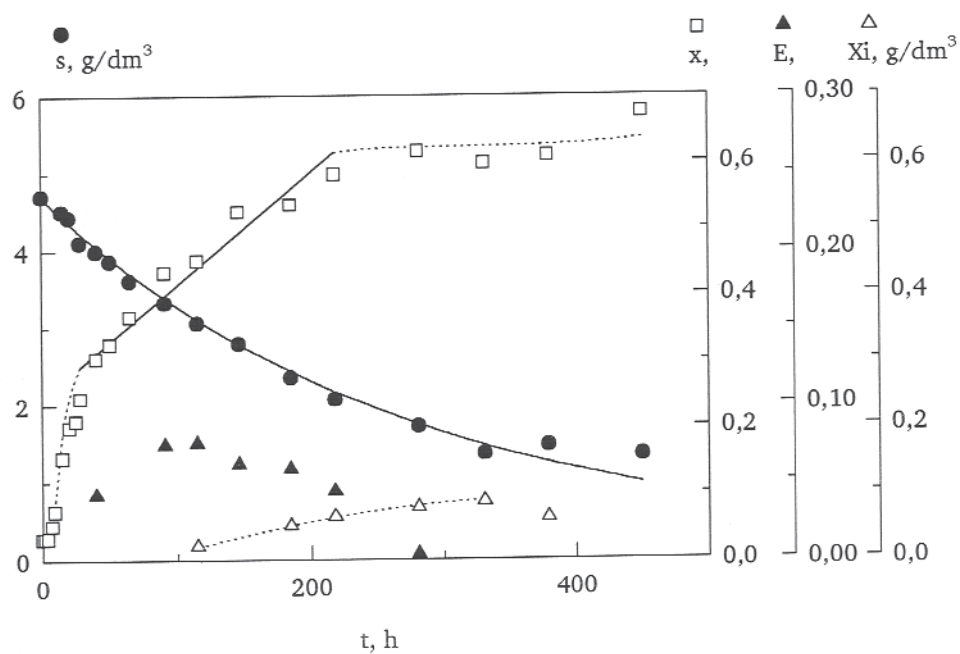


Figura 4.29 Expto. FP-HS-S2₃. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

C) Naturaleza y concentración del ácido

Los resultados de la fermentación de los hidrolizados obtenidos con diferentes ácidos y en diferentes condiciones se muestran en las Tablas 4.48 a 4.56 y en las representaciones gráficas recogidas en las figuras 4.30 a 4.38.

Todos los hidrolizados se obtuvieron a una temperatura de 90 °C durante un tiempo de 4 horas, modificándose la concentración y el tipo de ácido. Se han ensayado igualmente diferentes acondicionamientos. Las condiciones específicas y nomenclatura de los experimentos se indican seguidamente:

Hidrólisis con H ₂ SO ₄		
Expto.	C _A , N	Acondicionamiento
FP-HS-C1	0,1	Concentración + neutralización con NaOH
FP-HS-C2	0,5	Neutralización con NaOH + concentración
FP ₄ -HS-P3	1,0	Neutralización con KOH + concentración + decoloración
FP-HS-C4	2,0	Neutralización con KOH + concentración
Hidrólisis con HCl		
Expto.	C _A , N	Acondicionamiento
FP-HC-C1	0,1	Neutralización con NaOH + concentración
FP-HC-C2	0,3	Neutralización con NaOH + concentración
FP-HC-C3	0,5	Concentración + neutralización con NaOH
FP ₁ -HC-C3	0,5	Neutralización con NaOH + concentración
FP-HC-C4	0,75	Neutralización con NaOH + concentración
FP-HC-C5	1,0	Neutralización con NaOH + concentración

En el experimento FP₁-HC-C3 se sometió al residuo original a un pretratamiento en autoclave, antes de ser hidrolizado.

De la observación de los resultados, puede deducirse que en la fermentación de los hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico por *P. tannophilus*, se produce un consumo considerable y en algunos casos prácticamente total de los sustratos, formándose etanol en concentraciones superiores al xilitol.

Por lo que respecta a los hidrolizados obtenidos con ácido clorhídrico, no existe consumo de sustrato para concentraciones de este ácido superiores a 0,5 N. En este sentido, es necesario destacar que en la fermentación del hidrolizado con HCl 0,75 N no se detecta consumo de azúcares, pero sí de ácido acético. Ensayos realizados con hidrolizados en los que se empleó una concentración de ácido 1 N, pero con un esquema distinto de acondicionamiento, así como con concentraciones 2 N, fueron igualmente

negativos, tanto en el consumo de sustrato como en la generación de bioproductos.

El pH de los cultivos se ha mantenido prácticamente constante, sin producirse desviaciones superiores a 0,3 unidades respecto del valor inicial.

TABLA 4.48

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP-HS-C1

[H₂SO₄]=0,1 N

t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0408	3,02	0,05		
1	0,0415	2,83			
2	0,0433				
3	0,0454				
6	0,0581	2,55	0,04		
14	0,159	2,29	0,04		
18	0,201	2,40	0,04		
22	0,251				
26	0,291	2,07	0,04	0,008	
39	0,441	1,77	0,04	0,012	0,015
43	0,492	1,62		0,005	
49	0,514	1,37	0,00	0,006	0,023
63	0,495	1,42			
73	0,493	1,45			0,018
94	0,459	1,45			0,008
113	0,448	1,44			
135	0,454	1,42			

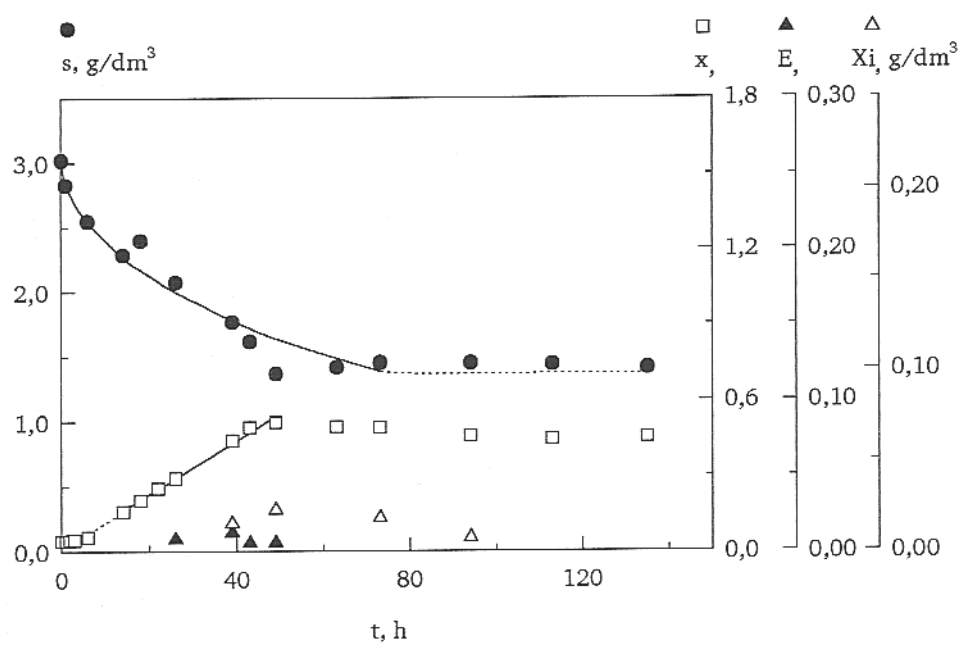


Figura 4.30 Expto. FP-HS-C1. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.49

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP-HS-C2			[H ₂ SO ₄]=0,5 N			
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,116	8,49	0,06			2,17
2	0,116					
5	0,114					
8	0,118					
17	0,141	8,33	0,03			
22	0,158					
27	0,169	8,10	0,04			
42	0,211	7,92	0,03			
52	0,230					
67	0,260	7,64		0,094		
75	0,263					
91	0,275	7,29		0,113		1,38
122	0,324	6,74				
162	0,359	5,79		0,281	0,039	
187	0,374	5,52				
211	0,435	5,29		0,407	0,047	
234	0,591	4,52		0,431		
258	0,811	3,84		0,531	0,055	
286	0,957	3,08		0,497	0,078	
313	1,06	2,86		0,445	0,074	0,113
330	1,10	2,87		0,490	0,078	0,005

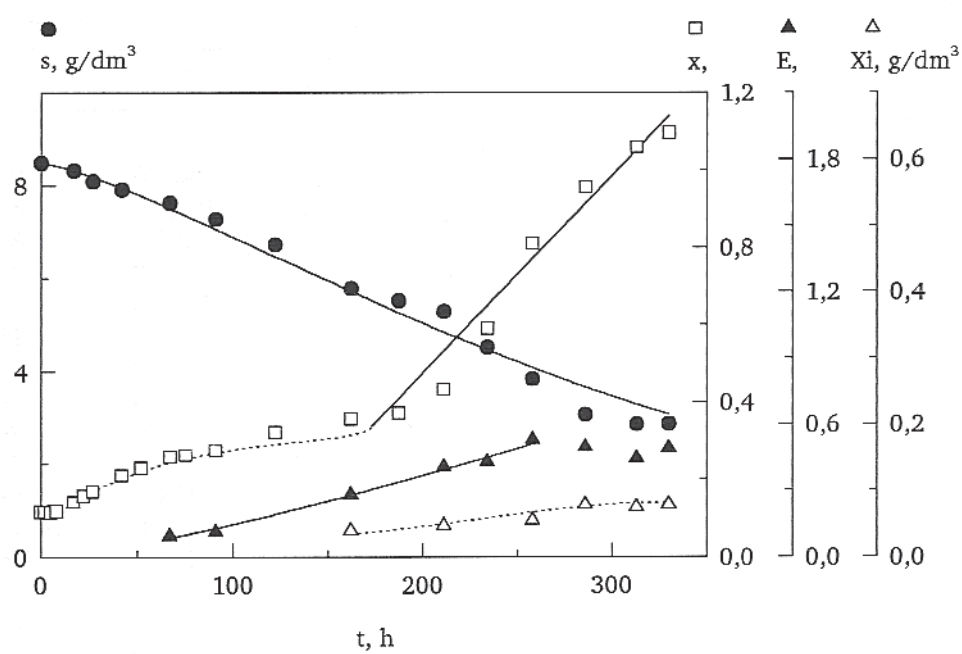


Figura 4.31 Expto. FP-HS-C2. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.50

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP-HS-C4			[H ₂ SO ₄]=2 N			
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,0245	14,4	0,29			1,50
3	0,0245					
5	0,0249					
8	0,0255	14,4				
20	0,0341	14,3	0,28			
24	0,0452					
31	0,0719	14,2	0,24			
45	0,121	13,9	0,14			
54	0,163	13,8	0,11			
69	0,209	13,5	0,11			
79	0,223	13,3	0,05	0,122		
93	0,261	13,1	0,03			
120	0,345	13,1				
166	0,590	11,9				
189	0,561	11,5	0,04	0,460	0,196	0,327
214	0,619	10,7				
237	0,674	9,59		0,607		
263	0,750	8,30		1,01	0,472	
333	1,15	3,81		2,11		
356	1,31	2,74		2,36	0,580	0,0
381	1,34	2,45		2,23	0,585	
405	1,52	2,40		1,98	0,578	
431	1,59	2,33			0,562	

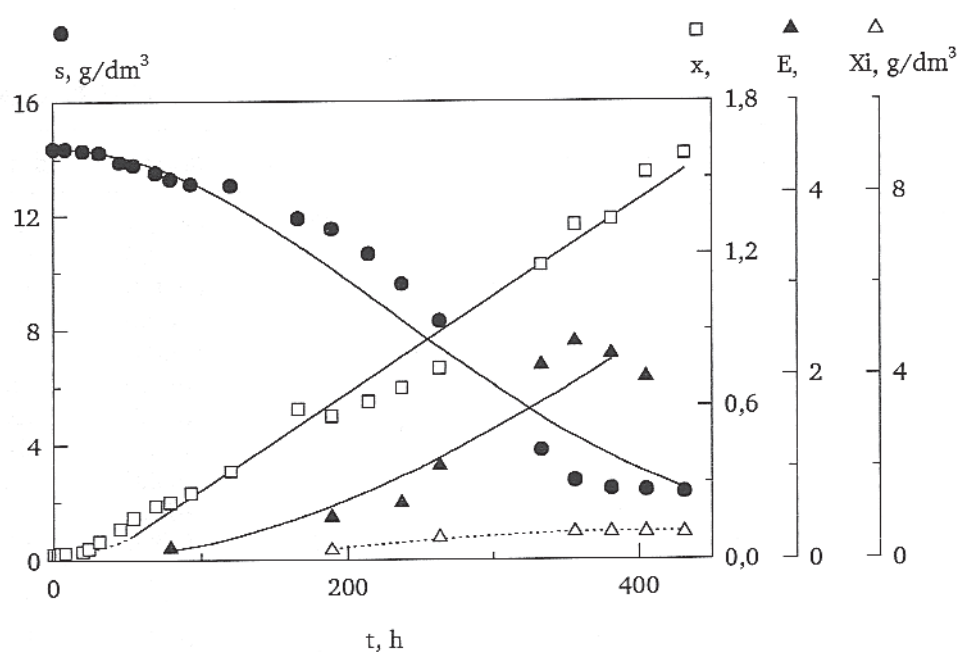


Figura 4.32 Expto. FP-HS-C4. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.51

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SISTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP-HC-C1						[HCl]=0,1 N
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,0323	5,89	0,08			1,12
2	0,0324					
4	0,0345					
6	0,0372					
17	0,0921		0,04			
22	0,130					
28	0,162		0,02			
43	0,232		0,01			
53	0,259	5,35	0,02	0,048		
67	0,314	5,20		0,083		
75	0,320	5,01		0,084	0,044	
91	0,390	4,87		0,123		
118	0,451	4,37		0,147	0,049	0,003
163	0,582	3,75		0,136	0,057	
187	0,701	3,03		0,102	0,054	0,0
211	0,837	2,98				
234	0,816	2,90		0,0		

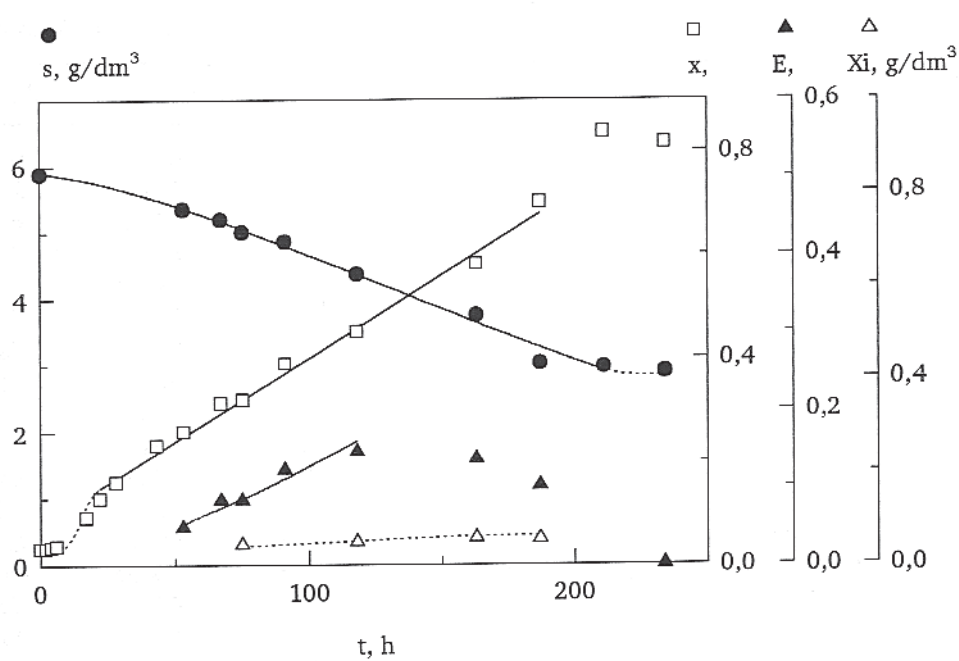


Figura 4.33 Expto. FP-HC-C1. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.52

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP-HC-C2			[HCl]=0,3 N			
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,115	12,6	0,11			2,31
2	0,115					
5	0,115					
8	0,115					
17	0,126		0,06			
22	0,143					
27	0,157		0,09			
42	0,206		0,05			
52	0,229					
67	0,268	12,3		0,106		
75	0,274					
91	0,305	11,9				
122	0,393	11,5		0,279	0,083	1,36
162	0,482	10,6		0,402		
187	0,579	10,0				
211	0,692	9,46		0,566	0,150	
234	0,928	8,37		0,681		
258	1,16	7,01		1,05	0,303	
286	1,42	5,42		1,35		
313	1,72	3,93		1,67	0,412	
330	1,85	3,46		1,58	0,374	0,105
354	1,95	3,34		1,36	0,384	0,005

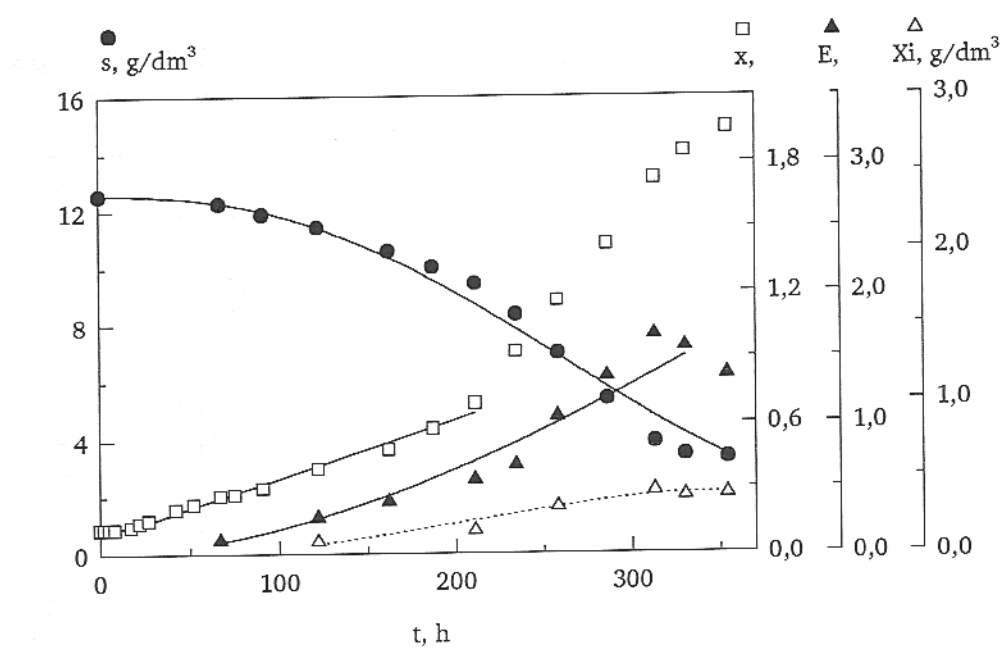


Figura 4.34 Expto. FP-HC-C2. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.53

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP-HC-C3				[HCl]=0,5 N		
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,0403	15,4	0,14			
2	0,0403					
4	0,0403					
6	0,0412					
8	0,0434					
10	0,0467					
19	0,0921					
24	0,131		0,12			
28	0,155					
32	0,173	15,0	0,07	0,059		
44	0,237	14,9	0,05			
55	0,271	14,3	0,04	0,126	0,086	
69	0,352	14,4	0,04			
94	0,451	13,7	0,04	0,199	0,163	
123	0,621	12,9				
141	0,633	12,4		0,344	0,327	
190	0,806	9,59		0,752	0,682	
238	1,12	6,31		1,49	1,06	
309	1,23	2,80		2,08	1,10	0,006
357	1,31	2,94		1,44	1,00	

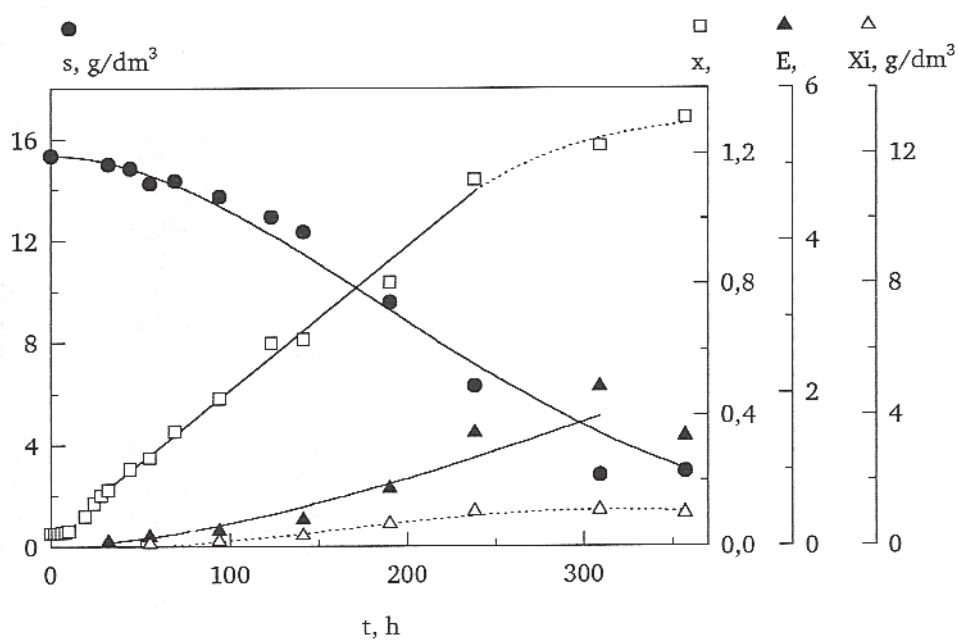


Figura 4.35 Expto. FP-HC-C3. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.54

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP ₁ -HC-C3			[HCl]=0,5 N (pret.)			
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,0318	16,2	0,14			1,46
2	0,0316					
4	0,0318					
6	0,0328					
17	0,0347		0,17			
22	0,0355					
28	0,0375					
43	0,0491		0,16			
53	0,0821	16,1				
67	0,134					
75	0,160	15,7	0,10			
91	0,202	15,8		0,103	0,063	
118	0,256	15,0	0,06	0,161		
163	0,389	14,3	0,04			
187	0,423	13,8	0,03	0,270	0,166	
211	0,505	13,4				
234	0,617	13,2				
259	0,704	12,3		0,494	0,307	
293	0,885	10,4		0,844		
331	1,19	8,09		1,44	0,534	0,116
355	1,28	6,88		1,73		
380	1,53	5,23		2,01	0,709	
403	1,66	4,57		2,27		
428	1,77	3,54		1,80	0,725	0,169
452	1,89	3,50		1,67	0,691	
498	2,06	3,62		0,998	0,593	

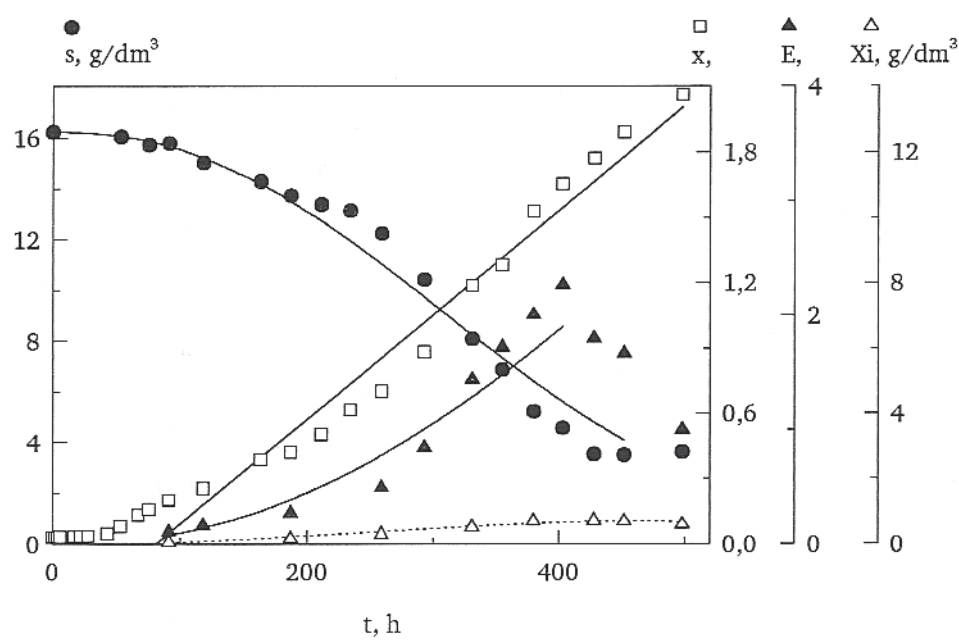


Figura 4.36 Expto. FP₁-HC-C3. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.55

PRODUCCIÓN DE BIOMASA.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP-HC-C4			[HCl]=0,75 N	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,0339	18,1	0,25	1,87
2	0,0341			
4	0,0339			
6	0,0343	18,0		
17	0,0362	18,2	0,27	
22	0,0367			
28	0,0375	18,4		
43	0,0391	18,6	0,23	
53	0,0393	18,3		
67	0,0411	18,1		
91	0,0428	18,1		
118	0,0455	16,6		
163	0,0484	17,5	0,28	
187	0,0506	17,9		
211	0,0534	17,7		
234	0,0559	16,6	0,30	
259	0,0606	17,3		
331	0,0598	17,0		
380	0,0463	17,0	0,30	1,67
428	0,0374	17,5		
498	0,0318	17,8		0,071

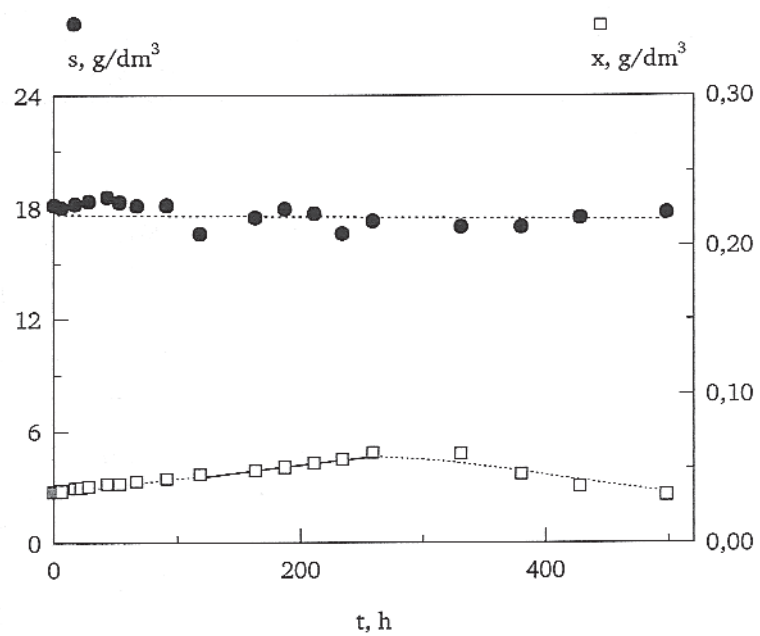


Figura 4.37 Expto. FP-HC-C4. Producción de biomasa.
Sustrato total.

TABLA 4.56

PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FP-HC-C5					[HCl] = 1 N
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,116	20,2	0,28		2,65
2	0,115	20,2			
5	0,114				
8	0,109	21,3			
17	0,115	20,1	0,32		
22	0,117				
27	0,117	20,3			
42	0,147	20,1			
52	0,198				
67	0,226	20,4			
75	0,227				
91	0,249	20,5	0,33		
122	0,218	20,4			
162	0,262	20,4			
187	0,264	20,6			
211	0,274	21,2			
234	0,294	20,6	0,40		
258	0,295	20,9		0,008	
286	0,297	21,4			
313	0,306	21,9			
330	0,310	21,8		0,009	2,28

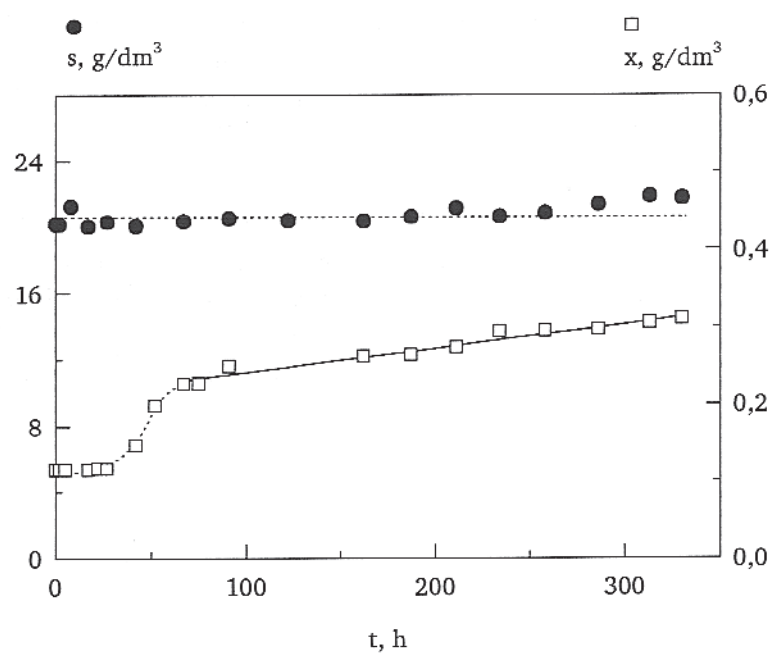


Figura 4.38 Expto. FP-HC-C5. Producción de biomasa.
Sustrato total.

D) Temperatura de hidrólisis

Se ha realizado la fermentación de hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico 1 N, durante 4 horas, a diferentes temperaturas. Seguidamente se muestra la nomenclatura y el acondicionamiento efectuado en estos experimentos.

Expto.	T _H , °C	Acondicionamiento
FP-HS-T1	70	Concentración + neutralización con NaOH
FP-HS-T2	80	Concentración + neutralización con NaOH
FP ₄ -HS-P3	90	Neutralización con KOH + concentración + decoloración
FP ₃ -HS-T4	95	Concentración + neutralización con NaOH + decoloración
FP-HS-T5	100	Concentración + neutralización con NaOH

Los resultados aparecen en las Tablas 4.57 a 4.59, para las temperaturas de 70, 80 y 100 °C, respectivamente. Los experimentos realizados a 90 y 95 °C son comunes a la serie en que se estudió el acondicionamiento y sus resultados se muestran en las tablas 4.34 y 4.39. El pH se ha mantenido prácticamente constante con el tiempo, no sufriendo variaciones superiores a 0,2 unidades.

TABLA 4.57

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP-HS-T1					$T_H=70\text{ }^{\circ}\text{C}$	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	
0	0,0406	5,41	0,09			
2	0,0412		0,08			
3	0,0421					
5	0,0445		0,07			
7	0,0491					
9	0,0576		0,07			
11	0,0678	5,23	0,05			
20	0,109	5,21	0,03			
24	0,131					
28	0,143		0,03			
33	0,161	4,85	0,05			
44	0,186	4,43	0,04			
55	0,210	4,57	0,03	0,029		
72	0,223	4,31	0,04			
94	0,252	4,46	0,03	0,048	0,013	
120	0,257	4,28				
144	0,280	4,23		0,025	0,017	
168	0,310	3,79		0,018		
193	0,332	3,44		0,008	0,027	
246	0,440	2,66		0,0		
263	0,465	2,47			0,039	
295	0,499	2,74				
319	0,492	2,63				
341		2,73		0,002		
361	0,490	2,73				
382	0,473	2,34				

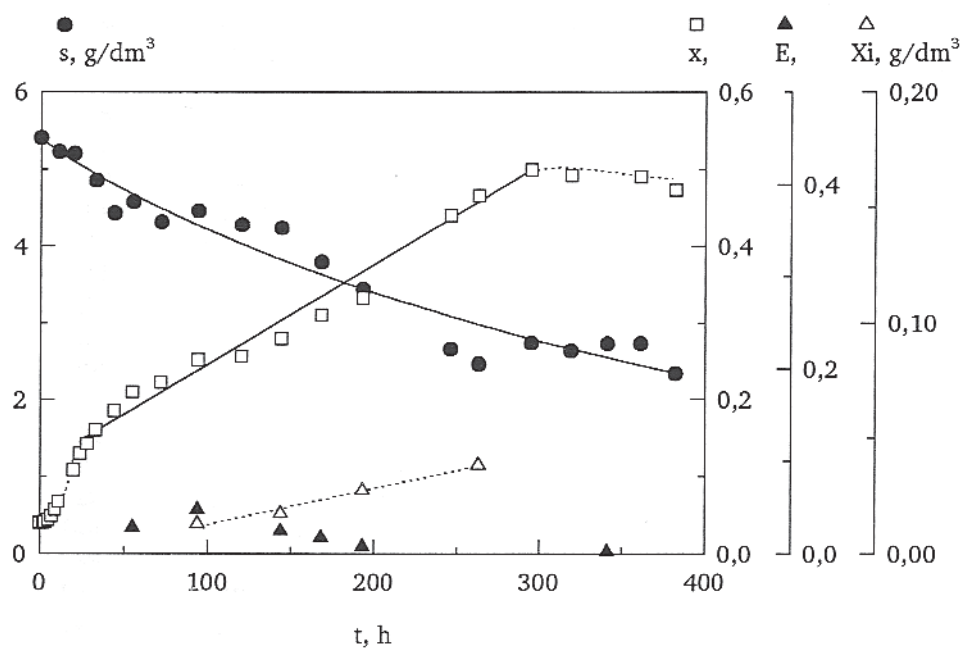


Figura 4.39 Expto. FP-HS-T1. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.58

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP-HS-T2					$T_H=80\text{ }^{\circ}\text{C}$
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0415	14,5	0,16		
2	0,0435		0,15		
3	0,0433				
5	0,0489	14,4	0,14		
7	0,0562				
9	0,0668		0,12		
11	0,0771		0,11		
20	0,146	13,6	0,06		
24	0,173				
28	0,185	13,9	0,04	0,115	
33	0,197	13,2	0,05		
44	0,222	12,7			
55	0,246	12,4	0,05		
72	0,275	12,7	0,04		
94	0,280	12,5	0,05		
120	0,287	12,2			
144	0,322	12,0		0,376	
168	0,370	11,1			
193	0,402	10,8		0,524	0,044
246	0,654	9,48		0,745	
263	0,828	9,27		0,859	
295	1,05	8,01		1,23	0,172
319	1,23	6,93		0,980	
341	1,26	6,87		0,959	0,144
361	1,29	6,02		0,848	
382	1,37	6,14			0,183
432	1,50	6,42		0,462	0,182
455	1,63	6,28			
509	2,04				
580	2,12				

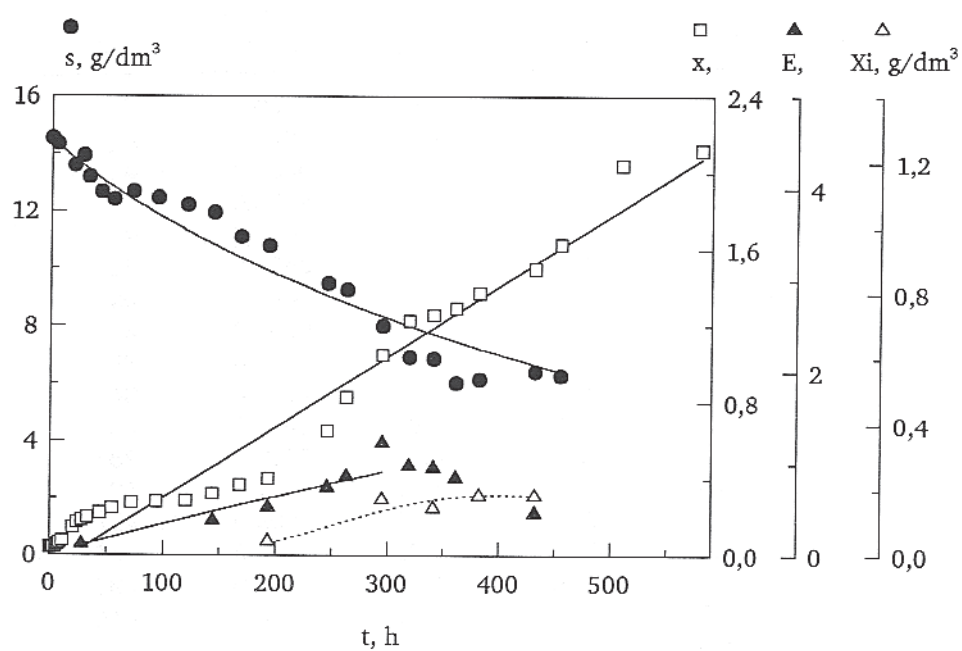


Figura 4.40 Expto. FP-HS-T2. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.59

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL Y D-GLUCOSA

Expto. FP-HS-T5

 $T_H = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$

t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³
0	0,0316	16,8	0,26		
2	0,0322	16,7			
4	0,0330				
7	0,0338				
9	0,0340				
15	0,0366	16,6	0,29		
20	0,0382				
25	0,0404				
28	0,0430				
40	0,0521		0,30		
50	0,0647	15,8	0,26		
65	0,0937	15,8	0,26		
91	0,162	15,1	0,19	0,057	
115	0,207	15,3	0,12		
146	0,253	15,3	0,06	0,163	
185	0,314	15,4	0,03		
218	0,351	14,4		0,286	
281	0,502	13,4		0,353	0,203
331	0,522	12,5		0,343	0,256
379	0,609	12,0			
450	0,815	10,4		0,564	0,489
499	1,07	8,68		0,914	0,618
546	1,38	6,05		1,34	0,895
619	1,98	3,88		0,645	1,01
666	2,35				1,05

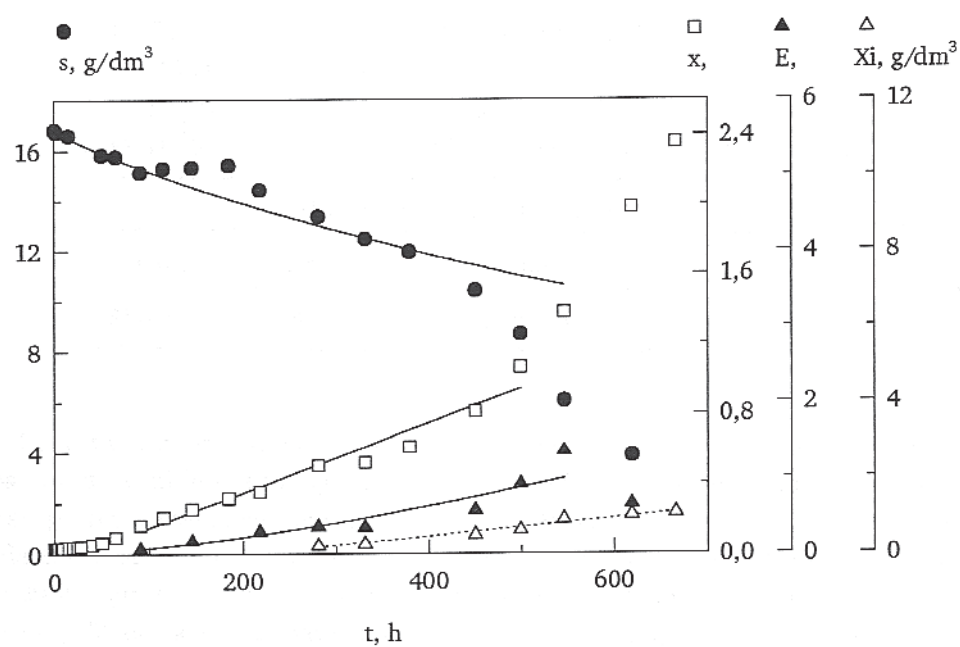


Figura 4.41 Expto. FP-HS-T5. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

4.2.3.2 Fermentación con *Fusarium oxysporum*

Con este microorganismo se han fermentado hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico 1 N a 90 °C y distintos tiempos de hidrólisis, así como hidrolizados en los que se empleó ácido clorhídrico 0,5 N a 90 °C y durante 4 horas. Los resultados se recogen en las tablas 4.60 a 4.64, indicándose seguidamente las condiciones para los distintos experimentos:

Hidrólisis con H ₂ SO ₄ 1 N, 90 °C		
Expto.	t, h	Acondicionamiento
FF-HS-t3	1	Neutralización con KOH
FF-HS-t4	2	Neutralización con KOH
FF-HS-t5	3	Neutralización con KOH
FF-HS-P3	4	Neutralización con KOH + concentración
Hidrólisis con HCl 0,5 N, 90 °C		
Expto.	t, h	Acondicionamiento
FF-HC-C3	4	Neutralización con KOH + concentración

Los resultados muestran que sólo existe crecimiento del hongo y consumo de sustrato en los casos de hidrolizados que no fueron sometidos a concentración en rotavapor y, además, presentan una baja concentración inicial de azúcares. Esta circunstancia queda de manifiesto en los experimentos FF-HS-t4 y FF-HS-t5, en los que los cultivos no comienzan a crecer hasta que se realiza una dilución con agua ultrapura (3ª etapa del experimento FF HS-t4 y 2ª etapa del experimento FF-HS-t5). La 2ª etapa del experimento FF-HS-t4 corresponde al seguimiento del cultivo tras realizar una nueva inoculación con el hongo; no se detecta crecimiento celular ni consumo de sustrato en este periodo, hasta que no se realiza la dilución con agua ultrapura (3ª etapa).

Una vez que comienza el crecimiento y el consumo de sustrato se produce también el consumo total del ácido acético presente en el medio de fermentación.

En la fermentación del hidrolizado HS-P3 no se produce asimilación de azúcares después de 166 horas, por lo que se procede a una nueva inoculación (2ª etapa), tras la cual sigue sin producirse el consumo de sustrato.

El comportamiento es similar en FF-HC-C3, en el que se ensayan dos procedimientos de detoxificación del medio de cultivo (etapas 2ª y 3ª) sin obtenerse ningún resultado positivo. En primer lugar, se trata con disolución de KOH hasta pH=10, se baja el pH a 4,5 con HCl, se adicionan 0,5 g de Na₂SO₃, se lleva de nuevo a 500 ml y pH=4,5 y se inocula de nuevo (2ª etapa). El segundo procedimiento ensayado

consistió en adicionar el Na_2SO_4 y mantener el medio en agitación a 90 °C durante media hora, adicionar KOH hasta pH=10, bajar hasta 4,5 con HCl, llevar a 500 ml e inocular de nuevo (3ª etapa).

En cuanto al pH de los cultivos, se produce una ligera subida con el tiempo en los experimentos FF-HS-t3 a t5, que se ha corregido con HCl cuando la desviación ha sido superior a 0,3 unidades. En los experimentos FF-HS-P3 y FF-HC-C3 el pH se ha mantenido prácticamente constante, no sufriendo variaciones superiores a 0,2 unidades.

TABLA 4.60

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FF-HS-t3			[H ₂ SO ₄]=1 N, t=1 h			
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,410	2,42	0,06			1,06
21	0,410					
54	0,410					
77	0,511		0,07			
119	1,18		0,02			
141		1,97	0,0	0,099	0,010	0,604
151	0,973	1,78				
166	1,19	1,62				
175	1,27	1,57		0,136	0,012	
189	1,42	1,38				0,188
214	1,65	1,20		0,202	0,025	0,0
239	2,17	1,06		0,091	0,013	
286	2,85	0,851		0,038		
309	3,62	0,704				
317	3,39	0,630		0,015		

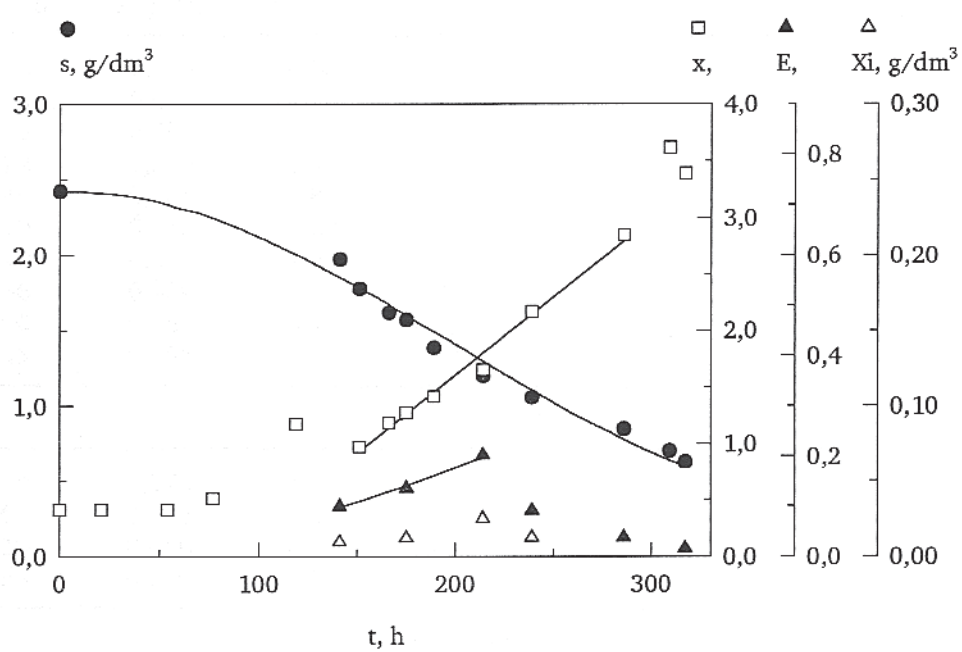


Figura 4.42 Expto. FF-HS-t3. Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.61

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FF-HS-t4 (1ª ETAPA)				[H ₂ SO ₄]=1 N, t=2 h		
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,286	4,02	0,08			1,16
3	0,414					
8	0,384	4,04				
22	0,396	3,98				
46	0,364	3,84				
70	0,318	4,27				
143	0,321	4,40				
166	0,409	4,41	0,11			
190	0,364	4,42	0,09			
215	0,396		0,09			
(2ª ETAPA)						
0	0,396	4,18				
62	0,392	4,22				1,17
110	0,450	4,20	0,09			
163	0,330	4,12	0,10			
(3ª ETAPA)						
0	0,279	2,97	0,09			0,994
63	0,603	2,45	0,03	0,049	0,007	
88	1,59	1,40	0,03	0,132	0,015	0,176
97	1,97	1,01		0,202		
112	2,24	0,828		0,265	0,009	
135	2,39	0,694		0,183	0,008	0,0
160	2,76	0,604				

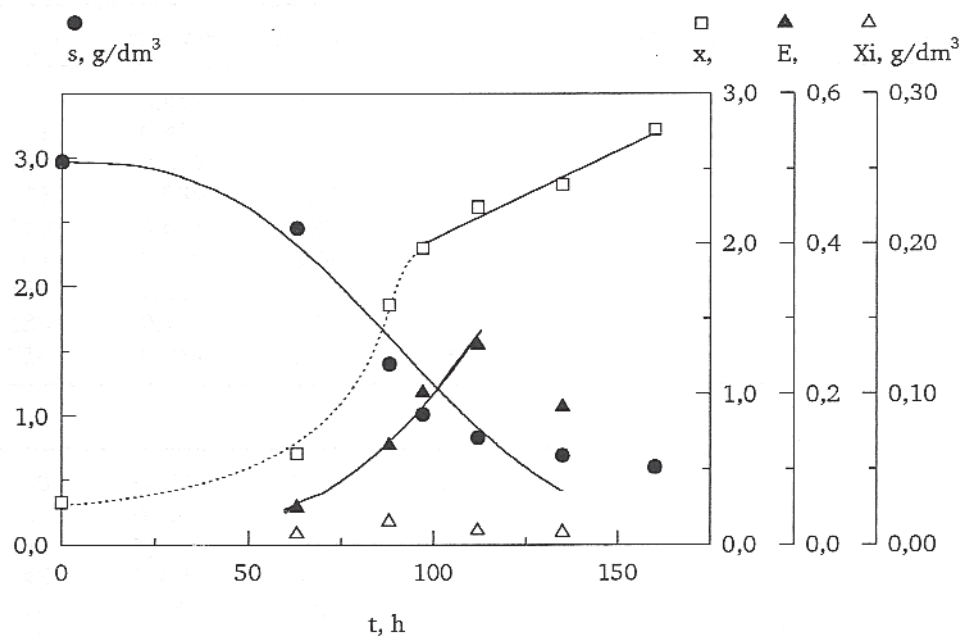


Figura 4.43 Expto. FF-HS-t4 (3ª etapa). Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.62

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ETANOL Y XILITOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FF-HS-t5 (1ª ETAPA)				[H ₂ SO ₄]=1 N, t=3 h		
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Xi, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,457	5,29	0,07			1,70
21	0,439	5,51				
54	0,517	5,71				
77	0,539	5,63				
119	0,645	5,84				
141	0,563	5,64				
166	0,463	5,38	0,10			
189	0,421	5,26				
214	0,361	5,32	0,12			1,46
(2ª ETAPA)						
0	0,255	3,17	0,07			0,954
23	0,255	3,15	0,08			
31	0,293		0,08			
46	0,450	3,02	0,02			
70	0,485	2,61	0,02	0,073		
93	0,546	2,33		0,162		0,586
117	0,696	1,82		0,381	0,013	
143	0,765	1,35		0,403	0,014	
166	0,910	0,968		0,435	0,015	0,273
190	1,14	0,750		0,442		
222		0,701		0,419	0,015	0,0

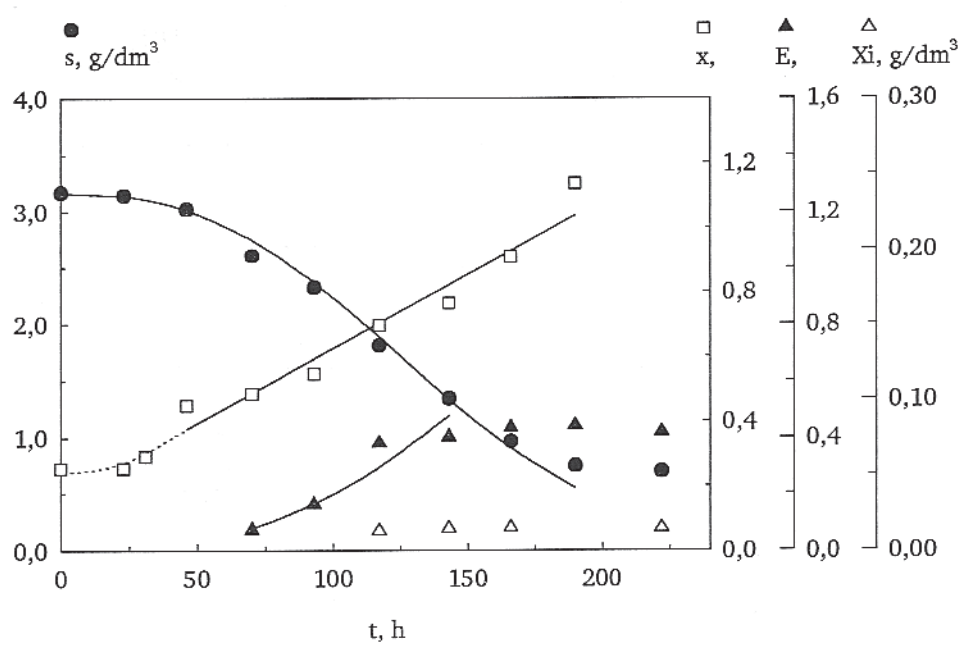


Figura 4.44 Expto. FF-HS-t5 (2ª etapa). Producción de biomasa, etanol y xilitol. Sustrato total.

TABLA 4.63
PRODUCCIÓN DE BIOMASA.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FF-HS-P3 (1ª ETAPA)				[H ₂ SO ₄] = 1 N, t = 4 h
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,740	21,2	0,24	1,81
8	0,897			
20	1,15	20,8	0,27	
32	1,05			
44		22,3	0,32	
71	0,949	21,5	0,26	
103	0,858			
166	1,11	22,0	0,34	
(2ª ETAPA)				
0	0,958	21,9	0,34	
7	0,879			
21	0,853	21,1		
47	1,05	20,9	0,32	
143	0,853	19,4	0,31	
165	0,804	20,4	0,35	

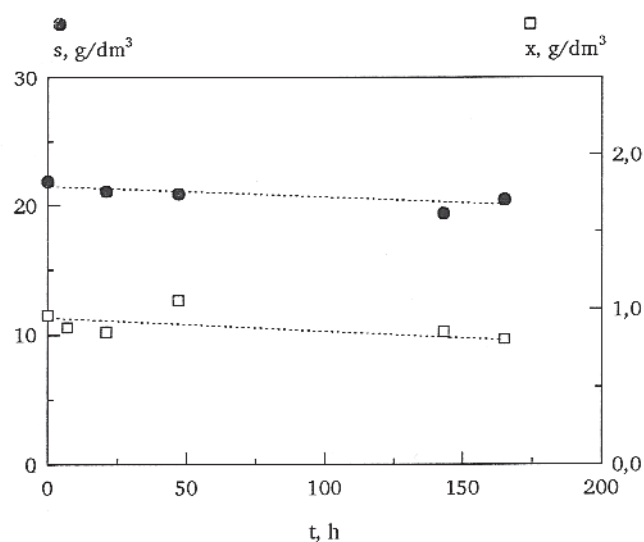


Figura 4.45 Expto. FF-HS-P3 (2ª etapa).
Producción de biomasa. Sustrato total.

TABLA 4.64
PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ETANOL.
SUSTRATO TOTAL, D-GLUCOSA Y ÁCIDO ACÉTICO

Expto. FF-HC-C3 (1ª ETAPA)				[HCl]=0,5 N, t=4 h	
t, h	x, g/dm ³	s, g/dm ³	g, g/dm ³	E, g/dm ³	Ac, g/dm ³
0	0,500	16,5	0,20		2,97
4	0,542	15,5			
19	0,553	17,4	0,23		
31	0,592	16,3			
50	0,517	16,8	0,20		
78	0,537	16,3			
141	0,561	15,6	0,21		
167	0,565	17,0			
213	0,563	16,8		0,008	2,82
(2ª ETAPA)					
0	0,472	10,1			1,82
49	0,424	10,3			
88	0,479	11,2			1,78
(3ª ETAPA)					
0	0,382	10,2	0,13		1,63
48	0,445	11,0			
119	0,405	10,6			
147	0,443	11,1	0,14		1,75

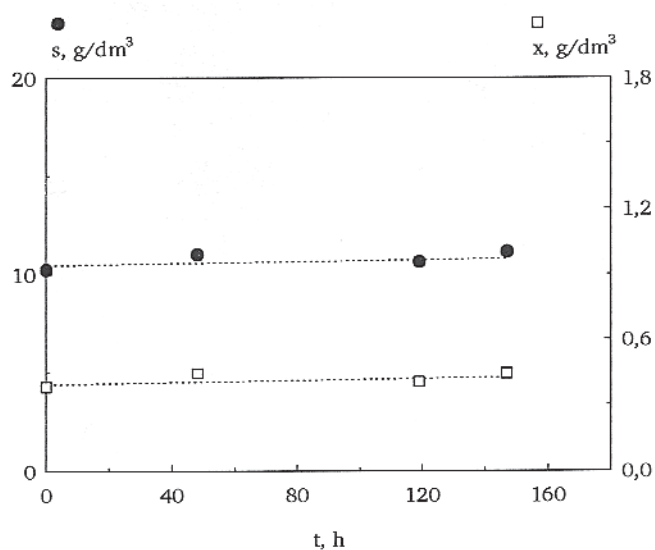


Figura 4.46 Expto. FF-HC-C3 (3ª etapa).
Producción de biomasa. Sustrato total.

V. Interpretación de los Resultados

5.1 Hidrólisis

5.1 HIDRÓLISIS

En la hidrólisis ácida del residuo de tallos de girasol se han empleado los ácidos sulfúrico y clorhídrico. Con el primero se ha estudiado la influencia del tamaño de partícula, la separación de las dos fracciones del residuo, el tiempo de proceso, la temperatura de hidrólisis y la concentración de ácido. En los experimentos con ácido clorhídrico se ha estudiado el efecto de la temperatura de hidrólisis y de la concentración de ácido.

5.1.1 INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

En esta serie se ha mantenido constante la concentración de ácido sulfúrico (1 N) y la temperatura de hidrólisis (90 °C), variándose el tamaño de partícula del residuo. A partir de las concentraciones de azúcares reductores totales y D-glucosa determinadas a distintos tiempos (Tablas 4.1 y 4.2) se han calculado los rendimientos Y_T y Y_G , definidos por las expresiones:

$$Y_T = \frac{\text{kg azúcares reductores totales}}{\text{kg residuo seco inicial}} \quad [5.1]$$

$$Y_G = \frac{\text{kg D-glucosa}}{\text{kg residuo seco inicial}} \quad [5.2]$$

para los distintos tiempos en cada experimento. En todos los casos se produce un aumento de Y_T y Y_G en el transcurso del proceso hidrolítico, como se muestra en la Figura 5.1 para uno de los experimentos de la serie. Como puede apreciarse, los valores obtenidos de Y_T son muy superiores a los de Y_G .

En la Tabla 5.1 se recogen los valores de Y_T y Y_G al final de cada hidrólisis. Se observa que el valor máximo de Y_T se obtiene para el tamaño de partícula comprendido entre 0,425 y 0,6 mm.

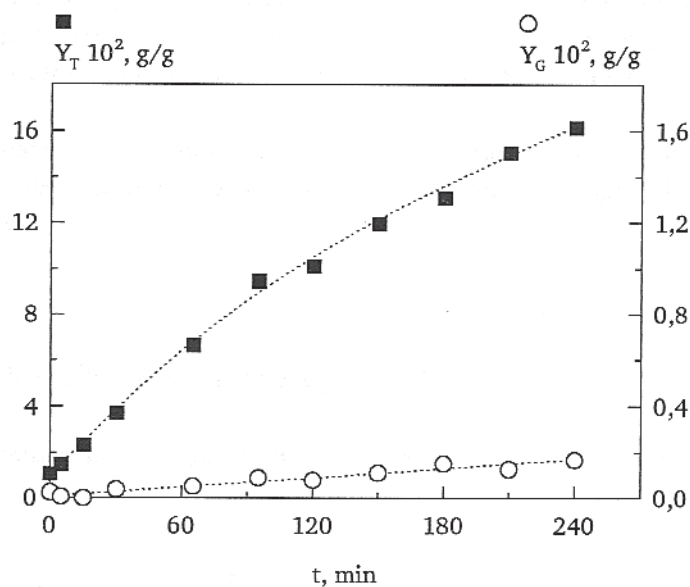


Figura 5.1 Rendimientos en azúcares reductores totales y en D-glucosa en el transcurso del experimento HS-P3

TABLA 5.1

INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA
Rendimientos en azúcares reductores totales
y en D-glucosa al final de la hidrólisis

Expto.	Tamaño de partícula, mm	Y _T 10 ² , g/g	Y _G 10 ² , g/g
HS-P1	0,125-0,300	12,3	0,23
HS-P2	0,300-0,425	14,7	0,17
HS-P3	0,425-0,600	16,2	0,17
HS-P4	0,600-0,850	13,5	0,16
HS-P5	0,850-1,200	13,9	0,17
HS-P6	1,200-1,600	13,9	0,22
HS-P7	1,600-2,000	13,3	0,18

La influencia del tamaño de partícula es estudiada por distintos grupos de investigación. En relación con este parámetro, Ballesteros *et al.* (2002), estiman que no existe una dependencia significativa entre el tamaño de partícula y la recuperación de azúcares hemicelulósicos en el pretratamiento con *steam explosion* de residuos agrícolas, aunque la recuperación de celulosa es mayor para los tamaños

de partícula superiores (8-12 mm) empleados en el estudio, lo que influye en la economía global del proceso.

Por otra parte, el estudio de la cinética del proceso de hidrólisis se ha realizado ajustando las concentraciones de azúcares con el tiempo de operación mediante una ecuación potencial:

$$s = m t^z \quad [5.3]$$

que cumple con la condición inicial de que para $t=0$, $s=0$.

Para determinar los parámetros m y z de la ecuación anterior, se ha linealizado en la forma:

$$\log s = \log m + z \log t \quad [5.4]$$

Para cada experimento de la serie se ha representado $\log s$ frente a $\log t$, obteniéndose una línea recta de cuyo ajuste por mínimos cuadrados se han calculado los parámetros m y z recogidos en la Tabla 5.2. En la Figura 5.2 se muestran como ejemplo los ajustes realizados para dos de los experimentos de esta serie.

La determinación de la velocidad de hidrólisis es inmediata una vez que se dispone de la ecuación que relaciona las concentraciones de azúcares reductores con el tiempo, ecuación [5.3], según la expresión:

$$r = \frac{ds}{dt} = m z t^{z-1} \quad [5.5]$$

Así, se pueden obtener las velocidades de hidrólisis para distintos tiempos en cada experimento. En la Figura 5.3 se representan los valores de r calculados, en los tiempos en que se tomaron muestras de hidrolizados, para los experimentos HS-P1 y HS-P3. Se observa que la velocidad de hidrólisis va disminuyendo a lo largo del proceso, siendo esta disminución más pronunciada al principio y más suave a partir de la primera hora de hidrólisis.

Calculando r con la ecuación [5.5] para un tiempo muy próximo a cero ($t=1$ s) se obtienen las velocidades iniciales de hidrólisis para cada experimento, r_0 , recogidas en la Tabla 5.2. Puede observarse una disminución de los valores de r_0 conforme aumenta el tamaño de partícula del residuo, obteniéndose el mayor valor de r_0 , 1,27 g/(dm³ min), con el tamaño de partícula más pequeño.

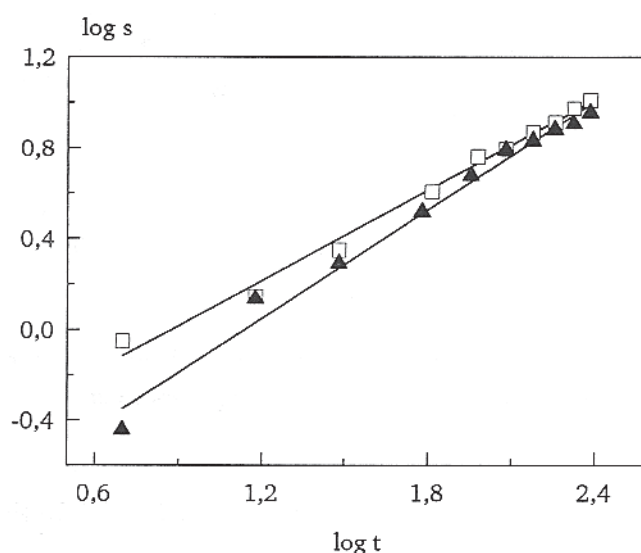


Figura 5.2 Reproducción de la ecuación [5.4] para los experimentos HS-P3 (□) y HS-P6 (▲)

TABLA 5.2
INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA
Parámetros cinéticos y velocidades iniciales de hidrólisis

Expto.	Tamaño de partícula, mm	m	z	r_0 , g/(dm ³ min)
HS-P1	0,125-0,300	0,383	0,571	1,27
HS-P2	0,300-0,425	0,287	0,649	0,783
HS-P3	0,425-0,600	0,265	0,663	0,698
HS-P4	0,600-0,850	0,182	0,729	0,401
HS-P5	0,850-1,200	0,218	0,690	0,536
HS-P6	1,200-1,600	0,124	0,797	0,227
HS-P7	1,600-2,000	0,0690	0,909	0,0910

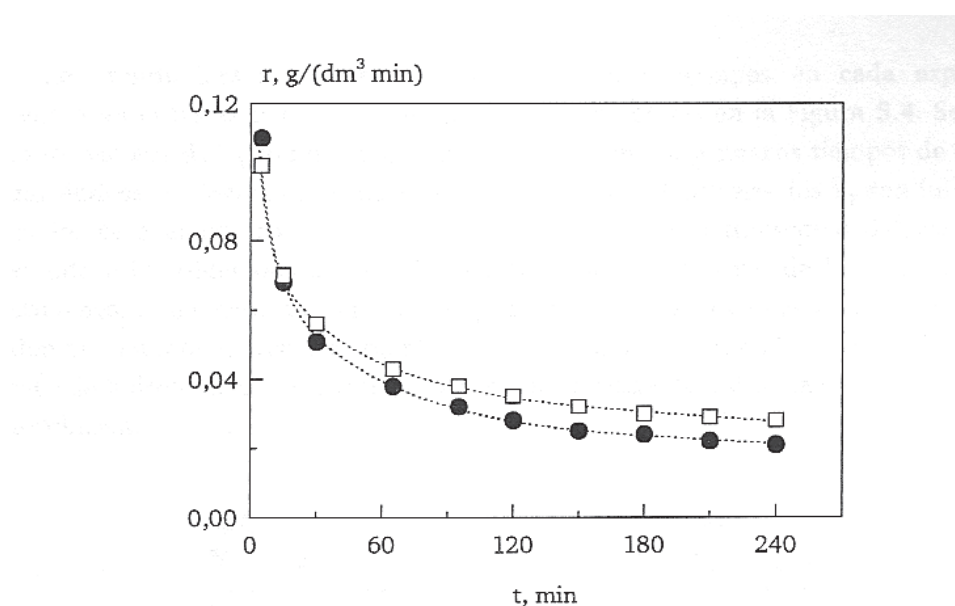


Figura 5.3 Velocidades de hidrólisis en el transcurso del proceso para los experimentos HS-P1 (●) y HS-P3 (□)

5.1.2 SEPARACIÓN DE MÉDULA Y CUBIERTA

Se han realizado hidrólisis con ácido sulfúrico 1 N a 90 °C de las dos fracciones del residuo de tallo de girasol por separado: médula y cubierta. Los valores de Y_T y Y_G al final de la hidrólisis se recogen en la Tabla 5.3. Los rendimientos en azúcares reductores totales son muy superiores a los de los rendimientos en D-glucosa. Se observa que el valor de Y_T obtenido en la hidrólisis de la cubierta es prácticamente el doble que en las de la médula, mientras que los rendimientos en D-glucosa son mayores para la médula.

TABLA 5.3
SEPARACIÓN DE MÉDULA Y CUBIERTA
Rendimientos en azúcares reductores totales
y en D-glucosa al final de la hidrólisis

Expto.	Fracción	Y_T 10 ² , g/g	Y_G 10 ² , g/g
HS-S1	Cubierta	14,8	0,16
HS-S2	Médula	7,79	0,49
HS-S3	Médula	8,46	0,32

Los rendimientos calculados para los distintos tiempos en cada experimento aumentan en el transcurso de la hidrólisis, como se aprecia en la Figura 5.4. Se observa cómo los valores de Y_T son mayores para la médula en los primeros tiempos de hidrólisis produciéndose un incremento suave con el tiempo. En la cubierta los Y_T son inferiores al principio, pero aumentan de forma más pronunciada en el transcurso del experimento superando a los obtenidos en la hidrólisis de la médula a partir de la primera hora de experimento. Este comportamiento parece indicar que los azúcares generados en la médula pueden proceder de la fracción soluble de la celulosa, al menos en los tiempos iniciales del proceso de hidrólisis. Esta fracción puede ser más fácilmente hidrolizable en la médula que en la cubierta.

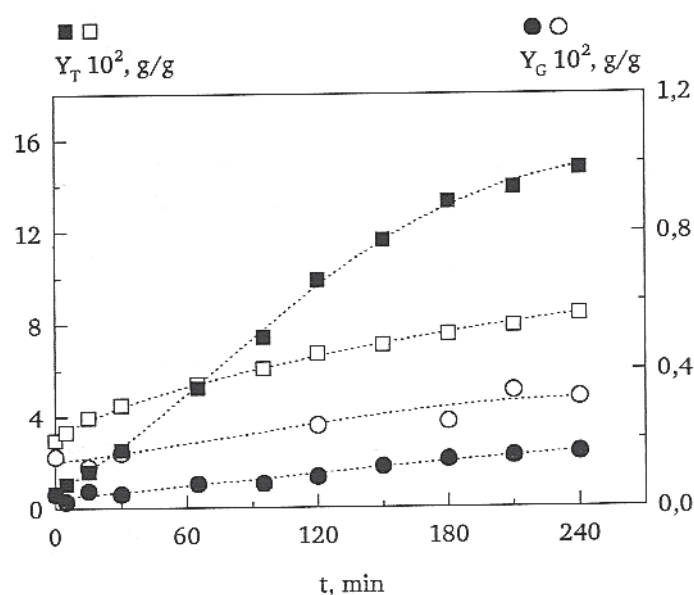


Figura 5.4 Rendimientos en azúcares reductores totales y en D-glucosa en el transcurso de los experimentos HS-S1 (■, ●) y HS-S3 (□, ○)

Las velocidades de hidrólisis se han obtenido con la ecuación [5.5], tras determinar los parámetros m y z ajustando las concentraciones de azúcares en el transcurso de los experimentos a la ecuación [5.4]. En la Figura 5.5 se muestran como ejemplo dos de los ajustes realizados. Los valores de m y z así obtenidos se recogen en la Tabla 5.4, junto con las velocidades iniciales de hidrólisis, r_0 . Los valores de r_0 son superiores para las hidrólisis de la médula. Sin embargo, cuando se calculan los valores de r a los tiempos en que se tomaron muestras del hidrolizado se obtienen valores superiores para la hidrólisis de la cubierta, como se muestra en la Figura 5.6.

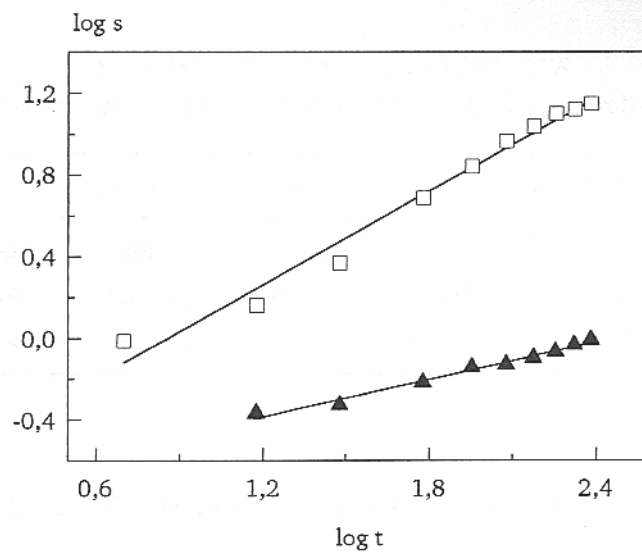


Figura 5.5 Reproducción de la ecuación [5.4] para los experimentos HS-S1 ($\square$) y HS-S2 ($\blacktriangle$)

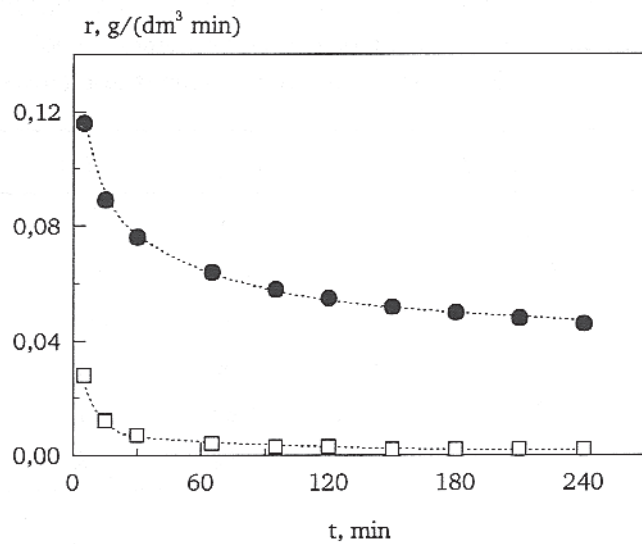


Figura 5.6 Velocidades de hidrólisis en el transcurso del proceso para los experimentos HS-S1 ($\bullet$) y HS-S3 ($\square$)

TABLA 5.4
SEPARACIÓN DE MÉDULA Y CUBIERTA
Parámetros cinéticos y velocidades iniciales de hidrólisis

Expto.	Fracción	m	z	r_o , g/(dm ³ min)
HS-S1	Cubierta	0,224	0,762	0,452
HS-S2	Médula	0,177	0,306	0,929
HS-S3	Médula	0,358	0,259	1,92

5.1.3 INFLUENCIA DEL TIEMPO EN EL PROCESO DE HIDRÓLISIS

En las hidrólisis realizadas con ácido sulfúrico 1 N a 90 °C se ha modificado el tiempo de operación en los valores que se recogen en la Tabla 5.5.

TABLA 5.5
INFLUENCIA DEL TIEMPO EN EL PROCESO DE HIDRÓLISIS
Conversiones fraccionales, rendimientos en azúcares
reductores totales y en D-glucosa al final de la hidrólisis

Expto.	t, min	X_H , %	X_C , %	Y_T 10 ² , g/g	Y_G 10 ² , g/g
HS-t1	0	16,6	0,0	1,06	-
HS-t2	30	31,8	2,48	3,11	-
HS-t3	60	50,3	9,01	5,21	-
HS-t4	120	64,5	14,4	9,31	-
HS-t5	180	83,4	14,2	11,6	0,17
HS-P3	240	91,5	13,6	16,2	0,17

En esta tabla se recogen los rendimientos calculados al final de cada hidrólisis con las correspondientes concentraciones de azúcares reductores totales y D-glucosa. Se produce un aumento de Y_T con el tiempo de hidrólisis, obteniéndose un valor máximo a los 240 minutos de 16,2 g/g.

Delgenes *et al.* (1990), operando a presión atmosférica, con ácido sulfúrico 0,4 N y a 91,5 °C, encuentran que la concentración de D-xilosa obtenida en la hidrólisis de paja de trigo describe un comportamiento aproximadamente sigmoidal, con un máximo rendimiento de 16,6 g/g al cabo de 23 h de tratamiento. Además de la naturaleza del residuo, las diferencias en cuanto al tiempo en que se alcanza el mayor rendimiento son debidas a la concentración de ácido utilizada, inferior en el trabajo que se comenta. Parajó *et al.* (1993), estudiando la hidrólisis de madera de eucalipto con ácido sulfúrico a presión atmosférica durante un tiempo total de 11 horas, obtienen más del 80 % de rendimiento en azúcares en las primeras cuatro horas de hidrólisis para concentraciones de ácido entre 0,7 y 2,2 N. En cambio, Converti *et al.* (2000b), en las mismas condiciones que en el estudio precedente, consiguen una ganancia de cerca del 40 % en azúcares reductores al pasar de cuatro a 22 horas de hidrólisis, con una concentración de ácido sulfúrico de aproximadamente 0,8 N.

Por otra parte, se ha realizado la caracterización de los distintos residuos resultantes a los diferentes tiempos de hidrólisis cuyos resultados se muestran en el apartado de Resultados Experimentales (Tabla 4.6). Se han calculado las conversiones en hemicelulosa, X_H , y en celulosa, X_C , considerando como hipótesis de partida que la lignina permanece inalterada en el proceso de hidrólisis. De acuerdo con la definición de conversión fraccional se puede calcular este parámetro para la fracción hemicelulósica en la forma:

$$X_H = \frac{\text{kg hemicelulosa transformados}}{\text{kg hemicelulosa iniciales}} \cdot 100 \quad [5.6]$$

y para la de celulosa:

$$X_C = \frac{\text{kg celulosa transformados}}{\text{kg celulosa iniciales}} \cdot 100 \quad [5.7]$$

Los valores calculados con estas expresiones para los experimentos de esta serie se recogen en la Tabla 5.5. Se observa cómo se va produciendo una degradación progresiva de las fracciones hemicelulósica y celulósica al ir aumentando el tiempo de hidrólisis, siendo muy superiores los valores de X_H frente a los de X_C . Esta evolución se muestra en la Figura 5.7, en la que se representan las variaciones de los contenidos en hemicelulosa y celulosa calculados suponiendo que la lignina permanece inalterada.

El mayor valor para la conversión en hemicelulosa se obtiene a los 240 minutos de hidrólisis, tiempo al que solamente el 8,5 % de la hemicelulosa quedaría sin hidrolizar. La celulosa en cambio se ataca en menor medida, alcanzándose una conversión del 14,4 % a las dos horas de hidrólisis, sin conseguirse un aumento a tiempos superiores. Sin embargo, es significativo el hecho de que los rendimientos en D-glucosa obtenidos sean tan bajos a pesar de que se degrada parte de la

fracción celulósica. Esto puede deberse a que se produzca la ruptura de la celulosa en oligómeros sin llegar a liberarse la D-glucosa, o bien a que se produzca la degradación de las moléculas de D-glucosa obtenidas.

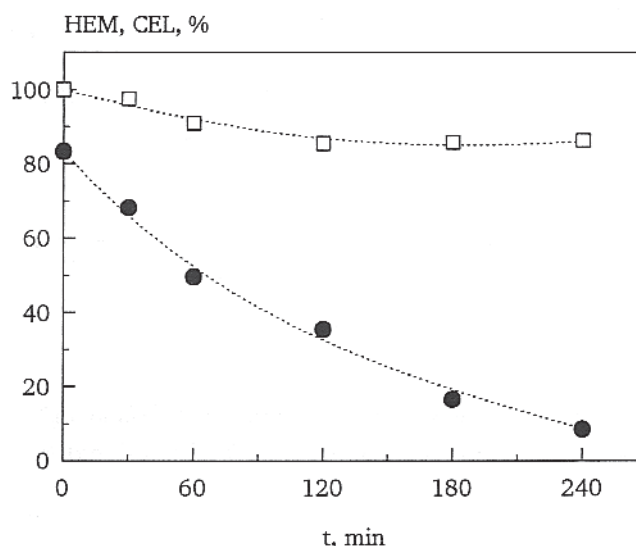


Figura 5.7 Variación de los porcentajes en hemicelulosa (●) y celulosa (□) con el tiempo de hidrólisis

A partir de las concentraciones de azúcares reductores totales obtenidos al final de cada una de las hidrólisis de esta serie, se ha representado el ajuste aplicado a la ecuación [5.4] tal como se muestra en la Figura 5.8. Posteriormente, con los valores de los parámetros m y z obtenidos de esta representación, se han calculado según la ecuación [5.5] las correspondientes velocidades de hidrólisis que se recogen en la Tabla 5.6. De nuevo se vuelve a poner de manifiesto como la velocidad de hidrólisis disminuye con el tiempo de proceso, aunque esta disminución es poco pronunciada a partir de los 60 min.

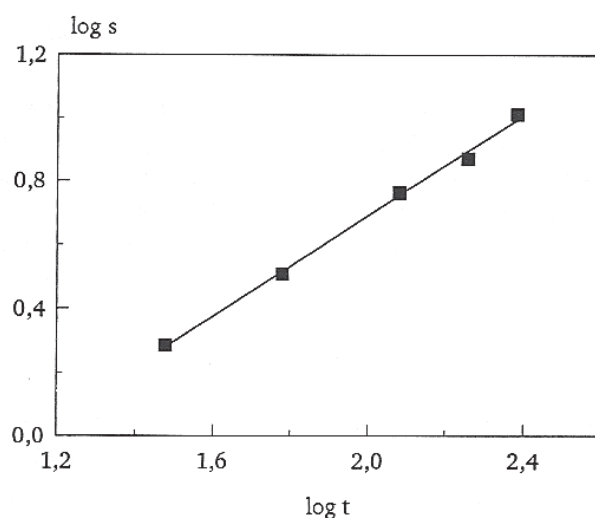


Figura 5.8 Ajuste de las concentraciones de azúcares reductores totales obtenidas al final de cada hidrólisis utilizando la ecuación [5.4]

TABLA 5.6
INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PROCESO

Velocidades de hidrólisis	
t, min	r, g/(dm ³ min)
30	0,056
60	0,044
120	0,035
180	0,030
240	0,028

5.1.4 INFLUENCIA DE LA NATURALEZA Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO

Se han realizado las hidrólisis con los ácidos sulfúrico y clorhídrico manteniendo constante la temperatura en 90 °C y variando la concentración del agente hidrolítico.

5.1.4.1 Ácido sulfúrico

Las concentraciones de ácido ensayadas han sido 0,1, 0,5, 1,0 y 2,0 N. En la Tabla 5.7 se recogen los valores de Y_T y Y_G para los tiempos finales de hidrólisis en cada experimento. Se observa cómo ambos rendimientos van aumentando con la concentración de ácido empleada, oscilando en el intervalo 1,8 - 17,0 g/g para Y_T y 0,03 - 0,3 para Y_G . Sin embargo, el incremento que se produce al pasar de 1,0 a 2,0 N es poco significativo si lo comparamos con los aumentos que se venían produciendo entre los valores de concentraciones inferiores.

TABLA 5.7
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SULFÚRICO

Conversiones fraccionales, rendimientos en azúcares
reductores totales y en D-glucosa al final de la hidrólisis

Expto.	C_A , N	X_H , %	X_C , %	Y_T 10 ² , g/g	Y_G 10 ² , g/g
HS-C1	0,1	4,12	0,0	1,85	0,03
HS-C2	0,5	64,1	9,33	8,28	0,18
HS-P3	1,0	91,5	13,6	16,2	0,17
HS-C4	2,0	100	22,6	17,0	0,31

Los valores de Y_T en el transcurso de cada experimento van aumentando con el tiempo como se muestra en la Figura 5.9 para las hidrólisis realizadas a las concentraciones de 0,1 y 2,0 N, si bien se observa que a concentraciones de ácido mayores el incremento del rendimiento en azúcares reductores es más rápido al principio para seguir aumentando de una forma más suave a tiempos superiores. Por ejemplo para la concentración 2,0 N la diferencia de los rendimientos entre las 2 y las 4 horas de hidrólisis es poco significativa. Un resultado parecido encuentran Parajó *et al.* (1993) en la hidrólisis de madera de eucalipto: el paso de una concentración de ácido sulfúrico de 0,7 a 1,4 N proporciona una ganancia del 6 % en el rendimiento en D-xilosa liberada. Con el mismo residuo, Converti *et al.* (2000b) estudian la influencia de la concentración de ácido sulfúrico en la hidrólisis a presión atmosférica, a la temperatura de ebullición, sobre los porcentajes de azúcares reductores obtenidos, encontrando que, para duplicar este parámetro, es preciso multiplicar por 15 la concentración de ácido empleada (de 0,2 a 3 N).

A partir de los resultados obtenidos de la caracterización de los residuos al final de la hidrólisis, se han calculado los valores de X_H y X_C que se muestran en la Tabla 5.7. Estos resultados muestran las variaciones de las fracciones hemicelulósica y celulósica (Figura 5.10), obtenidas bajo la hipótesis de que la lignina permanece inalterada.

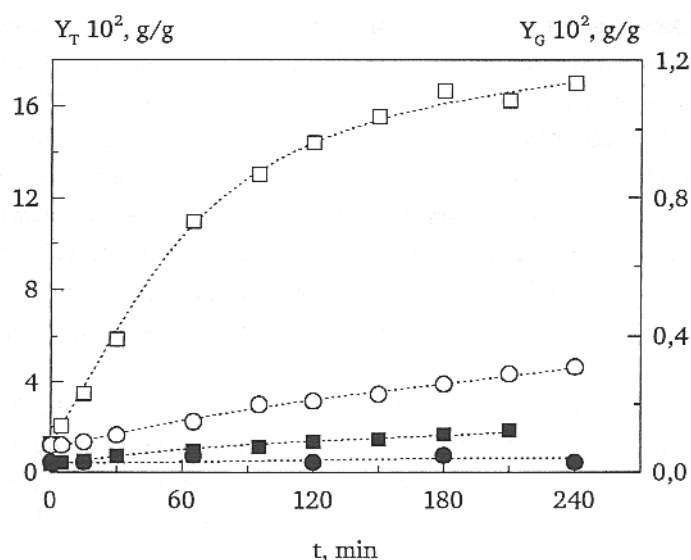


Figura 5.9 Rendimientos en azúcares reductores totales y en D-glucosa en el transcurso de los experimentos HS-C1 (■, ●) y HS-C4 (□, ○)

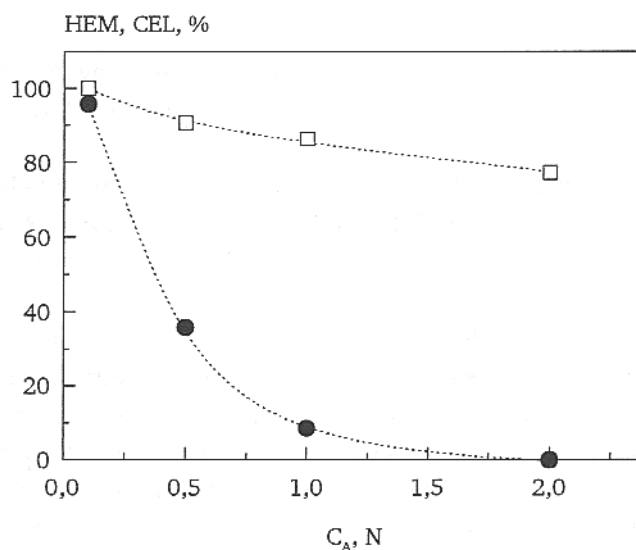


Figura 5.10 Variación de los porcentajes en hemicelulosa (●) y celulosa (□) con la concentración de ácido sulfúrico

La hidrólisis de la fracción hemicelulósica es casi completa a una concentración de ácido de 1,0 N a la que se alcanza una X_H del 91,5 %, mientras que a 0,1 N apenas se consigue ataque hidrolítico después de las cuatro horas de experimento. El porcentaje de celulosa atacado por el ácido también se incrementa con la concentración, alcanzándose un valor del 22,6 % en la hidrólisis con $C_A=2$ N. Por otra parte, se observa que el incremento de las conversiones que se produce entre los experimentos a 1 N y 2 N no se corresponde con un aumento significativo de los valores de Y_T , lo que pone de manifiesto la posible degradación de los azúcares producidos, o bien la formación de oligómeros que no han alcanzado el estado final del monómero D-glucosa.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos en la hidrólisis con ácido sulfúrico del residuo de poda de olivo donde se alcanza la conversión total de la hemicelulosa para una concentración 1 N, mientras que la fracción celulósica se hidroliza en un 24,1 % cuando la concentración de ácido sulfúrico es 2 N, Romero (2003).

Por otra parte, por aplicación del método diferencial de análisis de datos, y realizando un análisis parcial de la ecuación cinética mediante el método de las velocidades iniciales, se ha determinado el valor de la constante cinética, k (referida al sustrato), y el orden de la reacción, n . En principio, se supone una ecuación tipo potencial de la forma:

$$r_o = KC_A^n \quad [5.8]$$

donde r_o representa la velocidad de reacción inicial determinada por la ecuación [5.5] con base en la formación de producto.

Las velocidades iniciales de hidrólisis, r_0 , se determinan para cada experimento calculando los parámetros m y z de la ecuación [5.3] y sustituyendo en la ecuación [5.5] para un tiempo próximo a cero ($t=1$ s)

En las representaciones de los valores de $\log s$ frente a $\log t$ realizadas para obtener m y z , se observa que los puntos experimentales de azúcares no se ajustan a una única recta, como se muestra en la Figura 5.11. Para concentraciones de ácido sulfúrico inferiores a 1 N se aprecia un primer tramo recto de menor pendiente que podría corresponderse con la degradación de la parte de la hemicelulosa más fácilmente hidrolizable, seguido de un segundo periodo en el que se hidrolizaría el resto de la hemicelulosa. Este segundo intervalo, marcado con línea continua en la Figura 5.11, es el que se ha empleado para el ajuste a la ecuación [5.4], por lo que los valores de velocidades obtenidos serán los correspondientes a la fracción hemicelulósica más difícilmente hidrolizable.

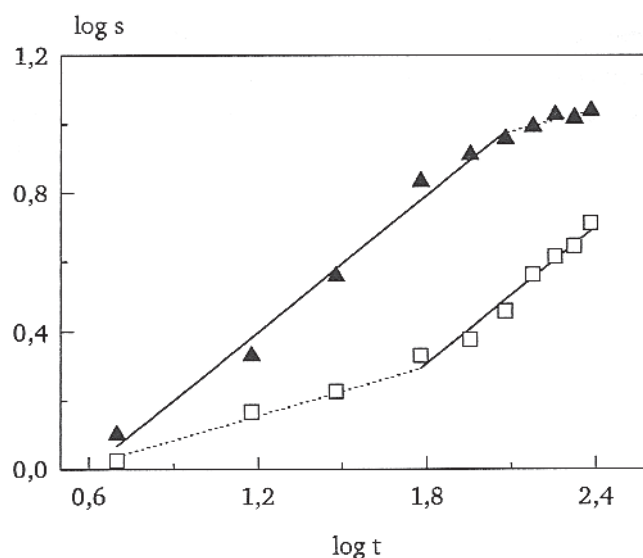


Figura 5.11 Reproducción de la ecuación [5.4] para los experimentos HS-C2 ($\square$) y HS-C4 ($\blacktriangle$)

La utilización, sobre todo a efectos de cálculo de las constantes cinéticas, de dos fracciones de la hemicelulosa, una que se hidroliza fácilmente y otra que lo hace con más dificultad, es descrita también por otros autores, Parajó *et al.* (1993), Parajó *et al.* (1994), Esteghlalian *et al.* (1997), Eken-Saracoglu *et al.* (1998), Lavarack *et al.* (2000), Lavarack *et al.* (2002). Los valores habituales para la fracción fácilmente hidrolizable de diferentes residuos se encuentran entre 0,5 y 1 g/g, Aguilar *et al.* (2002), aunque con frecuencia se obtiene que una de las fracciones no reacciona en las condiciones experimentales empleadas.

Para el experimento HS-C4 (2 N) se detecta ya en un primer tramo el ataque sobre la hemicelulosa al que corresponde la línea continua; los siguientes puntos

de azúcares que darían una pendiente menor resultarían de la hidrólisis de parte de la celulosa que no se observaba en las concentraciones inferiores. En el experimento HS-P3 (1 N) todos los valores de azúcares se han ajustado a una sola recta correspondiente a la hidrólisis de la fracción hemicelulósica como se representó en la Figura 5.2.

Una vez evaluadas las velocidades iniciales y, partiendo de la ecuación [5.8] en su forma linealizada,

$$\ln r_o = \ln k + n \ln C_A \quad [5.9]$$

mediante la representación gráfica de $\ln r_o$ frente a $\ln C_A$ que se muestra en la Figura 5.12, se determina el valor de n a partir de la pendiente y el valor de k a partir de la ordenada en el origen, obteniéndose un ajuste aceptable. Sustituyendo los valores de n y k en la ecuación [5.8] resulta la expresión:

$$r_o = 0,618 C_A^{1,06} \quad [5.10]$$

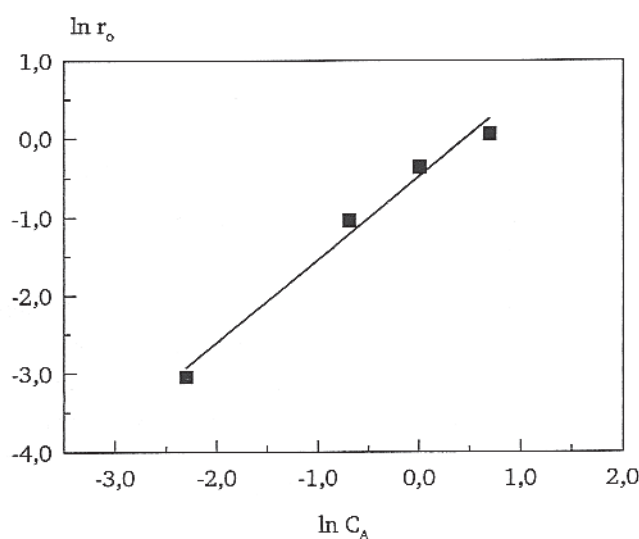


Figura 5.12 Ajuste a la ecuación [5.9] de las velocidades iniciales de las hidrólisis realizadas a distintas concentraciones de ácido sulfúrico

5.1.4.2 Ácido clorhídrico

En esta serie se han ensayado las concentraciones 0,1, 0,3, 0,5, 0,75, 1,0 y 2,0 N, obteniéndose los valores de rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa al final de cada hidrólisis que se recogen en la Tabla 5.8. Como sucedía

con el ácido sulfúrico, también se produce un aumento de los valores finales de Y_T e Y_G con la concentración de ácido clorhídrico, siendo el incremento de los rendimientos en azúcares reductores totales cada vez menos importante al aumentar la concentración de ácido.

Los rendimientos son inferiores a los obtenidos con este mismo ácido en el residuo de poda de olivo, Moya (1997), donde se alcanzaron valores de 32,6 y 9,5 g/g para azúcares reductores totales y D-glucosa, respectivamente, para una concentración 1 N y a 90 °C.

TABLA 5.8
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CLORHÍDRICO
Conversiones fraccionales, rendimientos en azúcares
reductores totales y en D-glucosa al final de la hidrólisis

Expto.	C_A , N	X_H , %	X_C , %	Y_T 10 ² , g/g	Y_G 10 ² , g/g
HC-C1	0,1	38,9	0,0	3,76	0,05
HC-C2	0,3	83,5	13,7	13,7	0,11
HC-C3	0,5	95,2	15,1	16,9	0,14
HC-C4	0,75	100	19,8	19,5	0,26
HC-C5	1,0	100	20,3	22,0	0,35
HC-C6	2,0	100	22,4	24,6	0,54

De igual forma, se observa para todas las concentraciones ensayadas un aumento de los rendimientos en el transcurso de cada hidrólisis, como se muestra en la Figura 5.13 para dos experimentos de esta serie. A medida que la concentración de ácido es más elevada, en la parte final de la hidrólisis el aumento de Y_T es más suave, como se observa en la figura para el experimento HC-C6 (2 N).

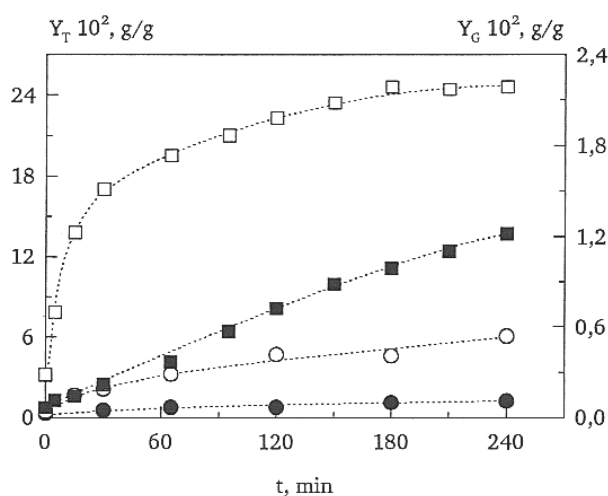


Figura 5.13 Rendimientos en azúcares reductores totales y en D-glucosa en el transcurso de los experimentos HC-C2 (■, ●) y HC-C6 (□, ○)

Utilizando también ácido clorhídrico, en concentraciones de aproximadamente 0,4, 0,8 y 1,3 N, pero a una temperatura superior (122 °C), Herrera *et al.* (2003) constatan que la mayor concentración de D-xilosa (16,4 g/dm³) en la hidrólisis de paja de sorgo se obtiene a la menor concentración de ácido ensayada, mientras que a concentraciones superiores se detectan reacciones de degradación hacia furfural. Por su parte, la concentración de D glucosa liberada se sitúa en 4,2 g/dm³ como máximo en esas condiciones.

Con respecto a la caracterización de los residuos del proceso, los valores de las conversiones de las fracciones hemicelulósica y celulósica obtenidos se recogen en la Tabla 5.8, representándose en la Figura 5.14 las correspondientes variaciones de ambas fracciones. La conversión de la hemicelulosa es total a partir de una concentración de HCl de 0,75 N, mientras que el mayor valor de X_c es del 22,4 %, obtenido para $C_A = 2,0$ N.

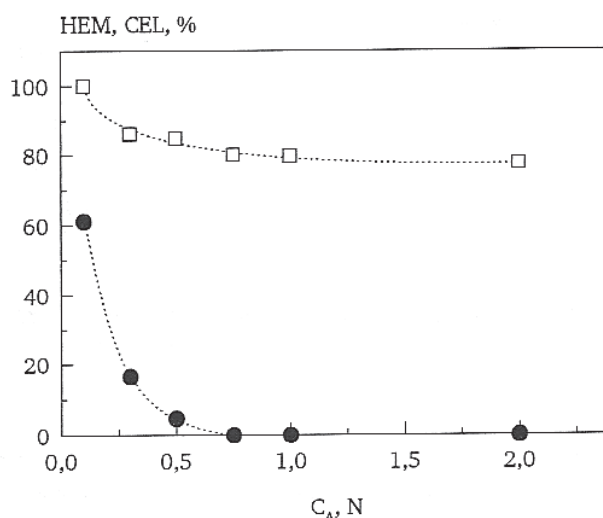


Figura 5.14 Variación de los porcentajes en hemicelulosa (●) y celulosa (□) con la concentración de ácido clorhídrico

En general, si se comparan estos resultados con los de la serie anterior de ácido sulfúrico se pone de manifiesto el mayor poder hidrolítico del ácido clorhídrico, con el que se obtienen valores superiores de rendimientos y conversiones para una misma concentración de ácido. Sólo a la concentración de ácido 2,0 N se observa que la conversión referida a la fracción celulósica alcanza para ambos ácidos prácticamente el mismo valor.

En el cálculo de la velocidad inicial de hidrólisis de nuevo se ha utilizado la ecuación [5.5]. Para la obtención de los parámetros m y z se realiza la representación gráfica de los valores de azúcares de cada experimento según la ecuación [5.4], como se muestra en la Figura 5.15; la línea continua representa el ajuste realizado correspondiente a la hidrólisis de la fracción hemicelulósica.

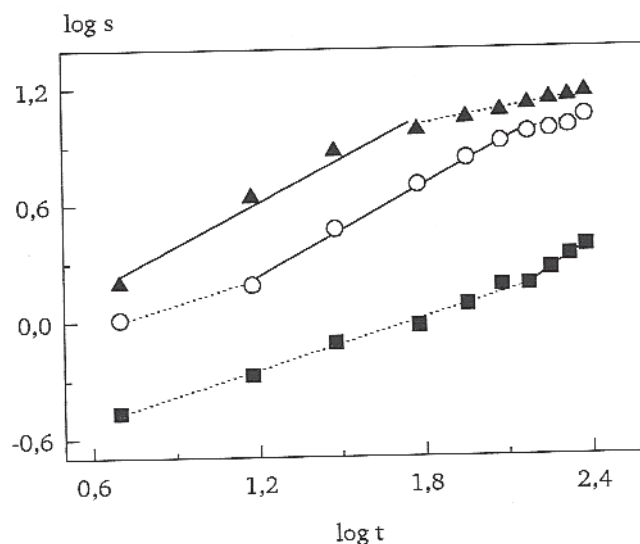


Figura 5.15 Reproducción de la ecuación [5.4] para los experimentos HC-C1 (■), HC-C3 (○) y HC-C5 (▲)

Al igual que sucedía con la concentración de ácido sulfúrico, se observan tres zonas diferenciadas en el ataque hidrolítico sobre el residuo. En este caso se pueden apreciar estos tres intervalos en el experimento central de la serie de $C_A=0,5$ N (HC-C3). Se podría interpretar lo que ocurre considerando una primera parte en la que se produciría la degradación de la hemicelulosa más fácilmente hidrolizable, un segundo intervalo (línea continua) correspondiente a la hidrólisis de la hemicelulosa que se hidroliza con más dificultad y un tercer tramo que representaría el ataque sobre parte de la celulosa.

En esta serie se han observado los dos primeros tramos en los experimentos de concentraciones inferiores a 0,5 N, como se muestra en la Figura 5.15 para el experimento HC-C1, siendo la duración del segundo intervalo correspondiente a la hidrólisis de la hemicelulosa más reducida cuanto menor es la concentración de ácido.

En los experimentos de concentraciones superiores a 0,5 N se han detectado los intervalos segundo y tercero descritos anteriormente, como se aprecia en la Figura 5.15 para la hidrólisis HC-C5 (1,0 N). En estos experimentos, la etapa de ataque de la hemicelulosa se va haciendo más corta conforme aumenta la concentración de ácido.

Una vez determinados los valores de las velocidades iniciales en cada uno de los experimentos de esta serie, se ha aplicado de nuevo la ecuación [5.8]. A partir de la ecuación [5.9], representando $\ln r_o$ frente a $\ln C_A$ (Figura 5.16), se obtienen los valores del orden de reacción, n , y la constante cinética, k . Estos valores sustituidos en la ecuación [5.8] conducen a la siguiente expresión:

$$r_o = 1,65 C_A^{2,12} \quad [5.11]$$

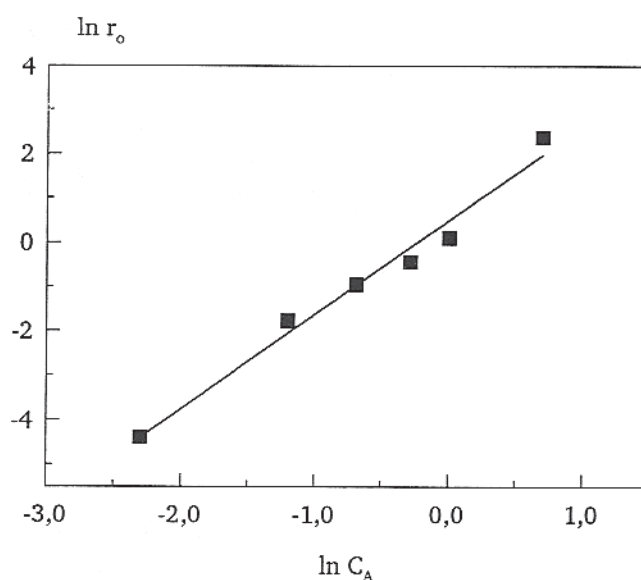


Figura 5.16 Ajuste a la ecuación [5.9] de las velocidades iniciales de las hidrólisis realizadas a distintas concentraciones de ácido clorhídrico

5.1.5 EFECTO DE LA TEMPERATURA DE HIDRÓLISIS

Se ha estudiado la influencia de la temperatura sobre el proceso hidrolítico con los ácidos sulfúrico y clorhídrico manteniendo constante la concentración de éstos.

5.1.5.1 Ácido sulfúrico

En esta serie se ha mantenido constante la concentración de ácido en 1,0 N variando la temperatura en el intervalo de 70 a 100 °C.

Los resultados de rendimientos en azúcares reductores totales y D-glucosa obtenidos al final de cada hidrólisis se recogen en la Tabla 5.9. Se observa un aumento de ambos rendimientos con la temperatura de hidrólisis, produciéndose el mayor incremento de Y_T al pasar de 80 a 90 °C. Como sucedía en series anteriores, los rendimientos calculados en el transcurso de cada hidrólisis van aumentando en todos los casos con el tiempo, como se observa en la Figura 5.17 para dos experimentos de esta serie.

TABLA 5.9
EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA HIDRÓLISIS CON H_2SO_4
Conversiones fraccionales, rendimientos en azúcares
reductores totales y en D-glucosa al final de la hidrólisis

Expto.	T_H , °C	X_H , %	X_C , %	Y_T 10 ² , g/g	Y_G 10 ² , g/g
HS-T1	70	29,7	1,72	2,37	0,07
HS-T2	80	56,4	2,91	5,92	0,09
HS-P3	90	91,5	13,6	16,2	0,17
HS-T4	95	95,2	18,0	18,5	0,24
HS-T5	100	100	19,4	20,8	0,30

En la hidrólisis del residuo de poda de olivo se obtienen rendimientos superiores para todas las temperaturas de hidrólisis ensayadas, alcanzándose valores de Y_T y Y_G de 29,5 y 7,2 g/g con ácido sulfúrico 1 N a 100 °C, Romero (2003).

La variación de las fracciones celulósica y hemicelulósica en los residuos finales de cada hidrólisis, calculadas suponiendo que la lignina permanece inalterada, se muestran en la Figura 5.18. Los correspondientes valores de conversiones que aparecen en la Tabla 5.9 muestran una hidrólisis completa de la hemicelulosa a la temperatura de 100 °C, a la que se obtiene un valor máximo de conversión de la celulosa del 19,4 %.

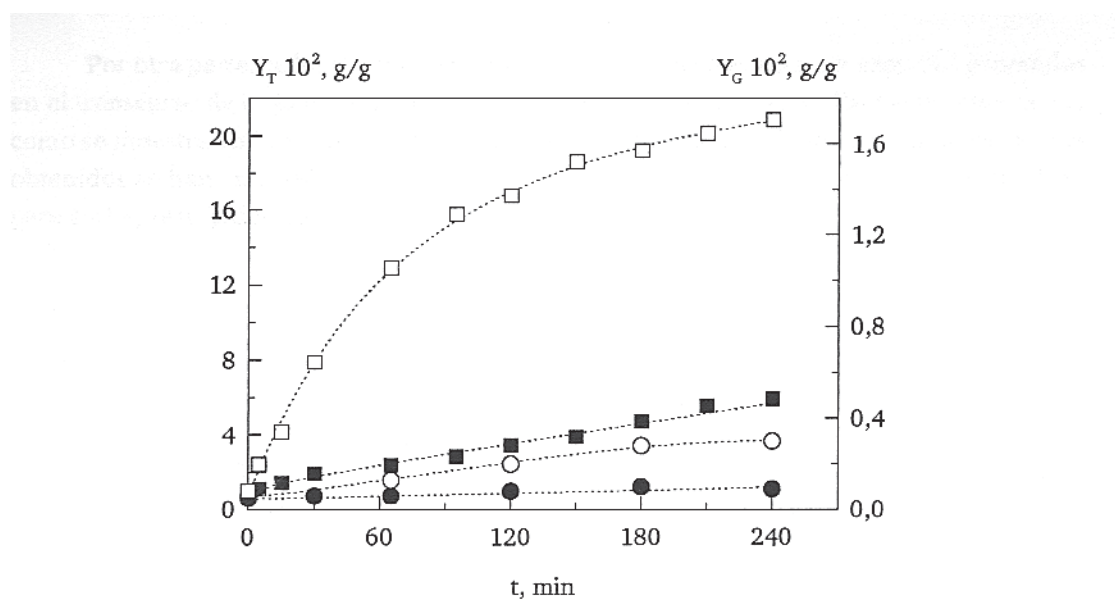


Figura 5.17 Rendimientos en azúcares reductores totales y en D-glucosa en el transcurso de los experimentos HS-T2 ($\blacksquare$, $\bullet$) y HS-T5 ($\square$, $\circ$)

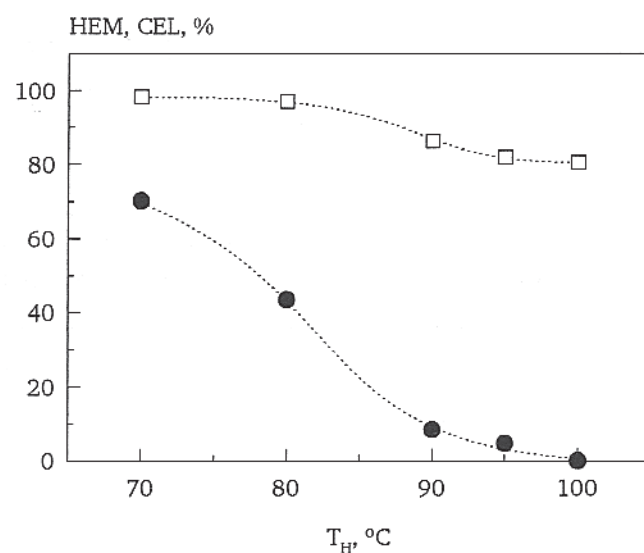


Figura 5.18 Variación de los porcentajes en hemicelulosa ($\bullet$) y celulosa ($\square$) con la temperatura en los procesos de hidrólisis con ácido sulfúrico 1 N

Por otra parte, se ha efectuado el ajuste de las concentraciones de azúcares generados en el transcurso de cada experimento a la ecuación [5.4] para calcular los parámetros m y z , como se muestra en la Figura 5.19 para dos de los experimentos de la serie. Con los valores obtenidos se han calculado las velocidades iniciales de hidrólisis, r_0 , con la ecuación [5.5] para $t=1$ s, resultados que se recogen en la Tabla 5.10.

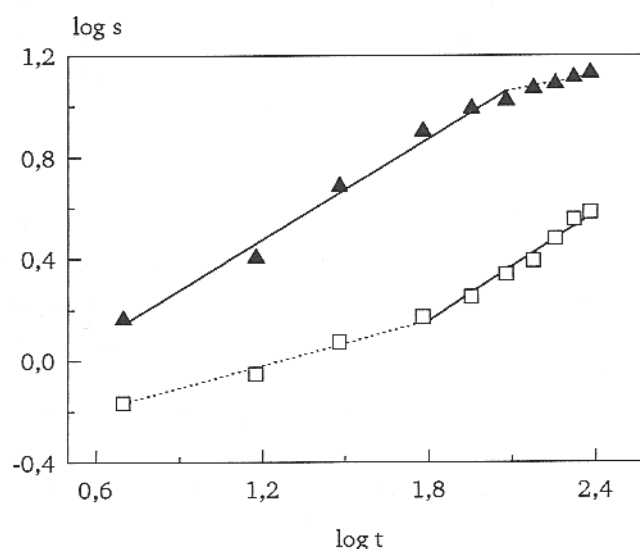


Figura 5.19 Reproducción de la ecuación [5.4] para los experimentos HS-T2 (□) y HS-T5 (▲)

TABLA 5.10
EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA HIDRÓLISIS CON H_2SO_4
Parámetros cinéticos y velocidades iniciales de hidrólisis

Expto.	T_H , °C	m	z	r_0 , g/(dm ³ min)
HS-T1	70	0,0345	0,690	0,0847
HS-T2	80	0,0766	0,708	0,179
HS-P3	90	0,265	0,663	0,698
HS-T4	95	0,185	0,814	0,323
HS-T5	100	0,479	0,664	1,26

Como ocurría en las series anteriores, se han encontrado diferentes intervalos en el ajuste de los resultados experimentales. Para las temperaturas inferiores a 90 °C, como es el caso del experimento HS-T2 (Figura 5.19), se observa un

primer tramo en el que los azúcares provienen de la fracción de hemicelulosa de fácil hidrólisis, y un segundo tramo correspondiente al resto de la hemicelulosa con el que se ha realizado el ajuste. En cambio, a temperaturas superiores a 90 °C (experimento HS-T5), el primer intervalo no se detecta, correspondiendo los primeros puntos de azúcares ajustados a la hidrólisis de la hemicelulosa, tras la cual se iniciaría la degradación de parte de la celulosa (segundo tramo marcado con línea discontinua).

5.1.5.2 Ácido clorhídrico

Se han realizado las hidrólisis a las temperaturas de 70, 80, 90 y 100 °C, manteniendo constante la concentración de ácido clorhídrico en 0,5 N. Con las concentraciones de azúcares reductores totales y D-glucosa obtenidas en las muestras tomadas en el transcurso de las hidrólisis, se han calculado los correspondientes rendimientos Y_T y Y_G , obteniéndose como en series anteriores un aumento de ambos con el tiempo, si bien este incremento es superior al principio y se va haciendo cada vez más suave, como se muestra en la Figura 5.20 para las hidrólisis realizadas a 90 y 100 °C. En estos dos experimentos se observa como a partir de las dos horas de hidrólisis el aumento de los valores de Y_T es poco significativo.

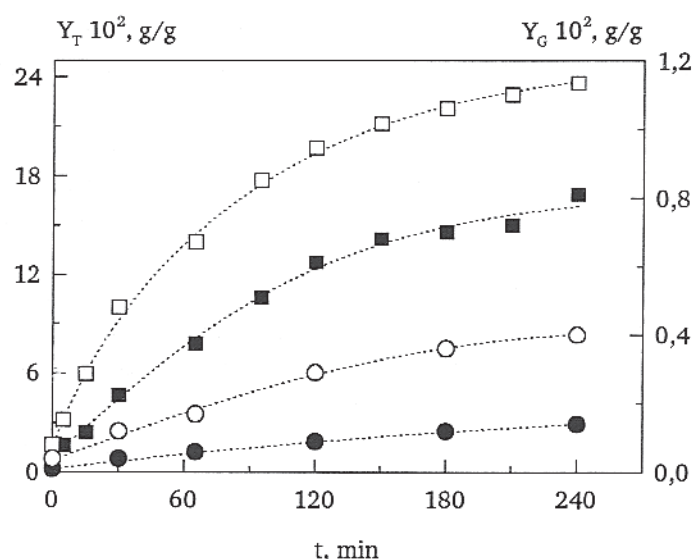


Figura 5.20 Rendimientos en azúcares reductores totales y en D-glucosa en el transcurso de los experimentos HC-C3 (■, ●) y HC-T4 (□, ○)

En la Tabla 5.11 se recogen los valores de Y_T y Y_G al final de cada hidrólisis, aumentando ambos con la temperatura de hidrólisis. Como en todas las series anteriores, los valores de rendimientos en D-glucosa son muy inferiores a los que se obtienen para azúcares reductores totales.

TABLA 5.11
EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA HIDRÓLISIS CON HCl
Conversiones fraccionales, rendimientos en azúcares
reductores totales y en D-glucosa al final de la hidrólisis

Expto.	T_H , °C	X_H , %	X_C , %	Y_T 10 ² , g/g	Y_G 10 ² , g/g
HC-T1	70	48,1	0,0	3,24	0,07
HC-T2	80	74,3	5,12	8,86	0,11
HC-C3	90	95,2	15,1	16,9	0,14
HC-T4	100	98,3	22,2	23,6	0,40

Con los resultados de la caracterización de los residuos se han calculado las variaciones de los porcentajes de las fracciones hemicelulósica y celulósica con la temperatura de hidrólisis, obteniéndose los valores que se representan en la Figura 5.21. Las correspondientes conversiones fraccionales X_H y X_C se recogen en la Tabla 5.11.

Se observa que la hemicelulosa es hidrolizada casi por completo a partir de los 90 °C, mientras que la máxima conversión en celulosa es del 22,2 % para una temperatura de 100 °C. Al igual que ocurre con todas las series anteriores los valores de X_C obtenidos no se corresponden con los rendimientos en D-glucosa tan bajos que se obtienen. Como se comentó anteriormente, esto puede deberse a que la celulosa se rompa en oligómeros sin llegar a D-glucosa o bien que ésta se degrade inmediatamente después de ser liberada. En la hidrólisis del residuo de poda de olivo, la conversión total de la fracción hemicelulósica se consigue ya a una temperatura de 80 °C, Moya (1997), aunque la concentración de ácido clorhídrico empleada fue 1 N.

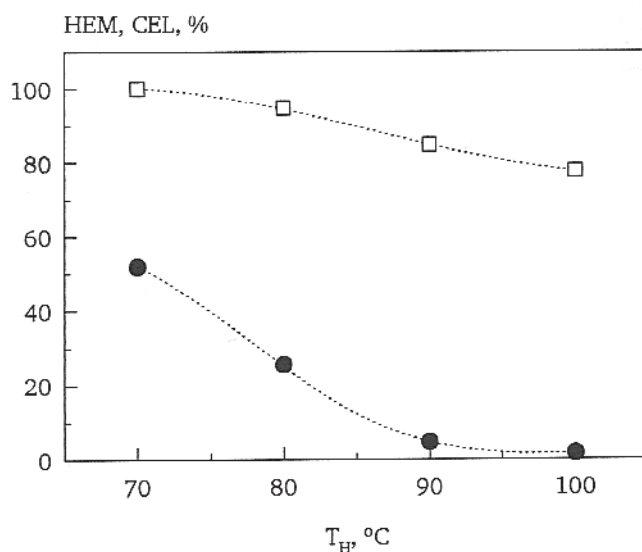


Figura 5.21 Variación de los porcentajes en hemicelulosa (●) y celulosa (□) con la temperatura de los procesos de hidrólisis con ácido clorhídrico 0,5 N

Al realizar el ajuste de los puntos experimentales de azúcares reductores totales a la ecuación [5.4] para determinar los parámetros m y z se obtienen representaciones como las que se muestran en la Figura 5.22. Para las temperaturas de 70 y 80 °C se aprecia un primer tramo correspondiente a la hidrólisis de la hemicelulosa fácilmente degradable y un segundo tramo, marcado con línea continua en la figura para el experimento a 80 °C, correspondiente a la hidrólisis del resto de la hemicelulosa. La duración de este segundo intervalo con el que se ha realizado el ajuste es menor en el experimento a 70 °C, como ocurre en todas las series para las condiciones más suaves.

La representación para la hidrólisis a 90 °C se mostró en la Figura 5.15, en la que se observaban los tres periodos de consumo. En el experimento a 100 °C, que se representa también en la Figura 5.22, se aprecia en primer lugar el tramo de ataque de la hemicelulosa más difícilmente hidrolizable con el que se ha realizado el ajuste y a continuación un periodo correspondiente a la hidrólisis de parte de la celulosa, como ocurría en la serie anterior de ácido sulfúrico a temperaturas superiores a 90 °C.

Con los valores obtenidos para m y z en cada experimento se han calculado las correspondientes velocidades iniciales hidrólisis para $t=1$ s, que se recogen en la Tabla 5.12. Se observa un aumento de las velocidades iniciales con la temperatura de hidrólisis, detectándose un gran incremento de r_0 en las hidrólisis realizadas a 90 y 100 °C.

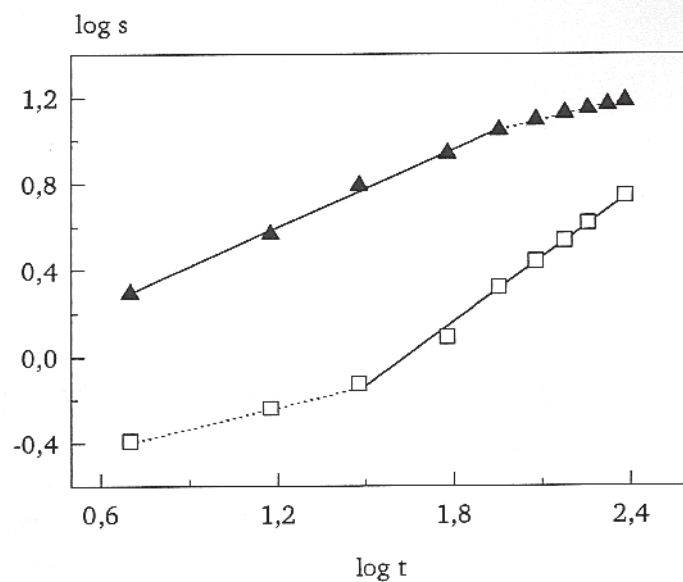


Figura 5.22 Reproducción de la ecuación [5.4] para los experimentos HC-T2 (□) y HC-T4 (▲)

TABLA 5.12

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA HIDRÓLISIS CON HCl

Parámetros cinéticos y velocidades iniciales de hidrólisis

Expto.	T_H , °C	m	z	r_o , g/(dm ³ min)
HC-T1	70	0,0093	0,981	0,0099
HC-T2	80	0,0244	0,987	0,0254
HC-C3	90	0,200	0,777	0,388
HC-T4	100	0,741	0,606	2,25

5.2 Fermentación con *Pachysolen tannophilus*

5.2 FERMENTACIÓN CON *Pachysolen tannophilus*

Los experimentos de fermentación se han caracterizado a través del estudio del crecimiento celular, el consumo de sustrato y la formación de productos; con este objetivo se han determinado en cada caso los parámetros cinéticos y de rendimientos característicos del proceso: velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m , productividad en biomasa, b , rendimiento global en biomasa, $Y_{x/s}^G$, velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , velocidad específica de producción de etanol, q_E , y rendimientos globales en etanol, $Y_{E/s}^G$, y en xilitol, $Y_{Xi/s}^G$.

5.2.1 EN MEDIO SINTÉTICO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO.

Los resultados experimentales correspondientes a la fermentación con *P. tannophilus* en medio sintético se muestran en las Tablas 4.19 a 4.22 y en las Figuras 4.1 a 4.4. La concentración inicial de sustratos empleada es la que se recoge en la Tabla 5.13.

La hidrólisis ácida de residuos lignocelulósicos provoca la aparición, entre otros compuestos, de ácido acético, que se libera a partir de los grupos acetilo presentes en el material de partida, pudiendo constituir un inhibidor del crecimiento celular en el proceso de fermentación posterior. Por ello, resulta necesario el estudio del comportamiento del microorganismo sobre un medio que contiene ácido acético o mezclas con azúcares presentes también como consecuencia del proceso de hidrólisis, tales como D-xilosa o D-glucosa, con el objetivo de minimizar su formación o bien eliminarlo del medio de fermentación, Converti *et al.* (2000a).

Crecimiento celular

Una vez realizada la inoculación en un biorreactor discontinuo, el número de células viables se va modificando con el tiempo. El crecimiento comienza con una fase de latencia o fase *lag* en la que el microorganismo no se desarrolla, debido a que se produce una adaptación de sus sistemas enzimáticos para metabolizar el nuevo sustrato. La duración de esta fase depende generalmente de las diferencias entre las condiciones del inóculo y las del medio.

Posteriormente tiene lugar la fase de crecimiento exponencial, en la que el número de células aumenta exponencialmente con el tiempo, que se puede cuantificar mediante la ecuación:

$$x = x_i \exp (\mu_m t) \quad [5.12]$$

donde x_i corresponde a la concentración de biomasa al inicio de la fase exponencial. Esta ecuación se puede expresar de la forma:

$$\ln(x/x_i) = \mu_m t \quad [5.13]$$

con lo que una representación de los valores del primer miembro frente al tiempo debe conducir a una línea recta que pasa por el origen de coordenadas, de cuya pendiente puede evaluarse el valor de la velocidad específica máxima de crecimiento, μ_m . Puesto que x_i no es un valor conocido previamente, la ecuación [5.13] puede modificarse según:

$$\ln(x/x_o) = a + \mu_m t \quad [5.14]$$

donde se ha sustituido x_i por la concentración de biomasa al inicio del experimento, x_o , que sí es conocida a priori. De esta forma, aparece una ordenada en el origen no nula, a , que sería igual a cero en el caso en que la fase *lag* fuese totalmente despreciable, ya que x_i tendería a x_o .

A partir de los datos de biomasa se han calculado los valores correspondientes de $\ln(x/x_o)$, y se han representado frente al tiempo para cada uno de los cultivos, con objeto de obtener las correspondientes curvas de crecimiento. En la Figura 5.23 se muestran como ejemplo las curvas correspondiente a los experimentos FP-1 y FP-4 en las que se ha representado con línea continua la fase exponencial. Con ayuda de estas representaciones, se ha establecido para cada experimento la duración de la fase exponencial y se han determinado las velocidades específicas máximas de crecimiento, μ_m , cuyos valores, obtenidos mediante ajuste por mínimos cuadrados de los resultados experimentales a la ecuación [5.14], se recogen en la Tabla 5.13.

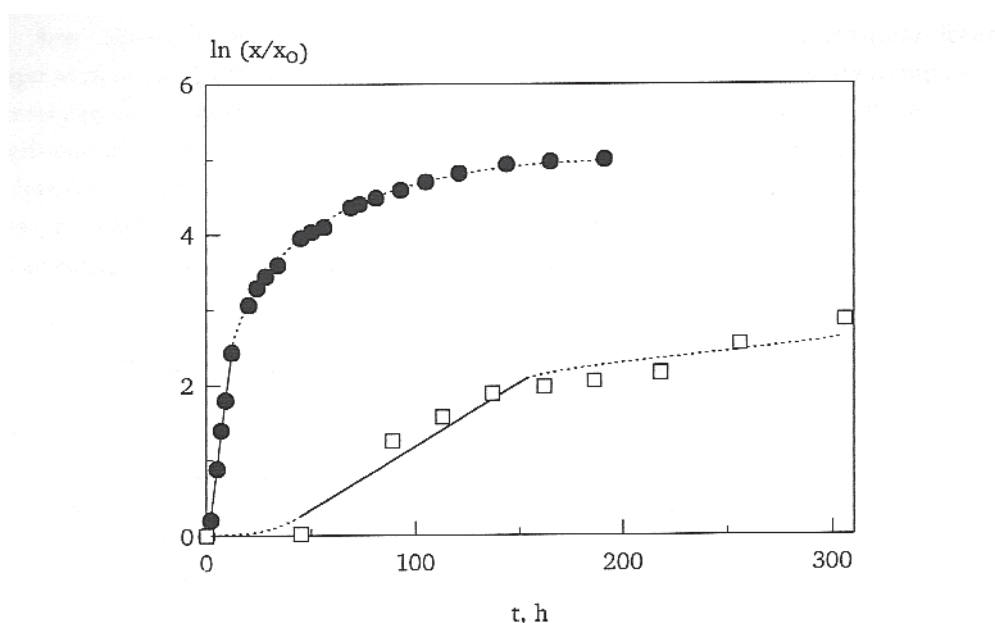


Figura 5.23 Curvas de crecimiento de los experimentos FP-1 (●) y FP-4 (□)

En una fermentación discontinua el número de células no puede aumentar de forma indefinida; por lo tanto, a la fase de crecimiento exponencial le sigue una fase de desaceleración, en la que algún nutriente del medio de cultivo empieza a limitar el crecimiento. En esta etapa se ha comprobado que la concentración de biomasa aumenta de forma lineal durante un intervalo de tiempo relativamente amplio, por lo que se podría cuantificar por la expresión:

$$x = c + b t \quad [5.15]$$

donde b representa la productividad en biomasa, $g/(dm^3 h)$, durante ese periodo de tiempo.

Esta fase de comportamiento lineal de la biomasa, que sigue al periodo de crecimiento exponencial, se pone de manifiesto en los datos proporcionados por diferentes autores, Jeffries (1982) y Detroy *et al.* (1982), siendo característica de las fermentaciones cinéticamente controladas por etapas de naturaleza física. Así, Slininger *et al.* (1982), en la fermentación de disoluciones de D-xilosa con *P. tannophilus*, determinaron que la concentración de oxígeno disuelto se anula rápidamente aproximadamente al final de la fase exponencial, incluso cuando se airea el medio de cultivo, por lo que el crecimiento celular llega a estar limitado por la disponibilidad de oxígeno en el medio de forma que el control cinético reside en la transferencia de oxígeno en la suspensión de células.

Los valores de biomasa obtenidos experimentalmente se han representado frente al tiempo para cada uno de los cultivos, con objeto de establecer el intervalo de tiempo en que el crecimiento es lineal. En los gráficos correspondientes del apartado

de Resultados Experimentales se ha representado con trazo continuo la recta considerada como fase lineal y se han determinado los valores de la productividad en biomasa en esta etapa, b , mediante ajuste por mínimos cuadrados de los datos experimentales a la ecuación [5.15]. En la Tabla 5.13 se recogen los valores de b obtenidos, junto con los de μ_m .

TABLA 5.13
VELOCIDADES ESPECÍFICAS MÁXIMAS DE CRECIMIENTO
Y PRODUCTIVIDADES EN BIOMASA

Expto.	Sustratos, g/dm ³	μ_m , h ⁻¹	b 10 ² , g/(dm ³ h)
FP-1	D-xilosa, 25	0,22	1,5
FP-2	D-xilosa, 10; D-glucosa, 10; Ac, 5	0,026	0,18
FP-3	D-glucosa, 15; Ac, 10	0,015	0,10
FP-4	Ac, 10	0,017	0,27

Se observa que los valores de μ_m y b son muy superiores para el experimento FP-1, en el que no se añadió ácido acético. Para este cultivo la duración del experimento es relativamente corta, mientras que para los experimentos con ácido acético inicial se aprecia una fase *lag* de entre 20 y 45 horas, seguida de una fase exponencial que llega a superar las 200 horas y de una fase lineal que alcanza valores de entre 300 y 500 horas. Así queda de manifiesto el efecto inhibitorio del ácido acético sobre el crecimiento celular. Por otra parte, en trabajos previos de cultivos con D-glucosa, se había observado una fase lineal de corta duración, Sánchez *et al.* (2002), mientras que en el experimento FP-3, que contiene D-glucosa y ácido acético, la fase lineal se extiende desde 218 a 426 horas. Se puede destacar que en el experimento realizado únicamente con ácido acético como sustrato (FP 4) el comportamiento en cuanto a crecimiento celular es muy similar al de los cultivos que contenían azúcares sintéticos además del ácido acético.

Los resultados concuerdan con los obtenidos por Palmqvist *et al.* (1999) utilizando cultivos de *Candida shehatae*, en los que se produjo una inhibición del crecimiento celular con concentraciones de ácido acético de hasta 10 g/dm³, si bien se emplearon concentraciones de inóculo de 2,2 g/dm³, muy superiores a las empleadas en este estudio, lo que puede reducir el efecto inhibitorio del ácido acético en aquel caso. Esta posibilidad se pone de manifiesto en el hecho de que sólo se obtuvo crecimiento celular, consumo de sustratos (incluido el ácido acético) y formación de etanol cuando los cultivos con mayor concentración de ácido acético fueron diluidos e inoculados por segunda vez (2^a y 3^a etapas en los experimentos FP-3 y FP-4). La reducción en el efecto inhibitorio que se produce al aumentar la concentración de inóculo ha sido también constatada en el caso de otros

compuestos, como el furfural, Palmqvist *et al.* (1999). En otro estudio sobre la fermentación con *Zymomonas mobilis* recombinante, Lawford y Rousseau (1998) constatan que la concentración celular final disminuye linealmente al aumentar el nivel de ácido acético en el rango 0-7,5 g/dm³, con una reducción del 50 % en el caso del experimento realizado con 5 g/dm³.

Después de la fase de desaceleración, los cultivos alcanzan una fase estacionaria, en la que el nivel de biomasa es máximo y prácticamente constante durante un intervalo de tiempo determinado. Esta estabilización puede atribuirse a varios factores. En primer lugar, se puede producir un agotamiento del sustrato o de otros nutrientes necesarios para el crecimiento; en tal caso, se produce un periodo de metabolismo endógeno, en el que las células metabolizan su propio protoplasma para mantenerse vivas. Otra posibilidad es que el crecimiento disminuya y se detenga por el aumento de la concentración en el medio de algún inhibidor. Por último, la posibilidad más frecuente es que las velocidades de crecimiento y de muerte del microorganismo se contrarresten durante cierto tiempo. En este último caso, la lisis de las células muertas libera carbohidratos, aminoácidos y otros componentes que pueden ser usados por las células activas para mantener su población, aunque la biomasa no puede sustentarse a sí misma de forma indefinida, por lo que la fase estacionaria suele ser, en tal caso, de duración relativamente reducida.

Con frecuencia se ha observado que, una vez consumido el sustrato, el propio bioproducto formado disminuía su concentración con el tiempo, lo que indica que éste era consumido por las células viables; es decir, que durante parte de la fase estacionaria, el sustrato utilizado por la levadura era el propio bioproducto de la fermentación, Ferrari *et al.* (1992).

Finalmente, sucede una fase de muerte en la que se detecta un descenso neto de la concentración de biomasa, ya que el número de células que mueren en la unidad de tiempo es superior al de las que se generan. En este trabajo se han dado por concluidos los experimentos antes de iniciarse la fase de muerte, en la fase estacionaria, puesto que el sustrato no se sigue consumiendo y los bioproductos ya se han formado en su máxima concentración.

Consumo de sustrato

El consumo de sustrato ha sido estudiado a través de la determinación de dos parámetros: rendimiento global en biomasa ($Y_{x/s}^G$) y velocidad específica de consumo de sustrato, q_s .

El rendimiento instantáneo en biomasa, $Y_{x/s}$, se puede definir como el cociente entre la biomasa neta producida y el sustrato neto consumido en un instante dado del cultivo:

$$Y_{x/s} = \frac{dx}{d(s_0 - s)} \quad [5.16]$$

Si el rendimiento permanece constante a lo largo del experimento, una representación de los valores de $(x-x_0)$ a distintos tiempos frente a (s_0-s) debería conducir a una recta de pendiente $Y_{x/s}^G$ y de ordenada en el origen nula. Aunque no sea nula, el rendimiento obtenido mediante la pendiente correspondería a todo el experimento (o a parte de él) y podría denominarse medio o global ($Y_{x/s}^G$), para distinguirlo del instantáneo. Para comprobar si los rendimientos en biomasa permanecen constantes a lo largo del cultivo se han realizado las representaciones correspondientes de $(x-x_0)$ frente a (s_0-s) en todos los experimentos, obteniéndose gráficos como los que se muestran en la Figura 5.24.

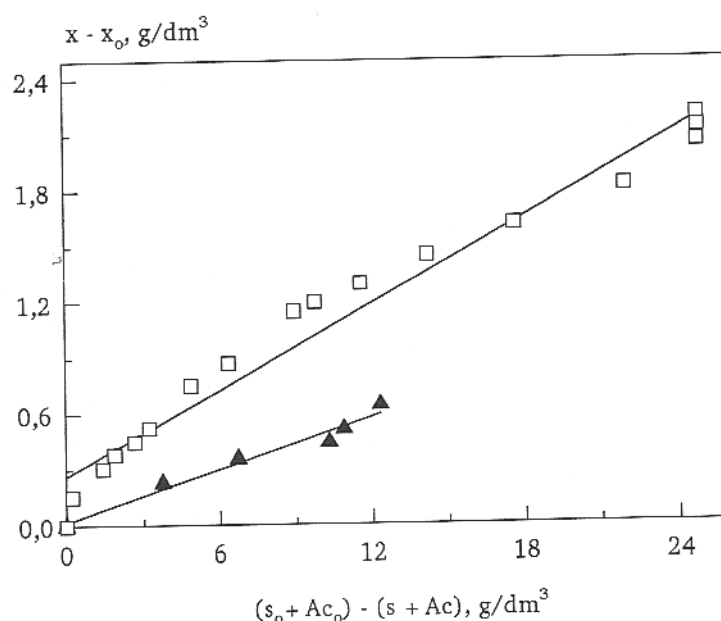


Figura 5.24 Formación neta de biomasa frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP-1 (□) y FP-3 (▲)

En esta serie, se ha considerado como sustrato la suma de las concentraciones de azúcares reductores totales y la concentración de ácido acético, por lo que los puntos experimentales empleados han sido solo aquellos en los que se habían determinado ambas concentraciones. Las representaciones obtenidas se ajustan a una línea recta de cuya pendiente se obtienen los rendimientos globales en biomasa que se recogen en la Tabla 5.14. El valor más alto corresponde al experimento sin ácido acético inicial, mientras que en el resto de los cultivos se obtienen valores muy similares.

TABLA 5.14
RENDIMIENTOS GLOBALES EN BIOMASA
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO

Expto.	$Y_{x/s}^G$, g/g	t, h	q_s^D , g/(g h)	q_s , g/(g h)
FP-1	0,077	25	0,29	0,42
		50	0,28	0,23
		100	0,12	0,12
FP-2	0,040	100*	0,46	0,65
		150*	0,38	0,65
		350	0,043	0,068
FP-3	0,047	200*	0,27	0,32
		350	0,025	0,036
FP-4	0,052	100*	0,14	0,32
		200	0,075	-

En esta serie, $Y_{x/s}^G = Y_{x/(s+Ac)}^G$ y $q_s = q_{s+Ac}$

*Tiempos de la fase exponencial de crecimiento

Los resultados son comparables a los proporcionados por Palmqvist *et al.* (1999) en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, si bien estos autores detectan una disminución del rendimiento en biomasa cuando en el medio se encuentran, además de ácido acético, otros inhibidores como furfural y ácido p-hidroxibenzoico. En cultivos de *C. shehatae* sobre D-xilosa, Rodrigues *et al.* (1992) constatan igualmente una disminución en el rendimiento en biomasa de un 36 % cuando el medio de cultivo contiene un 0,4 % (v/v) de ácido acético, con respecto al experimento sin este componente. Por otra parte, en cultivos de *P. tannophilus* sobre diferentes mezclas de D-xilosa y D-glucosa como sustrato, el rendimiento en biomasa fue del orden de 0,1 g/g, Sánchez *et al.* (2002), frente a 0,040 g/g obtenido en esta serie de experimentos en similares condiciones.

Por otra parte, para determinar la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s , se ha aplicado inicialmente el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. La velocidad de consumo de sustrato se define por:

$$q_s = \frac{1}{x} \frac{d(s_0 - s)}{dt} = - \frac{1}{x} \frac{ds}{dt} \quad [5.17]$$

por lo que para su determinación directa por el método diferencial es necesario evaluar la velocidad de consumo de sustrato por unidad de volumen (tasa volumétrica de consumo de sustrato, $d(s_0 - s)/dt$) a cada tiempo y posteriormente dividir por la concentración de biomasa, x . La dificultad intrínseca

de un método diferencial reside en la evaluación de esta derivada. Se podría aplicar un método gráfico pero, cuando el número de puntos experimentales no es muy elevado, el trazado de la curva (s_0-s) es dificultoso y la precisión en la evaluación de la pendiente es pequeña. Por este motivo, se ha decidido realizar un ajuste empírico de los datos experimentales a una ecuación que proporcione la variación de la concentración de sustrato con el tiempo y después, analíticamente, calcular la derivada.

En las fermentaciones discontinuas se observa un comportamiento característico en cuanto al consumo de sustrato. En las primeras fases del crecimiento, su concentración disminuye lentamente para, a continuación, descender de forma brusca hasta que se encuentra muy agotado, momento a partir del cual vuelve a disminuir lentamente. Este hecho determina que sea difícil ajustar todo el intervalo mediante ecuaciones simples (como exponencial, potencial o parabólica), con las que sólo se consigue la reproducción en intervalos de tiempo reducidos. Por ello, se han ensayado expresiones algo más complejas como:

$$s = s_0 \alpha^{-t^\beta} \quad [5.18]$$

que cumple con la condición inicial de que para $t=0$ $s=s_0$. Esta ecuación es la que permite obtener una mejor reproducibilidad de los datos de sustrato en mayores intervalos de tiempo.

Si se linealiza esta ecuación en la forma:

$$\ln \left(\ln \frac{s_0}{s} \right) = \ln(\ln \alpha) + \beta \ln t \quad [5.19]$$

se pueden determinar los parámetros α y β , mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores del primer miembro frente a los del logaritmo neperiano del tiempo.

Como ejemplo de los ajustes realizados, en la Figura 5.25 se recogen las representaciones correspondientes a la ecuación [5.19] para los experimentos FP-1 y FP-2. En esta serie, al igual que para el cálculo del rendimiento en biomasa, se ha considerado como sustrato la suma de las concentraciones de azúcares reductores totales y la concentración de ácido acético. Para los experimentos con un sustrato único (FP-1 y FP-4), la representación se ajusta a una recta en todo el experimento. En cambio, para los experimentos con mezcla de sustratos se distinguen dos intervalos, como se muestra en la Figura 5.25 para el experimento FP-2, en el que el primer tramo corresponde al consumo de D-glucosa y parte del ácido acético y el segundo al consumo de D-xilosa y el resto del ácido acético. Para el experimento FP-3 el primer intervalo ajustado corresponde al consumo de D-glucosa y una parte de acético y el

segundo tramo al consumo del resto del acético. Así, se han calculado mediante ajuste por mínimos cuadrados los parámetros α y β de la ecuación [5.18] para cada uno de los intervalos.

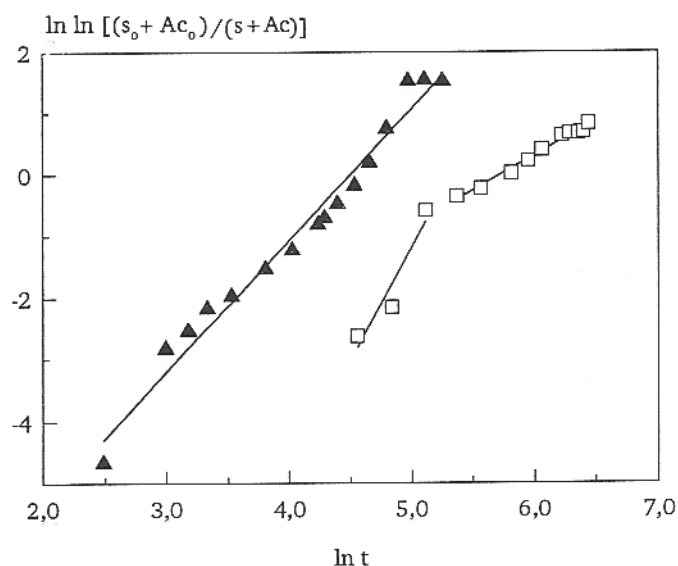


Figura 5.25 Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual a la ecuación [5.19] para los experimentos FP-1 (▲) y FP-2 (□)

En los gráficos correspondientes del apartado de Resultados Experimentales se representan los valores de la concentración de sustrato frente al tiempo para todos los experimentos. En las Figuras 4.1 y 4.4, correspondientes a los cultivos con sustrato único (FP-1 y FP-4), las líneas continuas corresponden a la ecuación [5.18], observándose que la reproducción es aceptable.

Por otra parte, se puede obtener la velocidad específica de consumo de sustrato en función del tiempo determinando la derivada $d(s_0 - s)/dt$ y sustituyendo posteriormente en la expresión [5.17]:

$$q_s^D = \frac{s_0 \beta (\ln \alpha) (t^{\beta-1}) (\alpha^{-t^\beta})}{x} \quad [5.20]$$

De esta forma se determinan las velocidades específicas de consumo de sustrato total, q_s^D , en función del tiempo. En la Tabla 5.14 se recogen los valores de q_s^D para varios tiempos de cada cultivo. Como se observa, en general, la velocidad específica de consumo de sustrato disminuye en el transcurso de cada experimento, siendo los valores de q_s^D calculados en puntos de la fase exponencial de crecimiento muy superiores a los de tiempos pertenecientes a la etapa de crecimiento lineal.

Cuando el rendimiento en biomasa permanece constante en el transcurso del experimento y si admitimos que no existe mantenimiento celular o que éste es despreciable, a partir de las ecuaciones [5.16] y [5.17], y de la definición de velocidad específica de crecimiento ($\mu = (1/x) dx/dt$) se puede deducir que:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}^G} \quad [5.21]$$

Así, con los valores de μ_m y b determinados previamente y conocidos los rendimientos globales en biomasa, se calcula la velocidad específica de consumo de sustrato, q_s .

En la fase exponencial de crecimiento $\mu = \mu_m$, mientras que en el intervalo donde la biomasa tiene un comportamiento lineal, de acuerdo con la ecuación [5.15], se cumplirá que:

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{b}{x} \quad [5.22]$$

ecuación que permite determinar el valor de μ en la fase lineal y con ello q_s para los tiempos comprendidos dentro de este intervalo.

En la Tabla 5.14 también se recogen los valores de q_s determinados por este procedimiento (método integral de tratamiento de datos cinéticos), con el fin de compararlos con los evaluados por el método diferencial, q_s^D , a los mismos tiempos. En general, se observa una aceptable concordancia entre los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato calculadas por ambos procedimientos.

Formación de bioproductos

La formación de los bioproductos mayoritarios, etanol y xilitol, se ha estudiado mediante los siguientes parámetros: rendimientos en etanol, $Y_{E/s}$, y xilitol, $Y_{xi/s}$ y velocidad específica de formación de etanol, q_E .

De forma similar al rendimiento en biomasa, el rendimiento instantáneo en etanol se define por:

$$Y_{E/s} = \frac{d(E - E_0)}{d(s - s_0)} \quad [5.23]$$

Si este rendimiento, $Y_{E/s}$, permanece constante en el transcurso del cultivo, una representación de $E - E_0$, o bien de E (puesto que en los experimentos realizados

$E_0=0$) frente a (s_0-s) debería conducir a una línea recta de pendiente $Y_{E/s}$ y de ordenada en el origen nula. Si esto sucede, este rendimiento constante corresponderá al medio o global, $Y_{E/s}^G$.

Con objeto de comprobar si el rendimiento en etanol permanece constante, de acuerdo con la ecuación [5.23], se han realizado las representaciones de E frente a (s_0-s) , obteniéndose gráficas similares a la que se muestra en la Figura 5.26. Para el experimento FP-2 se han ajustado los valores experimentales a dos líneas rectas, la primera correspondiente al consumo de D-glucosa y la segunda al de D-xilosa. En el caso de los cultivos con un único azúcar (FP-1 y FP-3) los puntos se ajustan a una única recta de cuya pendiente se ha determinado el rendimiento global en etanol, $Y_{E/s}^G$, valores que se muestran en la Tabla 5.15. Los máximos valores se obtienen del consumo de D-glucosa (experimento FP-3 y primer tramo de FP-2), alcanzándose rendimientos próximos al teórico. Para el consumo de D-xilosa (FP-1 y segundo tramo de FP-2), los rendimientos en etanol son más bajos, 0,20 y 0,23 g/g, respectivamente.

Los valores del rendimiento global en etanol en los cultivos con mezclas de D-xilosa y D-glucosa en presencia de ácido acético son comparables con los obtenidos por Lawford y Rousseau (1998), utilizando una cepa recombinante de *Zymomonas mobilis*. Estos autores concluyen que la adición de D-glucosa puede disminuir el efecto inhibitorio del ácido acético en la conversión de D-xilosa por parte del microorganismo, circunstancia que se pone de manifiesto también en el presente estudio, ya que los valores del rendimiento en etanol son prácticamente coincidentes en los experimentos FP-2 y FP-3, realizados con 10 y 15 g/dm³ de D-glucosa, respectivamente (Tabla 5.15). Igualmente, los resultados son concordantes con los obtenidos por Oliva *et al.* (2002), utilizando otro microorganismo, *Kluyveromyces marxianus*, donde no encuentran un efecto inhibitorio significativo del ácido acético, en concentraciones de hasta 10 g/dm³, sobre el rendimiento en etanol.

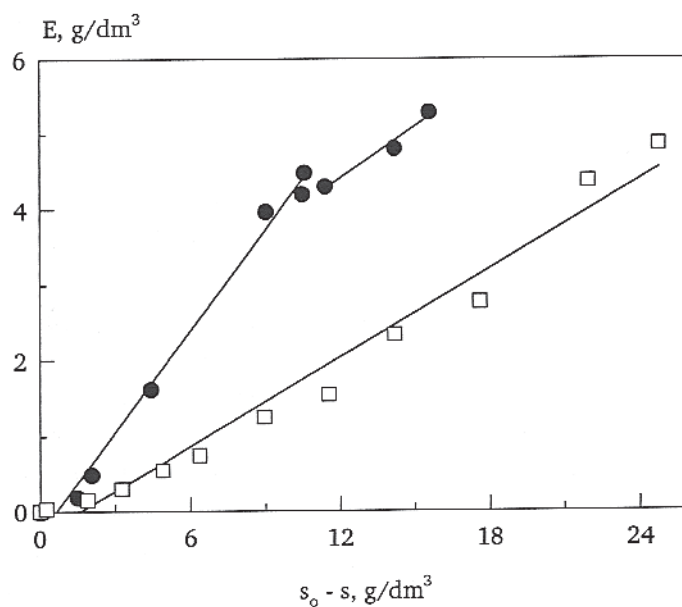


Figura 5.26 Etanol formado frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP-1 (□) y FP-2 (●)

TABLA 5.15
RENDIMIENTOS GLOBALES EN ETANOL Y XILITOL
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Expto.	$Y_{E/s}^G$, g/g	$Y_{Xi/s}^G$, g/g	t, h	q_E^D , g/(g h)	q_E , g/(g h)
FP-1	0,20	0,21	M(xil)	0,032	0,035
FP-2	0,45	0,012	150	0,27	0,24
	0,23*		M(xil)	0,0081	0,0071
FP-3	0,47	-	150	0,12	0,17

* 2º tramo correspondiente al consumo de D-xilosa

En cuanto a la generación de xilitol, el rendimiento instantáneo, $Y_{Xi/s}$, se puede definir de forma análoga a $Y_{E/s}$, como:

$$Y_{Xi/s} = \frac{d(Xi)}{d(s_o - s)} \quad [5.24]$$

ya que a $t=0$ -- $Xi=0$. Si permanece constante a lo largo del experimento representará un rendimiento global que representaremos por $Y_{Xi/s}^G$.

Para comprobar si el rendimiento en xilitol permanece constante, de acuerdo con la ecuación [5.24], se han realizado representaciones de Xi frente a $(s_o - s)$, obteniéndose gráficas como la que se muestra en la Figura 5.27, de cuyas pendientes se han determinado los rendimientos globales en xilitol, $Y_{Xi/s}^G$. valores que también se recogen en la Tabla 5.15. Se obtiene un valor elevado (0,21 g/g) para el cultivo de D-xilosa sin la presencia de ácido acético, mientras que cuando se utilizan mezclas D-xilosa/D-glucosa con la adición de ácido acético el rendimiento en xilitol es mucho más bajo. En el cultivo en que no existe D-xilosa como sustrato (FP-3), lógicamente no se detecta formación de xilitol.

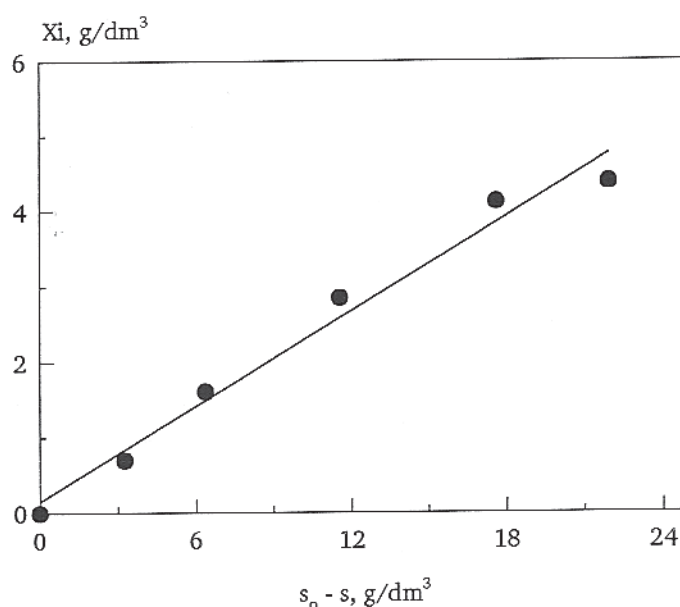


Figura 5.27 Xilitol formado frente a sustrato neto consumido en el experimento FP-1

Para el cálculo de la velocidad específica de producción de etanol, q_E , del mismo modo que para q_s , se ha aplicado en primer lugar el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. La velocidad específica de producción de etanol se define por:

$$q_E = \frac{1}{x} \frac{dE}{dt} \quad [5.25]$$

La dificultad reside en la evaluación de la velocidad de producción de etanol por unidad de volumen, dE/dt . Por las mismas consideraciones realizadas para el cálculo de ds/dt , se ha optado por efectuar un ajuste empírico de los datos $E-t$ de cada experimento que posteriormente permita la determinación analítica de la derivada.

La observación de la variación de los datos de concentración de etanol en función del tiempo pone de manifiesto que, en una primera fase, la concentración aumenta muy lentamente para a continuación hacerlo con gran rapidez hasta alcanzar un valor máximo que, en general, es prácticamente coincidente con el tiempo en que se ha consumido la D-xilosa. Seguidamente, se observa una disminución en la concentración de etanol que, en parte, sería debida a las pérdidas por evaporación, pero que fundamentalmente es atribuible a la capacidad de *P. tannophilus* de asimilar etanol en ausencia de D-xilosa, Schneider *et al.* (1981) y Slininger *et al.* (1982).

El objetivo es establecer la velocidad específica de producción de etanol, por lo que se han ensayado diferentes ecuaciones empíricas que ajustaran exclusivamente la fase en que la concentración de etanol aumenta con el tiempo. Entre estas ecuaciones la que reproduce mejor las variaciones experimentales observadas es de la forma:

$$\frac{E_T}{E_T - E} = A^{t^B} \quad [5.26]$$

donde E_T representa la concentración máxima alcanzable si el rendimiento de la transformación de D-xilosa en etanol fuese el teórico, de forma que siendo s_0 la concentración inicial de sustrato, E_T vendrá dado por:

$$E_T = s_0 \tau \frac{\text{PM (etanol)}}{\text{PM (sustrato)}} \quad [5.27]$$

siendo τ igual a 2 cuando el sustrato es D-glucosa e igual a 5/3 si se trata de D-xilosa.

Para determinar los parámetros A y B se puede linealizar la ecuación [5.26], que cumple con la condición inicial de que para $t=0 \rightarrow E=0$, de la siguiente forma:

$$\ln \ln \frac{E_T}{E_T - E} = \ln \ln A + B \ln t \quad [5.28]$$

con lo que, mediante ajustes por mínimos cuadrados de los valores del primer miembro frente a los del logaritmo neperiano del tiempo, se pueden obtener los parámetros A y B.

En la fermentación de los hidrolizados con *P. tannophilus*, en general, se pueden distinguir dos etapas de producción de etanol, fases que corresponden al consumo de D-glucosa, en la que se produce etanol de forma rápida, y al consumo de D-xilosa y resto de azúcares presentes en el medio, etapa en la que la concentración de etanol crece más lentamente. Así pues, se ha procedido a ajustar los valores experimentales E-t mediante la ecuación [5.28] en dos intervalos para el cultivo FP-2 en el que hay mezcla de D-xilosa y D-glucosa. Para los experimentos FP-1 y FP-3 el ajuste se ha realizado en un único tramo. En la Figura 5.28 se muestran a título de ejemplo las representaciones correspondientes a los experimentos FP-1 y FP-2. En las figuras 4.1 a 4.3 del apartado de Resultados Experimentales se muestra como línea continua en los valores de etanol la reproducida a partir de la ecuación [5.26], mientras que los puntos corresponden a los resultados experimentales. En general se aprecia una aceptable reproducción en los periodos de validez de la ecuación propuesta.

A partir de la ecuación [5.26] se puede determinar analíticamente la derivada dE/dt , y por tanto, sustituyendo en la ecuación [5.25], obtener la expresión para la velocidad específica de producción de etanol en función del tiempo:

$$q_E^D = \frac{E_T B (\ln A) (t^{B-1}) (A^{-t^B})}{x} \quad [5.29]$$

donde hay que sustituir la concentración de biomasa, x , por el valor correspondiente al tiempo considerado. Durante la etapa de consumo de D-glucosa, la velocidad específica de formación de etanol varía con el tiempo, mientras que en la etapa de consumo de D-xilosa, q_E^D permanece prácticamente constante. Por ello, en la Tabla 5.15 se recoge un valor de q_E^D para un tiempo de la etapa donde se consume D-glucosa y otro que es un valor medio, $M(xil)$, y que corresponde al periodo en el que se consume D-xilosa. Se observa que las velocidades específicas de producción de etanol obtenidas son mucho más elevadas para el consumo de D-glucosa que los correspondientes al de D-xilosa.

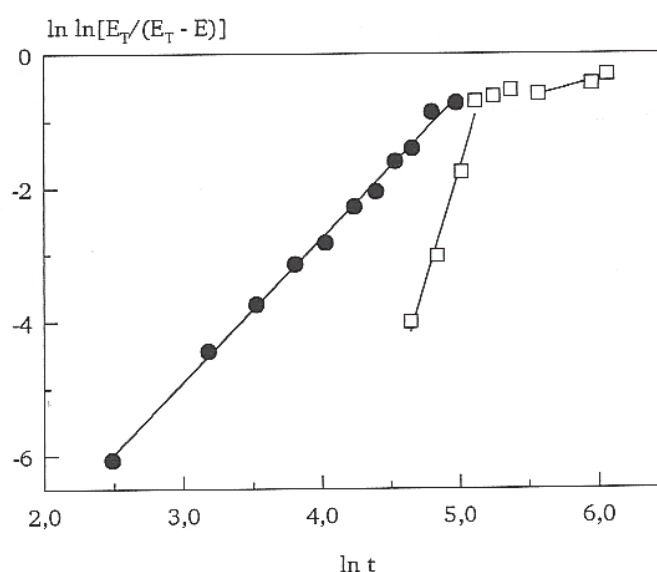


Figura 5.28 Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ecuación [5.28] para los experimentos FP-1 (●) y FP-2 (□)

Por otra parte, en experimentos donde no exista concentración de etanol a $t=0$, la productividad instantánea en etanol se define por:

$$Y_{E/x} = \frac{dE}{dx} \quad [5.30]$$

Si este parámetro permanece constante en el transcurso del experimento, una representación de E frente a $(x-x_0)$ daría lugar a una línea recta, cuya pendiente sería $Y_{E/x}^G$ y cuya ordenada en el origen debería ser nula. Esta pendiente constante correspondería a la productividad global, expresada en la forma $Y_{E/x}^G$. A partir de la definición de velocidad específica de crecimiento, de las ecuaciones [5.25] y [5.30], admitiendo una productividad instantánea en etanol constante e igual a $Y_{E/x}^G$ y suponiendo que no existe prácticamente mantenimiento celular, se puede deducir que la velocidad específica de producción de etanol es:

$$q_E = Y_{E/x}^G \mu \quad [5.31]$$

En el experimento FP-3 y en el primer tramo del experimento FP-2, correspondiente al consumo de D-glucosa, la representación del etanol producido, E , frente a la biomasa neta formada, $x-x_0$, ha conducido a una recta de cuya pendiente se ha determinado $Y_{E/x}^G$; un ejemplo de estas representaciones se muestra en la Figura 5.29. Una vez evaluados estos parámetros se ha podido calcular q_E (método

integral de tratamiento de datos cinéticos), cuyos valores se muestran en la Tabla 5.15.

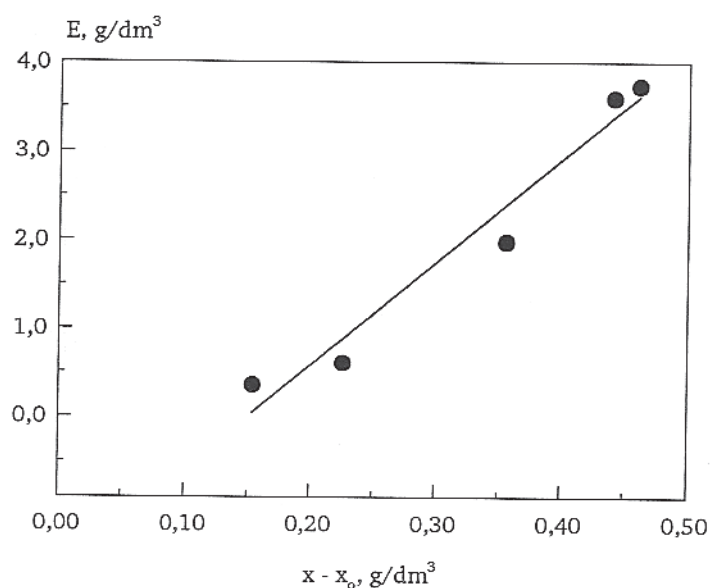


Figura 5.29 Etanol producido frente a la biomasa neta para el experimento FP-3

Finalmente, para los casos en que la velocidad de producción de etanol permanezca prácticamente constante, y considerando el intervalo correspondiente al consumo de D-xilosa, que es donde se cumple la ecuación [5.22] en la fase de crecimiento lineal, se puede deducir el valor de q_E . Para ello basta dividir miembro a miembro la ecuación [5.25] por la que define μ , obteniéndose:

$$\frac{dE}{dx} = \frac{q_E}{\mu} \quad [5.32]$$

de donde se puede deducir que:

$$\frac{dE}{x \, dx} = \frac{dE}{d(x^2/2)} = \frac{q_E}{b} \quad [5.33]$$

Así, una representación de E frente a $x^2/2$, restringida al intervalo de tiempo en que la biomasa presenta un comportamiento lineal, debe conducir a una línea recta de cuya pendiente se calcularía el valor de q_E en dicho periodo. Un ejemplo de estas representaciones se muestra en la Figura 5.30.

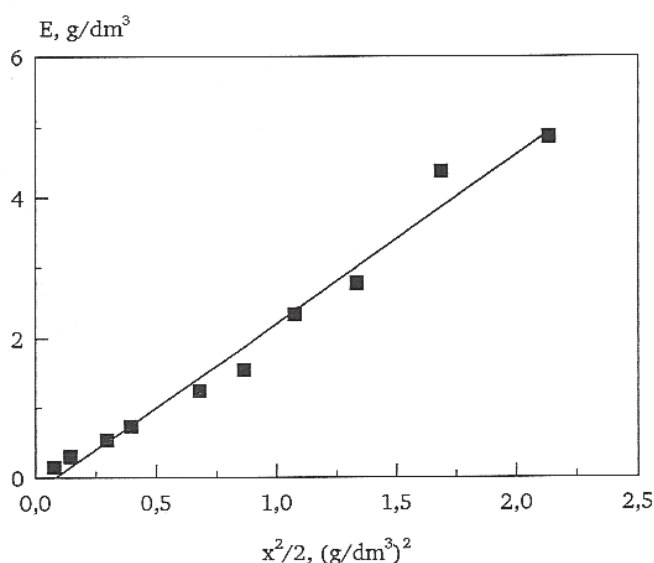


Figura 5.30 Representación con la ecuación [5.33] de los resultados del experimento FP-1

A partir de estos gráficos se han obtenido las respectivas pendientes que, multiplicadas por los valores de la productividad en biomasa, b , proporcionan las velocidades específicas de producción de etanol, q_E , que aparecen en la Tabla 5.15 para el experimento FP-1 y el segundo tramo de FP-2. Tanto estos valores como los anteriormente reseñados para el intervalo correspondiente al consumo de D-glucosa, son concordantes con los obtenidos por el método diferencial, q_E^D .

5.2.2 FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS

En la fermentación con *P. tannophilus* se ha estudiado la influencia de los distintos procedimientos de acondicionamiento de los hidrolizados y el efecto de las variables modificadas en la hidrólisis sobre el posterior bioproceso.

5.2.2.1 Influencia del acondicionamiento

A partir de los hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico 1 N a 90 °C (FP_i-HS-P3) y 95 °C (FP_i-HS-T4), cuyos resultados experimentales se recogen en el apartado 4.2.2, se ha tratado de analizar la influencia del acondicionamiento sobre el proceso de fermentación.

Crecimiento celular

Para evaluar el crecimiento celular se han determinado los valores de velocidad específica máxima de crecimiento y productividad en biomasa como se describió

en el apartado anterior, obteniéndose los resultados que se recogen en la Tabla 5.16. El máximo valor de μ_m ($0,11 \text{ h}^{-1}$) se obtiene para el experimento $\text{FP}_2\text{-HS-P3}$ en el que el acondicionamiento realizado sobre el hidrolizado consistió en realizar una concentración en rotavapor seguida de neutralización con KOH; en cambio, la mayor productividad en biomasa determinada ($0,019 \text{ g}/(\text{dm}^3 \text{ h})$) corresponde al experimento $\text{FP}_3\text{-HS-P3}$ en el que también se utilizó KOH como agente neutralizante pero la concentración en rotavapor se realizó después de la neutralización del hidrolizado. En la Figura 5.31 se representan dos de las curvas de crecimiento obtenidas, concretamente las de los dos experimentos mencionados.

TABLA 5.16
VELOCIDADES ESPECÍFICAS MÁXIMAS DE CRECIMIENTO
Y PRODUCTIVIDADES EN BIOMASA

Expto.	Acondicionamiento	μ_m, h^{-1}	$b \cdot 10^2, \text{g}/(\text{dm}^3 \text{ h})$
$\text{FP}_1\text{-HS-P3}$	conc. + NaOH	0,011	0,63
$\text{FP}_2\text{-HS-P3}$	conc. + KOH	0,11	0,42
$\text{FP}_3\text{-HS-P3}$	KOH + conc.	0,092	1,9
$\text{FP}_4\text{-HS-P3}$	KOH + conc. + decol.	0,097	0,62
$\text{FP}_5\text{-HS-P3}$	<i>overliming</i> + conc.	0,026	0,010
$\text{FP}_6\text{-HS-P3}$	<i>overliming</i>	0,032	0,79
$\text{FP}_1\text{-HS-T4}$	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ + conc.	0,030	0,30
$\text{FP}_2\text{-HS-T4}$	NaOH + conc.	0,042	0,31
$\text{FP}_3\text{-HS-T4}$	conc. + NaOH + decol.	0,040	0,23

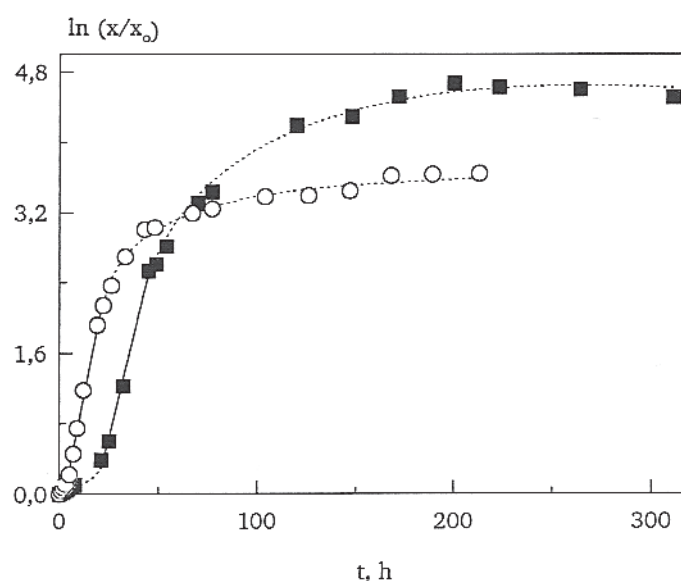


Figura 5.31 Curvas de crecimiento de los experimentos $\text{FP}_2\text{-HS-P3}$ (○) y $\text{FP}_3\text{-HS-P3}$ (■)

Consumo de sustrato

En primer lugar se han determinado los rendimientos globales en biomasa, $Y_{x/s}^G$, mediante las pendientes de las representaciones de los valores de $x-x_0$ frente a los de s_0-s , como las que se muestran en la Figura 5.32 para dos de los experimentos. En la Tabla 5.17 se recogen los valores obtenidos, que varían en el rango 0,060 a 0,15 g/g. Para el experimento FP₆-HS-P3, en el que se acondicionó el hidrolizado por adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (*overliming*) se encuentra un rendimiento en biomasa de 0,15 g/g, comparable al obtenido por Eken-Saracoglu y Arslan (2000) en la fermentación de hidrolizados de mazorca de maíz con *Candida shehatae*.

Para el cálculo de la velocidad específica de consumo de sustrato se han realizado las correspondientes representaciones gráficas según la ecuación [5.19] como las que se muestran en la Figura 5.33, en la que se observa cómo se ha realizado el ajuste de los puntos experimentales considerando un único tramo de consumo de sustrato, obteniéndose resultados aceptables. Los parámetros α y β obtenidos de estas representaciones se han sustituido en la ecuación [5.20] para obtener los valores de q_s^D a distintos tiempos. En la Tabla 5.17 se recogen estos resultados para varios tiempos de cada experimento. En el experimento FP₁-HS-T4, en el que el acondicionamiento del hidrolizado se realizó neutralizando con una disolución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, seguida de concentración en rotavapor, es en el que se obtienen las mayores velocidades de consumo de sustrato, siendo este experimento en el que se obtenía el menor rendimiento en biomasa de 0,060 g/g. Por otra parte, también se han calculado las velocidades específicas de consumo de sustrato por el método integral (q_s) según la ecuación [5.21], valores que se muestran en la Tabla 5.17 para los mismos tiempos en que se calcularon por el método diferencial, observándose una aceptable concordancia entre los resultados obtenidos por ambos procedimientos.

TABLA 5.17
 RENDIMIENTOS GLOBALES EN BIOMASA
 Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO

Expto.	$Y_{x/s}^G$, g/g	t, h	q_s^D , g/(g h)	q_s , g/(g h)
FP ₁ -HS-P3	0,11	300*	0,095	0,098
		400	0,049	0,061
		500	0,029	0,036
FP ₂ -HS-P3	0,14	50	0,089	0,040
		100	0,050	0,031
FP ₃ -HS-P3	0,15	50	0,15	0,27
		100	0,10	0,091
		200	0,019	0,040
FP ₄ -HS-P3	0,087	50	0,15	0,23
		100	0,12	0,11
		200	0,049	0,057
FP ₆ -HS-P3	0,14	100	0,095	0,23
		200	0,092	0,11
		300	0,050	0,039
FP ₁ -HS-T4	0,060	50*	0,47	0,49
		100	0,30	0,36
		200	0,079	0,11
FP ₂ -HS-T4	0,087	100	0,18	0,22
		200	0,062	0,076
		300	0,032	0,046
FP ₃ -HS-T4	0,082	100	0,10	0,096
		200	0,054	0,054
		300	0,031	0,037

*Puntos de la fase exponencial de crecimiento

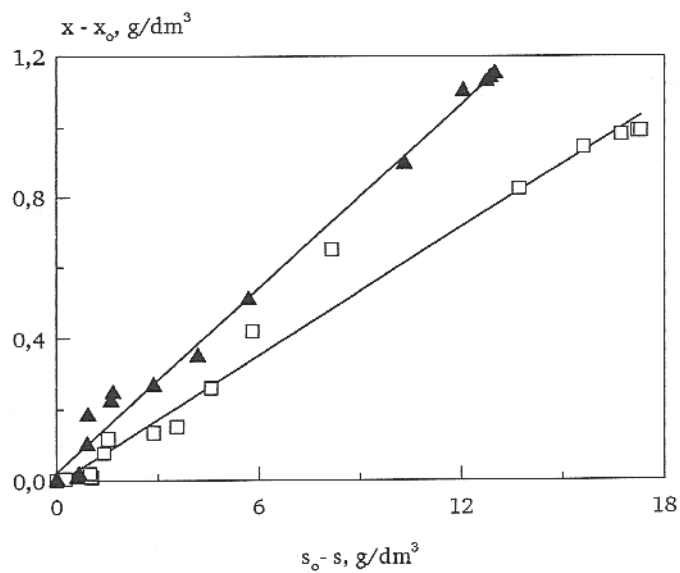


Figura 5.32 Formación neta de biomasa frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP₁-HS-T4 ($\square$) y FP₂-HS-T4 ($\blacktriangle$)

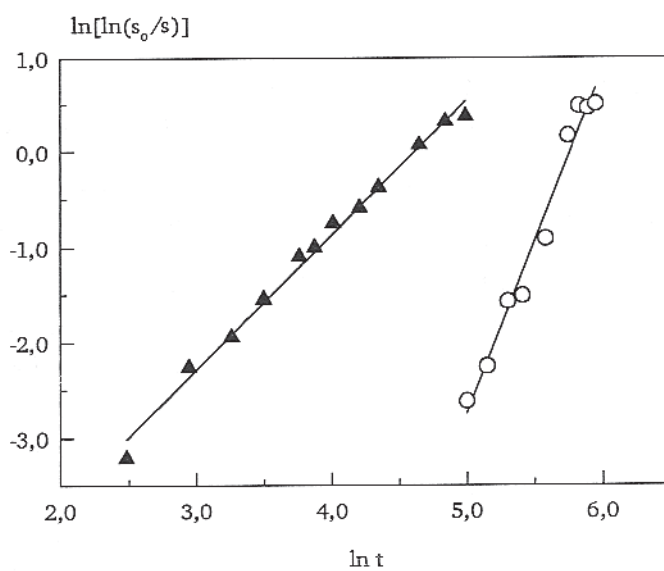


Figura 5.33 Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual a la ecuación [5.19] para los experimentos FP₂-HS-P3 ($\blacktriangle$) y FP₆-HS-P3 ($\circ$)

Formación de bioproductos

Los rendimientos globales en etanol y xilitol, que se recogen en la Tabla 5.18, se han calculado a partir de las pendientes de las correspondientes representaciones gráficas de las concentraciones de estos bioproductos frente a s_0 -s, como las que se muestran en las Figuras 5.34 y 5.35. En estos experimentos se obtienen rendimientos en etanol comprendidos entre 0,072 y 0,20 g/g. Estos resultados son inferiores a los obtenidos por Martínez *et al.* (2000) con un hidrolizado de bagazo de caña de azúcar fermentado por *E. coli* recombinante; tras un acondicionamiento con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a diferentes temperaturas, se alcanzan rendimientos del orden de 0,45 g/g frente a 0,15 g/g que resulta en el experimento equivalente de esta investigación (FP₆-HS-P3), si bien hay que indicar que la concentración de azúcares de partida en el trabajo que se menciona es muy superior (unos 90 g/dm³).

Con *P. stipitis* y *C. shehatae*, Eken-Saracoglu y Arslan (2000) obtienen rendimientos en etanol de 0,34 y 0,26 g/g respectivamente, en la fermentación de hidrolizados de mazorca de maíz sometidos a un acondicionamiento por *overliming*. También utilizando *P. stipitis*, Ferrari *et al.* (1992), encuentran un rendimiento en etanol de 0,35 g/g al fermentar hidrolizados de eucalipto sometidos a un acondicionamiento consistente en neutralización con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ seguido de concentración en rotavapor. Este resultado es superior al determinado en el experimento equivalente de esta serie (FP₁-HS-T4), cuyo valor es de 0,17 g/g.

TABLA 5.18
RENDIMIENTOS GLOBALES EN ETANOL Y XILITOL
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Expto.	$Y_{E/s}^G$, g/g	$Y_{XI/s}^G$, g/g	q_E^D (M), g/(g h)	q_E , g/(g h)
FP ₁ -HS-P3	0,12	0,085	0,0087	0,0089
FP ₂ -HS-P3	0,072	0,10	0,0075	0,0040
FP ₃ -HS-P3	0,20	0,057	0,024	0,025
FP ₄ -HS-P3	0,17	0,11	0,015	0,015
FP ₆ -HS-P3	0,15	0,050	0,0096	0,011
FP ₁ -HS-T4	0,17	0,032	0,015	0,017
FP ₂ -HS-T4	0,18	0,039	0,015	0,0084
FP ₃ -HS-T4	0,16	0,11	0,0090	0,0083

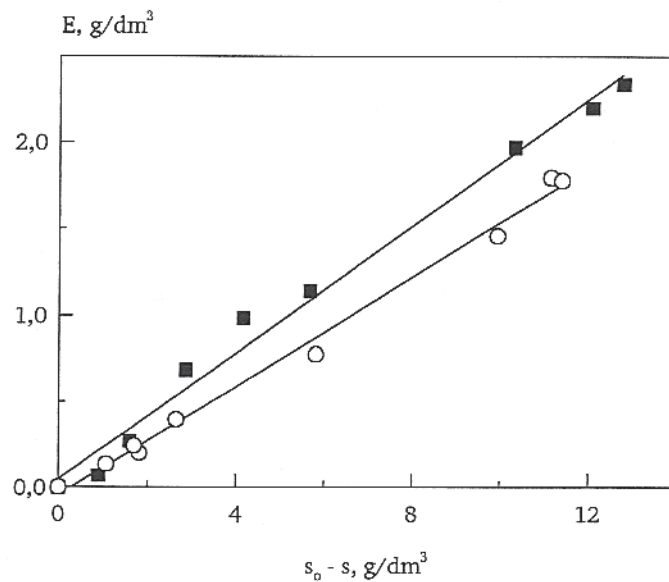


Figura 5.34 Etanol formado frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP₂-HS-T4 (■) y FP₃-HS-T4 (○)

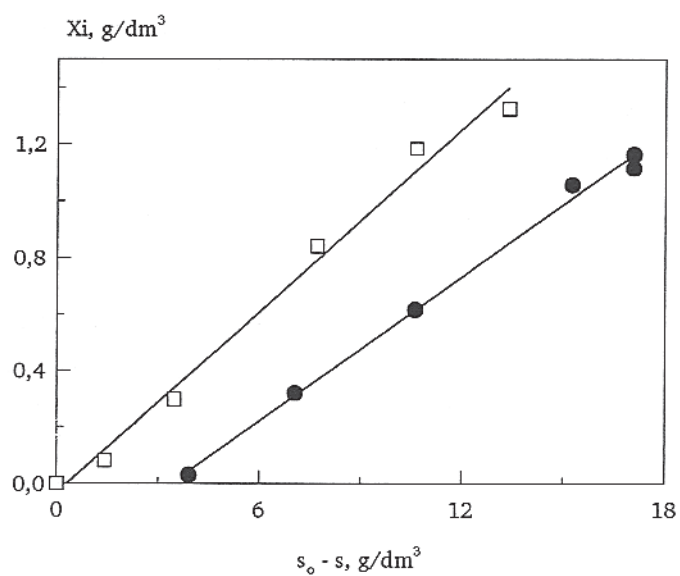


Figura 5.35 Xilitol formado frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP₁-HS-P3 (●) y FP₄-HS-P3 (□)

En general, los valores de $Y_{E/s}^G$ son superiores a los de $Y_{Xi/s}^G$. El mayor valor de rendimiento en etanol se obtiene en el experimento FP_3 -HS-P3, en el que el acondicionamiento del hidrolizado consistió en una neutralización con KOH seguida de concentración en rotavapor. Los valores más altos de rendimientos en xilitol corresponden a FP_4 -HS-P3 y FP_3 -HS-T4, que son los dos experimentos de la serie en que se realizó una decoloración del hidrolizado con carbón activo.

Los rendimientos globales en xilitol obtenidos oscilan entre 0,032 y 0,11 g/g. Gurgel *et al.* (1998) encuentran rendimientos en xilitol de 0,3 g/g en la fermentación de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar con *C. guilliermondii*, con un acondicionamiento consistente en la adición de $Ca(OH)_2$ hasta pH 10 y posterior bajada hasta pH 6,5 con ácido sulfúrico. En la fermentación de hidrolizados de eucalipto con la misma levadura utilizada en esta investigación, *P. tannophilus*, Converti *et al.* (2000b) encuentran valores de rendimiento en xilitol de 0,39 y 0,63 g/g, para procedimientos de acondicionamiento de hidrolizados que incluyen *overliming* en el primer caso y *overliming*, evaporación de ácido acético y adsorción con carbón activo, en el segundo.

Para el cálculo de las velocidades específicas de producción de etanol se ha aplicado en primer lugar el método diferencial de tratamiento de datos cinéticos. Se han ajustado los valores experimentales a la ecuación [5.28] para determinar los parámetros A y B, obteniéndose representaciones como las que se muestran en la Figura 5.36 para dos de los experimentos de la serie. La concentración de etanol con el tiempo que se obtiene a partir de la ecuación [5.26] se ha representado mediante una línea continua en las Figuras 4.13 a 4.21 del apartado de Resultados Experimentales. Sustituyendo los valores de A y B obtenidos en la ecuación [5.29] se pueden obtener las velocidades específicas de producción de etanol a distintos tiempos. Así se ha calculado q_E^D para los tiempos en los que se dispone de valores experimentales de etanol incluidos en el intervalo de ajuste. El valor medio de los resultados obtenidos q_E^D (M) se recoge en la Tabla 5.18.

Por otra parte, se ha determinado también la velocidad específica de producción de etanol por el método integral, q_E , según la ecuación [5.33]. De las representaciones de E frente a $x^2/2$ en el intervalo de tiempo en que la biomasa presenta un comportamiento lineal se obtienen líneas rectas como las que se muestran en la Figura 5.37. Las pendientes determinadas, multiplicadas por las correspondientes productividades en biomasa, b, proporcionan los valores de q_E que se recogen en la Tabla 5.18, que resultan, en general, concordantes con los obtenidos por el método diferencial.

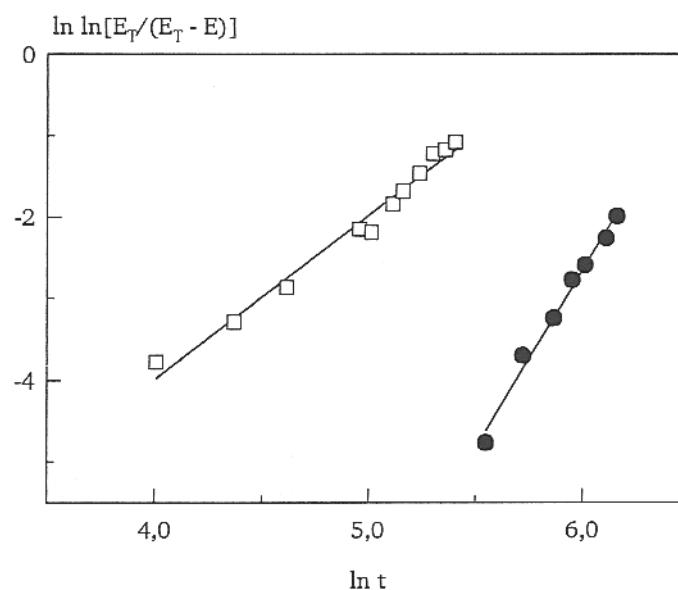


Figura 5.36 Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ecuación [5.28] para los experimentos FP₁-HS-P3 (●) y FP₄-HS-P3 (□)

Se observa que el experimento con mayor velocidad específica de producción de etanol es el FP₃-HS-P3, que resulta ser también el que daba un rendimiento en etanol más alto. En este caso, el acondicionamiento realizado al hidrolizado consistió en una neutralización con KOH seguida de concentración en rotavapor, que podría ser por tanto el tratamiento más aconsejable de los ensayados. Cabe destacar que los experimentos en que se realizó la concentración en rotavapor previamente a la neutralización del hidrolizado (FP₁-HS-P3, FP₂-HS-P3 y FP₃-HS-T4) son los que proporcionan las velocidades específicas de producción de etanol y los rendimientos en etanol más bajos. Parece claro, por tanto, que el orden de estas operaciones debe de ser al contrario, en primer lugar neutralizar el hidrolizado para después realizar la concentración. Esto puede deberse a que al concentrar el hidrolizado en medio ácido se produzcan más compuestos inhibidores a partir de los azúcares presentes.

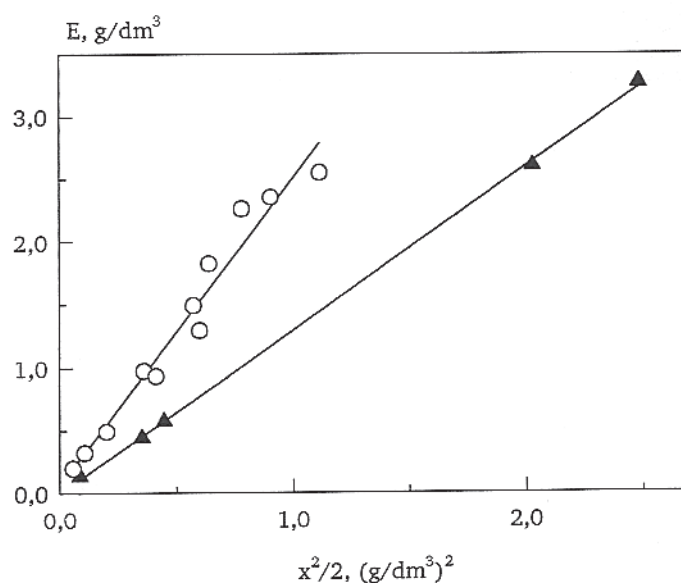


Figura 5.37 Representación con la ecuación [5.33] de los resultados de los experimentos FP₃-HS-P3 (▲) y FP₄-HS-P3 (○)

5.2.2.2 Efecto del tamaño de partícula

En el apartado 4.2.3.1(A) se recogen los resultados experimentales de las fermentaciones de los hidrolizados obtenidos con diferente tamaño de partícula.

Crecimiento celular

Como ejemplo de las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Figura 5.38 las de dos de los experimentos de la serie. Después de una fase *lag* de corta duración, se observa una fase exponencial de entre 15 y 20 horas de duración, marcada con línea continua en la figura, seguido de un amplio periodo de crecimiento lineal. Los correspondientes valores obtenidos de velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades en biomasa se recogen en la Tabla 5.19. Los valores más elevados de μ_m se determinan en los hidrolizados obtenidos con residuos de menor tamaño de partícula. En relación a las productividades en biomasa no se observa ninguna tendencia definida, aunque en la fermentación de los hidrolizados procedentes de residuos del mayor tamaño de partícula se detecta el valor más bajo de b .

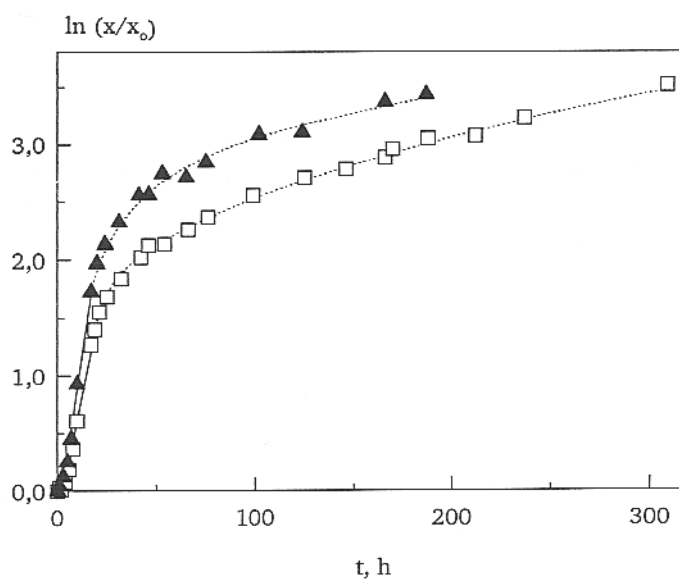


Figura 5.38 Curvas de crecimiento de los experimentos FP-HS-P1 (▲) y FP-HS-P7 (□)

TABLA 5.19
VELOCIDADES ESPECÍFICAS MÁXIMAS DE CRECIMIENTO
Y PRODUCTIVIDADES EN BIOMASA

Expto.	Tamaño, mm	μ_m, h^{-1}	$b \cdot 10^2, g/(dm^3 h)$
FP-HS-P1	0,125-0,300	0,12	0,46
FP-HS-P2	0,300-0,425	0,12	0,57
FP ₄ -HS-P3	0,425-0,600	0,097	0,62
FP-HS-P4	0,600-0,850	0,088	0,49
FP-HS-P5	0,850-1,200	0,082	0,48
FP-HS-P6	1,200-1,600	0,094	0,46
FP-HS-P7	1,600- 2,000	0,087	0,29

Consumo de sustrato

En la Tabla 5.20 se recogen los rendimientos globales en biomasa y las velocidades específicas de consumo de sustrato calculados en esta serie. En la Figura 5.39 se muestran dos de las representaciones realizadas para determinar los valores de $Y_{x/s}^G$. Para el cálculo de q_s^D mediante la ecuación [5.20] se obtienen previamente los parámetros α y β de representaciones como las de la Figura 5.40, en la que se observa que los ajustes obtenidos son aceptables.

TABLA 5.20
RENDIMIENTOS GLOBALES EN BIOMASA
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO

Expto.	$Y_{x/s}^G$ g/g	t, h	q_s^D , g/(g h)	q_s , g/(g h)
FP-HS-P1	0,15	25	0,11	0,10
		50	0,10	0,073
		100	0,063	0,047
FP-HS-P2	0,095	25	0,13	0,20
		50	0,12	0,14
		100	0,074	0,083
FP ₄ -HS-P3	0,087	50	0,15	0,23
		100	0,12	0,11
FP-HS-P4	0,13	25	0,23	0,19
		50	0,15	0,12
		100	0,072	0,068
FP-HS-P5	0,13	25	0,21	0,20
		50	0,12	0,12
		100	0,058	0,066
FP-HS-P6	0,13	25	0,25	0,19
		50	0,14	0,12
		100	0,067	0,068
FP-HS-P7	0,096	25	0,14	0,17
		50	0,12	0,12
		100	0,087	0,077

Los rendimientos globales en biomasa varían entre 0,087 y 0,15 g/g, no encontrándose influencia del tamaño de partícula del residuo hidrolizado sobre este parámetro. Tampoco se ha encontrado tendencia definida con esta variable en los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato, que van disminuyendo en el transcurso de cada experimento, observándose una aceptable concordancia entre los valores obtenidos por los métodos diferencial e integral.

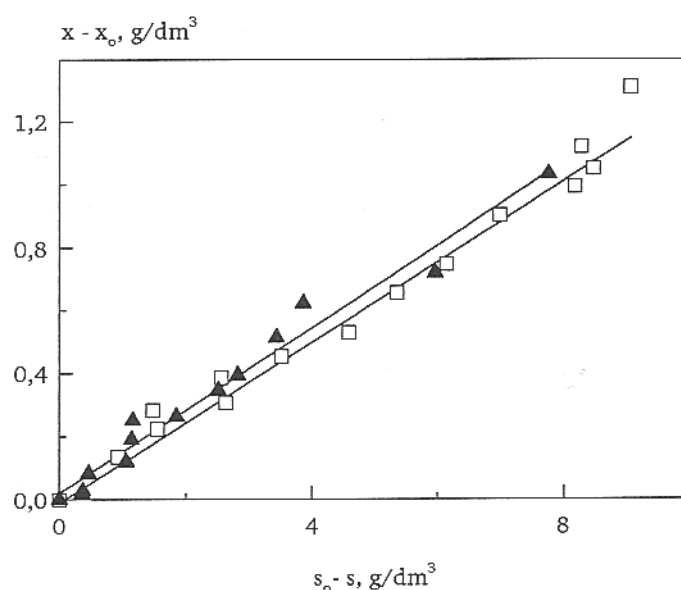


Figura 5.39 Formación neta de biomasa frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP-HS-P4 (□) y FP-HS-P5 (▲)

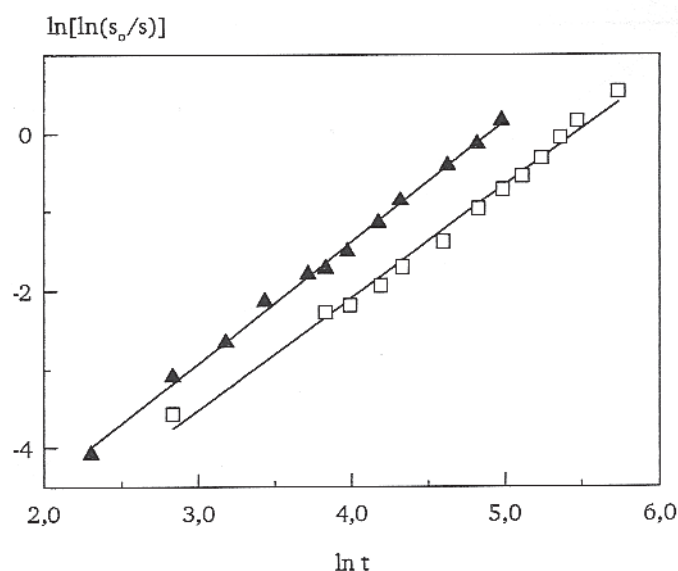


Figura 5.40 Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual a la ec. [5.19] para los experimentos FP-HS-P1 (▲) y FP-HS-P7 (□)

Formación de bioproductos

Mediante las representaciones gráficas de las concentraciones de etanol y xilitol frente al sustrato neto consumido como las que se muestran como ejemplo en las Figuras 5.41 y 5.42, se obtienen los rendimientos globales en estos bioproductos, $Y_{E/s}^G$ y $Y_{Xi/s}^G$, que se recogen en la Tabla 5.21.

Cabe destacar que los valores más elevados de ambos rendimientos se obtienen con los hidrolizados procedentes de residuos con tamaño de partícula comprendidos entre 0,425 y 0,600 mm, aunque también hay que señalar que en este experimento la concentración inicial de azúcares fue superior al resto de los cultivos de esta serie.

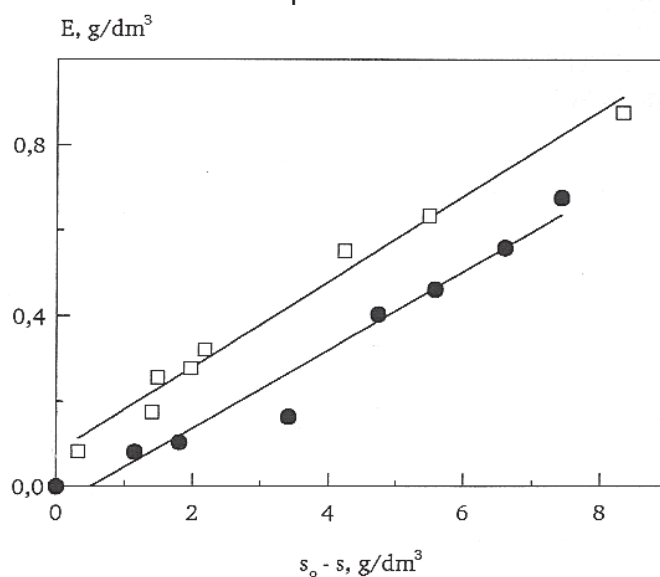


Figura 5.41 Etanol formado frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP-HS-P2 (□) y FP-HS-P7 (●)

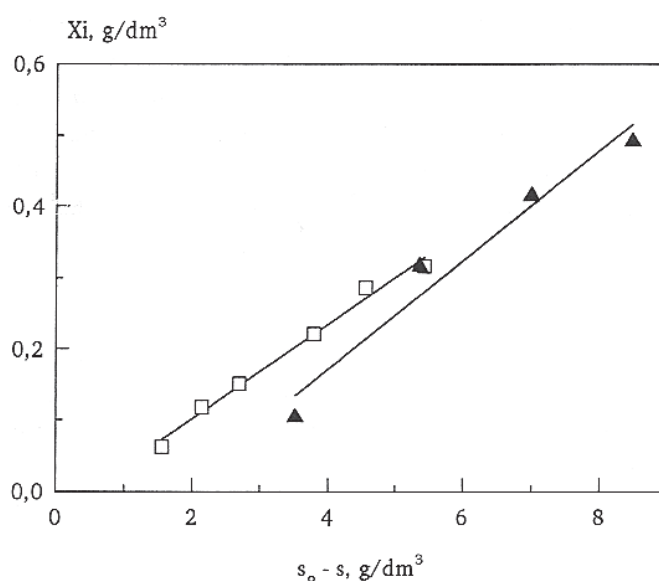


Figura 5.42 Xilitol formado frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP-HS-P1 (□) y FP-HS-P4 (▲)

TABLA 5.21
RENDIMIENTOS GLOBALES EN ETANOL Y XILITOL
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Expto.	$Y_{E/s}^G$, g/g	$Y_{Xi/s}^G$, g/g	q_E^D (M), g/(g h)	q_E , g/(g h)
FP-HS-P1	0,065	0,066	0,0064	0,0046
FP-HS-P2	0,10	0,065	0,012	0,0092
FP ₄ -HS-P3	0,17	0,11	0,015	0,015
FP-HS-P4	0,082	0,077	0,0067	0,0062
FP-HS-P5	0,073	0,060	0,0065	0,0072
FP-HS-P6	0,10	0,066	0,0075	0,0079
FP-HS-P7	0,092	0,065	0,0060	0,0067

De igual forma que en la serie anterior, se han calculado las velocidades específicas de producción de etanol por los métodos diferencial e integral, resultados que se recogen en la Tabla 5.21, obteniéndose valores concordantes por ambos procedimientos. En la Figura 5.43 se representan dos de los ajustes realizados para obtener los parámetros A y B que se requieren para el cálculo de los valores de q_E^D a distintos tiempos, con los que se ha determinado el valor medio que se recoge en la tabla, q_E^D (M). Asimismo, en la Figura 5.44 se muestran ejemplos de las representaciones de E frente a $x^2/2$ en el intervalo de comportamiento lineal de la biomasa; en todos los casos se observa una línea recta de cuya pendiente, multiplicada por los valores de b, se obtienen las correspondientes velocidades específicas de producción de etanol por el método integral.

De estos resultados no se puede deducir claramente una relación entre el tamaño de partícula y la formación de bioproductos, aunque se determinan valores de q_E algo superiores en los cultivos con hidrolizados obtenidos con tamaño de partícula comprendido entre 0,3 y 0,6 mm. Los valores más altos de estos parámetros que se obtienen para el experimento FP₄-HS-P3 pueden deberse a la mayor concentración de azúcares existente en este cultivo al inicio de la fermentación.

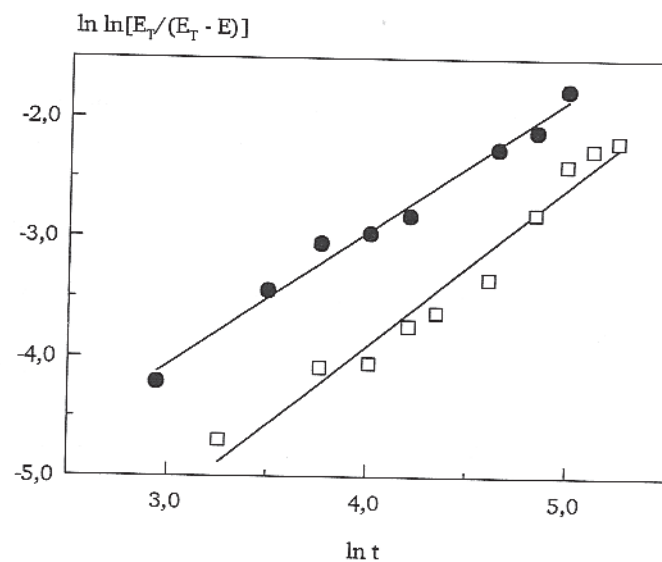


Figura 5.43 Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ec. [5.28] para los experimentos FP-HS-P2 (●) y FP-HS-P5 (□)

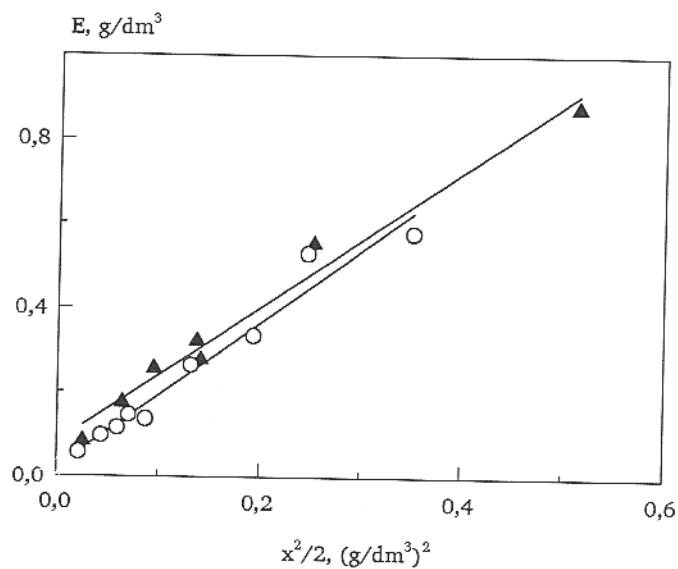


Figura 5.44 Representación con la ecuación [5.33] de los resultados de los experimentos FP-HS-P2 (▲) y FP-HS-P6 (○)

5.2.2.3 Separación de médula y cubierta

Se han realizado experimentos de fermentación con los hidrolizados procedentes de cada una de estas fracciones, cuyos resultados se recogen en el apartado 4.2.3.1(B).

Crecimiento celular

En la Figura 5.45 se muestran las curvas de crecimiento para los experimentos de esta serie. Se ha observado la existencia de fase *lag* en la fermentación de ambos hidrolizados con *P. tannophilus*. En los hidrolizados de la cubierta la duración de esta fase de adaptación es más amplia (7 h) que en el caso de la médula (2 h). Sin embargo, los periodos exponenciales de ambos cultivos son de similar duración, 21 h para el de la cubierta y 18 h para el de la médula.

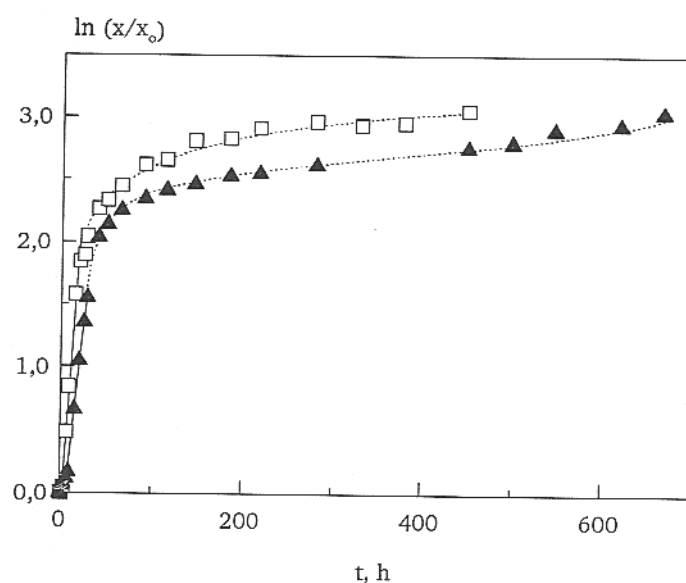


Figura 5.45 Curvas de crecimiento de los experimentos FP-HS-S1 (▲) y FP-HS-S2₃ (□)

Al igual que en el resto de los cultivos, estos periodos exponenciales son de muy corta duración si se comparan con los correspondientes a la fase de desaceleración del crecimiento. También en esta fase se ha observado que en el caso de la fermentación de los hidrolizados de la cubierta, la duración de este periodo es bastante más amplia que en el de la médula. En este último caso, después de 200 h donde la biomasa aumenta de forma lineal con el tiempo, el cultivo entra en la fase estacionaria. Sin embargo, en los hidrolizados de cubierta, la fase lineal tiene una duración superior a 600 h, no llegándose a detectar la fase estacionaria. Estos resultados parecen indicar que los amplios periodos de crecimiento lineal de

la biomasa originados inicialmente por la limitación de oxígeno en el medio, son aún de mayor duración si en el medio de cultivo existen compuestos inhibidores.

A partir de los periodos exponenciales, se han obtenido las velocidades específicas máximas de crecimiento, μ_m , que se recogen en la Tabla 5.22, junto con los correspondientes valores de productividad en biomasa, b . Ambos parámetros son mayores para el caso de la fermentación de la médula.

TABLA 5.22
VELOCIDADES ESPECÍFICAS MÁXIMAS DE CRECIMIENTO
Y PRODUCTIVIDADES EN BIOMASA

Expto.	Fracción	μ_m , h^{-1}	b 10^2 , $g/(dm^3 h)$
FP-HS-S1	Cubierta	0,071	0,053
FP-HS-S2 ₃	Médula	0,11	0,17

Consumo de sustrato

Las representaciones realizadas para la determinación de los rendimientos en biomasa que se recogen en la Tabla 5.23 se muestran en la Figura 5.46. Se observan dos tramos en el caso del experimento FP-HS-S1, posiblemente debido a la existencia de una importante concentración de ácido acético al inicio de la fermentación, lo que provocaría la fuerte inhibición observada en este cultivo y la duración tan larga del mismo. No se dispone de datos de la concentración de este inhibidor en el transcurso del experimento, por lo que no se pueden realizar los cálculos considerando el ácido acético como sustrato, como en el apartado 5.2.1. Por ello, se ha calculado un $Y_{x/s}^G$ para cada uno de los intervalos detectados.

Los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato por los procedimientos diferencial e integral también se recogen en la Tabla 5.23. En la Figura 5.47 se muestra el ajuste realizado con los valores de sustrato para el experimento FP-HS-S2₃ con la que se han calculado los parámetros α y β de la ecuación [5.19] para obtener q_s^D . En el experimento FP-HS-S1 se ha realizado el ajuste en dos tramos por lo indicado en el párrafo anterior. Las reproducciones correspondientes según la ecuación [5.18] son las marcadas con línea continua en las Figuras 4.28 y 4.29.

TABLA 5.23
 RENDIMIENTOS GLOBALES EN BIOMASA
 Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO

Expto.	$Y_{x/s}^G$, g/g	t, h	q_s^D , g/(g h)	q_x , g/(g h)
FP-HS-S1	0,17	200	0,015	0,0083
	0,032*	300*	0,034	0,038
		400*	0,031	0,034
FP-HS-S2 ₃	0,16	50	0,043	0,032
		100	0,028	0,025
		200	0,014	0,018

*Segundo tramo

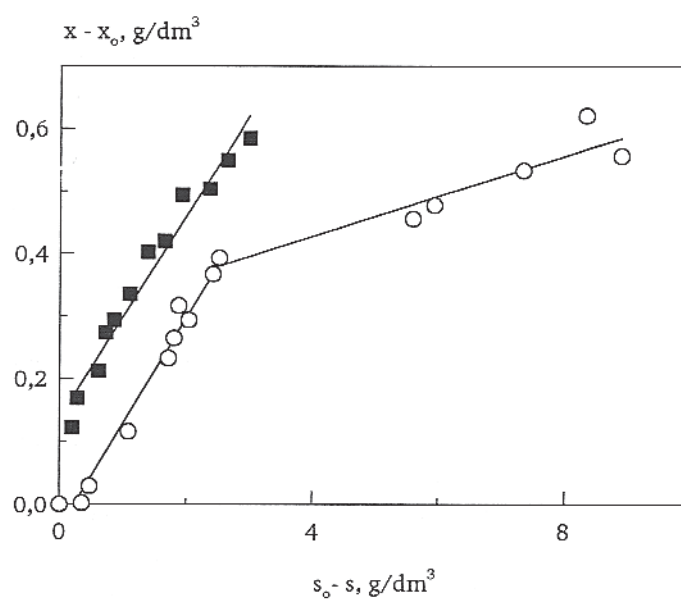


Figura 5.46 Formación neta de biomasa frente a sustrato neto consumido
 en los experimentos FP-HS-S1 (○) y FP-HS-S2₃ (■)

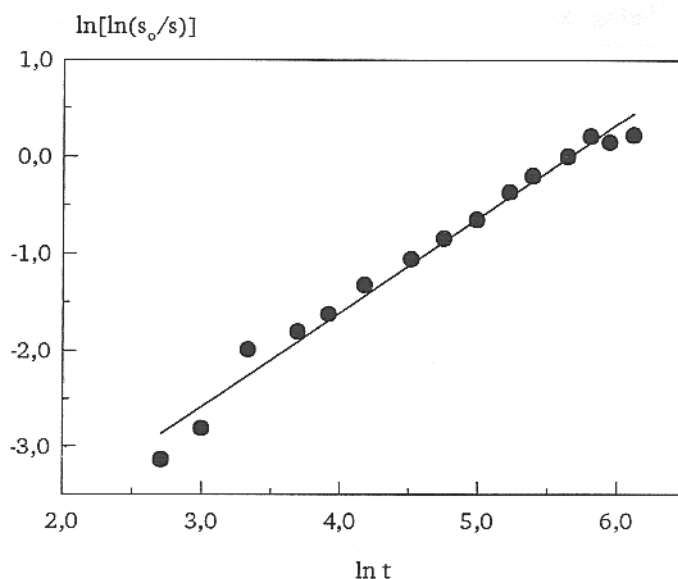


Figura 5.47 Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual a la ecuación [5.19] para el experimento FP-HS-S2₃

Formación de bioproductos

En la fermentación de ambos hidrolizados se han tratado de evaluar los rendimientos globales en bioproductos, así como las velocidades específicas de producción de etanol. En la Figura 5.48 se muestran como ejemplo las representaciones realizadas para el cálculo de los rendimientos en bioproductos de uno de los experimentos. En la Figura 5.49 se representa el ajuste de los resultados experimentales de etanol que ha permitido el cálculo de q_E^D (M) para el experimento FP-HS-S1. La velocidad específica de producción de etanol por el método diferencial no se ha podido determinar para FP-HS-S2₃ por disponer solamente de dos puntos experimentales de aumento de concentración de etanol, aunque sí se ha calculado por el método integral para los dos experimentos, como resultado del producto de las correspondientes productividades en biomasa por las pendientes de las representaciones que se muestran en la Figura 5.50 para el intervalo de comportamiento lineal de la biomasa. Los valores de rendimientos globales en etanol y xilitol y velocidades específicas de producción de etanol obtenidos se recogen en la Tabla 5.24.

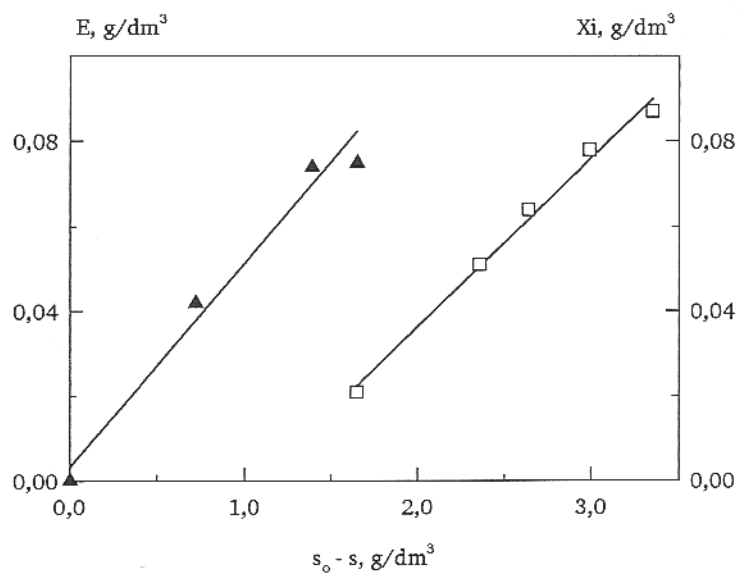


Figura 5.48 Etanol (▲) y Xilitol (□) formados frente a sustrato neto consumido para el experimento FP-HS-S2₃

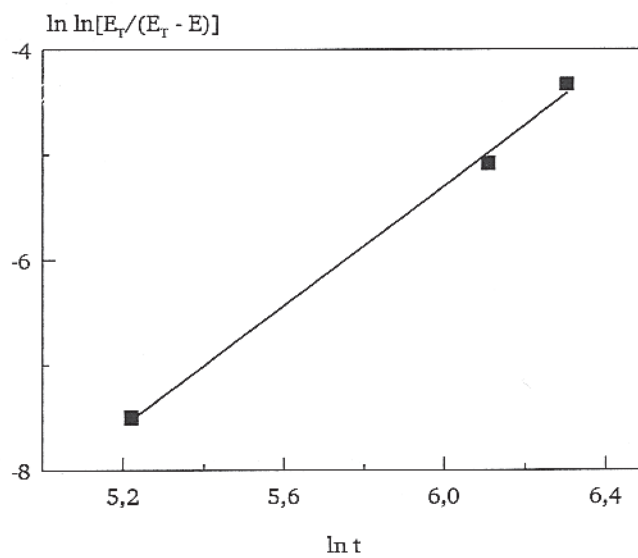


Figura 5.49 Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ecuación [5.28] para el experimento FP-HS-S1

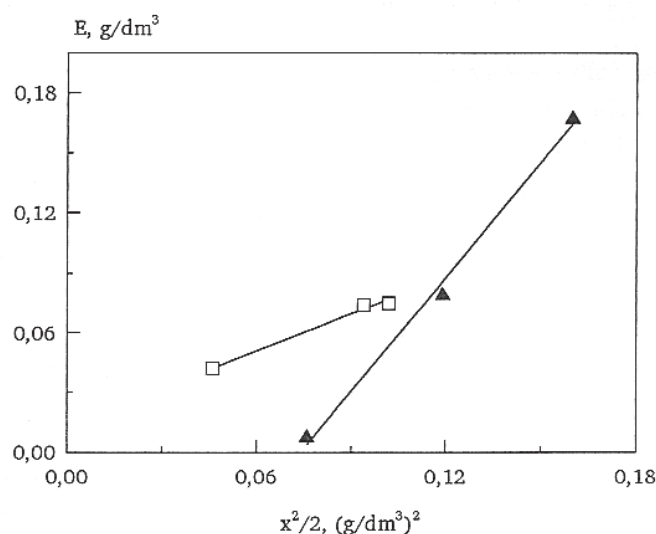


Figura 5.50 Representación con la ecuación [5.33] de los resultados de los experimentos FP-HS-S1 (▲) y FP-HS-S2₃ (□)

TABLA 5.24
RENDIMIENTOS GLOBALES EN ETANOL Y XILITOL
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Expto.	$Y_{E/S}^G$, g/g	$Y_{Xi/S}^G$, g/g	q_E^D (M) 10^3 , g/(g h)	q_E 10^3 , g/(g h)
FP-HS-S1	0,021	0,014	0,94	1,0
FP-HS-S2 ₃	0,048	0,040	-	1,1

Se obtienen valores muy bajos de estos parámetros de formación de bioproductos en los dos experimentos si los comparamos con los que se han determinado en series anteriores. En el caso de la médula la inhibición del cultivo es menor, pero la concentración inicial de sustrato es muy baja debido a los niveles tan bajos de azúcares que se obtienen en la hidrólisis de esta fracción. Los mayores valores de s_0 en el caso de la cubierta no han dado lugar a mejores resultados posiblemente debido a la presencia de altas concentraciones de inhibidores, que se podrían disminuir mejorando el procedimiento de acondicionamiento de los hidrolizados.

5.2.2.4 Influencia de la naturaleza y concentración de ácido

Se ha estudiado la fermentación de los hidrolizados obtenidos a distintas concentraciones con los ácidos sulfúrico y clorhídrico. Las concentraciones empleadas, procedimiento de acondicionamiento de los hidrolizados y los correspondientes resultados experimentales se recogen en el apartado 4.2.3.1(C).

A) Ácido sulfúrico

Se analiza la influencia de la concentración de ácido sulfúrico utilizado en la hidrólisis a 90 °C sobre la fermentación de los hidrolizados. Las concentraciones empleadas se recuerdan en la Tabla 5.25.

Crecimiento celular

En la Figura 5.51 se muestran como ejemplo dos de las curvas de crecimiento obtenidas en esta serie para las concentraciones 1,0 y 2,0 N. Los puntos de biomasa utilizados para el cálculo de b son los correspondientes al trazo continuo en las figuras de Resultados Experimentales.

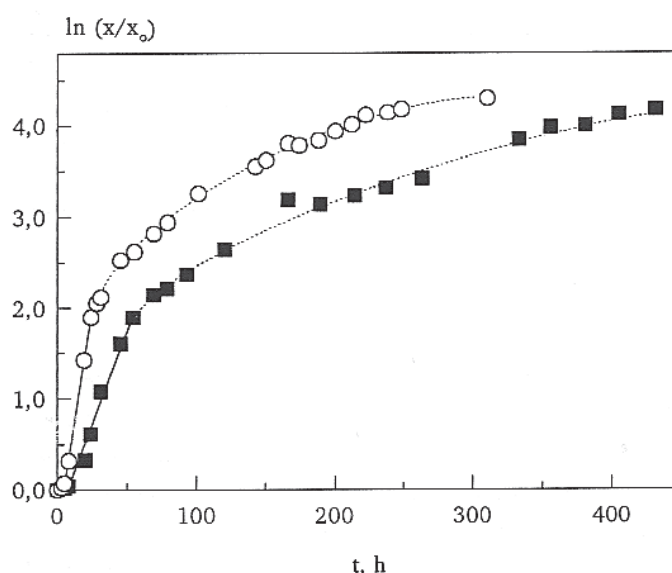


Figura 5.51 Curvas de crecimiento de los experimentos FP₄-HS-P3 (○) y FP₄-HS-C4 (■)

En estos cultivos se ha detectado una fase *lag* entre 2 y 5 horas, correspondiendo el mayor tiempo a los hidrolizados procedentes de concentraciones más elevadas de ácido. Se observa cómo la duración de las fases exponencial y lineal es más amplia cuanto mayor es la concentración de ácido.

Utilizando los periodos de la fase exponencial y los de comportamiento lineal de la biomasa, se han determinado los valores de velocidad específica máxima de crecimiento y productividad en biomasa, resultados que se recogen en la Tabla 5.25. En general, se produce un descenso de ambos parámetros al aumentar la concentración de ácido sulfúrico utilizado en la hidrólisis. Los mayores valores de μ_m y b , $0,11 \text{ h}^{-1}$ y $0,011 \text{ g}/(\text{dm}^3 \text{ h})$, corresponden al experimento de menor concentración, 0,1 N. Los valores de μ_m y b son superiores a los determinados en trabajos previos para la fermentación de hidrolizados de residuo de poda de olivo

en las mismas condiciones (por ejemplo, para ácido sulfúrico 1 N se obtuvieron $\mu_m = 0,019 \text{ h}^{-1}$ y $b = 0,0024 \text{ g}/(\text{dm}^3 \text{ h})$), aunque la concentración inicial de inóculo empleada fue superior, Romero (2003).

TABLA 5.25
VELOCIDADES ESPECÍFICAS MÁXIMAS DE CRECIMIENTO
Y PRODUCTIVIDADES EN BIOMASA

Expto.	$C_A, \text{ N}$	$\mu_m, \text{ h}^{-1}$	$b \cdot 10^2, \text{ g}/(\text{dm}^3 \text{ h})$
FP-HS-C1	0,1	0,11	1,1
FP-HS-C2	0,5	-	0,51
FP ₄ -HS-P3	1,0	0,097	0,62
FP-HS-C4	2,0	0,041	0,38

Consumo de sustrato

En relación con el sustrato, se han tratado de calcular los rendimientos globales en biomasa y velocidades específicas de consumo. En este sentido, en la Figura 5.52 se muestran las representaciones efectuadas en dos de los experimentos de esta serie para el cálculo del rendimiento global en biomasa. Tal como se puede apreciar en la Tabla 5.26, en general se observa que, a mayor concentración de ácido en la obtención de los hidrolizados, el rendimiento global en biomasa es menor. También se observa una disminución de $Y_{x/s}^G$ conforme la concentración de sustrato al inicio de la fermentación es más alta. El menor valor obtenido, 0,087 g/g, corresponde al experimento FP₄-HS-P3, común con la serie de acondicionamiento, (Tabla 4.34 y Figura 4.16) con $s_0 = 17,3 \text{ g}/\text{dm}^3$.

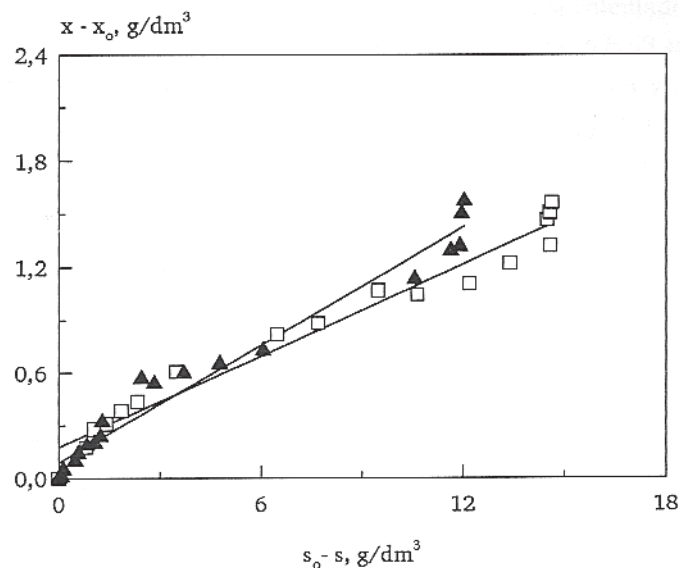


Figura 5.52 Formación neta de biomasa frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP₄-HS-P3 (□) y FP-HS-C4 (▲)

TABLA 5.26
RENDIMIENTOS GLOBALES EN BIOMASA
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO

Expto.	$Y_{x/s}^G$, g/g	t, h	q_s^D , g/(g h)	q_s , g/(g h)
FP-HS-C1	0,31	15	0,16	0,20
		25	0,070	0,12
FP-HS-C2	0,16	200	0,037	0,068
		300	0,014	0,033
FP ₄ -HS-P3	0,087	100	0,12	0,11
		200	0,049	0,057
FP-HS-C4	0,11	100	0,093	0,13
		200	0,057	0,052
		300	0,033	0,033

Las velocidades específicas de consumo de sustrato se han calculado por los métodos diferencial e integral para distintos tiempos del cultivo. En la Figura 5.53 se representan dos de los ajustes realizados en esta serie para obtener los parámetros α y β necesarios para calcular q_s^D mediante la ecuación [5.20], observándose una aceptable concordancia entre los valores experimentales de consumo de sustrato y los que predice esta ecuación (Tabla 5.26). En todos los casos, se observa que la velocidad específica de consumo de sustrato disminuye en el transcurso del experimento. Finalmente, cabe destacar la aceptable concordancia entre los valores de q_s^D y q_s evaluados por los métodos diferencial e integral.

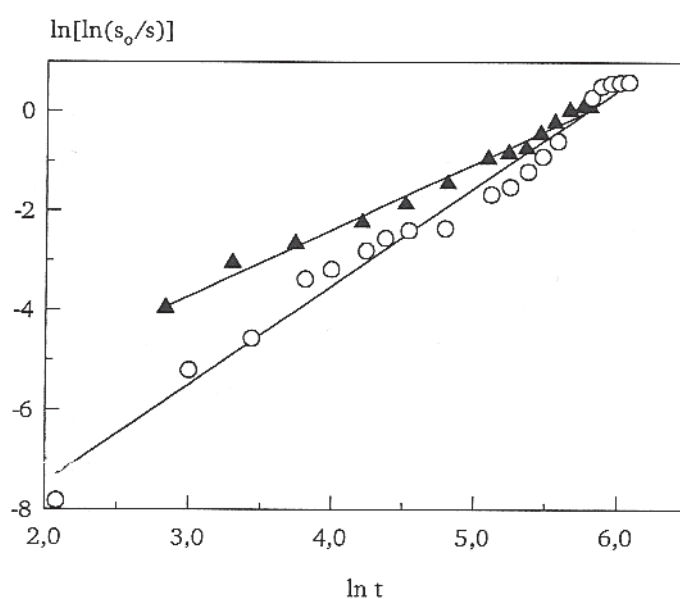


Figura 5.53 Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual a la ecuación [5.19] para los experimentos FP-HS-C2 (▲) y FP-HS-C4 (○)

Formación de bioproductos

Los rendimientos globales en etanol y xilitol, que se recogen en la Tabla 5.27, se han calculado a partir de las pendientes de las correspondientes representaciones gráficas de sus concentraciones frente al sustrato neto consumido como las que se muestran en las Figuras 5.54 y 5.55.

TABLA 5.27
RENDIMIENTOS GLOBALES EN ETANOL Y XILITOL
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Expto.	$Y_{E/s}^G$, g/g	$Y_{Xi/s}^G$, g/g	q_E^D (M), g/(g h)	q_E , g/(g h)
FP-HS-C1	0,0095	0,013	-	-
FP-HS-C2	0,12	0,013	0,0055	0,0040
FP ₄ -HS-P3	0,17	0,11	0,015	0,015
FP-HS-C4	0,21	0,045	0,0095	0,0099

Se observa un aumento de los rendimientos globales en etanol al incrementarse la concentración de ácido sulfúrico empleada en la hidrólisis, alcanzándose el mayor valor (0,21 g/g) para el experimento de 2,0 N. No se detecta la misma tendencia para el rendimiento global en xilitol, para el que el valor máximo (0,11 g/g) se obtiene en la fermentación del hidrolizado obtenido con ácido sulfúrico 1,0 N. Destaca el valor tan pequeño de $Y_{E/s}^G$ para el experimento de menor concentración de ácido (0,1 N), que es precisamente del que se obtenía el mayor rendimiento global en biomasa; esto puede ser debido a la baja concentración inicial de sustrato en este cultivo, que hace que el consumo se dirija previamente a la formación de biomasa en lugar de a la de bioproductos.

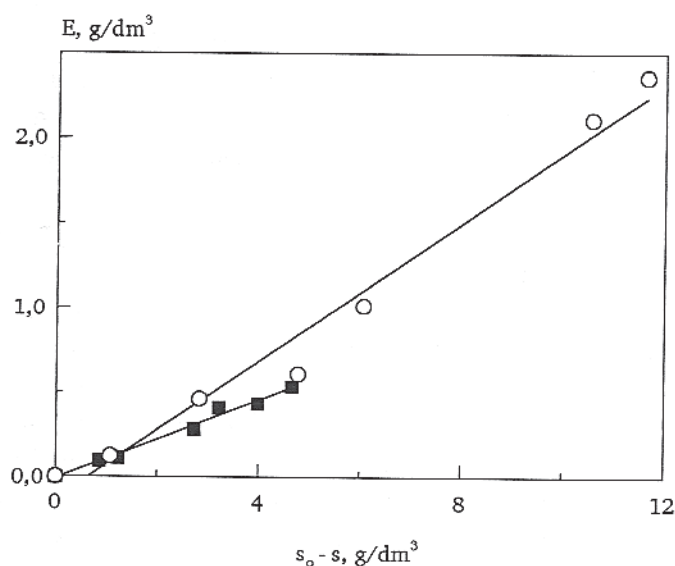


Figura 5.54 Etanol formado frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP-HS-C2 (■) y FP-HS-C4 (○)

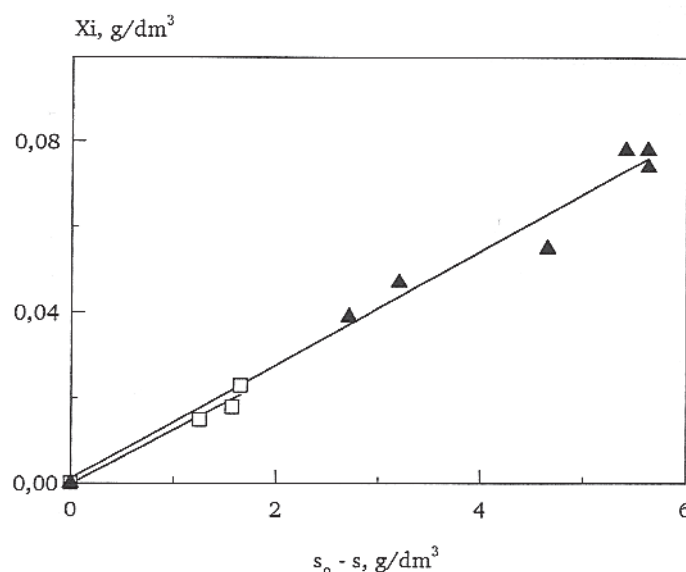


Figura 5.55 Xilitol formado frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP-HS-C1 (□) y FP-HS-C2 (▲)

Los rendimientos globales en etanol son inferiores a los determinados para el residuo de poda de olivo en las mismas condiciones de hidrólisis y fermentación, mientras que con tallos de girasol se obtienen rendimientos en xilitol superiores. Por ejemplo, para la fermentación del hidrolizado con ácido sulfúrico 1 N, resultaba $Y_{E/s}^G = 0,35$ g/g y $Y_{Xi/s}^G = 0,012$ g/g, frente a los 0,17 y 0,11 g/g del experimento FP₄-HS-P3. Este hecho puede deberse a las diferencias en la composición en azúcares de los hidrolizados, que contienen una concentración en D-glucosa mucho más elevada en la poda de olivo, Romero (2003).

También en la Tabla 5.27 se recogen las velocidades específicas de producción de etanol determinadas por los métodos diferencial e integral. En la Figura 5.56 se representan dos de los ajustes realizados para el cálculo de los parámetros A y B que se requieren para la determinación de los valores de q_E^D a distintos tiempos, con los que se ha calculado el valor medio, q_E^D (M). Por otra parte, mediante la pendiente de las representaciones de E frente a $x^2/2$ en el intervalo de comportamiento lineal de la biomasa, como la de la Figura 5.57, multiplicada por los valores de b, se obtienen las correspondientes velocidades por el método integral (q_E), observándose una aceptable concordancia con los resultados determinados por el método diferencial. La velocidad específica de producción de etanol más elevada, 0,015 g/(g h), se obtiene para el experimento procedente de hidrólisis a concentración 1 N, que puede considerarse por tanto el de mejores resultados de esta serie por proporcionar también el mayor valor de la suma de los rendimientos globales en bioproductos.

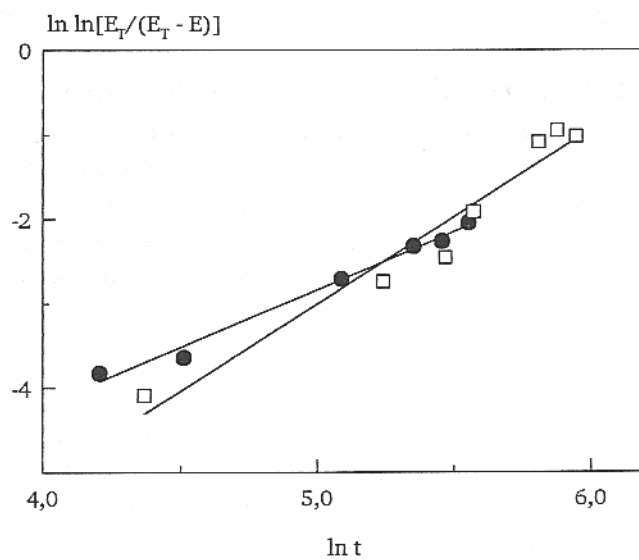


Figura 5.56 Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ec. [5.28] para los experimentos FP-HS-C2 (●) y FP-HS-C4 (□)

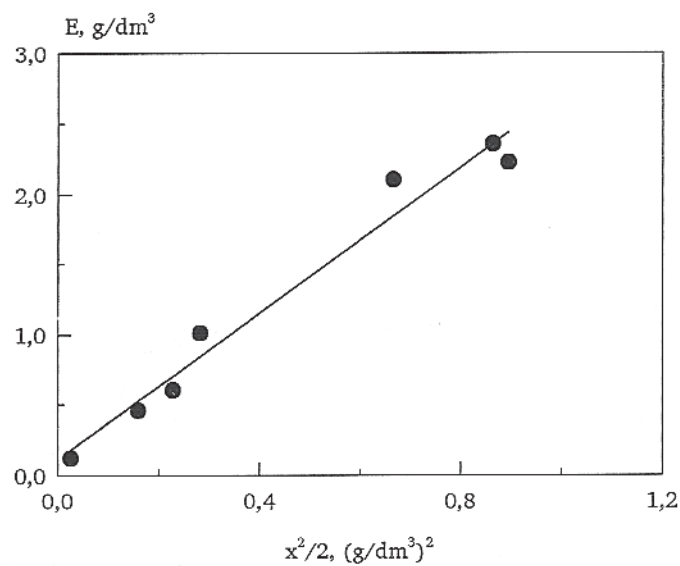


Figura 5.57 Representación con la ecuación [5.33] de los resultados del experimento FP-HS-C4

B) Ácido clorhídrico

Se ha estudiado la influencia de la concentración de ácido clorhídrico utilizado en la hidrólisis a 90 °C sobre el posterior proceso de fermentación. Las concentraciones se han variado en el intervalo 0,1 a 2,0 N, aunque para concentraciones superiores a 0,5 N no se produce consumo de sustrato ni formación de bioproductos en las condiciones en que se han realizado estos experimentos. En las Tablas 4.51 a 4.56 se recogen los resultados experimentales correspondientes de esta serie.

Crecimiento celular

En la Figura 5.58 se muestran dos de las curvas de crecimiento obtenidas, concretamente para los experimentos de concentraciones 0,1 y 1,0 N. En todos los cultivos se ha observado fase de adaptación, oscilando entre 4 h (para el experimento FP-HC-C1) y 43 h (en el experimento FP-HC-C3). De nuevo se observa una fase exponencial corta (entre 10 y 47 h) y un amplio periodo de comportamiento lineal de la biomasa, que llega a alcanzar del orden de 420 h en el cultivo FP₁-HC-C3.

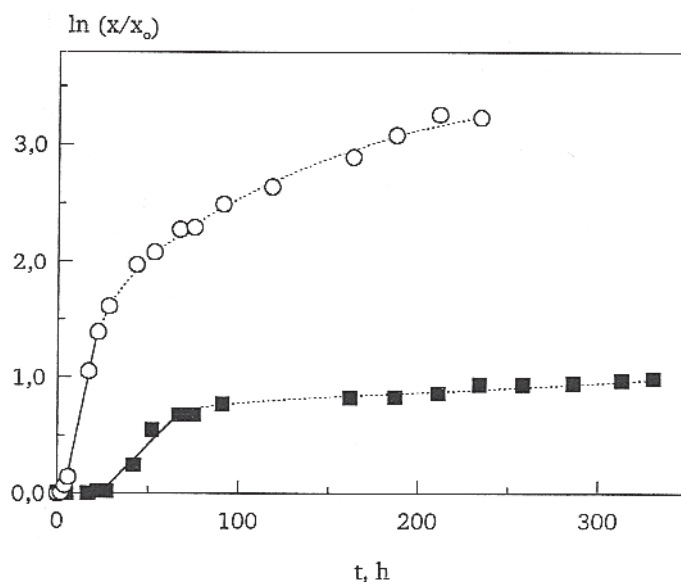


Figura 5.58 Curvas de crecimiento de los experimentos FP-HC-C1 (○) y FP-HC-C5 (■)

En los cultivos FP-HC-C4 y FP-HC-C5 se observa que la formación de biomasa es pequeña, lo cual en principio indica que el cultivo está fuertemente inhibido, llegándose a alcanzar la fase estacionaria en un tiempo menor que en el experimento FP₁-HC-C3. De cualquier forma, en los experimentos donde ha existido un amplio crecimiento celular, la duración de la fase *lag* ha sido mayor conforme más alta ha sido la concentración de ácido utilizado en la obtención del hidrolizado.

Los valores de velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades en biomasa se muestran en la Tabla 5.28. No se observa ninguna tendencia definida con la concentración de ácido clorhídrico utilizada en la hidrólisis aunque, como ocurría en el apartado anterior en el que se estudiaba la concentración de ácido sulfúrico, los mayores valores de ambos parámetros se obtienen para el experimento de menor concentración, 0,1 N.

TABLA 5.28
VELOCIDADES ESPECÍFICAS MÁXIMAS DE CRECIMIENTO
Y PRODUCTIVIDADES EN BIOMASA

Expto.	C _A , N	μ_m , h ⁻¹	b 10 ² , g/(dm ³ h)
FP-HC-C1	0,1	0,076	0,32
FP-HC-C2	0,3	0,022	0,27
FP-HC-C3	0,5	0,065	0,44
FP ₁ -HC-C3	0,5	0,041	0,48
FP-HC-C4	0,75	0,0037	0,010
FP-HC-C5	1,0	0,016	0,031

Tal como se ha indicado, en los experimentos FP-HC-C4 y FP-HC-C5, en los que no se ha producido consumo de sustrato, se detecta sin embargo algo de crecimiento celular; este crecimiento seguramente está producido por los nutrientes adicionados al medio de fermentación y los valores tan bajos de μ_m y b que se obtienen ponen de manifiesto la fuerte inhibición a la que deben estar sometidas las levaduras.

La diferencia entre los experimentos de 0,5 N, además del orden de las operaciones de concentración y neutralización con NaOH de los hidrolizados, estaba en que en FP₁-HC-C3 se sometió al residuo a un pretratamiento en autoclave anterior a la hidrólisis, que no supuso un aumento de los rendimientos finales en azúcares. En este experimento se ha medido la concentración de oxígeno disuelto a distintos tiempos durante la fermentación, obteniéndose concentraciones cercanas a 6,0 mg/dm³ a las 4 y 28 horas (tiempos de la fase de adaptación), 0,4 mg/dm³ a las 53 horas (fase exponencial) y valores muy próximos a cero a partir de las 75 h (fase lineal) hasta el final del experimento. En los experimentos de este trabajo se han medido los niveles de oxígeno disuelto al final de la fermentación, resultando

valores cercanos a cero, excepto en los cultivos en los que no se ha producido consumo de sustrato ni formación de bioproductos, en los que la concentración final de oxígeno no es nula. En esta serie, al final de los experimentos FP-HC-C4 y FP-HC-C5 se obtuvieron 3,4 y 7,2 mg/dm³ de oxígeno disuelto respectivamente, lo cual vuelve a indicar que en estos casos la limitación del crecimiento no es atribuible a la deficiencia de oxígeno disuelto, sino a los productos de degradación que provocan inhibición.

Consumo de sustrato

En la Figura 5.59 se muestran como ejemplo para dos experimentos de esta serie las representaciones de la biomasa neta formada frente al sustrato neto consumido, de cuyas pendientes se han calculado los correspondientes rendimientos globales en biomasa. Los valores de $Y_{x/s}^G$ varían en el intervalo 0,10-0,23 g/g, disminuyendo conforme aumenta la concentración de ácido clorhídrico (Tabla 5.29).

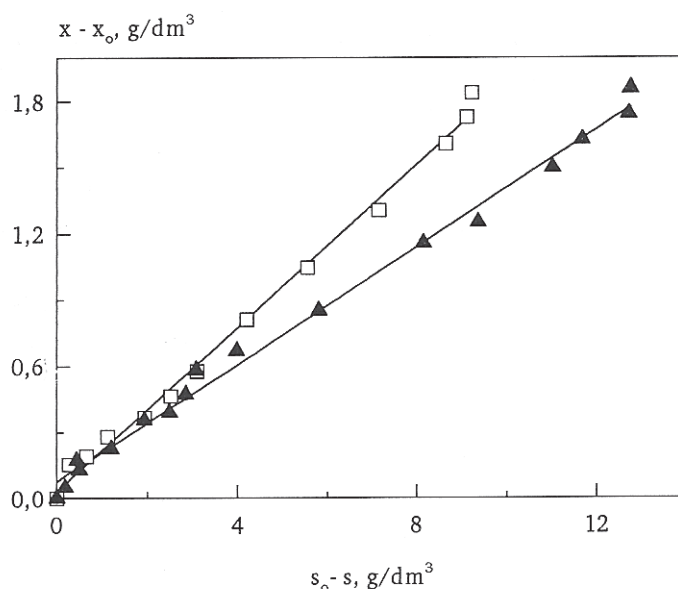


Figura 5.59 Formación neta de biomasa frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP-HC-C2 (□) y FP₁-HC-C3 (▲)

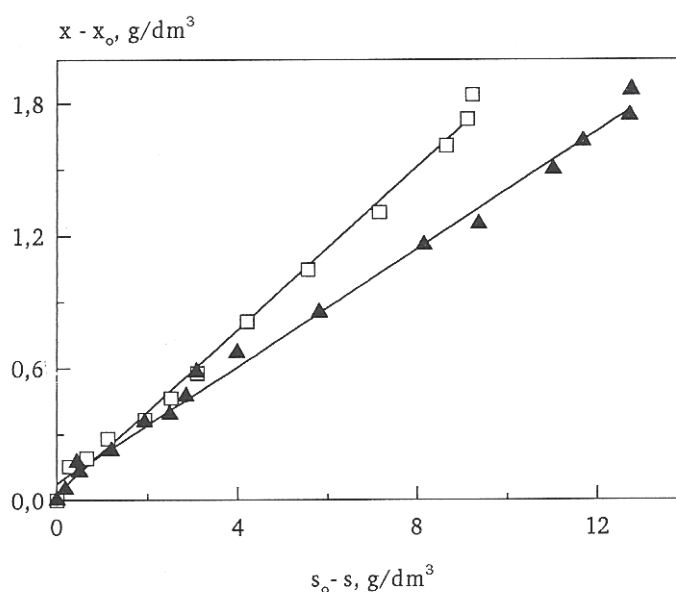


Figura 5.59 Formación neta de biomasa frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP-HC-C2 (□) y FP₁-HC-C3 (▲)

En la Figura 5.60 (a) aparecen dos de los ajustes realizados con los puntos experimentales de sustrato para el cálculo de los parámetros α y β con los que se determina q_s^D a distintos tiempos. En la Figura 5.60 (b) se muestran los valores obtenidos para dos de los experimentos de la serie en el intervalo utilizado para el ajuste y a los tiempos de los que se dispone de puntos experimentales de sustrato. Excepto en FP-HC-C2, en el que la velocidad específica de consumo de sustrato determinada por el método diferencial aumenta al principio para disminuir a partir de un valor máximo próximo a las 150 h hasta el final del experimento, en el resto de los cultivos de esta serie se produce una bajada q_s^D desde el tiempo correspondiente al primer punto experimental de azúcares distinto del inicial hasta el final del intervalo incluido en el ajuste.

En la Tabla 5.29 se muestran los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato determinadas por los métodos diferencial e integral. En general, ambos procedimientos de cálculo conducen a resultados muy próximos.

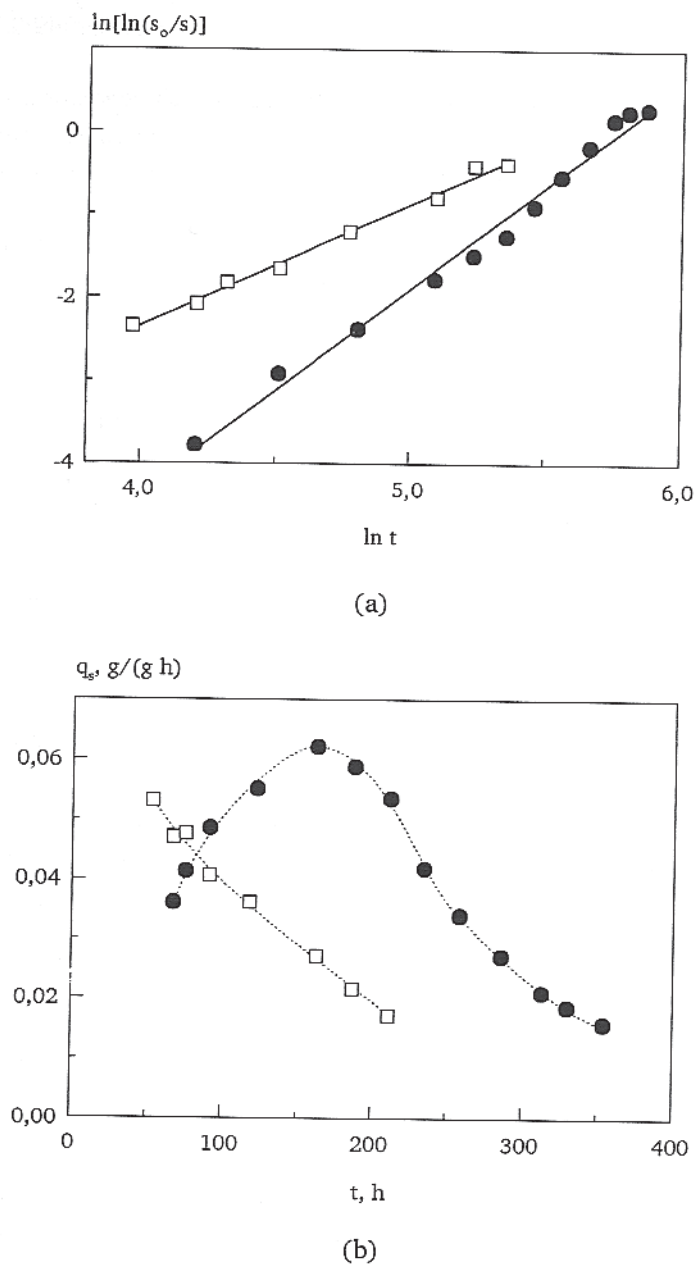


Figura 5.60

(a) Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual a la ec. [5.19] para los experimentos FP-HC-C1 ($\square$) y FP-HC-C2 ($\bullet$)

(b) Variación de la velocidad específica de consumo de sustrato con el tiempo en los experimentos FP-HC-C1 ($\square$) y FP-HC-C2 ($\bullet$)

Formación de bioproductos

Con las representaciones de las concentraciones de etanol y xilitol frente al sustrato neto consumido, como las que se muestran en la Figura 5.61 para el experimento FP-HC-C2, se han determinado los rendimientos globales en estos bioproductos que se recogen en la Tabla 5.30. Se obtienen rendimientos globales en etanol comprendidos entre 0,10 y 0,19 g/g y en xilitol entre 0,011 y 0,12 g/g. Los valores más bajos corresponden al experimento de menor concentración de ácido clorhídrico (0,1 N).

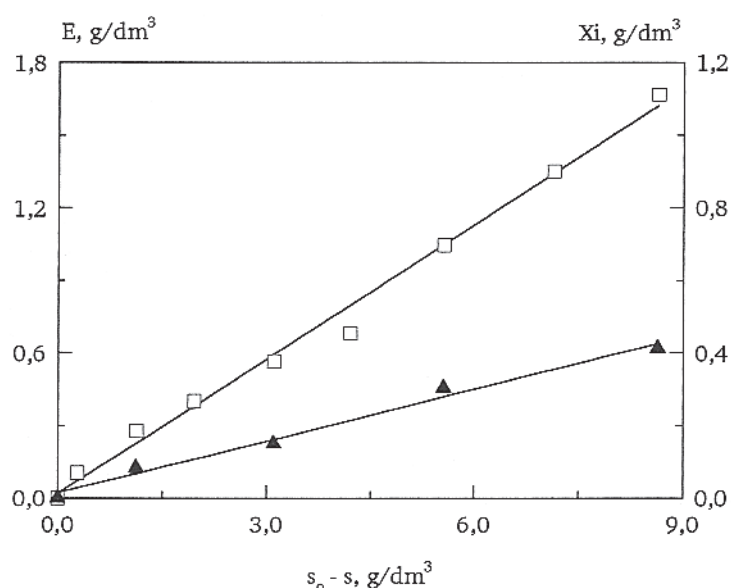


Figura 5.61 Etanol (□) y xilitol (▲) formados frente a sustrato neto consumido para el experimento FP-HC-C2

Si se comparan estos rendimientos con los obtenidos en trabajos previos para la fermentación de hidrolizados de residuo de poda de olivo a distintas concentraciones de ácido clorhídrico, se obtienen valores de $Y_{E/s}^G$ superiores y de $Y_{Xi/s}^G$ inferiores a los de esta investigación, igual que ocurría en el apartado anterior a distintas concentraciones de ácido sulfúrico. Por ejemplo, para una concentración de ácido clorhídrico de 0,5 N se determinaron un $Y_{E/s}^G = 0,32$ g/g y un $Y_{Xi/s}^G = 0,0042$ g/g, Moya (1997), frente a los 0,17 g/g y 0,12 g/g que se obtienen para el experimento FP-HC-C3. Por otra parte, en el caso de la poda de olivo sí se produjo el consumo de sustrato y la formación de bioproductos para una concentración de ácido clorhídrico 1 N, al contrario de lo que sucede en este trabajo. Esto pone de manifiesto la mayor presencia de inhibidores con el residuo de tallos de girasol, lo que también podría explicar (junto con lo comentado en el apartado anterior sobre la mayor concentración de D-glucosa en los hidrolizados de poda de olivo) que se obtengan rendimientos en xilitol superiores, ya que la presencia de productos de degradación

del residuo en el proceso de hidrólisis, fundamentalmente furfural y ácido acético, puede provocar inhibición de la actividad enzimática de la xilitol deshidrogenasa, Delgenes *et al.* (1990).

TABLA 5.30
RENDIMIENTOS GLOBALES EN ETANOL Y XILITOL
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Expto.	$Y_{E/s}^G$, g/g	$Y_{Xi/s}^G$, g/g	q_E^D (M), g/(g h)	q_E , g/(g h)
FP-HC-C1	0,10	0,011	0,0047	0,0046
FP-HC-C2	0,19	0,048	0,0070	0,0057
FP-HC-C3	0,17	0,12	0,0096	0,010
FP ₁ -HC-C3	0,19	0,059	0,0080	0,0080

Las velocidades específicas de producción de etanol determinadas por los métodos diferencial e integral también se recogen en la Tabla 5.30. Con la ecuación [5.29] se han calculado los valores de q_E^D a los tiempos en que se dispone de puntos experimentales de etanol, después de la determinación de los parámetros A y B con los correspondientes ajustes como los que se muestran en la Figura 5.62. Con estos valores se ha calculado el valor medio, q_E^D (M), obteniéndose resultados concordantes con los de la velocidad específica de producción de etanol calculada por el método integral, q_E , determinada en el intervalo de comportamiento lineal de la biomasa como el producto de la productividad en biomasa por la pendiente de las representaciones de E frente a $x^2/2$, como las que se muestran a título de ejemplo en la Figura 5.63.

Las velocidades específicas de producción de etanol más elevadas se obtienen en la fermentación de los hidrolizados obtenidos con concentración de ácido clorhídrico 0,5 N. El mejor experimento de la serie sería el FP-HC-C3, en el que se obtienen los mayores valores de q_E , siendo también la suma de $Y_{E/s}^G$ y $Y_{Xi/s}^G$ la más elevada. Si se compara este experimento, de concentración 0,5 N, con el mejor de la serie anterior de ácido sulfúrico, que fue el de concentración 1,0 N (Tabla 5.27), los rendimientos en bioproductos son muy similares, aunque las velocidades específicas de producción de etanol son más altas en el del sulfúrico.

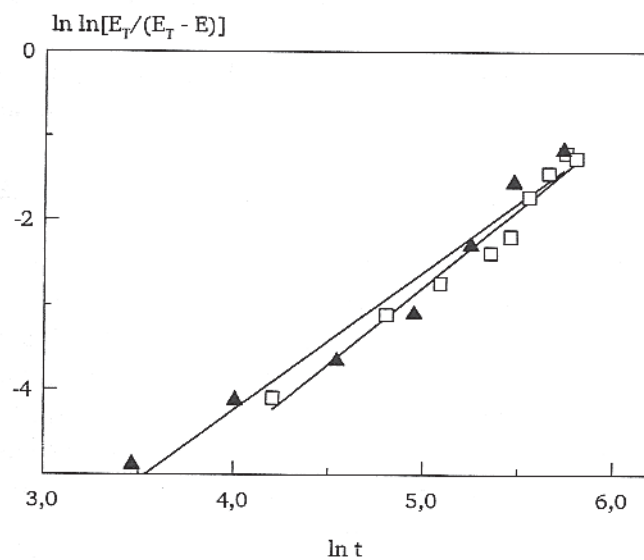


Figura 5.62 Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ec. [5.28] para los experimentos FP-HC-C2 (□) y FP-HC-C3 (▲)

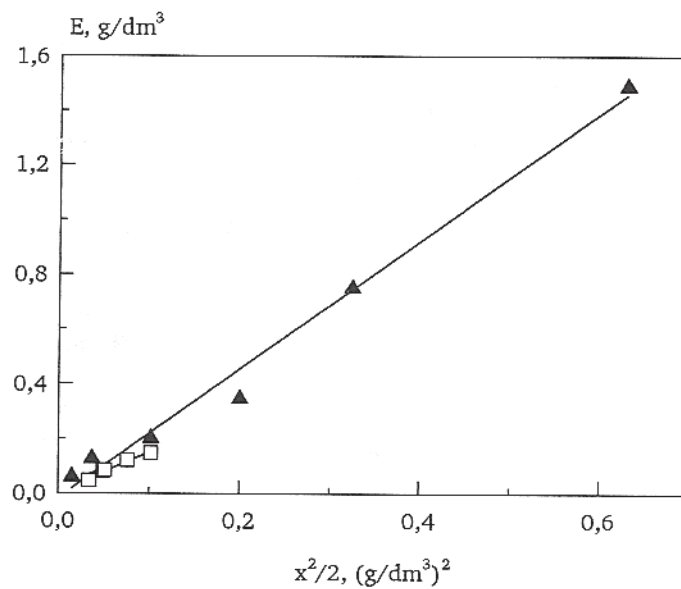


Figura 5.63 Representación con la ecuación [5.33] de los resultados de los experimentos FP-HC-C1 (□) y FP-HC-C3 (▲)

5.2.2.5 Efecto de la temperatura de hidrólisis

En el apartado 4.2.3.1(d) se recogen los resultados experimentales de la fermentación de los hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico 1,0 N a distintas temperaturas de hidrólisis.

Crecimiento celular

En la Figura 5.64 se representan dos de las curvas de crecimiento obtenidas en esta serie. La fase *lag* ha sido de corta duración, excepto para el experimento FP-HS-T5 en el que se ha detectado una etapa de adaptación de 15 horas. La duración de la fase exponencial es de unas 20 horas para los experimentos de temperaturas entre 70 y 90 °C, mientras que para el experimento a 95 °C es de 50 horas y para el de 100 °C próxima a las 75 horas. De forma más acusada se observa esta tendencia en el periodo de comportamiento lineal de la biomasa; así, en la fermentación de los hidrolizados obtenidos a 70 °C, este periodo lineal es próximo a 270 h, mientras que en los hidrolizados de 100 °C se determina un periodo superior a 400 h. Este hecho pone de manifiesto la mayor inhibición existente en la fermentación de los hidrolizados obtenidos de las hidrólisis a mayor temperatura.

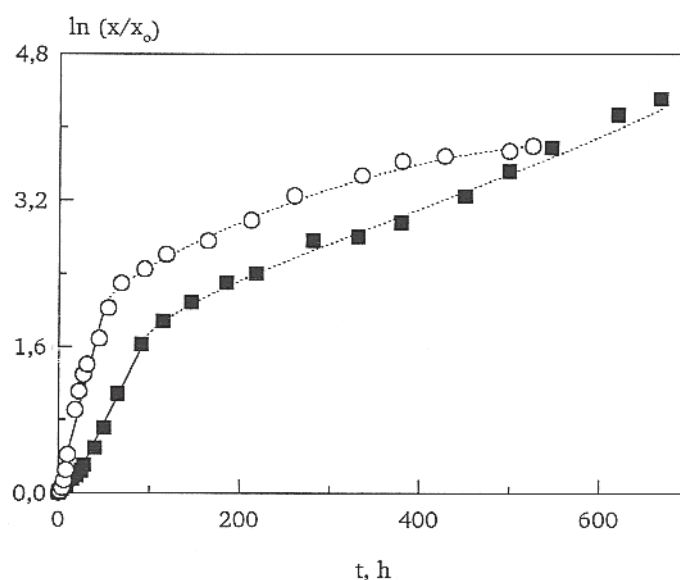


Figura 5.64 Curvas de crecimiento de los experimentos FP₃-HS-T4 (○) y FP-HS-T5 (■)

En la Tabla 5.31 se recogen los valores de velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades en biomasa determinados en esta serie. Los menores valores de μ_m se obtienen para los experimentos correspondientes a las mayores temperaturas de hidrólisis. Si se comparan con trabajos previos, en residuo de

poda de olivo los valores de μ_m determinados a las mismas temperaturas con ácido sulfúrico 1 N son siempre inferiores a las de esta investigación, aunque la concentración inicial de inóculo empleada fue superior, Romero (2003).

TABLA 5.31
VELOCIDADES ESPECÍFICAS MÁXIMAS DE CRECIMIENTO
Y PRODUCTIVIDADES EN BIOMASA

Expto.	T_H , °C	μ_m , h ⁻¹	b 10 ² , g/(dm ³ h)
FP-HS-T1	70	0,055	0,13
FP-HS-T2	80	0,068	0,37
FP ₄ -HS-P3	90	0,097	0,62
FP ₃ -HS-T4	95	0,040	0,23
FP-HS-T5	100	0,020	0,20

En esta serie de experimentos, cabe destacar el comportamiento paralelo que presentan μ_m y b , obteniéndose los máximos valores en la fermentación de la hidrolizados obtenidos a 90°C.

Consumo de sustrato

Los rendimientos globales en biomasa, que se recogen en la Tabla 5.32, se han calculado de la pendiente de las representaciones de $x-x_0$ frente a s_0 -s para cada experimento, como las que se muestran en la Figura 5.65. Los valores obtenidos, varían en el intervalo 0,082 a 0,16 g/g, no encontrándose relación definida entre este parámetro y la temperatura empleada en la hidrólisis. Solo cabe señalar que se obtienen mayores rendimientos con los hidrolizados obtenidos a temperaturas extremas.

En la Figura 5.66 se muestran dos de los ajustes realizados en esta serie de los puntos experimentales de sustrato para la obtención de los parámetros α y β con los que se han determinado los valores de q_s^D a distintos tiempos de la fase lineal de crecimiento.

Las velocidades específicas de consumo de sustrato determinadas por los métodos diferencial e integral se recogen en la Tabla 5.32, en donde se observa una aceptable concordancia entre los resultados determinados por ambos procedimientos. Para igual tiempo de fermentación, en general, se detecta que estas velocidades son más elevadas en los bioprocesos realizados con hidrolizados obtenidos a 90 y 95 °C.

TABLA 5.32
 RENDIMIENTOS GLOBALES EN BIOMASA
 Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO

Expto.	$Y_{x/s}^G$, g/g	t, h	q_s^D , g/(g h)	q_s , g/(g h)
FP-HS-T1	0,14	50	0,063	0,049
		100	0,039	0,036
		200	0,019	0,024
FP-HS-T2	0,16	50	0,22	0,20
		100	0,073	0,077
		200	0,025	0,035
FP ₄ -HS-P3	0,087	100	0,12	0,11
		200	0,049	0,057
FP ₃ -HS-T4	0,082	100	0,10	0,096
		200	0,054	0,054
		300	0,031	0,037
FP-HS-T5	0,14	100	0,10	0,098
		200	0,034	0,041
		300	0,019	0,026

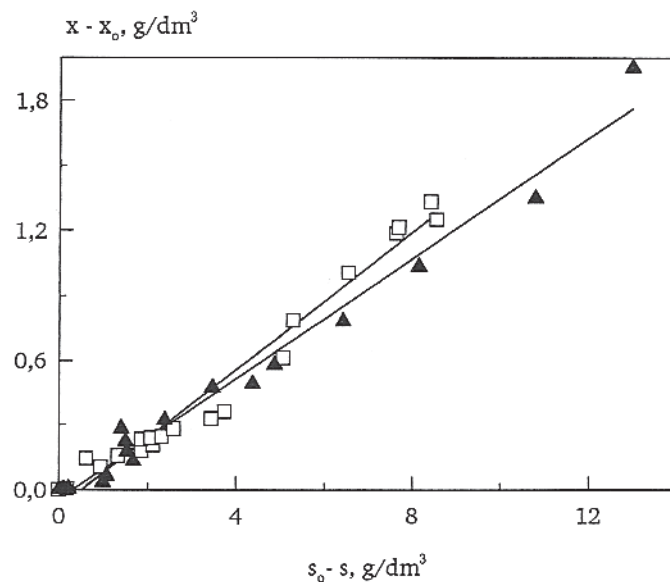


Figura 5.65 Formación neta de biomasa frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP-HS-T2 (□) y FP-HS-T5 (▲)

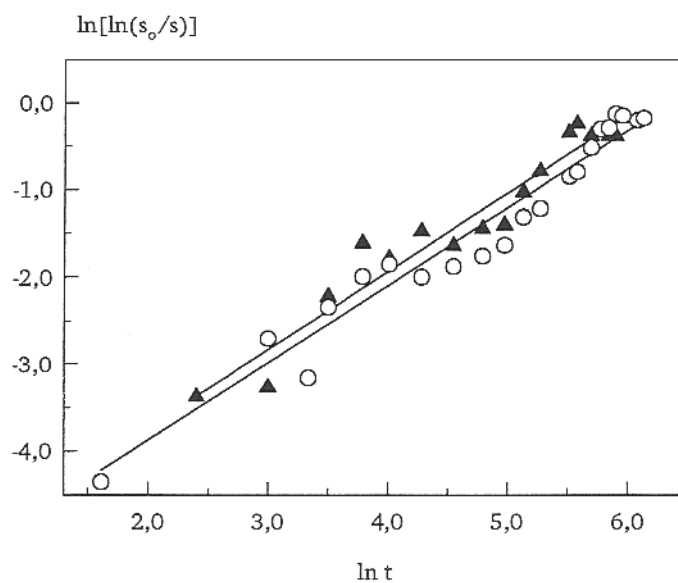


Figura 5.66 Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual a la ec. [5.19] para los experimentos FP-HS-T1 (▲) y FP-HS-T2 (○)

Formación de bioproductos

Para evaluar la formación de bioproductos se han determinado los rendimientos globales en etanol y xilitol, y las velocidades específicas de producción de etanol. En este sentido, en las Figuras 5.67 y 5.68 se muestran algunas de las representaciones realizadas para obtener los valores de $Y_{E/s}^G$ y $Y_{Xi/s}^G$, observándose un ajuste bastante aceptable en todos los experimentos realizados.

Tal como se puede apreciar en la Tabla 5.33, los rendimientos globales en etanol y xilitol más pequeños se obtienen en el experimento FP-HS-T1, que corresponde a la temperatura de hidrólisis más baja y es el cultivo en el que la concentración inicial de azúcares es más reducida. Para los experimentos de temperaturas comprendidas entre 80 y 95 °C resultan valores de $Y_{E/s}^G$ muy similares, entre 0,17 y 0,16 g/g, bajando de nuevo para el experimento de 100 °C hasta 0,12 g/g. En cuanto a los rendimientos globales en xilitol oscilan entre 0,013 y 0,11 g/g, obteniéndose los valores más altos para las temperaturas de 90 y 95 °C. El experimento de la serie que proporciona mejores resultados sigue siendo el FP₄-HS-P3, que es común con la serie de concentración de ácido sulfúrico en la que también era el más destacado. No se han obtenido mayores rendimientos en bioproductos a otras temperaturas distintas de 90 °C con ácido sulfúrico 1 N.

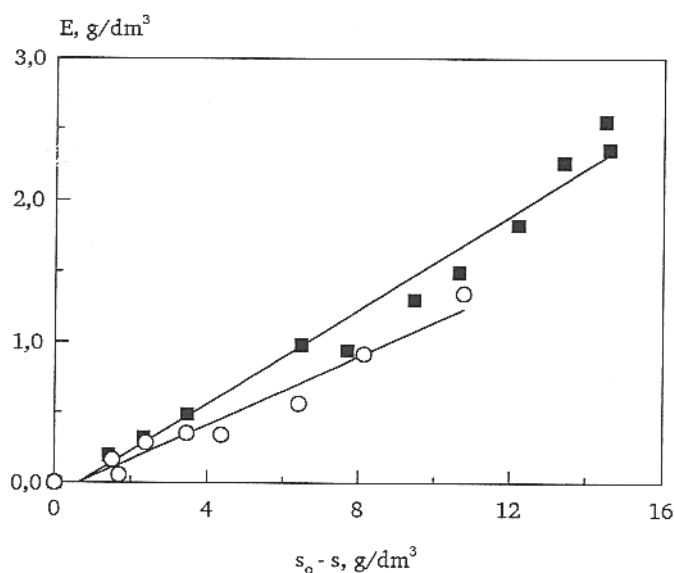


Figura 5.67 Etanol formado frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP₄-HS-P3 (■) y FP-HS-T5 (○)

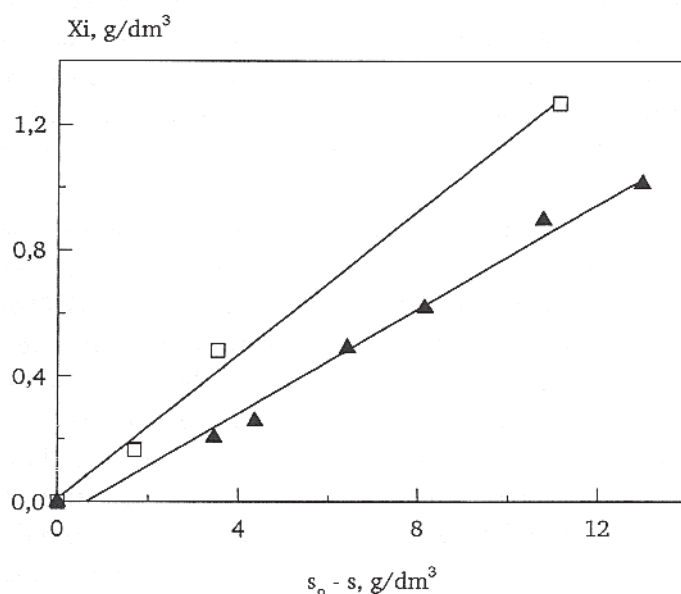


Figura 5.68 Xilitol formado frente a sustrato neto consumido en los experimentos FP₃-HS-T4 (□) y FP-HS-T5 (▲)

TABLA 5.33
RENDIMIENTOS GLOBALES EN ETANOL Y XILITOL
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Expto.	$Y_{E/s}^G, \text{g/g}$	$Y_{X/s}^G, \text{g/g}$	$q_E^D (M), \text{g/(g h)}$	$q_E, \text{g/(g h)}$
FP-HS-T1	0,044	0,013	-	-
FP-HS-T2	0,17	0,023	0,0077	0,0070
FP ₄ -HS-P3	0,17	0,11	0,015	0,015
FP ₃ -HS-T4	0,16	0,11	0,0090	0,0083
FP-HS-T5	0,12	0,083	0,0041	0,0027

En la Figura 5.69 se muestran dos de los ajustes realizados para el cálculo de los parámetros A y B con los que se determinan mediante la ecuación [5.29] los valores de q_E^D a los tiempos en los que se dispone de puntos experimentales de etanol, con los que se ha obtenido el correspondiente valor medio, $q_E^D (M)$. Por otra parte, mediante la pendiente de las representaciones de E frente a $x^2/2$ como las que se muestran en la Figura 5.70, restringidas al periodo en el que la biomasa tiene un comportamiento lineal, multiplicadas por los correspondientes valores de productividad en biomasa, b, se han calculado las velocidades específicas de producción de etanol por el método integral, resultando una aceptable concordancia con los obtenidos por el método diferencial (Tabla 5.33).

En este caso, las velocidades más elevadas se determinan en los hidrolizados de 90 °C, existiendo una cierta concordancia con los mayores rendimientos globales en

bioproductos. En el experimento FP-HS-T5 (100 °C), en que se había detectado una mayor inhibición en el crecimiento celular, es en el que se obtienen los valores más bajos de velocidades específicas de producción de etanol. Sin embargo, en fermentación de hidrolizados de residuo de poda de olivo el mayor rendimiento de etanol con ácido sulfúrico 1 N se obtenía con la temperatura de 100 °C (0,36 g/g), sin producirse una disminución significativa de las q respecto a las de temperaturas inferiores, Romero (2003), lo que vuelve a poner de manifiesto la posible menor producción de inhibidores en hidrólisis de residuo de poda de olivo que en tallos de girasol.

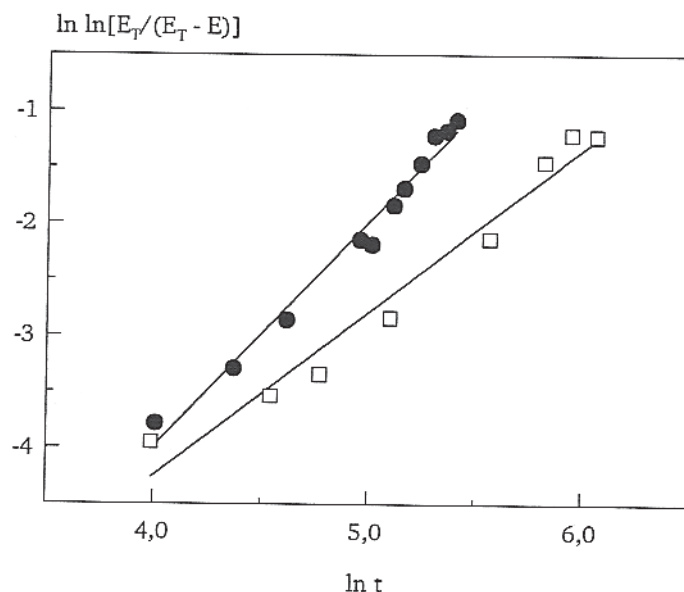


Figura 5.69 Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ec. [5.28] para los experimentos FP₄-HS-P3 (●) y FP₃-HS-T4 (□)

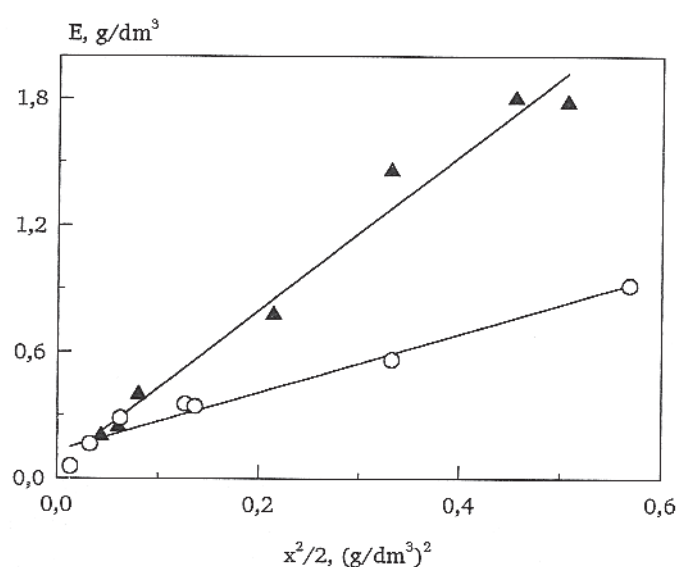


Figura 5.70 Representación con la ecuación [5.33] de los resultados de los experimentos FP₃-HS-T4 (▲) y FP-HS-T5 (○)

5.3 Fermentación con *Fusarium oxysporum*

5.3 FERMENTACIÓN CON *Fusarium oxysporum*

Para el estudio de la fermentación con el hongo *Fusarium oxysporum* VTT-D-80134 se han determinado los mismos parámetros cinéticos y de rendimientos descritos en el apartado anterior de fermentación con *Pachysolen tannophilus*. Para evaluar el crecimiento celular se ha calculado la velocidad específica máxima de crecimiento y la productividad en biomasa; para el consumo de sustrato el rendimiento global en biomasa y la velocidad específica de consumo de sustrato; y para la formación de bioproductos los rendimientos globales en etanol y xilitol, y la velocidad específica de producción de etanol.

5.3.1 EN MEDIO SINTÉTICO

En el apartado 4.2.1.2 se recogen los Resultados Experimentales de la fermentación en medio sintético con *Fusarium oxysporum*. La concentración inicial de sustratos empleada se recuerda en la Tabla 5.34. En los experimentos FF-1 y FF-3 se utilizó un medio de cultivo específico para el hongo, Hanh-Hägerdal *et al.* (1994a), mientras que en el resto se ha empleado un medio típico del cultivo con levaduras, Lindegren *et al.* (1958).

Crecimiento celular

A partir de los datos de concentración de biomasa se han representado los correspondientes valores de $\ln(x/x_0)$ frente al tiempo para obtener las curvas de crecimiento, como las que se muestran en la Figura 5.71 para dos de los experimentos de la serie. De las pendientes de las rectas trazadas con línea continua, correspondiente a la fase exponencial, se han determinado las velocidades específicas máximas de crecimiento que se recogen en la Tabla 5.34.

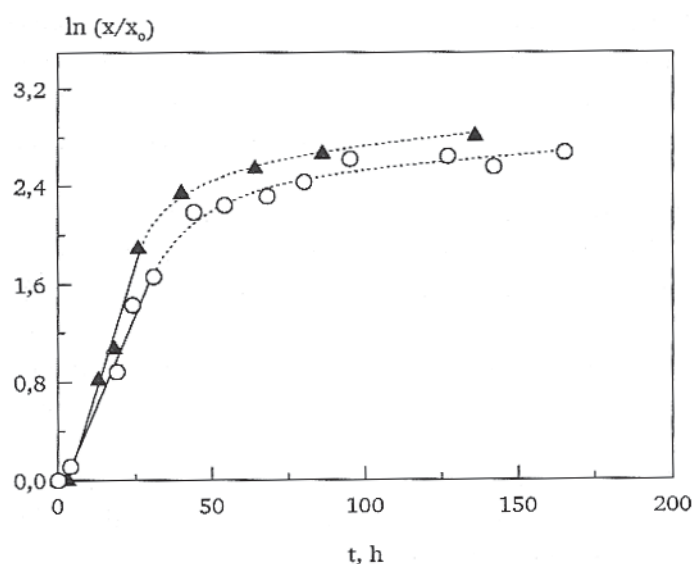


Figura 5.71 Curvas de crecimiento de los experimentos FF-7 (○) y FF-8 (▲)

TABLA 5.34
VELOCIDADES ESPECÍFICAS MÁXIMAS DE CRECIMIENTO
Y PRODUCTIVIDADES EN BIOMASA

Expto.	Sustrato inicial, g/dm ³	μ_m , h ⁻¹	b 10 ² , g/(dm ³ h)
*FF-1	D-xilosa, 25	0,083	2,5
FF-2	D-xilosa, 25	0,075	1,7
*FF-3	D-xilosa, 12,5; D-glucosa, 12,5	0,11	0,89
FF-4	D-xilosa, 12,5; D-glucosa, 12,5	0,11	4,5
FF-5	D-glucosa, 25	0,10	7,8
FF-6	D-xilosa, 20; D-glucosa, 5	0,075	1,3
FF-7	D-xilosa, 24; D-glucosa, 1	0,059	1,5
FF-8	D-arabinosa, 25	0,080	0,68

* Medio de Hanh-Hägerdal *et al.* (1994a)

Se obtienen valores de μ_m que oscilan en el intervalo 0,059 a 0,11 h⁻¹, obteniéndose los resultados más altos cuando el sustrato está formado por mezclas de D-xilosa/D-glucosa al 50 % (0,11 h⁻¹) y D-glucosa pura (0,10 h⁻¹); mientras que el valor más bajo corresponde al cultivo con 1 g/dm³ de D-glucosa y 24 g/dm³ de D-xilosa.

A la fase de crecimiento exponencial le sigue una etapa de desaceleración en la que puede admitirse un crecimiento lineal durante un intervalo de tiempo relativamente amplio, que puede cuantificarse mediante la ecuación [5.15]. En las Figuras 4.5 a 4.12 se marcan con línea continua las rectas que incluyen a los puntos experimentales de biomasa correspondientes a esta fase lineal, cuyas pendientes proporcionan las productividades en biomasa que se recogen en la Tabla 5.34.

Se obtienen valores de b que varían en el rango 0,0068 a 0,078 g/(dm³ h), siendo la más alta la del cultivo de D-glucosa y la más baja para la D-arabinosa. Para este último experimento (FF-8) no se ha detectado consumo de sustrato ni formación de bioproductos, aunque sí se ha producido crecimiento celular a partir de los componentes adicionados al medio de cultivo, como se observa en la Figura 5.71, siendo la productividad en biomasa obtenida la más baja de la serie. En trabajos previos también se intentó el cultivo de *Pachysolen tannophilus* sobre D-arabinosa, siendo esta levadura igualmente incapaz de asimilar este sustrato, aunque se obtuvieron valores de μ_m y b más elevados que con *F. oxysporum*, Moya (1997).

Comparando los valores de μ_m y b obtenidos para el experimento de D-xilosa pura con *P. tannophilus* (FP-1, Tabla 5.13) con los de FF-2, con el mismo sustrato y medio de cultivo, se obtienen valores muy parecidos de productividad en biomasa, mientras que la velocidad específica máxima de crecimiento es inferior con *F. oxysporum* (0,083 h⁻¹ frente a 0,22 h⁻¹), aunque la concentración inicial de inóculo ha sido muy superior en el caso del hongo. La duración de la fase exponencial es más larga para FF-2, mientras que la etapa lineal es más reducida. En los cultivos de *P. tannophilus* sobre D-glucosa y mezclas D-glucosa/D-xilosa en diferentes proporciones, Sánchez *et al.* (2002) obtienen valores de μ_m entre 0,30 y 0,32 h⁻¹, muy por encima de las que se determinan en este trabajo, y productividades en biomasa algo superiores, empleando también concentraciones de inóculo más pequeñas.

Consumo de sustrato

De las pendientes de las representaciones de $x-x_0$ frente a s_0-s , como las que se muestran en la Figura 5.72, pueden obtenerse los correspondientes rendimientos globales en biomasa, $Y_{x/s}^G$, que se recogen en la Tabla 5.35. En los cultivos en los que se han empleado mezclas de D-glucosa y D-xilosa como sustrato, se observan dos rectas correspondientes al consumo de cada uno de estos azúcares, por lo que para estos experimentos se han calculado dos rendimientos globales en biomasa, siendo en todos los casos el primero, referido al consumo de D-glucosa, muy superior al segundo, correspondiente a la asimilación de D-xilosa.

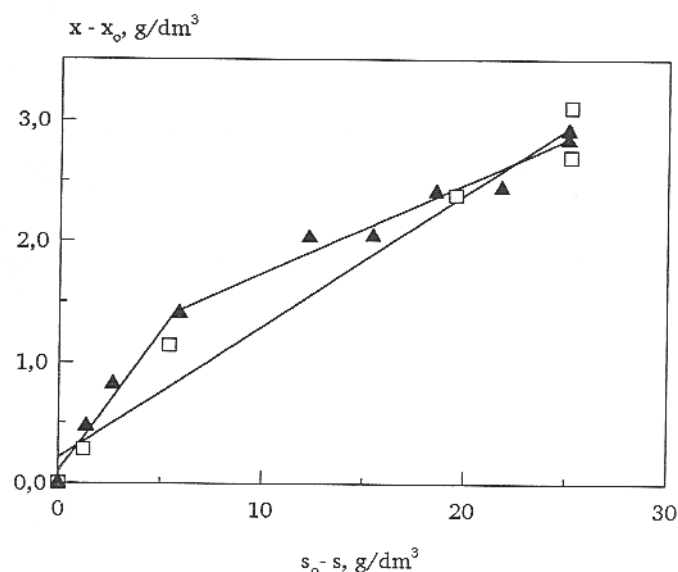


Figura 5.72 Formación neta de biomasa frente a sustrato neto consumido en los experimentos FF-5 (□) y FF-6 (▲)

El valor de $Y_{x/s}^G$ del experimento FF-2, 0,079 g/g, es muy cercano al que se obtiene con *P. tannophilus* con el mismo medio de cultivo y también con D-xilosa como sustrato (Tabla 5.14), igual que ocurre cuando el sustrato es D-glucosa (experimento. FF-5) en que se obtiene un rendimiento global en biomasa de 0,11 g/g, similar al obtenido en trabajos previos con *P. tannophilus*, Sánchez *et al.* (2002). Aunque $Y_{x/s}^G$ es superior para el consumo de D-glucosa pura que para el de D-xilosa, cuando se trata de mezclas de ambos azúcares se observa que se obtienen rendimientos globales en biomasa ligeramente superiores conforme la proporción de D-glucosa en la mezcla es más baja.

Comparando las parejas de experimentos en las que sólo se ha modificado la composición del medio cultivo (FF-1 con FF-2 y FF-3 con FF-4) se observa cómo los rendimientos globales en biomasa obtenidos son siempre superiores en los que se ha utilizado el medio de cultivo específico para este hongo, Hahn-Hägerdal *et al.* (1994a) frente a los del medio característico de levaduras, Lindegren *et al.* (1958).

En las fermentaciones con *F. oxysporum* se ha observado un comportamiento similar en el consumo de sustrato al que se produce con la levadura *P. tannophilus*, por lo que se han calculado las velocidades específicas de consumo de sustrato utilizando los mismos procedimientos descritos en el apartado 5.2.1, métodos diferencial, q_s^D , e integral, q_s , recogiendo los resultados obtenidos en la Tabla 5.35.

TABLA 5.35
RENDIMIENTOS GLOBALES EN BIOMASA
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO

Expto.	$Y_{x/s}^G$, g/g	t, h	q_s^D , g/(g h)	q_s , g/(g h)
FF-1	0,16	25**	0,30	0,52
		50	0,19	0,10
FF-2	0,079	30	0,18	0,19
		50	0,20	0,13
FF-3	0,21*	25**	0,32	0,49
	0,093	100	0,036	0,042
FF-4	0,16*	30	0,30	0,18
	0,034	50	0,18	0,54
FF-5	0,11	25**	0,91	0,92
		40	0,27	0,30
FF-6	0,23*	25**	0,29	0,32
	0,074	100	0,042	0,065
FF-7	0,25*	25**	0,24	0,23
	0,074	100	0,063	0,073

* Valores referidos al consumo de D-glucosa

** Tiempos de la fase exponencial de crecimiento

Se han determinado las velocidades específicas de consumo de sustrato por el método diferencial para distintos tiempos con la ecuación [5.20], después de obtener los parámetros α y β del ajuste de las concentraciones de sustrato a la ecuación [5.19] como se muestra en la Figura 5.73 para uno de los experimentos.

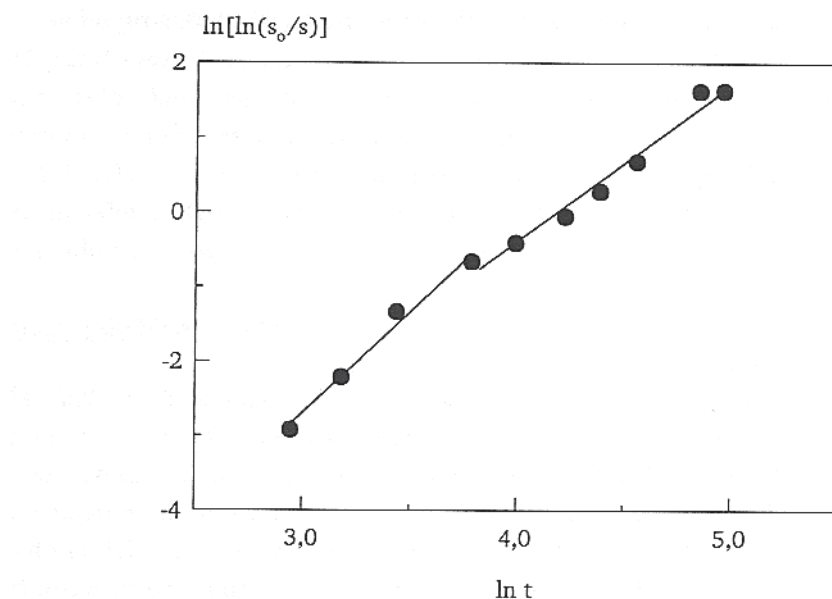


Figura 5.73 Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual a la ecuación [5.19] para el experimento FF-6

Como se observa en esta figura, se ha realizado el ajuste en dos intervalos para los casos en que se empleó como sustrato mezclas D-glucosa/D-xilosa, en los que el consumo de estos dos azúcares se produce de forma secuencial. En los experimentos en que se ha partido de un único sustrato, los valores experimentales se han ajustado a una única recta. Una vez determinados estos parámetros para cada experimento, se ha reproducido con la ecuación [5.18] la concentración de sustrato frente al tiempo, que corresponde a la línea continua representada en los gráficos del apartado de Resultados Experimentales.

Para el cálculo de la velocidad específica de consumo de sustrato por el método integral se ha empleado la ecuación [5.21], sustituyendo los valores de rendimiento global en biomasa y velocidades específicas máximas de crecimiento obtenidos y determinando el valor de μ_m con la ecuación [5.22], cuando se ha calculado el valor de q_s para puntos de la fase lineal de crecimiento. En los experimentos con mezclas de D-xilosa/D-glucosa como sustrato, para los que se han obtenido un valor de $Y_{x/s}^G$ para cada uno de los azúcares, se ha sustituido en la ecuación [5.21] el valor correspondiente al tiempo en que se ha calculado q_s . En general se observa una concordancia aceptable de los resultados obtenidos por los métodos diferencial e integral.

Se ha procurado elegir un tiempo de la fase exponencial de crecimiento y otro de la lineal, poniéndose de manifiesto que los valores son muy superiores en la primera etapa. Las mayores velocidades específicas de consumo de sustrato se obtienen para D-glucosa, aunque son inferiores a las determinadas con este mismo sustrato y *P. tannophilus*, Sánchez *et al.* (2002); igual ocurre cuando el sustrato es D-xilosa (experimento FP-1, Tabla 5.14) donde se obtienen valores algo superiores a los del experimento FF-2 con el mismo medio de cultivo fermentado con *F. oxysporum*.

Formación de bioproductos

En la Tabla 5.36 se recogen los rendimientos globales en etanol y xilitol, que se han obtenido de las pendientes de las representaciones de sus concentraciones frente al sustrato neto consumido, como las que se muestran en la Figura 5.74. Los rendimientos en xilitol son sensiblemente inferiores a los de etanol, que oscilan entre 0,20 y 0,38 g/g, siendo el más elevado el del cultivo sobre D-glucosa como sustrato. Los valores de $Y_{E/s}^G$ son ligeramente inferiores a los obtenidos con las mismas mezclas y *P. tannophilus* (0,41 g/g para D-glucosa, 0,34 g/g para D-xilosa/D-glucosa 20/5 g/dm³ y 0,24 g/g para D-xilosa/ D-glucosa 24/1 g/dm³). Igual ocurre con los valores de $Y_{Xi/s}^G$ (0,075 g/g para D-xilosa/ D-glucosa 20/5 g/dm³ y 0,16 g/g para D-xilosa/D-glucosa 24/1 g/dm³), Sánchez *et al.* (2002).

TABLA 5.36
RENDIMIENTOS GLOBALES EN ETANOL Y XILITOL
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Expto.	$Y_{E/s}^G$, g/g	$Y_{Xi/s}^G$, g/g	q_E^D (M), g/(g h)	q_E , g/(g h)
FF-1	0,20	0,0016*	0,025	0,016
FF-2	0,25	0,015*	0,033	0,038
FF-3	0,24	0,0018*	0,038	0,031
FF-4	0,28	0,0059*	0,055	0,072
FF-5	0,38	-	0,14	0,15
FF-6	0,21	0,051	0,029	0,018
FF-7	0,22	0,041	0,02	0,011

* Rendimientos puntuales

En el caso del xilitol, se han calculado rendimientos puntuales en los experimentos FF-1 a FF-4, determinándose los globales para FF-6 y FF-7. En estos dos últimos cultivos, de los que se dispone de más valores experimentales de xilitol, se observa que su concentración alcanza un máximo a tiempos inferiores al mayor valor del etanol, para disminuir de forma significativa a continuación (apartado de Resultados Experimentales). Este hecho observado en las fermentaciones con *F. oxysporum* contrasta con lo que ocurre con *P. tannophilus*, donde el mayor valor de xilitol suele alcanzarse a tiempos superiores al máximo de etanol, cuya concentración suele disminuir tras el pico, mientras que no se detecta en general disminución en la de xilitol a partir de su máximo. Estos resultados también se podrían explicar inicialmente, si se considera que *F. oxysporum* puede fermentar el xilitol, Suihko (1983) y Jeffries y Jin (2000).

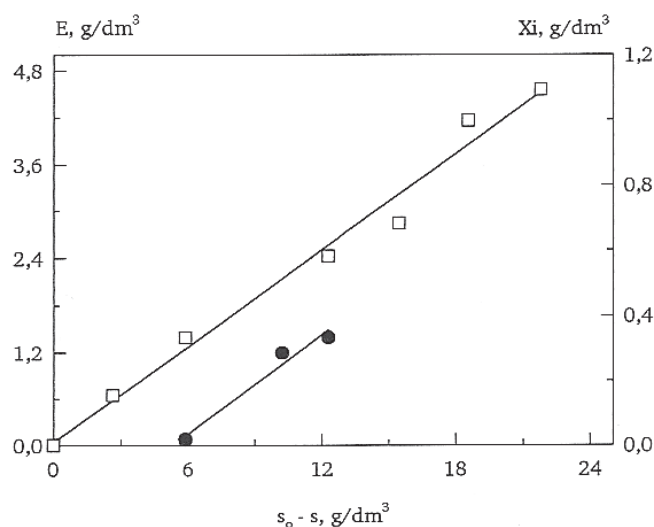


Figura 5.74 Etanol (□) y Xilitol (●) formados frente a sustrato neto consumido para el experimento FF-6

Los rendimientos en etanol obtenidos en esta investigación, cuando el sustrato es D-xilosa, son inferiores a los calculados por Suihko y Enari (1981) y Viikari *et al.* (1984) con este mismo hongo, que determinan unos rendimientos en etanol de 0,50 g/g y 0,35 g/g, respectivamente. Inicialmente, esta diferencia en los rendimientos en etanol, puede ser atribuida al hecho de que estos dos grupos de investigación utilizan una concentración inicial de D-xilosa de 50 g/dm³. Por otra parte, cabe destacar que los valores del rendimiento proporcionados por estos autores son puntuales, referidos a la máxima concentración de etanol obtenida.

Del mismo modo que en la fermentación con *P. tannophilus*, la variación de los datos de concentración de etanol en función del tiempo se puede ajustar a la ecuación [5.26], como se indica en la Figura 5.75, para obtener los parámetros A y B. La reproducción de la ecuación [5.26], sustituyendo los valores de A y B determinados en cada experimento, es la que se muestra en línea continua en los gráficos correspondientes del apartado de Resultados Experimentales. De esta forma se puede obtener la velocidad específica de producción de etanol por el método diferencial, q_E^D , en función del tiempo mediante la ecuación [5.29]. Se han calculado estos valores a los tiempos en que se dispone de datos experimentales de concentración de etanol, calculándose el valor medio, $q_E^D (M)$, que se recoge en la Tabla 5.36.

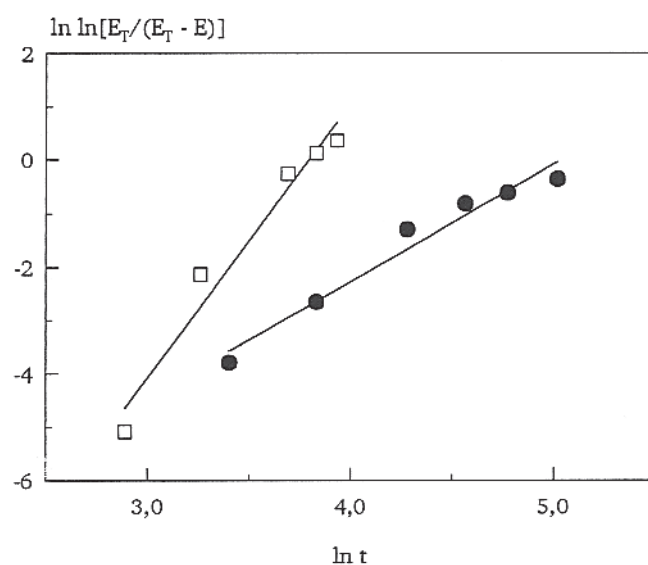


Figura 5.75 Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ecuación [5.28] para los experimentos FF-2 (●) y FF-5 (□)

En esta tabla también se muestran los valores de velocidades específicas de producción de etanol por el método integral, q_E , que se han obtenido mediante la ecuación [5.33], como el producto del valor de la productividad en biomasa, b , por la pendiente de la línea recta de las representaciones de E frente a $x^2/2$ en el

intervalo de comportamiento lineal de la biomasa, como las que se muestran en la Figura 5.76. Los valores obtenidos son, en general, concordantes con los determinados por el método diferencial.

Las mayores velocidades específicas de producción de etanol se obtienen cuando el sustrato es D-glucosa, mientras que en las mezclas de D-glucosa y D-xilosa en distintas proporciones (experimentos FF-4, FF-6 y FF-7) se detecta que los valores de q_E van disminuyendo conforme la proporción de D-glucosa es más baja en la mezcla, lo que también se pone de manifiesto en fermentación de sustratos sintéticos con *P. tannophilus*, Sánchez *et al.* (2002).

De la comparación de las parejas de experimentos con el mismo sustrato inicial y diferente composición del medio de cultivo (FF-1 con FF-2 y FF-3 con FF-4) se observa cómo, mientras que los rendimientos globales en biomasa eran más altos con el medio de Hahn-Hägerdal *et al.* (1994a), Tabla 5.35, tanto los rendimientos globales en etanol como las velocidades específicas de producción de etanol son superiores cuando se utiliza el medio de Lindegren *et al.* (1958). Este hecho, unido a los factores ya comentados en el apartado de Resultados Experimentales sobre la menor complejidad y coste del medio de Lindegren y las menores desviaciones de pH que se producen, pone de manifiesto la conveniencia de utilizar este medio de cultivo en las fermentaciones con *F. oxysporum*.

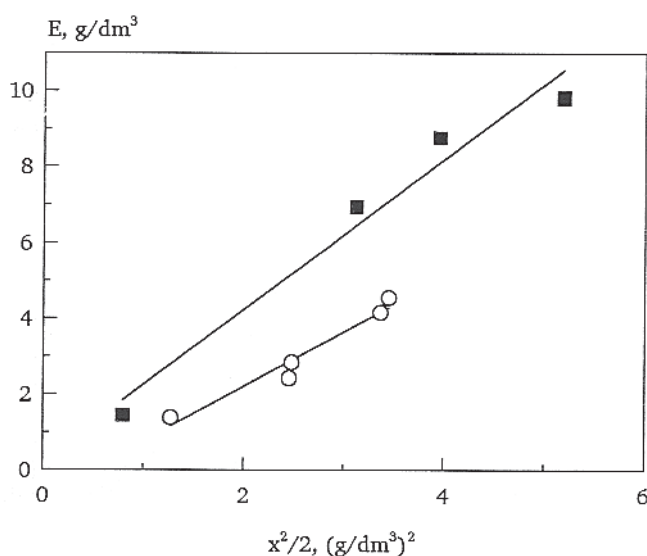


Figura 5.76 Representación con la ecuación [5.33] de los resultados de los experimentos FF-5 (■) y FF-6 (○)

5.3.2 FERMENTACIÓN DE HIDROLIZADOS

En el apartado 4.2.3.2 se recogen los resultados experimentales de la fermentación de hidrolizados con *F. oxysporum*. Solamente se ha producido crecimiento celular, consumo de sustrato y formación de bioproductos en los experimentos FF-HS-t3, 3ª etapa del FF-HS-t4 y 2ª etapa del FF-HS-t5, en los que se han determinado los correspondientes parámetros cinéticos y de rendimientos de la misma forma que se ha descrito en el apartado anterior.

Crecimiento celular

En la Figura 5.77 se muestran dos de las curvas de crecimiento obtenidas, en donde se observa que hay una fase de adaptación de considerable duración, que oscila entre 23 y 63 horas. De nuevo se observa una corta fase exponencial y un amplio periodo de comportamiento lineal de la biomasa, que puede alcanzar un tiempo próximo a las 150 h. Las velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades en biomasa calculadas se recogen en la Tabla 5.37. Se obtienen valores de μ_m inferiores a las que se determinaron para el crecimiento de *F. oxysporum* sobre medios sintéticos (Tabla 5.34).

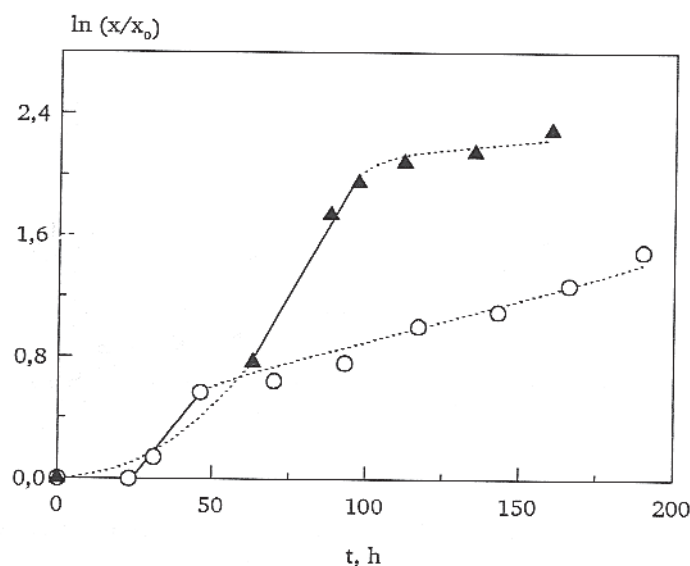


Figura 5.77 Curvas de crecimiento de los experimentos FF-HS-t4 (▲) y FF-HS-t5 (○)

TABLA 5.37
VELOCIDADES ESPECÍFICAS MÁXIMAS DE CRECIMIENTO
Y PRODUCTIVIDADES EN BIOMASA

Expto.	μ_m, h^{-1}	$b \cdot 10^2, g/(dm^3 h)$
FF-HS-t3	0,017	1,4
FF-HS-t4	0,036	1,2
FF-HS-t5	0,025	0,46

Consumo de sustrato

Mediante las representaciones de $x - x_0$ frente a $s_0 - s$, como las que se muestran en la Figura 5.78, se han determinado los rendimientos globales en biomasa, $Y_{x/s}^G$, que se recogen en la Tabla 5.38.

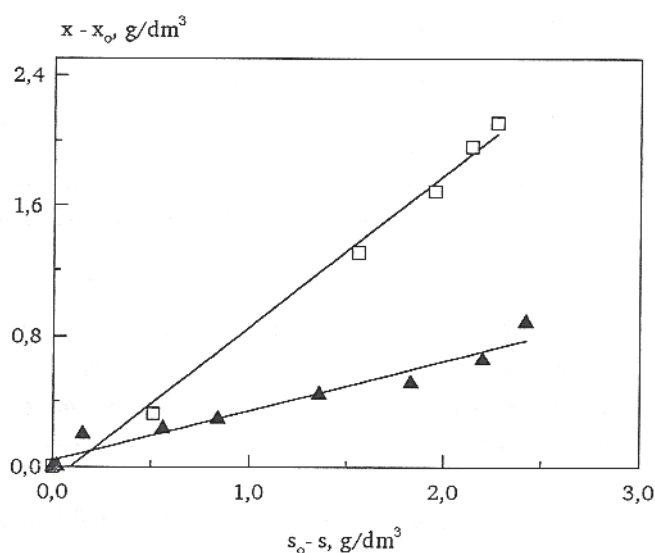


Figura 5.78 Rendimientos globales en biomasa en los experimentos
FF-HS-t4 (□) y FF-HS-t5 (▲)

Se observan rendimientos en biomasa próximos a 1 e incluso superiores; este hecho induce a pensar que lógicamente deben existir otros sustratos no reductores a partir de los cuales se forma biomasa. En principio el componente existente en

los hidrolizados que no es reductor y que puede ser consumido por este hongo es el ácido acético. Por ello, como también se dispone de valores de concentración de ácido acético en el transcurso de los experimentos, se han calculado también los correspondientes rendimientos en biomasa considerando también el ácido acético como sustrato, $Y_{x/(s+Ac)}^G$. Estos resultados parecen ser más consistentes, observándose que los valores de $Y_{x/(s+Ac)}^G$ disminuyen conforme los hidrolizados han sido obtenidos con mayor tiempo de hidrólisis.

TABLA 5.38
RENDIMIENTOS GLOBALES EN BIOMASA
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE SUSTRATO

Expto.	$Y_{x/s}^G$, g/g	$Y_{x/(s+Ac)}^G$, g/g	t, h	q_s^D , g/(g h)	q_s , g/(g h)
FF-HS-t3	1,45	0,55	151	0,0076	0,0098
			200	0,0049	0,0059
FF-HS-t4	0,94	0,63	75*	0,038	0,038
			100	0,019	0,0062
FF-HS-t5	0,3	0,23	75	0,030	0,030
			100	0,031	0,024
			150	0,023	0,018

* Tiempo de la fase exponencial de crecimiento

Mediante los correspondientes ajustes de los resultados experimentales de sustrato, como los que se muestran en la Figura 5.79, se han obtenido los parámetros α y β con los que se determinan las velocidades específicas de consumo de sustrato por el método diferencial, q_s^D , valores que se recogen en la Tabla 5.38 para distintos tiempos del cultivo.

También se han determinado por el método integral, q_s , mediante la ecuación [5.21], con los valores de rendimiento global obtenidos considerando solamente como sustrato las concentraciones de azúcares reductores totales, $Y_{x/s}^G$. En general, los resultados son concordantes con los calculados por el procedimiento diferencial. En todos los casos las velocidades específicas de consumo de sustrato son mucho más bajas que las que se determinaron para sustratos sintéticos (Tabla 5.35).

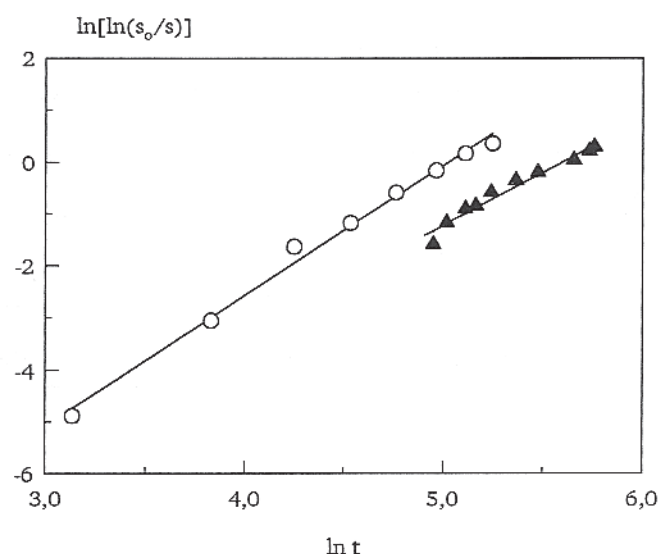


Figura 5.79 Ajuste de los resultados experimentales de sustrato residual a la ec. [5.19] para los experimentos FF-HS-t3 (▲) y FF-HS-t5 (○)

Formación de bioproductos

Los rendimientos globales en etanol y xilitol que se recogen en la Tabla 5.39 se han determinados de las pendientes de las representaciones como la que se muestra como ejemplo en la Figura 5.80. Cabe destacar que los rendimientos globales en etanol son cercanos a los que se obtienen con sustratos sintéticos (Tabla 5.36). Sin embargo, a pesar de los significativos valores de $Y_{E/s}^G$, las reducidas concentraciones iniciales de azúcares hacen que las concentraciones de etanol en el medio no superen los 0,5 g/dm³.

Estos rendimientos en etanol son superiores a los obtenidos por Hahn-Hagerdal *et al.* (1994a), utilizando esta misma especie de hongo en la fermentación de hidrolizados ácidos de mazorcas de maíz. Estos hidrolizados fueron también obtenidos con ácido sulfúrico, aunque con una concentración de 0,17 N. Estos autores determinan un rendimiento en etanol de 0,2 g/g, aunque la concentración de etanol obtenida fue superior (del orden de 0,8 g/dm³), pero parten de una concentración inicial de sustrato más elevada (21 g/dm³), además emplean una concentración bastante mayor de inóculo (5,5 g/dm³).

TABLA 5.39
RENDIMIENTOS GLOBALES EN ETANOL Y XILITOL
Y VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Expto.	$Y_{E/s}^G$, g/g	$Y_{Xi/s}^G$, g/g	q_E^D (M), g/(g h)	q_E , g/(g h)
FF-HS-t3	0,16	0,019	0,0010	-
FF-HS-t4	0,11	0,009	0,0032	-
FF-HS-t5	0,25	0,007	0,0084	0,0091

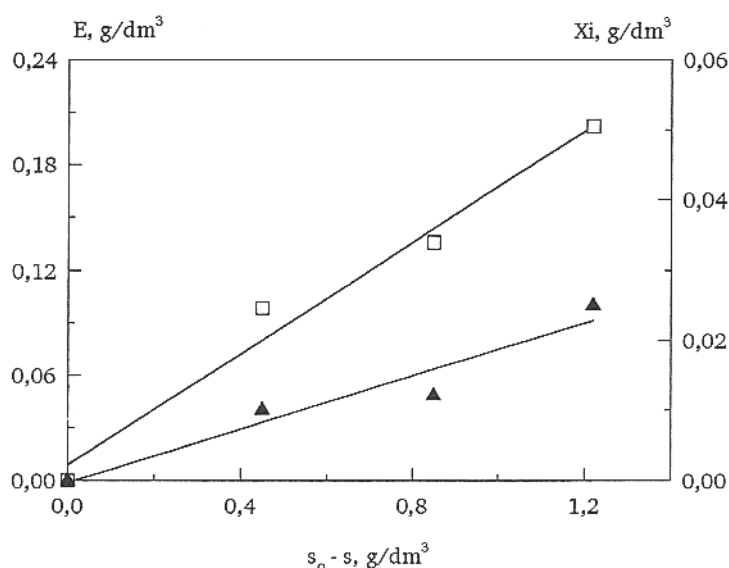


Figura 5.80 Etanol (□) y xilitol (▲) formados frente a sustrato neto consumido para el experimento FF-HS-t3

También se recogen en la Tabla 5.39 las velocidades específicas de producción de etanol determinadas por los procedimientos diferencial e integral, de la forma en que se describió en el apartado anterior, mostrándose ejemplos de las representaciones realizadas en las Figuras 5.81 y 5.82.

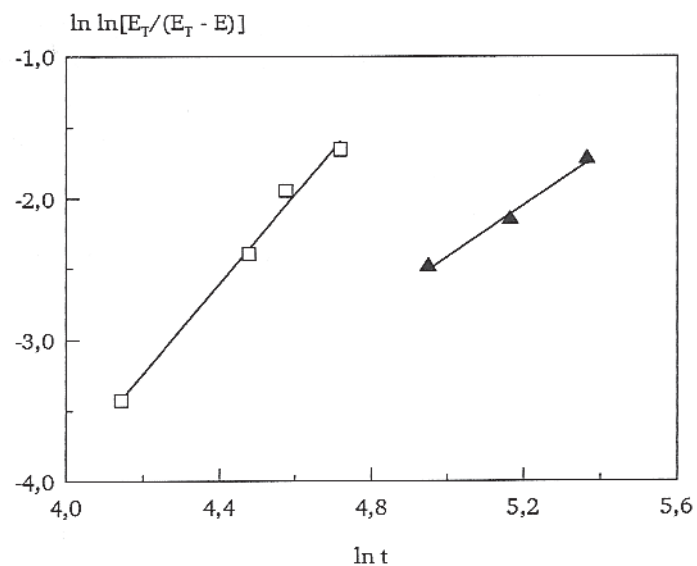


Figura 5.81 Ajuste de los resultados experimentales de producción de etanol a la ec. [5.28] para los experimentos FF-HS-t3 (▲) y FF-HS-t4 (□)

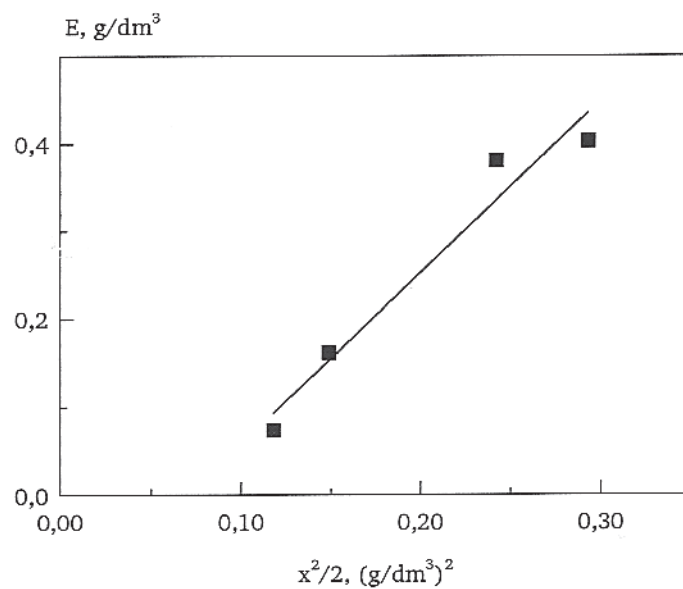


Figura 5.82 Representación con la ecuación [5.33] de los resultados del experimento FF-HS-t5

Las velocidades específicas de producción de etanol son muy inferiores a las que se obtienen con azúcares puros (Tabla 5.36). Por otra parte, las concentraciones iniciales de sustrato son muy bajas, ya que no se ha conseguido el crecimiento del hongo en hidrolizados con concentraciones superiores de azúcares, seguramente porque las concentraciones de compuestos inhibidores también serán mayores, lo que pone de manifiesto la peor tolerancia a estos compuestos por parte de *F. oxysporum*, respecto a la mayor resistencia a la inhibición que presenta la levadura *P. tannophilus*.

VI. Conclusiones

A partir de los resultados de la investigación descrita en esta Memoria se han deducido las siguientes conclusiones:

1. La hidrólisis del residuo de tallos de girasol, utilizando los ácidos sulfúrico y clorhídrico en el rango de concentración 0,1-2,0 N, temperatura 90 °C y tiempo de operación 240 minutos, muestra que solo es la fracción hemicelulósica la que puede ser totalmente hidrolizada. La hidrólisis de esta fracción es completa cuando se emplea una concentración de ácido clorhídrico de 0,75 N, mientras que con el ácido sulfúrico es necesario usar una concentración 2 N para alcanzar este mismo resultado.

La fracción celulósica del residuo es parcialmente hidrolizada con ambos ácidos, alcanzándose una conversión fraccional próxima al 22,5 % cuando se utiliza HCl o H_2SO_4 2 N. Sin embargo, a concentraciones menores, el ácido clorhídrico presenta un mayor poder hidrolítico que el ácido sulfúrico.

2. En la hidrólisis con ácido sulfúrico 1 N, temperatura 90 °C, y fijando el tiempo de operación en 240 minutos, se ha determinado el efecto del tamaño inicial de partícula (en el rango 0,125-2,0 mm) sobre los parámetros de rendimientos en azúcares y velocidad de reacción.

2.1 Los máximos rendimientos en azúcares reductores totales (Y_T) se alcanzan cuando se utiliza un tamaño de partícula comprendido entre 0,425-0,600 mm, obteniéndose un valor de 0,16 g ART/g residuo seco. Los rendimientos en D-glucosa no están influenciados por el tamaño de partícula, obteniéndose valores muy bajos del orden de 2 mg D-glucosa/g residuo seco.

2.2 A partir de los valores de concentración de azúcares reductores totales (s) para cada tiempo de hidrólisis (t) se ha encontrado una ecuación tipo potencial, que los relaciona en la forma,

$$s = m t^z$$

expresión que permite determinar la velocidad de hidrólisis ($r=ds/dt$). En todos los casos se comprueba que esta velocidad disminuye durante el

transcurso del proceso de hidrólisis, siendo esta disminución más pronunciada al principio y más suave a partir de la primera hora.

Cuando se determina r para un tiempo muy próximo a cero ($t=1$ s), se obtienen velocidades de hidrólisis próximas a la inicial de cada proceso (r_0), observándose una disminución de esta velocidad conforme aumenta el tamaño de partícula del residuo, alcanzándose el mayor valor, $r_0=1,27$ g/(dm³ min), con el tamaño de partícula más pequeño (rango 0,125-0,300 mm).

3. La hidrólisis con ácido sulfúrico 1 N, a 90 °C y tiempo de operación 240 min, de las dos fracciones del residuo de tallo de girasol (médula y cubierta) muestra que con la cubierta se obtienen rendimientos en azúcares reductores totales ($Y_T=0,15$ g/g) que son aproximadamente el doble que los correspondientes a la médula ($Y_T=0,078$ g/g). Sin embargo, los rendimientos en D-glucosa son mayores para la médula ($Y_G=4,9$ mg/g) que para la cubierta ($Y_G=1,6$ mg/g).

La velocidad de hidrólisis en tiempos muy próximos al inicio del proceso es superior para la fracción médula, $r_0=1,92$ y $r_0=0,93$ g/(dm³ min), en relación a la cubierta, $r_0=0,45$ g/(dm³ min). Sin embargo, cuando se calculan los valores de r a los tiempos en que se efectuaron las tomas de muestras del hidrolizado, se obtienen valores superiores para la hidrólisis de la cubierta.

4. De la comparación de los resultados de hidrólisis con los dos ácidos, clorhídrico y sulfúrico, se observa que el contenido en celulosa disminuye al aumentar la concentración de ácido. En relación a la fracción hemicelulósica, también se detecta una continua disminución hasta alcanzar la total transformación de la fracción; se observa como para una concentración de ácido 0,5 N se alcanza una conversión prácticamente completa (95,1 %) en el caso del ácido clorhídrico, mientras que para el ácido sulfúrico se obtiene sólo una conversión del 64,1 %.

4.1 Los rendimientos en azúcares reductores totales y en D-glucosa aumentan con el tiempo de operación y conforme se incrementa la concentración de ácido en el proceso de hidrólisis. Para una misma concentración de ácido, estos rendimientos (Y_T e Y_G) son superiores cuando el proceso se realiza con ácido clorhídrico. Con HCl 2 N se obtienen unos rendimientos máximos de $Y_T=0,25$ g/g e $Y_G=5,4$ mg/g, mientras que con H₂SO₄ 2 N se determina que $Y_T=0,17$ g/g e $Y_G=3,1$ mg/g. Sin embargo, con el ácido clorhídrico puede existir una mayor degradación de los azúcares obtenidos, y con ello, la formación de compuestos como el ácido acético, furfural, hidroximetil-furfuraldehído..., que presentan inhibición sobre las levaduras en el posterior proceso de fermentación.

4.2 Por aplicación del método diferencial de análisis de datos y realizando un análisis parcial de la ecuación cinética, se ha tratado de determinar el valor

de la constante cinética (referida al sustrato) y el orden de reacción, n , partiendo de una ecuación tipo potencial,

$$r_o = k C_A^n$$

donde r_o representa la velocidad de reacción inicial.

En los procesos con ácido sulfúrico se determina que,

$$r_o = 0,618 C_A^{1,06}$$

mientras que con el ácido clorhídrico se deduce que,

$$r_o = 1,65 C_A^{2,12}$$

obteniéndose un orden de reacción próximo a 1 para el H_2SO_4 y a 2 para el HCl.

5. En los procesos de hidrólisis con los ácidos sulfúrico 1 N, y clorhídrico 0,5 N, fijando el tiempo de hidrólisis en 240 minutos, se ha determinado la influencia de la temperatura sobre los parámetros de conversión fraccional, rendimientos en azúcares y velocidad de reacción, en el intervalo de 70 a 100 °C.

5.1 En la fracción hemicelulósica del residuo, con ambos ácidos, se alcanza una conversión prácticamente completa a los 100 °C, mientras que la fracción celulósica es parcialmente hidrolizada en las condiciones de operación ensayadas. Con los dos ácidos se observa un aumento de la conversión de la fracción celulósica (X_c) conforme aumenta la temperatura; este incremento es mayor cuando se utiliza ácido clorhídrico, alcanzándose una conversión máxima de 22,2 % a los 100 °C, mientras que con ácido sulfúrico es de 19,4 % a esta misma temperatura.

5.2 Los máximos rendimientos en azúcares se alcanzan a la temperatura de 100 °C, obteniéndose que $Y_T=0,24$ g/g e $Y_G=4$ mg/g cuando se utiliza HCl, mientras que $Y_T=0,21$ g/g e $Y_G=3$ mg/g cuando el agente hidrolítico es el ácido sulfúrico.

Los valores de X_c obtenidos no se corresponden con los rendimientos en D-glucosa tan bajos que se determinan. Este hecho puede deberse a que la celulosa se rompa en oligómeros sin llegar a D-glucosa o bien que ésta se degrade inmediatamente después de ser liberada.

5.3 A igual tiempo de proceso, tanto para el ácido clorhídrico como para el sulfúrico, la velocidad de reacción en el transcurso de cada hidrólisis (r)

aumenta con la temperatura de operación. Se observa que los valores más elevados para cada experimento se alcanzan al inicio del mismo (r_o) disminuyendo a medida que avanza el proceso hidrolítico. A 100 °C se determina una velocidad inicial de hidrólisis superior en el ácido clorhídrico que con el sulfúrico, a pesar de utilizar con este último una concentración doble (1 N).

6. En la fermentación en medio sintético con *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691, a una temperatura de 30 °C y pH=3,5, utilizando los sustratos D-glucosa y D-xilosa, se ha determinado la influencia de la adición de distintas concentraciones de ácido acético sobre el crecimiento celular, el consumo de sustrato y la formación de bioproductos.

6.1 Los valores más elevados de la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) y de la productividad en biomasa (b) se obtienen en el cultivo en que no hubo adición de ácido acético. Para este cultivo, con una concentración inicial de D-xilosa de 25 g/dm³, se obtuvieron unos valores de $\mu_m=0,22 \text{ h}^{-1}$ y $b=15 \text{ mg}/(\text{dm}^3 \text{ h})$. La adición de ácido acético disminuye de forma acusada los valores de μ_m y b . En el cultivo con concentraciones iniciales de 10 g/dm³ de D-xilosa, 10 g/dm³ de D-glucosa y 5 g/dm³ ácido acético, los valores de μ_m y b fueron 0,026 h⁻¹ y 1,8 mg/(dm³ h), respectivamente. Este hecho pone de manifiesto el efecto inhibitorio del ácido acético sobre el crecimiento celular.

6.2 El máximo rendimiento global en biomasa ($Y_{x/s}^G=0,077 \text{ g/g}$) se obtiene en el cultivo cuyo único sustrato fue D-xilosa. En los cultivos con adición de ácido acético se observa una disminución en los valores del rendimiento en biomasa. Cuando están presentes los tres sustratos, D-glucosa es asimilada inicialmente por *P. tannophilus* y posteriormente se consume D-xilosa, mientras que el ácido acético se consume de forma simultánea con ambos azúcares. En todos los cultivos se observa una disminución de las velocidades específicas de consumo en el transcurso de la fermentación.

6.3 Se ha observado que la presencia de D-glucosa puede disminuir el efecto de inhibición del ácido acético en la conversión de D-xilosa con *P. tannophilus*. El rendimiento más elevado en xilitol se obtiene en el cultivo cuyo único sustrato fue D-xilosa.

Se ha comprobado que la velocidad específica de producción de etanol, q_E , calculada por los métodos diferencial e integral de tratamiento de datos cinéticos, disminuye en el transcurso del cultivo cuando el sustrato era D-glucosa, mientras que cuando se utilizó D-xilosa q_E^D permanecía prácticamente constante. Se observa que las velocidades específicas de producción de etanol obtenidas son más elevadas durante el consumo de D-glucosa en relación a las correspondientes al consumo de D-xilosa. La presencia del ácido

acético hace disminuir la velocidad específica de producción de etanol durante la etapa de consumo de D-xilosa.

7. En la fermentación con *P. tannophilus*, a 30 °C y pH=3,5, se observa que el acondicionamiento previo de los hidrolizados es una etapa determinante en la posterior conversión bioquímica. De los distintos acondicionamientos ensayados, el tratamiento que conduce a unos mayores rendimientos globales en etanol y velocidades específicas de producción en este bioproducto, consiste en una neutralización con hidróxido potásico seguida de una concentración en rotavapor. Con este tratamiento aplicado a un hidrolizado obtenido con ácido sulfúrico, se alcanza un rendimiento global en etanol de 0,20 g/g y una velocidad específica de producción de etanol próxima a 0,025 g/(g h).
8. En la fermentación con *P. tannophilus* de hidrolizados obtenidos modificando el tamaño de partícula, se observa que los valores más elevados de la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_m=0,12 \text{ h}^{-1}$) se determinan en aquellos que proceden de residuos con menor tamaño de partícula. En las productividades en biomasa no se observa una tendencia definida, aunque en la fermentación de los hidrolizados procedentes de residuos del mayor tamaño de partícula (1,6-2,0 mm) se detecta el valor más bajo de b , 2,9 mg/(dm³ h).
 - 8.1 Los rendimientos globales en biomasa varían en el rango 0,09-0,15 g/g, no encontrándose influencia del tamaño de partícula del residuo hidrolizado sobre este parámetro. Tampoco se ha encontrado influencia de esta variable en los valores de las velocidades específicas de consumo de sustrato, q_s , calculadas por los métodos diferencial e integral de tratamiento de datos cinéticos,. En todos los cultivos q_s disminuye en el transcurso del experimento.
 - 8.2 No se ha podido establecer una relación clara entre el tamaño de partícula y la formación de bioproductos, aunque se determinan unas velocidades específicas de formación de etanol más elevadas en los hidrolizados obtenidos con tamaño de partícula comprendido entre 0,3 y 0,6 mm.

Los rendimientos globales en etanol ($Y_{E/s}^G=0,17 \text{ g/g}$) y xilitol ($Y_{XI/s}^G=0,11 \text{ g/g}$) más elevados se obtienen con los hidrolizados procedentes de residuos con tamaño de partícula en el rango 0,425-0,600 mm, aunque pueden estar influenciados por la mayor concentración inicial de sustrato en estos cultivos.
9. La fermentación con *P. tannophilus* de hidrolizados de ambos ácidos, manteniendo constante la temperatura en 30 °C y el pH del cultivo en 3,5, muestra que la velocidad específica máxima de crecimiento disminuye a medida que aumenta la concentración de ácido en la hidrólisis previa. Las productividades

en biomasa presentan el mismo comportamiento que los valores de μ_m en los hidrolizados de ácido sulfúrico; sin embargo, en los de ácido clorhídrico los valores más elevados de b se determinan en los hidrolizados obtenidos con una concentración 0,5 N de HCl. Para este ácido, en los hidrolizados de concentraciones superiores apenas existe crecimiento y no se detecta consumo de sustrato ni formación de productos.

9.1 En general, se observa que a mayor concentración de ácido sulfúrico o clorhídrico en la obtención de los hidrolizados, el rendimiento global en biomasa es menor.

Con ambos ácidos las velocidades específicas de consumo de sustrato disminuyen en el transcurso de la fermentación, fundamentalmente en el periodo de comportamiento lineal de la biomasa. Se han determinado valores superiores de q_s en los hidrolizados obtenidos con ácido sulfúrico, a igual tiempo y concentración de ácido. Este hecho muestra la mayor inhibición que presentan los hidrolizados de ácido clorhídrico en el proceso de fermentación.

9.2 Se observa un aumento de los rendimientos globales en etanol al incrementarse la concentración de ácido sulfúrico empleada en la hidrólisis, alcanzándose el mayor valor (0,21 g/g) en los hidrolizados de ácido 2 N. En la fermentación de los hidrolizados de ácido clorhídrico se determina que el valor de $Y_{E/s}^G$ permanece prácticamente constante (e igual a 0,19 g/g) a partir de una concentración de ácido 0,3 N en la hidrólisis previa. Para los dos ácidos los rendimientos globales en xilitol más altos se obtienen en los hidrolizados de ácido 1 N, siendo $Y_{Xi/s}^G$ muy próximo a 0,12 g/g para ambos tipos de hidrolizados.

Las mayores velocidades específicas de formación de etanol se determinan en los hidrolizados de ácido sulfúrico obtenidos con una concentración de ácido 1 N, en consonancia con los resultados obtenidos para las velocidades específicas de consumo de sustrato.

10. En la fermentación de hidrolizados de ácido sulfúrico 1 N, modificando la temperatura de hidrólisis, se observa un comportamiento paralelo de las velocidades específicas máximas de crecimiento y las productividades en biomasa, determinándose los máximos valores en la fermentación de los hidrolizados obtenidos a 90 °C, $\mu_m = 0,097 \text{ h}^{-1}$ y $b = 6,2 \text{ mg}/(\text{dm}^3 \text{ h})$.

10.1 No se ha encontrado una relación entre temperatura de hidrólisis y rendimiento global en biomasa en fermentación. En el rango de temperaturas de hidrólisis ensayadas (70-100 °C), $Y_{x/s}^G$ oscila entre 0,082 y 0,16 g/g, detectándose valores más elevados en los hidrolizados obtenidos a temperaturas extremas.

En todos los cultivos se ha observado que las velocidades de consumo de sustrato disminuyen con el tiempo. De forma general, para igual tiempo

de experimentación, se determina que estas velocidades son más elevadas en los bioprocesos realizados con hidrolizados obtenidos a 90 y 95 °C.

10.2 Las velocidades específicas de producción de etanol más altas, $q_E=0,015 \text{ g/(g h)}$, se determinan en la fermentación de los hidrolizados de 90 °C, existiendo cierta concordancia con los mayores rendimientos globales en bioproductos ($Y_{E/s}^G=0,17 \text{ g/g}$ e $Y_{Xi/s}^G=0,11 \text{ g/g}$).

11. En la fermentación en dos medios sintéticos con *Fusarium oxysporum* VTT-D-80134, a una temperatura de 30 °C y un pH de cultivo de 4,5, utilizando como sustrato D-glucosa, D-xilosa y D-arabinosa, o bien mezclas en distintas proporciones de D-xilosa/D-glucosa, se ha observado que la duración de la fase exponencial es más amplia que la determinada en el caso de *P. tannophilus*, no existiendo diferenciación entre la fermentación de una hexosa y una pentosa. En la fase de desaceleración la biomasa crece linealmente con el tiempo y este periodo es mayor en la fermentación de D-xilosa y D-arabinosa.

11.1 El máximo valor de la velocidad específica de crecimiento ($\mu_m=0,11 \text{ h}^{-1}$) se obtiene cuando el sustrato está formado por mezclas de D-xilosa/D-glucosa en igual proporción o bien se utiliza sólo D-glucosa ($\mu_m=0,10 \text{ h}^{-1}$).

Las productividades en biomasa más altas, $b=78 \text{ mg/(dm}^3 \text{ h)}$, se alcanzan cuando el sustrato es sólo D-glucosa y el valor más bajo se obtiene con D-arabinosa, $b=6,8 \text{ g/(dm}^3 \text{ h)}$. Con esta pentosa no se detecta consumo de sustrato ni formación de productos, comportamiento similar al que presenta *P. tannophilus*.

En los dos medios sintéticos utilizados se obtienen velocidades específicas máximas de crecimiento prácticamente coincidentes, dependiendo μ_m del sustrato empleado.

11.2 En los cultivos en los que se ha empleado D-glucosa y D-xilosa como sustrato, se observa un consumo secuencial; en primer lugar *F.oxysporum* asimila D-glucosa y posteriormente D-xilosa, al igual que sucedía con la levadura *P. tannophilus*. En el cálculo de los rendimientos globales en biomasa se determinan dos valores correspondientes al consumo de cada uno de estos azúcares, siendo el primero, referido al consumo de D-glucosa, muy superior al segundo que corresponde a la asimilación de D-xilosa.

Comparando los experimentos en los que se ha modificado la composición del medio de cultivo, se observa como los valores de $Y_{x/s}^G$ son superiores cuando se utiliza el medio de cultivo específico para este hongo frente a los del medio característico de las levaduras.

En general, para todos los azúcares, la velocidad específica de consumo de sustrato disminuye en el transcurso del cultivo, obteniéndose los mayores valores de q_s cuando el sustrato es D-glucosa.

11.3 Los rendimientos globales en etanol son muy superiores a los de xilitol, determinándose que $Y_{E/S}^G$ oscila en el intervalo 0,20-0,38 g/g, siendo el más elevado el del cultivo con D-glucosa como sustrato. El mayor rendimiento global en xilitol (0,051 g/g) se obtiene en el cultivo cuyo sustrato estaba formado por 20 g/dm³ de D-xilosa y 5 g/dm³ de D- glucosa.

Las velocidades específicas de producción de etanol más elevadas se determinan cuando el sustrato es D-glucosa, mientras que en las mezclas D-glucosa/D-xilosa se detecta que los valores de q_E disminuyen conforme la proporción de D-glucosa es más baja en la mezcla.

12. En la fermentación de hidrolizados con *F. oxysporum* se ha observado una fuerte inhibición, determinándose consumo de sustrato y formación de productos sólo en aquellos obtenidos con ácido sulfúrico 1 N y tiempos de operación de 1 a 3 h. Esta inhibición provoca que las velocidades específicas máximas de crecimiento y productividades en biomasa sean inferiores a las que se determinaron para el crecimiento de este hongo en medios sintéticos.

12.1 En las condiciones de operación ensayadas este hongo se ha caracterizado por un excesivo crecimiento celular, obteniéndose unos elevados rendimientos globales en biomasa que alcanzan el valor de 0,63 g/g, considerando como sustrato no sólo los azúcares sino el ácido acético contenido en los hidrolizados y asimilado completamente por *F. oxysporum*.

Las velocidades específicas de consumo de sustrato disminuyen en el transcurso del cultivo y presentan valores inferiores a las que se calcularon para azúcares puros.

12.2 Los rendimientos globales en etanol son próximos a los determinados con sustratos sintéticos, alcanzándose un valor de 0,25 g/g en los hidrolizados obtenidos con mayor tiempo de operación.

Las velocidades específicas de producción de etanol son muy inferiores a las que se obtienen con azúcares puros, poniendo este parámetro de manifiesto la fuerte inhibición provocada por los productos de degradación formados durante el proceso de hidrólisis. Estos resultados muestran la peor tolerancia de *F. oxysporum* a estos compuestos, respecto a la mayor resistencia a la inhibición que presenta *P. tannophilus*.

VII. Nomenclatura

a	Parámetro de la ecuación [5.14]
A	Parámetro de la ecuación [5.26]
A_i	Factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius ($i=1, 2$)
A_{oi}	Parámetro de la ecuación [2.7] ($i=1, 2$)
Ac	Concentración de ácido acético, g/dm ³
Ac_o	Concentración de ácido acético inicial, g/dm ³
b	Productividad en biomasa, g/(dm ³ h)
B	Parámetro de la ecuación [5.26]
c	Parámetro de la ecuación [5.15]
C_A	Concentración de ácido, N
C_{Go}	Fracción de celulosa amorfa, ecuación [2.5]
C_S	Concentración de celulosa, ecuación [2.4]
C_{So}	Fracción de celulosa en el residuo original, ecuación [2.5]
C_X	Concentración de D-xilosa, ecuación [2.10]
C_{Xo}	Parámetro de las ecuaciones [2.10] y [2.11]
CEL	Celulosa, %
CEN	Cenizas, %
CMC	Carboximetilcelulosa
CS	Severidad combinada
D	Velocidad de dilución, h ⁻¹
dE/dt	Velocidad de producción de etanol por unidad de volumen, g/(dm ³ h)
DNS	Reactivo dinitrosalicílico
E	Concentración de etanol, g/dm ³
E_{ai}	Energía de activación, kJ/mol ($i=1, 2$)
E_T	Concentración teórica máxima alcanzable de etanol, g/dm ³
FAD	Fibra Ácido Detergente, %
FND	Fibra Neutro Detergente, %

g	Concentración de D-glucosa, g/dm ³
HEM	Hemicelulosa, %
HUM	Humedad, %
k	Constante cinética referida al sustrato, ecuación [5.8]
k _i	Constantes cinéticas, h ⁻¹ (i = 1; 2; 1,I; 1,II)
LIG	Lignina, %
L/S	Relación líquido/sólido (v/p)
m	Parámetro de la ecuación [5.3]
MS	Materia seca
n	Orden de reacción, ecuación [5.8]
p _i	Parámetro de la ecuación [2.7] (i=1, 2)
pH	pH de operación
q _E	Velocidad específica de producción de etanol, g/(h g)
q _E ^D	Velocidad específica de producción de etanol, determinada usando el método diferencial, g/(h g)
q _E ^D (M)	Velocidad específica media de producción de etanol, determinada usando el método diferencial, g/(h g)
q _s	Velocidad específica de consumo de sustrato, g/(h g)
q _s ^D	Velocidad específica de consumo de sustrato, determinada usando el método diferencial, g/(h g)
Q _E	Productividad volumétrica en etanol, g/(dm ³ h)
Q _s	Velocidad volumétrica de consumo de sustrato, g/(dm ³ h)
Q _{xi}	Productividad volumétrica en xilitol, g/(dm ³ h)
r	Velocidad de hidrólisis, g/(dm ³ min)
r _o	Velocidad inicial de hidrólisis, g/(dm ³ min)
Ref.	Residuo de tallos de girasol de partida
RCTA	Reactor continuo tanque agitado
RDTA	Reactor discontinuo tanque agitado
Ro	Factor de severidad
s	Concentración de sustrato (azúcares reductores totales), g/dm ³
s _o	Concentración de sustrato inicial, g/dm ³
t	Tiempo, h o min
T	Temperatura, K

T_b	Temperatura de referencia, ecuación [2.1]
T_H	Temperatura de hidrólisis, °C
tep	Toneladas equivalentes de petróleo
x	Concentración de biomasa, g/dm ³
X_C	Conversión de la fracción de celulosa, %
X_H	Conversión de la fracción de hemicelulosa, %
x_i	Concentración de biomasa al comienzo de la fase de crecimiento exponencial, g/dm ³
x_o	Concentración inicial de biomasa, g/dm ³
X_i	Concentración de xilitol, g/dm ³
$Y_{E/s}$	Rendimiento instantáneo en etanol, g/g
$Y_{E/x}$	Productividad instantánea en etanol, g/g
$Y_{E/s}^G$	Rendimiento global en etanol, g/g
$Y_{E/x}^G$	Productividad global en etanol, g/g
Y_T	Rendimiento de hidrólisis en azúcares reductores totales, g/g
$Y_{x/s}$	Rendimiento instantáneo en biomasa, g/g
$Y_{x/s}^G$	Rendimiento global en biomasa, g/g
$Y_{Xi/s}$	Rendimiento instantáneo en xilitol, g/g
$Y_{Xi/s}^G$	Rendimiento global en xilitol, g/g
z	Parámetro de la ecuación [5.3]

LETRAS GRIEGAS

α	Parámetro de la ecuación [5.18]
β	Parámetro de la ecuación [5.18]
γ	Fracción de xilano fácil de hidrolizar
μ	Velocidad específica de crecimiento, h ⁻¹
μ_m	Velocidad específica máxima de crecimiento, h ⁻¹
τ	Parámetro de la ecuación [5.27]
ϕ	Razón sólido a líquido, ecuaciones [2.10] y [2.11]

VIII. Bibliografía

- Abate C., Callieri D., Rodríguez E., Garro O. (1996). Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces sp.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 580-583.
- Abatzoglou N., Koeberle P.G., Chornet E., Overend R.P., Koukios E.G. (1990). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosics. An application to medium consistency suspensions of hardwoods using a plug flow reactor. *Can. J. Chem. Eng.* **68**, 627-638.
- Adaskaveg J.E., Gilberton R.L., Dunlap M.R. (1995). Effects of incubation time and temperature on *in vitro* selective delignification of silver leaf oak by *Ganoderma colossum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 138-144.
- Aguilar R., Ramírez J.A., Garrote G., Vázquez M. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *J. Food Eng.* **55**, 309-318.
- Ahring B.K., Jensen K., Nielsen P., Bjerre A.B., Schmidt A.S. (1996). Pretreatment of wheat straw and conversion of xylose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria. *Bioresour. Technol.* **58**, 107-113.
- Amin G., van den Eynde E., Verachtert H. (1983). Determination of by-products formed during the ethanolic fermentation, using batch and immobilized cell systems of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces bayanus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1-5.
- Ando S., Arai I., Kiyoto K., Hanai S. (1986). Identification of aromatic monomers in steam exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.* **64**, 567-570.
- Aranda Barradas J.S., Delia M.L., Riba J.P. (2000). Kinetic study and modelling of the xylitol production using *Candida parapsilosis* in oxygen limited culture conditions. *Bioprocess Eng.* **22**, 219-225.
- Azuma M., Ikeuchi T., Kiritani R., Kato J., Ooshima H. (2000). Increase in xylitol production by *Candida tropicalis* upon addition of salt. *Biomass Bioenerg.* **19**, 129-135.
- Ballesteros I., Oliva J.M., Negro M.J., Ballesteros M. (2000). Effect of particle size on steam explosion pretreatment of herbaceous agricultural wastes. En: *1st World Conference on Biomass for Energy and Industry*. Kyritsis, S., Beenackers, A.A.C.M., Helm, P., Grassi, A., Chiaramonti, D. (Eds.), James & James Pub., Londres, Vol. 1, p. 414-417.

- Barbosa M.F.S., Lee H., Schneider H., Forsberg C.W. (1990). Temperature mediated changes of D-xylose metabolism in the yeast *Pachysolen tannophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**, 35-40.
- Barron N., Marchant R., McHale L., McHale A.P. (1995). Studies on the use of a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* in simultaneous saccharification and ethanol formation from cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 518-520.
- Baugh K.D., McCarty P.L. (1988). Thermochemical pretreatment of lignocellulose to enhance methane fermentation: I. Evaluation and application of pretreatment model. *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 50-61.
- Bazus A. (1991). Raffinage des agroressources: extraction et caractérisations des glucuronoxylanes des coques de tournesol. Tesis Doctoral. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Bergmeyer H.U., Bernt E., Schmidt F., Stork H. (1974). Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer, H.U. (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, 2nd ed., Nueva York, Vol. 3, p. 1196-1201.
- Bergmeyer H.U., Möllering H. (1974). Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer, H.U. (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, 2nd ed., Nueva York, Vol. 3, p. 1520-1528.
- Bertolini M.C., Ernandes J.R., Lalue C. (1991). New yeast strains for alcoholic fermentation at higher sugar concentration. *Biotechnol. Lett.* **13**, 197-202.
- Beutler H.O., Becker J. (1977). Enzymatischen Bestimmung von D-Sorbit und Xylit in Lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittel - Rundschau* **6**, 182-187.
- Beutler H.O., Michal G. (1977). Neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Ethanol in Lebensmitteln. *Z. Anal. Chem.* **284**, 113-117.
- Bhandari N., Macdonald D.G., Bakhshi N.N. (1984). Kinetic studies of corn stover saccharification using sulfuric acid. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 320-327.
- Bhat M.K., Hazlewood G.P. (2001). Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. En: *Enzymes in farm animal nutrition*. Bedford M.R., Partridge G.G. (Eds.), CABI International, Oxon.
- Bicho P.A., Cunningham J.D., Lee H. (1989). Differential fructose effect in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**, 323-328.
- Bienkowski P.R., Ladisch M.R., Voloch M., Tsao G.T. (1984). Acid hydrolysis of pretreated lignocellulose from corn residue. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **14**, 511-524.
- Bjerre A.B., Olesen A.B., Fernqvist T., Plöger A., Skammelsen A. (1996). Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 568-577.

- Boyle N., Barron N., McHale A.P. (1997). Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus imb3*. *Biotechnol. Lett.* **19**, 49-51.
- Bravo V., Camacho F., Sánchez S., Castro E. (1993). The effect of pH on kinetic and yield parameters during the ethanolic fermentation of D-xylose with *Pachysolen tannophilus*. *Bioprocess Eng.* **9**, 159-165.
- Bravo V., Martínez M.E., Sánchez S., Castro E., Sánchez P. (1995a). Fermentación etanólica de disoluciones de D-xilosa con *Pachysolen tannophilus*. Influencia del nivel de aireación. *Afinidad* **457**, 189-196.
- Bravo V., Camacho F., Sánchez S., Castro E. (1995b). Influence of the concentrations of D xylose and yeast extract on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. *J. Ferment. Bioeng.* **79**, 566-571.
- Bridgwater A.V. (2001). The contribution of fast pyrolysis to Bio-energy. En: *1st World Conference on Biomass for Energy and Industry*. Kyritsis S., Beenackers A.A.C.M., Helm P., Grassi A. , Chiaramonti D. (Eds.), James & James Pub., Londres, Vol. 1, p. 45-48.
- Bruinenberg P.M., de Bot P.H.M., van Dyken J.P., Scheffers W.A. (1983). The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 287-292.
- Camacho F., González P., Jurado E., Páez M.P. (1986). Aprovechamiento de residuos lignocelulósicos (II). *Ing. Quím.* **18** (203), 117-123.
- Cao N.J., Krishnan M., Du J.X., Gong C.S., Ho N.W., Chen Z.D., Tsao G.T. (1996). Ethanol production from corn cob pretreated by the ammonia steeping process using genetically engineered yeast. *Biotechnol. Lett.* **18** **9**, 1013-1018.
- Carrasco J.E., Martínez J.M., Pérez J., Molina A. (1992). La hidrólisis ácida como tecnología para el fraccionamiento de la biomasa lignocelulósica (II). *Ing. Quím.* **24** (275), 195-200.
- Castro E. (1993). Fermentación de disoluciones de D-xilosa y D-glucosa con levaduras. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Castro M. (1987). Fermentación etanólica discontinua de glucosa con *Pachysolen tannophilus*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Granada.
- Chamy R., Núñez M.J., Lema J.M. (1994). Product inhibition of fermentation of xylose to ethanol by free and immobilized *Pichia stipitis*. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 622-626.
- Chen L.F., Gong C.S. (1985). Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate-acclimatized yeast. *J. Food Sci.* **50**, 226-228.
- Chiang G., Knight S.G. (1960). Metabolism of D-xylose by molds. *Nature* **188**, 79-81.

- Choi C.H., Mathews A.P. (1996). Two-step acid hydrolysis process kinetics in the saccharification of low-grade biomass: 1. Experimental studies on the formation and degradation of sugars. *Bioresour. Technol.* **58**, 101-106.
- Chum H.L., Johnson D.K., Black S. (1988). Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplar: 1. Enzyme hydrolysis of cellulosic residues. *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 643-649.
- Chum H.L., Johnson D.K., Black S.K., Overend R.P. (1990). Pretreatment-catalyst effects of the combined severity parameter. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**, 1-14.
- Clark T., Mackie K.L. (1984). Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *J. Chem. Biotechnol.* **B 34**, 101-110.
- Converti A., Perego P., Domínguez J.M. (1999). Microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus* at different pH values. *Biotechnol. Lett.* **21**, 719-723.
- Converti A., Perego P., Torre P., Silva S.S. (2000a). Mixed inhibition by methanol, furfural and acetic acid on xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.* **22**, 1861-1865.
- Converti A., Domínguez J.M., Perego P., da Silva S.S., Zilli M. (2000b). Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production. *Chem. Eng. Technol.* **23**, 1013-1020.
- Curreli N., Agelli A., Oisu B., Rescigno A., Sanjust E., Rinaldi A. (2002). Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. *Process Biochem.* **37**, 937-941.
- Da Silva S.S., Afschar A.S. (1994). Microbial production of xylitol from D xylose using *Candida tropicalis*. *Bioprocess Eng.* **11**, 129-134.
- Dadach Z., Kaliaguine S. (1993). Acid hydrolysis of cellulose. Part I. Experimental kinetic analysis. *Can. J. Chem. Eng.* **71**, 880-891.
- Debus D., Methner H., Schulze D., Dellweg H. (1983). Fermentation of xylose with the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 287-291.
- Dekker R.F.H. (1986). Lipid-enhanced ethanol production from xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 605-608.
- Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M. (1986). The effect of aeration on D-xylose fermentation by *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.* **8**, 897-900.
- Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M. (1988). Fermentation of D-xylose, D glucose and L arabinose mixture by *Pichia stipitis* Y7124: sugar tolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 155-161.
- Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M. (1990). Acid hydrolysis of wheat straw and process considerations for ethanol fermentation by *Pichia stipitis* Y7124. *Process Biochem. Int.* **8**, 132-135.

- Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M. (1991). Xylose metabolism by *Pichia stipitis*: the effect of ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 656-661.
- Delgenes M.C., Escare J.M., Laplace R., Moletta J.M., Navarro (1998). Biological production of industrial chemicals, i.e. xylitol and ethanol, from lignocelluloses by controlled mixed culture systems. *Ind. Crop. Prod.* **7**, 101-111.
- Dellweg H., Debus D., Methner H., Schulze D., Saschewag I. (1982). Xylose-Vergärung mit *Pachysolen tannophilus*. En: *5th Symposium Techn. Mikrobiol.* Dellweg H. (Ed.), Institut für Gärungsgew. und Biotechnol., Berlin, p. 200-207.
- Deshpande V., SivaRaman H., Rao M. (1983). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol using *Penicillium funiculosum* cellulase and free or immobilized *Saccharomyces uvarum* cells. *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 1679-1684.
- Detroy R.W., Cunningham R.L., Herman A.I. (1982). Fermentation of wheat straw hemicelluloses to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **12**, 81-89.
- DiPardo J. (2001). Outlook for biomass ethanol production and demand.
<http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biomass.html> (acceso: 25-07-2002).
- Domínguez J.M., Gong C.G., Tsao G.T. (1996). Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58** 49-56.
- Domínguez J.M., Ningjun C., Gong C.S., Tsao, G.T. (1997). Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. *Bioresour. Technol.* **61**, 85 90.
- Du Preez J.C., Kock J.L.F., Monteiro A.M.T., Prior B.A. (1985). The vitamin requirements of *Candida shehatae* for xylose fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**, 271-275.
- Du Preez J.C. (1994). Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 944-956.
- Eken-Saracoglu N., Ferda Mutlu S., Dilmac G., Cavusoglu H. (1998). A comparative kinetic study of acidic hemicellulose hydrolysis in corn cob and sunflower seed hull. *Bioresour. Technol.* **65**, 29-33.
- Eken-Saracoglu N., Arslan Y. (2000). Comparison of different pretratments in ethanol fermentation usibg corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.* **22**, 855-858.
- Emmel A., Mathias A.L., Wypych F., Ramos L.P. (2003). Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. *Bioresour. Technol.* **86**, 105-115.

- Esteghlalian A., Hashimoto A.G., Fenske J.J., Penner M.H. (1997). Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresour. Technol.* **59**, 129-136.
- Eurostat (2003). <http://europa.eu.int> (acceso: 23-11-2003)
- Fan L.T., Gharpuray M.M., Lee Y.H. (1987). En: Cellulose hydrolysis biotechnology monographs. Springer, Berlin, p. 57.
- Fanta G.F., Abbott T.P., Herman A.I., Burr R.C., Doane W.M. (1984). Hydrolysis of wheat straw hemicellulose with trifluoroacetic acid. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1122-1125.
- Fein J.E., Tallim S.R., Lawford G.R. (1984). Evaluation of D-xylose fermenting yeasts for utilization of wood-derived hemicellulose hydrolysate. *Can. J. Microbiol.* **30**, 682-690.
- Felipe M.G.A., Alves L.A., Silva S.S., Roberto I.C., Mancilha I.M., Almeida e Silva J.B. (1996). Fermentation of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Bioresour. Technol.* **56**, 281-283.
- Felipe M.G.A., Vitolo M., Mancilha I.M., Silva S.S. (1997). Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: effect of pH. *Biomass Bioenerg.* **13**, 11-14.
- Fernández Bolaños J., Felizón B., Heredia A., Rodríguez R., Guillén R., Jiménez A. (2001). Steam explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresour. Technol.* **79**, 53-61.
- Ferrari D., Burastero J. (1994). Procesos de hidrólisis ácida. En: *Etanol de lignocelulósicos. Tecnología y perspectivas*. Cunningham R.E., López G.D. (Eds.), Universidad de Santiago de Compostela, p. 61-94.
- Ferrari M.D., Neirotti E., Albornoz C., Saucedo E. (1992). Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 753-759.
- Frazer F.R., McCaskey T.A. (1989). Wood hydrolyzate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2,3 butanediol. *Biomass Bioenerg.* **18**, 31-42.
- Furlan S.A., Bouilloud P., Strehaiano P., Riba J.P. (1991). Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. *Biotechnol. Lett.* **13**, 203-206.
- Furlan S.A., Bouilloud P., de Castro H.F. (1994). Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process Biochem.* **29**, 657-662.
- Galbe M., Zacchi G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 618-628.
- Garrote G., Dominguez H., Parajo J. (1999). Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als Roh und Werkst.* **57**, 191-202.

- Garrote G., Domínguez H., Parajó J.C. (2001a). Generation of xylose solutions from *Eucalyptus globulus* wood by autohydrolysis-posthydrolysis processes: posthydrolysis kinetics. *Bioresour. Technol.* **79**, 155-164.
- Garrote G., Domínguez H., Parajó J.C. (2001b). Kinetic modelling of corn cob autohydrolysis. *Process Biochem.* **36**, 571-578.
- Grohmann K., Torget R., Himmel M. (1985). Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **15**, 59-80.
- Gurgel P.V., Furlan S.A., Martinez S.E.R., Mancilha I.M. (1998). Evaluation of sugarcane bagasse acid hydrolyzate treatments for xylitol production. *Braz. J. Chem. Eng.* **15**, 309-312.
- Hahn-Hägerdal B., Jeppsson H., Olsson L., Mohagheghi A. (1994a). An interlaboratory comparison of the performance of ethanol-producing microorganisms in a xylose-rich acid hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 62-72.
- Hahn Hägerdal B., Jeppsson H., Skoog K., Prior B.A. (1994b). Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 933-943.
- Hallborn J., Gorwa M.F., Meinander N., Penttilä M., Keränen S., Hahn-Hägerdal B. (1994). The influence of cosubstrate and aeration on xylitol formation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *XYL1* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 326-333.
- Herrera A., Téllez Luis S.J., Ramírez J.A., Vázquez M. (2003). Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. *J. Cereal Sci.* **37**, 267-274.
- Hess, D. (1975). Plant physiology. Springer-Verlag, Nueva York, p. 57-73.
- Hinfray C., Jouenne T., Mignot L., Junter G.A. (1995). Influence of the oxygenation level on D xylose fermentation by free and agar entrapped cultures of *Candida shehatae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 682-687.
- Hoebler C., Barry J. L., David A., Delort-Laval J. (1989). Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 360-367.
- Horitsu H., Yahashi Y., Takamizawa K., Kawai K. (1992). Production of xylitol from D xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1085-1091.
- IDAE, Instituto para la Diversificación y el Ahorro de la Energía (1997). Anuario de Proyectos de Energías Renovables en España 96. Edición Cinco Días, Madrid.
- IDAE (1999). Plan de Fomento de las energías renovables en España. Ministerio de Industria y Energía. Madrid.

- Ikeuchi T., Azuma M., Kato J., Ooshima H. (1999). Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentrations of xylose. *Biomass Bioenerg.* **16**, 333-339.
- Ingram L.O., Doran J.B. (1995). Conversion of cellulosic materials to ethanol. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 235-241.
- Jagnow G., Dawid W. (1991). Procesos clásicos en la Industria de los Alimentos e industrias afines. En: *Biotecnología. Introducción con experimentos modelos*. Acribia, Zaragoza, p. 6-11.
- Jeffries T.W. (1982). A comparison of *Candida tropicalis* and *Pachysolen tannophilus* for conversion of xylose to ethanol. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **12**, 103-110.
- Jeffries T.W., Fady J.H., Lightfoot E.N. (1985). Effect of glucose supplements on the fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 171-176.
- Jeffries T.W., Kurtzman C.P. (1994). Strain selection, taxonomy and genetics of xylose-fermenting yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 922-932.
- Jeffries T.W., Jin Y.S. (2000). Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.* **47**, 221-268.
- Jiménez L., López F., Sánchez I. (1991). Characterization of cellulose pulp from agricultural residues. *TAPPI J.* **74**, 217-221.
- Jiménez L., Pérez I., García J.C., López F., Ariza J. (2000). Influence of oxygen bleaching variables of enzyme treated soda pulp from wheat straw on the quality of black liquor. *Process Biochem.* **35**, 685-691.
- Jönsson L.J., Palmqvist E., Nilvebrant N.O., Hähn-Hagerdal B. (1998). Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 691-697.
- Junta de Andalucía (2003).
<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/agraria/estagric.html>
(acceso: 23-11-2003).
- Kastner J.R., Ahmad M., Jones W.J., Roberts R.S. (1992). Viability of *Candida shehatae* in D xylose fermentations with added ethanol. *Biotechnol, Bioeng.* **40**, 1282-1285.
- Kastner J.R., Roberts R.S., Jones W.J. (1996). Effect of pH on cell viability and product yields in D-xylose fermentations by *Candida shehatae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 224-228.
- Kavanagh K., Whittaker P.A. (1994). Application of the Melle Boinot process to the fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 28-31.

- Kim S.B., Lee Y.Y. (1987). Kinetics in acid catalyzed hydrolysis of hardwood hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **17**, 71-84.
- Kim S.Y., Kim J.H., Oh D.K. (1997). Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilosis*. *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 267-270.
- Klinke H.B., Thomsen A.B., Schmidt A.S., Olsson L., Ahring B.K. (2001). Wet oxidation of wheat straw: potential fermentation inhibitors for ethanol production. En: *1st World Conference on Biomass for Energy and Industry*. Kyritsis S., Beenackers A.A.C.M., Helm P., Grassi A., Chiaramonti D. (Eds.), James & James Pub., Londres, p. 1610-1613.
- Kosaric N., Wieczorek A., Cosentino G.P., Magee R.J., Prenosil J.E. (1983). Ethanol Fermentation. En: *Biotechnology*. Rehn H.J., Reed G., Dellweg H. (Eds.), Verlag-chemie, Weinheim, p. 257-385.
- Kuhad C.R., Singh A. (1993). Lignocellulose technology: current and future prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* **13**, 151-172.
- Kumar P.K.R., Singh A., Schugerl K. (1991). Formation of acetic-acid from cellulosic substrates by *Fusarium oxysporum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 570-572.
- Kuriyama H., Mahakarnchanakul W., Matsui S., Kobayashi H. (1993). The effects of pCO₂ on yeast growth and metabolism under continuous fermentation. *Biotechnol. Lett.* **15**, 189-194.
- Laplace J.M., Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M. (1992). Cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* co-cultivated with a xylose-fermenting yeast. *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 207-212.
- Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tenborg C., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N.O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 151-159.
- Laser M., Schulman D., Allen S.G., Lichwa J., Antal M.J., Lynd, L.R. (2002). A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresour. Technol.* **81**, 33-44.
- Latif F., Rajoka M.I. (2001). Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. *Bioresour. Technol.* **77**, 57-63.
- Lavarack B.P., Griffin G.J., Rodman D. (2000). Measured kinetics of the acid-catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to produce xylose. *Catal. Today* **63**, 257-265.
- Lavarack B.P., Griffin G.J., Rodman D. (2002). The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass Bioeng.* **23**, 367-380.
- Lawford H.G., Rousseau J.D. (1991). Fuel ethanol from hardwood hemicellulose hydrolysate by genetically engineered *Escherichia coli* B carrying genes from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **13**, 191-196.

- Lawford H.G., Rousseau J.D. (1998). Improving fermentation performance of recombinant *Zymomonas* in acetic acid-containing media. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**, 161-172.
- Leathers T.D., Dien B.S. (2000). Xylitol production from corn fibre hydrolysates by a two stage fermentation process. *Process Biochem.* **35**, 765-769.
- Lee, H., Biely P., Latta R.K., Barbosa M.F.S., Schneider H. (1986). Utilization of xylan by yeasts and its conversion to ethanol by *Pichia stipitis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 320-324.
- Lee H. (1992). Reversible inactivation of D-xylose utilization by D-glucose in the pentose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **92**, 1-4.
- Lee H., Sopher C.R., Yaau K.Y.F. (1996). Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in *Candida guilliermondii*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **66**, 375-379.
- Lee J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* **56**, 1-24.
- Lee K.C.P., Bulls M., Holmes J., Barrier J.W. (1997). Hybrid process for the conversion of lignocellulosic materials. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 1-23.
- Lee W.J., Ryu Y.W., Seo J.H. (2000). Characterization of two-substrate fermentation processes for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. *Process Biochem.* **35**, 1199-1203.
- Lema J., Núñez M.J. (1994). Equipos de alta eficacia en fermentación alcohólica. En: *Etnol de lignocelulósicos. Tecnología y perspectivas*. Cunningham R.E., López G.D. (Eds.), Universidad de Santiago de Compostela, p. 131-168.
- Lezinou V., Christakopoulos P., Li L.W., Kekos D., Macris B.J. (1995). Study of a single and mixed culture for the direct bio-conversion of sorghum carbohydrates to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 412-415.
- Lidén G., Jacobsson V., Niklasson C. (1993). The effect of carbon dioxide on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **38**, 27-40.
- Ligthelm M.E., Prior B.A., du Preez J.C. (1988). The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 63-68.
- Lindgren C.C., Nagai S., Nagai H. (1958). Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel. *Nature* **182**, 446-448.
- Lindén T., Hahn-Hägerdal B. (1989). Fermentation of lignocellulose hydrolysates with yeasts and xylose isomerase. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 583-589.
- Lis M.J., Carrillo F., Colom X., Martínez D., Nogués F. (2000). Hidrólisis ácida de paja previa a su tratamiento enzimático. Determinación de un modelo cinético. *Ing. Quím.* **32** (369), 18-186.

- Lu J., Tsai L.B., Gong C.S., Tsao G.T. (1995). Effect of nitrogen sources of xylitol production from D-xylose. *Biotechnol. Lett.* **17**, 167-170.
- Maiorella B.L., Blanch H.W., Wilke C.R. (1984). Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1003-1025.
- Maloney M.T., Chapman T.W., Baker A.J. (1985). Dilute acid hydrolysis of paper birch: kinetics studies of xylan and acetyl group hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 355-361.
- Mamma D., Koullas D., Fountoukidis G., Kekos D., Macris B.J., Koukios E. (1996). Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture. *Process Biochem.* **31**, 377-381.
- Marechal V., Rigal L. (1999). Characterization of by products of sunflower culture commercial applications for stalks and heads. *Ind. Crop. Prod.* **10**, 185-200.
- Martín A., Jiménez L., Ferrer J.L. (1987). Caracterización física y química de los tallos de girasol. *Afinidad* **44** (408), 133-137.
- Martínez A., Rodríguez M.E., York S.W., Preston J.F., Ingram L.O. (2000). Effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ treatments (overliming) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 526-536.
- McGinnis G.D., Wilson W.W., Price S.E., Chen Ch. (1983). Conversion of biomass into chemicals with high temperature wet oxidation. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **22**, 633-636.
- Meinander N., Hahn-Hägerdal B., Linko M., Linko P., Ojamo H. (1994). Fed-batch xylitol production with recombinant XYL1-expressing *Saccharomyces cerevisiae* using ethanol as a cosubstrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 334-339.
- Meinander N.Q., Hahn-Hägerdal B. (1997). Fed-batch xylitol production with two recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing XYL1 at different levels, using glucose as a cosubstrate: a comparison of production parameters and strain stability. *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 391-399.
- Mes-Hartree M., Dale B.E., Craig W.K. (1988). Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 462-468.
- Metzger M.H., Hollenberg C.P. (1994). Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* transketolase gene and expression in a xylose-utilising *Saccharomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 319-325.
- Meyrial V., Delgenes J.P., Moletta R., Navarro J.M. (1991). Xylitol production from D xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. *Biotechnol. Lett.* **13**, 281-286.
- Millati R., Niklasson C., Taherzadeh M.J. (2002). Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* **38**, 515-522.

- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Moritz J.W., Duff S. (1996). Simultaneous saccharification and extractive fermentation on cellulosic substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 504-511.
- Moya A.J. (1997). Hidrólisis y fermentación de residuo de poda de olivo. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.
- Mussatto S.I., Roberto I.C. (2001). Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 1681-1684.
- Neirinck L., Maleszka R., Schneider H. (1982). Alcohol production from sugar mixtures by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **12**, 161-169.
- Nguyen Q., Tucker M.P., Keller F.A., Beaty D.A., Connors K.M., Eddy F.P. (1999). Dilute acid hydrolysis of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77-79**, 133-142.
- Nigam J.N. (2001). Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J. Biotechnol.* **87**, 17-27.
- Nishikawa N.K., Sutcliffe R., Saddler J.N. (1988). The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 549-552.
- Oh D.K., Kim S.Y. (1998). Increase of xylitol yield by feeding xylose and glucose in *Candida tropicalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 419-425.
- Oliva J.M., Sáez F., Ballesteros I., González A., Negro M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M. (2002). Effect of inhibitory compounds from steam explosion of poplar biomass on thermotolerant strain *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. En: *12th European Biomass Conference*. Palz W., Spitzer J., Maniatis K., Kwant K., Helm P., Grassi A. (Eds.), ETA-Florence, p. 512-515.
- Olsson L., Hahn-Hägerdal B., Zacchi G. (1995). Kinetics of ethanol production by recombinant *Escherichia coli* KO11. *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 356-365.
- Overend R.P., Chornet E. (1987). Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A Math. Phys. Eng. Sci.* **321**, 523-536.
- Palmqvist E., Hahn Hägerdal B., Szengyel Z., Zacchi G., Reczey K. (1997). Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 286-293.
- Palmqvist E., Grage H., Meinander N.Q. (1999). Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and *p*-hidroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 46-55.
- Palmqvist E., Hahn Hägerdal B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.* **74**, 17-24.

- Palnitkar S., Lachke A.(1992). Effect of nitrogen sources on oxidoreductive enzymes and ethanol production during D xylose fermentation by *Candida shehatae*. *Can. J. Microbiol.* **38**, 258-260.
- Panchal C.J., Bast L., Russell I., Stewart G.G. (1988). Represion of xylose utilization by glucose in xylose-fermenting yeasts. *Can. J. Microbiol.* **34**, 1316-1320.
- Parajó J.C., Vázquez D., Alonso J.L., Santos V., Domínguez H. (1993). Prehydrolysis of *Eucalyptus* wood with dilute sulphuric acid: operation at atmospheric pressure. *Holz als Roh-und Werkst.* **51**, 357-363.
- Parajó J.C., Vázquez D., Alonso J.L., Santos V., Domínguez H. (1994). Prehydrolysis of *Eucalyptus* wood with dilute sulphuric acid: operation in autoclave. *Holz als Roh-und Werkst.* **52**, 102-108.
- Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1996a). Xylitol from wood: study of some operational strategies. *Food Chem.* **57**, 531-535.
- Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1996b). Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: effect of the initial cell concentration. *Biotechnol. Lett.* **18**, 593-598.
- Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M.(1996c). Study of charcoal adsorption for improving the production of xylitol from wood hydrolysates. *Bioprocess Eng.* **16**, 39-43.
- Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1998a). Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresour. Technol.* **65**, 191-201.
- Parajó J.C., Domínguez H., Domínguez J.M. (1998b). Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresour. Technol.* **65**, 203-212.
- Parajó J.C., Domínguez H. y Domínguez J.M. (1998c). Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresour. Technol.* **66**, 25-40.
- Parekh S.R., Yu S., Wayman M. (1986). Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysates for increased ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 300-304.
- Park S.C., Kademi A. y Baratti J.C. (1993). Alcoholic fermentation of cellulose hydrolysate by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **15**, 1179-1184.
- Perego P., Converti A., Palazzi E., Del Borghi M., Ferraiolo G. (1990). Fermentation of hardwood hemicellulose hydrolysate by *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *J. Ind. Microb.* **6**, 157-164.
- Philippidis G.P., Smith T.K., Wyman C.E. (1993). Study of enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 846-853.

- Philippidis G.P., Hatzis C. (1997). Biochemical engineering analysis of critical process factors in the biomass-to-ethanol technology. *Biotechnol. Prog.* **13**, 222-231.
- Preziosi-Belloy L., Nollet V., Navarro J.M. (1997). Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 124-129.
- Preziosi Belloy L., Nollet V., Navarro J.M. (2000). Xylitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.* **22**, 239-243.
- Quintero R.R. (1981). Ingeniería Bioquímica. Ed. Alambra, México.
- Ranatunga T., Jervis J., Helm R.F., McMillan J.D., Wooley R.J. (2000). The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 240-247.
- Ranganathan S., Macdonald D.G., Bakhshi N.N. (1985). Kinetic studies of wheat straw hydrolysis using sulphuric acid. *Can. J. Chem. Eng.* **63**, 840-844.
- Riera F.A., Álvarez R., Coca J. (1988). Aprovechamiento integral de residuos agrícolas. *Ing. Quím.* **20** (228), 135-144.
- Roberto I.C., Felipe M.G.A., Lacis L.S., Silva S. (1991). Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. *Bioresour. Technol.* **36**, 271-275.
- Roberto I.C., de Mancilha I.M., de Souza C.A., Felipe M.G.A., Sato S., de Castro H.F. (1994). Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.* **16**, 1211-1216.
- Roberto I.C., Felipe M.G.A., de Mancilha I.M., Vitolo M., Sato S., da Silva S.S. (1995a). Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. *Bioresour. Technol.* **51**, 255-257.
- Roberto I.C., Sato S., de Mancilha I.M., Taqueda M.E.S. (1995b). Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. *Biotechnol. Lett.* **17**, 1223-1228.
- Rodrigues A., Morais M., Madeira A. (1992). Effects of acetic acid on the temperature range of ethanol tolerance in *Candida shehatae* growing on D xylose. *Biotechnol. Lett.* **14**, 1181-1186.
- Rodrigues D.C.G.A., Silva S.S., Felipe M.G.A. (1998). Using response surface methodology to evaluate xylitol production by *Candida guilliermondii* by fed batch process with exponential feeding rate. *J. Biotechnol.* **62**, 73-77.
- Rodríguez J.J., García F., Cordero T. (1990). Posibilidades de aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos. *Ing. Quím.* **22** (254), 191-197.
- Roebuck K., Brundin A., Johns M. (1995). Response surface optimization of temperature and pH for the growth of *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 75-78.

- Rolla G., Scheie A.A., Assev S. (1987). Plaque formation and plaque inhibition. *Deutsch Zahnärztl Zeitung* **42**, 39-41.
- Romero M.I. (2003). Hidrólisis ácida y enzimática de residuo de poda de olivo. Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus*. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.
- Rubio M., Tortosa J.F., Quesada J., Gómez D. (1998). Fractionation of lignocellulosics. Solubilization of corn stalks hemicelluloses by autohydrolysis in aqueous medium. *Biomass Bioenerg.* **15**, 483-491.
- Saeman J.F. (1945). Hydrolysis of cellulose and decomposition of sugars in dilute acid at high temperature. *Ind. Eng. Chem.* **37**, 43-52.
- Saha B.C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 279 -291.
- Sánchez B., Bautista J. (1988). Effects of furfural and 5 hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guillierimondii*. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 315-318.
- Sánchez P. (1990). Procédé de production de sirop de xylose par hydrolyse acide de sorgho. Tesis Doctoral. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Sánchez S., Moya M., Castro E., Moya A.J., Romero M.I., Bravo V., Camacho F. (1996). Acid hydrolysis of the waste from pruning of the olive tree. En: *Biomass for Energy and the Environment*. Chartier P., Ferrero G.L., Henius U.M., Hultberg S., Sachau J., Wiinblad M. (Eds.), Elsevier Science, Oxford, Vol. 3, p. 1555.
- Sánchez S., Bravo V., Castro E., Moya A., Camacho F. (2002). The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**, 641-648.
- Sawada T., Nakamura Y., Kobayashi F. (1995). Effects of fungal pretreatment and steam explosion pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass. *Biotechnol. Bioeng.* **48**, 719-724.
- Schneider H., Wang P.Y., Chan Y.K., Maleszka R. (1981). Conversion of D-xylose into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.* **3**, 89-92.
- Sharma S.K., Kalra K.L., Grewal H.S. (2002a). Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks. *Biomass Bioenerg.* **23**, 237-243.
- Sharma S.K., Kalra K.L., Grewal H.S. (2002b). Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up. *Bioresour. Technol.* **85**, 31-33.
- Shimizu K., Sudo K., Ono H., Ishihara M., Fujii T., Hishiyama S. (1998). Integrated process for total utilization of wood components by steam-explosion pretreatment. *Biomass Bioenerg.* **14**, 195-203.

- Silva C.J.S.M., Roberto I.C. (1999). Statistical screening method for selection of important variables on xylitol biosynthesis from rice straw hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Biotechnol. Techniques* **13**, 743-747.
- Silva C.J.S.M., Roberto I.C. (2001). Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. *Process Biochem.* **36**, 1119-1124.
- Silva S.S., Felipe M.G.A., Silva J.B.A., Prata A.M.R. (1998). Acid hydrolysis of *Eucalyptus grandis* chips for microbial production of xylitol. *Process Biochem.* **33**, 63-67.
- Skoog K., Hahn-Hägerdal B. (1988). Xylose fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 66-80.
- Slininger P.J., Bothast R.J., van Cauwenberge J.E., Kurtzman C.P. (1982). Conversion of D xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 371-384.
- Slininger P.J., Bolen P.L., Kurtzman C.P. (1987). *Pachysolen tannophilus*: properties and process considerations for ethanol production from D-xilose. *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 5-15.
- So K.S., Brown R.C. (1999). Economic analysis of selected lignocellulose-to-ethanol conversion technologies. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77-79**, 633-640.
- Soltes E.J. (1988). Of biomass, pyrolysis and liquids therefrom. En: *Pyrolysis oils from biomass*. Soltes E.J., Milne T.A. (Eds.), American Chemical Society Symposium Series 376, Washington, DC, p. 1-8.
- Sreenath H.K., Jeffries T.W. (2000). Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. *Bioresour. Technol.* **72**, 253-260.
- Stankovic L., Kovacovska R. (1991). Production of alditols from D-xylose by yeasts. *Folia Microbiol.* **36**, 542-548.
- Stanley G.A., Douglas N.G., Every E.J., Tzanatos T., Pamment N.B. (1993). Inhibition and stimulation of yeast growth by acetaldehyde. *Biotechnol. Lett.* **15**, 1199-1204.
- Stenberg K., Tengborg C., Galbe M., Zacchi G. (1998). Optimisation of steam pretreatment of SO₂-impregnated mixed softwoods for ethanol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **71**, 299-308.
- Suihko M.L., Enari T.M. (1981). The production of ethanol from D-glucose and D-xilose by different *Fusarium* strains. *Biotechnol. Lett.* **3**, 723-728.
- Suihko M.L. (1983). The fermentation of different carbon sources by *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol. Lett.* **5**, 721-724.
- Suihko M.L., Suomalainen I., Enari T.M. (1991). D-xylose catabolism in *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol. Lett.* **5**, 525-530.

- Sun Y., Cheng J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* **83**, 1-11.
- Taherzadeh M.J. (1999). Ethanol from lignocellulose: Physiological effects of inhibitors and fermentation strategies. Tesis Doctoral. Chalmers University of Technology. Göteborg.
- Téllez Luis S.J., Ramírez J.A., Vázquez M. (2002). Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum straw. *J. Food Eng.* **52**, 285-291.
- Thatipamala R., Rohani S., Hill G.A. (1992). Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 289-297.
- Thonart P., Gómez J., Foucart M., Paquot M. (1987). Bioconversion of xylose into xylitol by *Pachysolen tannophilus*. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* **52**, 1517-1528.
- Tran A.V., Chambers R.P. (1985). Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Biotechnol. Lett.* **7**, 841-846.
- Tran A.V., Chambers R.P. (1986). Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 439-444.
- Trinder P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* **6**, 24-27.
- Van den Bossche V. (1998). Fractionnement des tiges et capitules de tournesol. Hydrodistillation d'une huile essentielle odorante, extraction et modification chimique de pectines, et mise en forme d'agromatériaux biodégradables. Tesis Doctoral. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Van Es A.J.H., Van der Meer J.M. (1980). Methods of analysis for predicting the energy and protein value of feeds for farm animals. *Proc. 31st Annual Meeting EAAP*. Munich.
- Van Soest P.J. (1963). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. II. A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **46**, 829-835.
- Van Soest P.J. (1964). Symposium on nutrition pastures: New Chemical, procedures for evaluating forages. *J. Anim. Sci.* **23**, 838.
- Van Soest P.J., Wine R.H. (1967). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **50**, 50-55.
- Van Zyl C., Prior B.A., du Preez J.C. (1988). Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **17**, 357-369.

- Van Zyl C., Prior B.A., du Preez J.C. (1991). Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 82-86.
- Viikari L., Suihko M.L., Linko M. (1984). Enhancement of pentose fermentation by *Fusarium oxysporum*. *3rd European Congress in Biotechnology*, p. 425-429.
- Walther T., Hensirisak P., Abglevor F.A. (2001). The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. *Bioresour. Technol.* **76**, 213-220.
- Watson N.E., Prior B.A., Lategan P.M. (1984). Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol.* **6**, 451-456.
- Wayman M., Parekh S. (1985). Ethanol and sugar tolerance of *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.* **7**, 909-912.
- Wilson J.J., Deschatelets L., Nishikawa N.K. (1989). Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 592-596.
- Winkelhausen E., Kuzmanova S. (1998). Microbial conversion of D xylose to xylitol. *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 1-14.
- Woehrer W., Roehr M. (1981). Regulatory aspects of bakers-yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 567-581.
- Wood B.E., Aldrich H.C., Ingram L.O. (1997). Ultrasound stimulates ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper. *Biotechnol. Prog.* **13**, 232-237.
- Xu J., Taylor K.B. (1993). Characterization of ethanol production from xylose and xylitol by a cell free *Pachysolen tannophilus* system. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 231-235.
- Zacchi G., Skoog K., Hahn-Hägerdal B. (1988). Economic evaluation of enzymatic hydrolysis of phenol-pretreated wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* **32**, 460-466.
- Zayed G., Meyer O. (1996). The single-batch bioconversion of wheat straw to ethanol employing the fungus *Trichoderma viride* and the yeast *Pachysolen tannophylus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 551-555.